

---

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS, IMOBILIZAÇÃO E  
APLICAÇÃO DAS CELULASES, PRODUZIDAS E COMERCIAL, NA  
HIDRÓLISE DA CELULOSE**

Douglas Fernandes da Silva

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências do Campus  
de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Biológicas  
(Microbiologia Aplicada).

Março – 2012

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS, IMOBILIZAÇÃO E  
APLICAÇÃO DAS CELULASES, PRODUZIDAS E COMERCIAL, NA HIDRÓLISE  
DA CELULOSE**

**Douglas Fernandes da Silva**

**Orientador: Dr. Pedro de Oliva Neto**

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências do Campus  
de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Biológicas  
(Microbiologia Aplicada).

**Março – 2012  
Rio Claro – SP**

547.758 Silva, Douglas Fernandes da  
S586s        Seleção de microrganismos celulolíticos, imobilização e  
aplicação das celulasas produzidas e comercial, na hidrólise  
da celulose/ Douglas Fernandes da Silva. - Rio Claro : [s.n.],  
2012  
87 f. : il., figs., gráfs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Pedro de Oliva Neto

1. Enzimas. 2. Fermentação e produção de celulasas. 3.  
Materiais lignocelulósicos. 4. Fungos celulolíticos. 5.  
Imobilização. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

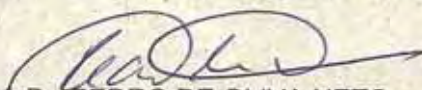
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

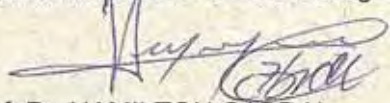
**TÍTULO:** Seleção de microrganismos celulolíticos, imobilização e aplicação das celulares, produzidas e comercial, na hidrólise da celulose

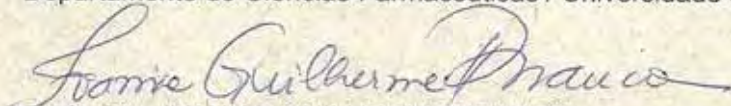
**AUTOR:** DOUGLAS FERNANDES DA SILVA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis

  
Prof. Dr. HAMILTON CABRAL  
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade de São Paulo

  
Profa. Dra. IVANISE GUILHERME BRANCO  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis

Data da realização: 26 de abril de 2012.

*"Os conceitos e princípios fundamentais da ciência são invenções livres do espírito humano."*

(Albert Einstein)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me acompanhado nesta jornada, me dado força e sabedoria na hora necessária.

Aos meus pais e irmã, por tudo o que já fizeram por mim, por estarem sempre ao meu lado e pela certeza de que sempre estarão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto, por sua paciência comigo durante todo esse tempo desde a graduação, por toda a experiência adquirida com ele e por todas as nossas discussões construtivas que tivemos.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho no laboratório, André Cesário, Bianca Bussamara e Daniele Patrocínio, sem o qual esse trabalho não existiria.

A Dra. Valéria Marta Gomes de Lima, pelas valiosas orientações teóricas e práticas acerca do meu trabalho.

A Dra. Ana Flávia Carvalho que me auxiliou em diversos pontos do meu trabalho, tanto teórico como prático.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Industrial da Unesp de Assis pelo apoio técnico e pelo companheirismo.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, por ter me acolhido e fornecido todo o suporte necessário para a fase experimental da minha pesquisa científica.

A Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelo suporte financeiro.

A todos que, de uma forma ou de outra participaram da elaboração desse trabalho e que porventura eu tenha esquecido de citar aqui, minhas desculpas e meus mais sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

|                                                                               | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO .....                                                                  | 9      |
| ABSTRACT .....                                                                | 10     |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                           | 11     |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                | 14     |
| 2.1. Petróleo: Combustível fóssil e fonte de energia .....                    | 14     |
| 2.2. Biomassa: Fonte de bioenergia (energias renováveis) .....                | 16     |
| 2.3. Bagaço de cana-de-açúcar: Fonte de biomassa lignocelulolítica .....      | 19     |
| 2.4. Enzimas: Catalisadores biológicos .....                                  | 21     |
| 2.5. Enzimas celulolíticas .....                                              | 21     |
| 2.6. Imobilização de enzimas: Tecnologia para processos biotecnológicos ..... | 25     |
| 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....                                            | 28     |
| 3.1. Justificativa .....                                                      | 28     |
| 3.2. Objetivo geral .....                                                     | 28     |
| 3.2.1. Objetivos específicos .....                                            | 29     |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                  | 29     |
| 4.1. Materiais .....                                                          | 29     |
| 4.1.1. Microrganismos .....                                                   | 29     |
| 4.1.2. Suportes utilizados na imobilização enzimática .....                   | 30     |
| 4.1.3. Celulase (E.C.3.2.1.4) .....                                           | 30     |
| 4.1.4. Reagentes e Substratos .....                                           | 30     |
| 4.1.5. Equipamentos .....                                                     | 30     |
| 4.2. Metodologias .....                                                       | 31     |
| 4.2.1. Cultivo, Preservação e Inoculação dos microrganismos .....             | 31     |
| 4.2.2. Produção do extrato enzimático .....                                   | 31     |

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.3. Teste de adsorção da enzima comercial em zeólita, resina de troca iônica e poliestireno .....    | 32 |
| 4.2.4. Imobilização do extrato fúngico produzido e/ou enzima comercial .....                            | 32 |
| 4.2.4.1. Imobilização do extrato fúngico .....                                                          | 33 |
| 4.2.4.2. Imobilização da celulase comercial .....                                                       | 33 |
| 4.2.4.3. Protocolos de imobilização adicionando diretamente o biocatalizador .....                      | 34 |
| 4.2.4.3.1. Protocolos <i>A</i> e <i>A'</i> : Peletes de Alginato de Cálcio .....                        | 34 |
| 4.2.4.3.2. Protocolos <i>B</i> e <i>B'</i> : Peletes de Quitosana + Alginato de Cálcio .....            | 34 |
| 4.2.4.3.3. Protocolos <i>C</i> e <i>C'</i> : Biofilme de Alginato de Cálcio .....                       | 35 |
| 4.2.4.3.4. Protocolos <i>D</i> e <i>D'</i> : Biofilme de Quitosana + Alginato de Cálcio .....           | 35 |
| 4.2.4.3.5. Protocolos <i>E</i> e <i>E'</i> : Biofilme de Alginato de Cálcio com Agente adsorvente ..... | 35 |
| 4.2.4.4. Protocolos de imobilização com posterior tratamento enzimático, para enzima comercial .....    | 36 |
| 4.2.5. Determinação da Atividade celulolítica (FPase) .....                                             | 36 |
| 4.2.6. Determinação da Atividade da Endoglucanase (CMCase) .....                                        | 37 |
| 4.2.7. Determinação da concentração de proteína .....                                                   | 38 |
| 4.2.8. Cálculo dos parâmetros de imobilização .....                                                     | 38 |
| 4.2.8.1. Cálculo do rendimento de proteína imobilizada .....                                            | 38 |
| 4.2.8.2. Cálculo do rendimento de imobilização .....                                                    | 38 |
| 4.2.8.3. Cálculo da atividade recuperada .....                                                          | 39 |
| 4.2.8.4. Cálculo de atividade perdida .....                                                             | 39 |
| 4.2.9. Tratamento Estatístico .....                                                                     | 40 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                         | 40 |
| 5.1. Obtenção dos Extratos Enzimáticos .....                                                            | 40 |



|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.1. Triagem dos fungos mais promissores para produção do extrato celulolítico .....                                                      | 40 |
| 5.1.2. Obtenção dos Extratos Enzimáticos dos fungos mais promissores .....                                                                  | 44 |
| 5.2. Caracterização da enzima comercial livre estudada: ROHAMENT® CL-ABEnzyme .....                                                         | 52 |
| 5.3. Imobilização enzimática .....                                                                                                          | 54 |
| 5.3.1. Imobilização da celulase comercial (1endo-1,4-β-glucanase) em peletes .....                                                          | 54 |
| 5.3.2. Testes preliminares de adsorção da enzima comercial (1endo-1,4-β-glucanase) em zeólita e resina de troca iônica e poliestireno ..... | 61 |
| 5.3.3. Imobilização da celulase comercial (1endo-1,4-β-glucanase) em biofilmes .....                                                        | 63 |
| 5.3.4. Imobilização do extrato celulolítico produzido em biofilmes .....                                                                    | 70 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                                                                                         | 72 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                         | 73 |

## Resumo

Atualmente, as celulasas são enzimas bastante estudadas para a hidrólise de resíduos ligno-celulósicos para obtenção de açúcares fermentescíveis utilizáveis em diferentes processos biotecnológicos. Um destes resíduos é o bagaço de cana proveniente da indústria sucroalcooleira, que pode ser uma alternativa para produção de bioetanol, desde que haja tecnologia eficaz e econômica para a conversão em açúcar (glicose ou xilose). O objetivo deste trabalho foi encontrar fungos celulolíticos produtores de enzimas que sejam eficientes nos processos de degradação da biomassa lignocelulósica. No presente trabalho foram selecionados 12 fungos celulolíticos previamente isolados pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial (UENSP – Assis). Estes fungos foram cultivados em bagaço de cana-de-açúcar como substrato e para seus extratos foram testados suas atividades para celulasas (FPase) e endoglucanase (CMCase) e comparados com o *T.reesei* CCT 2768. Os fungos mais eficientes foram às linhagens: M51, FS09, MG10A e FS11A. Destes, se destacaram respectivamente para atividade FPase e CMCase, os fungos FS09 com 0,054 FPU/mL ou 1,79 FPU/g de substrato e 0,874 U/mL ou 29,1 U/g de substrato; seguido pela M51 com 0,049 FPU/mL ou 1,62 FPU/g de substrato e 1,094 U/mL ou 36,46 U/g de substrato, valores vezes superior em relação ao fungo *T. reesei* CCT 2768, espécie considerada uma dos principais microrganismos de referência em estudos para a produção de celulasas. A imobilização da celulase comercial em microesferas de alginato e de hidrogéis (alginato/quitosana) mostraram resultados promissores para os protocolos com adição da enzima durante o processo de formação dos derivados, tanto os peletes como os biofilmes, sendo os melhores derivados, o pelete B e o biofilme E'. Com estes protocolos de imobilização houve um incremento de 56% (derivado B) e 44,05% (biofilme E'), através da soma dos reciclos, de 13 e 28, respectivamente, em relação à enzima gasta no processo de imobilização. Espera-se que estes resultados possam contribuir para avanços no desenvolvimento de bioprocessos para aproveitamento de resíduos lignocelulósicos por via enzimática, tanto pela descoberta de novas linhagens celulolíticas como pela possibilidade de imobilizar as celulasas e aplicação no resíduos de celulose para produzir açúcares fermentescíveis.

**Palavras-chave:** materiais lignocelulósicos, fungos celulolíticos, celulasas, imobilização.

## Abstract

Nowadays the cellulases are widely studied for the hydrolysis of ligno-cellulosic residues to obtain fermentable and economic sugars for several biotechnological applications. Cane bagasse is the most important residue from sugar factory, which could be an alternative of substrate to produce bioethanol or other biotechnological production, but it depending on the economical technology for the conversion in simple sugar (glucose or xylose). In the present study was selected 12 cellulolytic fungi, previous isolated by the Laboratory of Industrial Biotechnology (UNESP – Assis). These fungi were cultivated in cane bagasse as substrate and their extracts was tested as FPU and Endoglucanase (CMCase) activity and compared with *T. reesei* CCT 2768. The most efficient fungi were the not yet identified strains: M51, FS09, MG10A e FS11A. Respectively for FPase and CMCase activity, the strain FS09 shows 0.054 FPU/mL or 1.79 FPU/g of substrate, and 0.874 U/ml or 29.1 U/g of substrate, followed by M51 with 0.049 FPU/mL or 1.62 FPU/g of substrate, and 1.094 U/mL or 36.46 U/g of substrate. These results were higher than *T. reesei* CCT 2768, considered as a important microorganism for the studies of the production of cellulose. Immobilization of commercial cellulase in microspheres of alginate and hydrogels (alginate/chitosan) was procedure and it showed promising results for the protocols of the enzyme with added during the formation of derivatives (immobilized enzymes). The best immobilization of cellulase was obtained with the pellets and biofilms produced by the protocols *B* and *E'*, respectively. These protocols were responsible for the increase in cellulolytic activity of 56% (protocol *B*) and 44% (protocol *E'*) when compared with the enzyme used in the immobilization process due to the 13 and 28 recycles of the enzyme. It is hoped that these results will contribute to advances in the development of bioprocesses for the use of ligno-cellulosic residues by enzymatic method, by new cellulolytic strains and the possibility of immobilization of cellulases and make this product more economic by its recycle and application on cellulose residues to produce fermentable glucose.

**Keywords:** lignocellulosic material, cellulolytic fungi, cellulase, immobilization, alginate, chitosan.

## 1. Introdução

A necessidade de suprimento de energia para a manutenção de toda a estrutura e dinâmica operacional da sociedade representa um ponto crucial nas mais diversas áreas, como no próprio bem-estar individual até nos bioprocessos industriais e de prestações de serviços. Nesta conjunção, os combustíveis fósseis, como o petróleo, atualmente, são a base para a manutenção energética e econômica da sociedade. O aumento do seu uso como fonte de energia acarretou, ao longo dos anos, transformações tanto econômicas, como sociais e ambientais. Desta forma, a sua escassez pelo uso prolongado ao longo dos anos, acarreta um aumento do valor destas fontes não renováveis de energia. Estimativas pessimistas afirmam que em torno de 40 anos, estes combustíveis, irão se esgotar (ODAC, 2011).

Assim sendo, a crescente demanda por energia no mundo, que acelera o esgotamento das reservas petrolíferas mundiais, principal fonte de energia na Terra, tem como consequência o aumento no preço dos combustíveis fósseis, particularmente o petróleo. Desta forma, antes de se atingir exaustão das suas reservas, o uso do petróleo se verá inviabilizado devido ao seu alto custo. Com isso, e somado ao risco de colapso ambiental, a natureza vem sendo transformada em uma velocidade muito maior com que consegue se recompor, torna-se necessária a busca de fontes alternativas e renováveis de energia, as chamadas energias limpas. Nesse cenário, o uso do bioetanol produzido por fermentação de matérias-primas renováveis aparece como uma atraente fonte substitutiva aos combustíveis fósseis (SCHUCHARDT, 2001; GIORDANO, 2004) e com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental (PEREIRA Jr. et al., 2008).

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) do mundo, tendo processado cerca de 569 milhões de toneladas na safra 2008/2009 (UNICA, 2008). As usinas sucroalcooleiras são as principais consumidoras, utilizando a cana na produção de bioetanol, que tem como resíduo lignocelulósico o bagaço, totalizado em cerca de 100 milhões de toneladas em 2004 (CUNHA et al., 2005). De acordo com a Cenbio (2005), o processamento da cana produz cerca de 30% de bagaço com 50% de umidade. De 60 a 90% deste bagaço é utilizado pelas próprias usinas, em substituição a lenha e o óleo combustível, no processo de aquecimento das caldeiras e geração de energia elétrica, com uma produção média em torno de 30 kW/h/tonelada de cana moída (MAPA, 2010). Entretanto, o excedente, que pode variar de 10 a 30%, gera problemas ambientais e de estocagem como aponta a Fapesp (1998). Neste contexto, a possível utilização desta biomassa para a bioprodução se tornou vital para a economia do Brasil (PESSOA Jr et al., 1997). Sendo estes resíduos um

subproduto da indústria sucroalcooleira que se destacam como um dos materiais lignocelulósicos mais abundantes, e estão disponíveis para sua utilização biotecnológica, resultando em novos produtos (COELHO et al., 2001; CUNHA et al., 2005; RAMOS, 2003).

Celulose é um polissacarídeo constituído por cerca de quarenta cadeias glicosídicas unidas em um feixe compacto. Cada cadeia tem grau de polimerização em torno de 10000 unidades de glicose, unidas por ligações  $\beta 1 \rightarrow 4$ , não podendo ser usada pela maioria dos animais por faltar-lhes uma enzima que hidrolise estas ligações. Contudo, este material não se acumula devido à ação de fungos e bactérias os quais produzem enzimas celulolíticas (NELSON, 2006). As muitas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares presentes na estrutura da celulose tornam esse polímero muito recalcitrante à hidrólise. A hemicelulose mais comumente encontrada na parede celular de plantas terrestres é a xilana, composta de resíduos de ligações ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) D-xilopiranosídicas e que se apresentam na forma de heteropolissacarídeos, contendo diferentes grupos substituintes nas cadeias centrais e laterais, sendo os mais comuns os grupos acetil, arabionosil e glucoronosil (ADSUL et al., 2004).

Dentro do moderno conceito de “biorrefinaria” a separação seletiva de frações constituintes de uma dada biomassa permite a utilização de cada fração para geração de produtos de alto valor agregado. Dessa forma, a celulose, hemicelulose e lignina presentes nos resíduos lignocelulósicos poderão gerar, em um processo hidrolítico eficiente, glicose, pentoses, principalmente xilose, e fenilpropano, os quais poderão ser transformados em diferentes novos produtos (LASER et al., 2002; GARROTE et al., 2002; GIORDANO, 2004; PESSOA Jr. et al., 1997). A glicose liberada no final da hidrólise pode ser fermentada e usada para a produção de biocombustível, entretanto, o processo ainda é inviável e se encontra em fase experimental no Brasil. O principal objetivo é a busca por um processo químico/biológico eficiente para que esta tecnologia se torne viável (FICK, 2008).

Para uma utilização eficiente dos resíduos lignocelulósicos são necessários tratamentos prévios, ou pré-tratamentos, no qual vários vêm sendo estudados para separação dos componentes do bagaço da cana e/ou hidrólise dos polímeros, os quais podem ser utilizados individualmente ou de forma combinada, pois todos possuem aspectos positivos e negativos. O tratamento do bagaço pode ser físico-químico utilizando-se ácidos (hidrólise ácida), com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose, onde o principal ácido usado é o sulfúrico. Outra forma de tratamento pode ser com o uso de enzimas (hidrólise enzimática) produzidas por microorganismos que se alimentam desta matéria orgânica (BASTOS, 2007), sendo os fungos, os mais utilizados entre os microrganismos pelas indústrias na produção das enzimas (AGUIAR & MENEZES, 2000). Isso se deve ao fato de

que eles possuem um complexo enzimático extracelular que facilita a extração e pode hidrolisar celulose em condições suaves sem gerar subprodutos tóxicos e, conseqüentemente, sua utilização pela indústria biotecnológica (CLAEYSSSEN & TOMME, 1989).

As principais desvantagens da hidrólise ácida são seu alto custo (MULLINGS, 1985) e a liberação de produtos tóxicos no meio reacional como ácido acético, furfural e compostos fenólicos que são potentes inibidores de microrganismos. (GURGEL et al., 1998; PESSOA Jr., 1997; SASAKI et al., 2003). Por outro lado, a hidrólise enzimática é realizada por um complexo de enzimas, o que torna este processo pouco eficaz, de difícil acesso das enzimas à celulose, pois suas fibras encontram-se envoltas pela lignina e hemicelulose, atuando como barreiras naturais à decomposição, e por consequência diminuem a eficiência da hidrólise (SUN & CHENG, 2002). A conversão hidrolítica da celulose tem sido considerada como um dos principais pontos tecnológicos do processo de produção do bioetanol.

As enzimas do complexo celulolítico são capazes de hidrolisar a celulose, que é a matéria-prima mais abundante do planeta, principal fonte de carbono (ZHANG, 2006), sendo encontradas nas paredes celulares de vegetais. A conversão enzimática da celulose em glicose é uma tarefa árdua, devido à natureza física do substrato, sendo este composto por frações de celulose, hemicelulose e lignina (COELHO et al., 2001; PANDEY et al., 2000), a qual reduz a acessibilidade às enzimas celulolíticas (BÉGUIN, 1990).

São encontrados na literatura diversos microrganismos produtores do complexo celulolítico, com destaque para o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* como fonte de enzimas celulolíticas, sendo sua enzima a mais frequentemente usada em processos de sacarificação do material lignocelulósico (FUJII, 2010). Vários outros microrganismos podem ser utilizados como fonte dessas enzimas como, por exemplo, o *Aspergillus niger* (KIM, 2004). E para uma aplicação desta tecnologia enzimática em escala industrial é necessário torná-la economicamente viável, o que pode ser conseguido através de tecnologia de imobilização. Sendo que a imobilização e estabilização de celulasas e xilanases em suportes sólidos poderá auxiliar a superar a grande desvantagem da rota enzimática, possibilitando seu reaproveitamento catalítico e ganho em estabilidade (GAMA et al., 2002; GU et al., 2005; NABY-ABDEL et al., 1997; SHEN & XIA, 2004; TYAGI et al., 1995).

No atual contexto mundial mostra-se uma necessidade da aquisição de recursos práticos e viáveis economicamente para a obtenção de fontes de energias renováveis, e para o reaproveitamento dos resíduos lignocelulósicos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de processos para produção de enzimas do complexo celulolítico

por diferentes fungos, além do desenvolvimento e aperfeiçoamento da tecnologia de imobilização destas enzimas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Petróleo: Combustível fóssil e fonte de energia**

As reservas mundiais de petróleo, no ano de 2010, totalizam 1,38 trilhões de barris (ANP, 2011) (figura 2.1), e o consumo deste combustível fóssil está estimado em mais de 80 milhões de barris/dia (PADUA, 2005; ANP, 2011). Estimativas preocupantes afirmam que as reservas mundiais de petróleo se esgotarão por volta de 40 anos (ODAC, 2011), isso se não houver descobertas de novas reservas petrolíferas. Em comparação a 2009, o volume de petróleo produzido no mundo em 2010 aumentou 2,3%, passando de 80,3 para 82,1 milhões de barris/dia, enquanto o consumo mundial em 2010 foi de 3,2% superior a 2009, totalizando 87,4 milhões de barris/dia (ANP, 2011), mostrando que apesar de se elevar a produção mundial de petróleo, e assim reduzindo cada vez mais as reservas, o consumo aumenta em proporções alarmantes. Com isso, é de se prever que antes do esgotamento das reservas o preço do petróleo ficará tão elevado que a sua utilização como combustível não será mais aplicável na sociedade, denotando uma necessidade da obtenção de alternativas de recursos energéticos que permitam a substituição do petróleo (SCHUCHARDT, 2001; RAMOS, 2003; GIORDANO, 2004). Por outro lado, questões ambientais (poluição, mudanças climáticas, aquecimento global) e sociais reforçam a necessidade do uso de combustíveis produzidos de fontes renováveis, como da biomassa.



Figura 2.1: Reservas provadas de petróleo, segundo regiões geográficas (bilhões de barris) – 2010. (Fonte: ANP, 2011).

Estudos já apontam que, a utilização da biomassa para fins energéticos vem tendo uma participação crescente na matriz energética mundial, considerando que o crescimento da demanda por agroenergia ocorrerá principalmente em função da exigência da sociedade pela substituição de combustíveis fósseis, principalmente devido a questões ambientais, sendo assim é estimando que até o ano de 2050 deva dobrar o uso mundial de biomassa disponível (FISCHER, 2001). E como já havia sido reportado por Vásquez et al. (2007), novos estudos de processos biotecnológicos estão sendo feitos, para que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica. Possibilitando assim, uma alternativa viável para a obtenção de novas fontes de energia, e que poderá suprir toda a demanda da sociedade.

Pesquisas apontam o aumento da concentração dos gases de efeito estufa na atmosfera (dióxido de carbono - CO<sub>2</sub>) de 31% nos últimos 250 anos. Sendo que estes valores tendem a aumentar consideravelmente se as fontes emissoras não forem controladas, isso ocorre devido às atividades antrópicas, como a queima de combustíveis fósseis. Diversos esforços foram feitos neste sentido, como a criação do protocolo de Kyoto, no Japão em 1997, que estabelece o compromisso de diversos países de, a partir de 2005, reduzir a emissão dos gases que provocam o efeito estufa. Ou a Diretiva para Obtenção de Eletricidade de Fontes Renováveis do Parlamento Europeu, que se mostrou um instrumento indutor do uso da bioenergia.



## 2.2: Biomassa: Fonte de bioenergia (energias renováveis)

A possibilidade de utilização dos combustíveis renováveis tem despertado um interesse cada vez maior em todo o mundo. Este fato acontece, devido a impactos positivos do uso destas energias renováveis, em substituição aos fósseis, que não se limitam apenas nas questões econômicas, mas também nas ambientais, sendo assim uma alternativa limpa sem prejuízos econômicos. A utilização da bioenergia, além de reduzir a dependência do petróleo e os gastos com energia, resulta em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera, e desta forma diminui o impacto ambiental causado pela queima dos combustíveis fósseis. Esse apelo ambiental constitui um dos principais agentes para a substituição dos derivados de petróleo pelos chamados: biocombustíveis. Atualmente diversos centros de pesquisas buscam por substitutos para o petróleo, segundo previsões de Evans (1999), o consumo de petróleo irá aumentar significativamente até por volta de 2014, quando então o preço do barril deverá subir a níveis absurdos, que forçará a diminuição do consumo. Este fato está próximo de se tornar realidade, visto que, no ano de 2010 o preço do barril chegou a custar U\$ 79,39/barril, com uma elevação de quase 29% em relação a 2009 (ANP, 2011). Em princípio, os combustíveis fósseis, como o gás natural e o carvão mineral, podem ser utilizados e poderiam substituir o petróleo (CAMPBELL, 1998). Porém, eles não iriam resolver o principal problema relacionado ao uso do petróleo, que é o impacto ambiental pela eliminação de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e gases sulfurados durante sua queima, outro fator que poderia atrapalhar o uso desses combustíveis fósseis seria a sua difícil transformação em matéria-prima para a indústria. Desta forma os altos preços e improváveis substitutos tornam o bioetanol e o biodiesel, tanto economicamente atrativos e viáveis no setor energético, como uma energia mais limpa, apresentando um menor impacto ambiental. E sendo Brasil é um dos maiores produtores de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) do mundo, tendo desta forma, processado cerca de 569 milhões de toneladas na safra 2008/2009 (UNICA, 2008), e por consequência uma alta produção de biomassa, esta pode se tornar um excelente substituto para o petróleo como fonte de energia (SHUCHARDT et al., 2001).

Denomina-se biomassa qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. As principais fontes de biomassa provêm dos resíduos agrícolas, como restos de madeira, resíduos de serralherias e plantas, como a cana-de-açúcar e palha de cereais. Como já havia sido reportado por Vásquez et al. (2007), novos estudos estão sendo feitos no qual é baseado em desenvolver processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, como palha de milho e arroz, bagaço de

cana-de-açúcar e resíduos da indústria de celulose, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de segunda geração. Portanto materiais lignocelulósicos se tornam interessantes para a produção de energias renováveis, reduzindo assim a poluição, pois são formadas a partir de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , aproveitando a energia solar (CORTEZ, 1997). De acordo com Compet (1999), 1 tonelada de biomassa corresponde a aproximadamente 2,9 barris de petróleo (valor calorífico médio do petróleo = 10000 kcal/kg; biomassa base seca = 4000 kcal/kg), o Brasil precisaria atualmente de 1,8 a 2,6 milhões de barris/dia ( $90 \times 10^6$  toneladas de petróleo por ano), o que é aproximadamente 3% do total mundial (ANP, 2011). Isso poderia ser suprido por  $225 \times 10^6$  toneladas de biomassa por ano. Já em 1993, no mundo já eram produzidos cerca de  $100 \times 10^9$  toneladas de biomassa por ano (KUHAD, 1993), sendo que a produção no Brasil em 2007 foi de aproximadamente 400 milhões de toneladas de subprodutos agroflorestais, incluindo os resíduos gerados na indústria de celulose (PEREIRA Jr. et al., 2008), sendo assim, necessário apenas uma pequena porcentagem dessa biomassa produzida anualmente, para que no Brasil o petróleo fosse substituído, não exigindo devastação ou qualquer outra forma de agressão às florestas (CORTEZ, 1997). Os recursos renováveis apresentam cerca de 12,2% do suprimento total de energia no mundo, sendo 10% proveniente de biomassa e 2,2% de fonte hídrica (BEN, 2011). Segundo dados do Balanço Energético Nacional (edição 2011), a participação da energia renovável na matriz energética brasileira é de 45,4% (figura 2.2)- incluindo lenha e carvão vegetal (9,6%), bagaço de cana-de-açúcar (17,7%), energia hidráulica e eletricidade (14,2%) e outros (3,9%) (BEN, 2011).

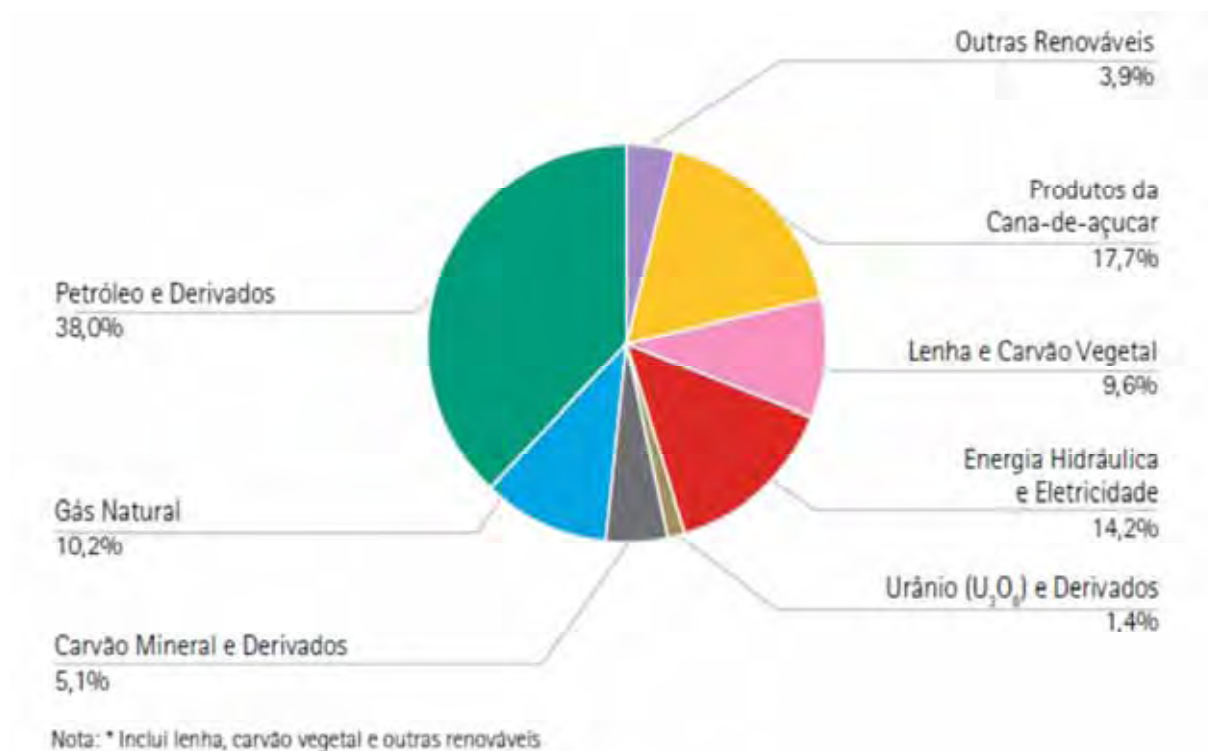


Figura 2.2: Oferta interna de Energia para o Brasil. (Fonte: BEN, 2011).

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 “biorrefinaria” 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; GARROTE et al., 2002), em que as frações devem ser separadas seletivamente de acordo com suas características e as do produto desejado. De acordo com Giordano (2004) o esquema geral de uma biorrefinaria ilustrada novas rotas e transformações, aplicações de novas tecnologias, 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 aperfeiçoar 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).

Entre as matérias-primas renováveis de grande interesse tecnológico, encontram-se os materiais lignocelulósicos, que são estruturas duras e fibrosas, principalmente sob a forma de

resíduos agroindustriais e florestais, constituído de três frações fundamentais. A fração mais abundante é a celulose, um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose. O grau de ordenação da celulose resulta numa alta cristalinidade, que se traduz na resistência ao ataque hidrolítico. Uma segunda fração, denominada hemicelulose, apresenta composição Heteropolissacarídica e é constituído por vários açúcares, como xilose e arabinose, contudo a proporção depende da origem do material. Por último encontram-se álcoois aromáticos polimerizados, constituindo a fração de lignina, que unida à hemicelulose envolve a matriz celulósica (SUN, 2002). A composição e a estrutura dessa biomassa lignocelulósica tem forte influência na natureza e nos rendimentos dos processos de hidrólise e fermentação. Sendo que a composição básica depende do vegetal de origem e, no caso de biomassas agroflorestais residuais, da região, idade e período de coleta do material. Na Tabela 2.1 pode ser visualizada a variação da composição química básica de algumas biomassas de composição lignocelulósica.

**Tabela 2.1.** Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos

| Material lignocelulósico   | Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Lignina (%) |
|----------------------------|--------------|------------------|-------------|
| Farelo de cevada           | 23,0         | 32,7             | 24,4        |
| Sabugo de milho            | 31,7         | 34,7             | 20,3        |
| Folhas de milho            | 37,6         | 34,5             | 12,6        |
| Bagaço de cana             | 46,2         | 26,4             | 25,2        |
| Palha de arroz             | 43,5         | 22,0             | 17,2        |
| Palha de trigo             | 33,8         | 31,8             | 20,1        |
| Palha de sorgo             | 34,0         | 44,0             | 20,0        |
| Casca de aveia             | 30,5         | 28,6             | 23,1        |
| <i>Eucalyptus grandis</i>  | 40,2         | 15,7             | 26,9        |
| <i>Eucalyptus globulus</i> | 46,3         | 17,1             | 22,9        |

Fonte: PANDEY et al., (2000); TAMANINI & HAULY (2004); MUSSATO & ROBERTO (2002); BOFO (2005).

### 2.3. Bagaço de cana-de-açúcar: Fonte de biomassa lignocelulolítica

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, chegando em 2008 a 649 milhões de toneladas, seguida pela Índia com apenas 348 milhões de toneladas (MAPA, 2011). Atualmente, o Brasil produz 25 bilhões de etanol por ano a partir da cana-de-açúcar,

no qual o plantio dessa matéria-prima, realizado em terras aráveis de boa qualidade, deverá ser expandido devido à crescente demanda nacional e internacional de álcool (MAPA, 2011). No entanto, para evitar a expansão desmedida das áreas de cultivo, têm se desenvolvido processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais. Dentre estas biomassas, os resíduos celulósicos provenientes da produção de pasta de celulose e separados na etapa de decantação constituem uma das fontes mais promissoras de carboidratos para a produção de bioetanol de segunda geração. Nas ultimas safras a produção superou facilmente 100 milhões de toneladas de subproduto, deste, entre 6% a 10% não tem uma destinação apropriada (MAPA, 2011). Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados em média 230kg de bagaço (SANTANA & SOUZA, 1984). A composição química do bagaço integral é em média de 46,2% de celulose, 26,4% de hemicelulose e 25,2% lignina (Tabela 2.1) (TAMANINI & HAULY, 2004; MUSSATO & ROBERTO, 2002; BOFO et al., 2005).

Uma das formas de utilização desse resíduo é cogeração de energia através da queima do bagaço em caldeira, sendo uma prática tradicional em todo o mundo. No Brasil para cada 1 tonelada de cana moída é produzida cerca de 30 kW/h de energia. A cogeração de energia através do bagaço nas indústrias sucroalcoleiras induz uma economia na produção do bioetanol, que por sua vez, aumenta a competitividade do álcool carburante nacionalmente e internacionalmente. Contudo existe um excedente em valores de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar que podem ser utilizados para produção de produtos de interesse como o biocombustível (bioetanol de segunda geração) e assim ajudar de forma limpa e economicamente favorável, a substituir a demanda energética da sociedade que atualmente é suprida pelos combustíveis fósseis.

A hidrólise dos polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos pode ser feita com diferentes tecnologias utilizadas individualmente ou combinadas: cozimento com vapor a alta pressão seguida de hidrogênio, dissolução da lignina a quente com solvente orgânico ou álcali, entre outros. Dependendo da severidade do processo utilizado o tratamento pode gerar grande quantidade de subprodutos tóxicos aos microrganismos que irão utilizar os açúcares produzidos. Por outro lado um complexo de enzimas, celulasas e xilanases, pode catalisar essa hidrólise em condições suaves de reação, sem geração de subprodutos.

## 2.4. Enzimas: Catalisadores biológicos

As enzimas são substâncias orgânicas de natureza, normalmente, protéica (com exceção de alguns grupos de moléculas de RNA), que tem funções de catalisadores biológicos que aumentam a velocidade de reações bioquímicas (GAMA, 2002). Para formar proteínas, os aminoácidos se ligam através das chamadas *ligações peptídicas*, ligação dos grupos amino de um aminoácido e carboxila de outro, com eliminação de uma molécula de água (NELSON, 2006). As propriedades funcionais das enzimas dependem essencialmente do número dos resíduos desses aminoácidos e sua atividade catalítica, da integridade conformacional da proteína ativa. Portanto, a atividade é perdida caso esta enzima sofra alterações em sua conformação estrutural. Para serem ativas, algumas não requerem nenhum outro grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos. Outras requerem componentes químicos denominados cofatores, que podem ser um ou mais íons tais como:  $Mg^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ou um grupamento orgânico chamado de coenzima. Algumas enzimas requerem ambos para exercer sua atividade. Uma enzima completa, ou seja, ativa, unida a sua coenzima e/ou grupo inorgânico é chamada de holoenzima, já a parte exclusivamente protéica é denominada apoenzima (NELSON, 2006).

Enzimas como catalisadores biológicos são extremamente eficientes, podendo acelerar em média de  $10^9$  até  $10^{12}$  vezes a velocidade de reação, esta velocidade é aumentada devido ao abaixamento da energia de ativação necessária para converter o substrato em produto. Essa velocidade é função da concentração de substrato e geralmente seguem cinética de Michaelis-Menten, onde a velocidade de reação é função hiperbólica da concentração de substrato (RADZICKA & WOLFENDEN, 1995).

## 2.5. Enzimas celulolíticas

As celulasas são compostas por um complexo enzimático, que agindo juntamente são capazes de hidrolisar a celulose, que é a matéria-prima mais abundante do planeta, principal fonte de carbono (ZHANG, 2006), sendo encontradas nas paredes celulares de vegetais. Do ponto de vista químico, a celulose é um polissacarídeo composto de unidades  $\beta$ -D-glicopiranosil, ligados por pontos  $\beta$ -(1,4), formando um polímero linear (RAMOS, 2003). A figura 2.3 apresenta a estrutura linear da celulose.

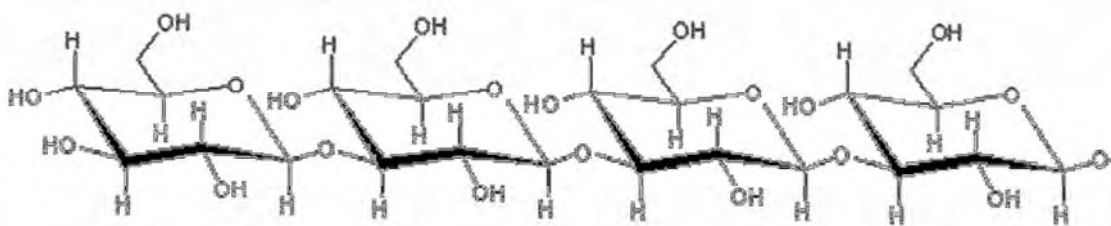


Figura 2.3: Cadeia linear polimérica da celulose.

Estas enzimas são classificadas como hidrolases e, segundo a nomenclatura enzimática (E.C. 3.2.1), hidrolases O-glicosídicas são baseadas em sua especificidade ao substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. De acordo com a nomenclatura, o número 3 refere-se à hidrolases; 3.2 glicosilases e 3.2.1 glicosidases, isto é, uma enzima que hidrolisa compostos O-glicosil ou S-glicosil. Atualmente as hidrolases glicosídicas são agrupadas em 87 famílias (WULFF, 2002). A conversão enzimática da celulose em glicose é uma tarefa árdua, devido à natureza física do substrato, que é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, chamadas de microfibrilas, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Essas fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina (COELHO et al., 2001; PANDEY et al., 2000), a qual reduz a acessibilidade às enzimas celulolíticas (BÉGUIN, 1990). As celulasas produzidas por fungos possuem três componentes principais:

- I) As **endoglucanases** que hidrolisam aleatoriamente as ligações  $\beta 1 \rightarrow 4$  D-glicosídicas internas;
- II) As **celobiohidrolases** (exocelulasas) que produzirão celobiose das extremidades não redutoras a partir de celulose e;
- III) As  **$\beta$ -glicosidases** (celobiasas) que converterão celobiose em glicose. Para uma efetiva hidrólise da celulose é necessário um consórcio destas enzimas, que são descritas na literatura como tendo uma ação sinérgica entre elas (MONTI, 1989; NIDTZKY et al., 1994; TANNER, 2002; WULFF, 2002; DASHTBAN et al., 2010).

As endoglucanases e as celobiohidrolases degradam celodextrinas solúveis e celulose amorfa, enquanto somente as celobiohidrolases, com notáveis exceções, degradam a celulose cristalina eficientemente (WULFF, 2002). Na figura 2.4 é apresentado o mecanismo de degradação da celulose e se pode verificar o sinergismo das enzimas. A endocelulase quebra aleatoriamente a cadeia polimérica, posteriormente a exocelulase quebra o final dessa cadeia

em um dímero de glicose, chamado de celobiose. Por ultimo, as celobiasas convertem a celobiose em glicose (WULFF, 2002).

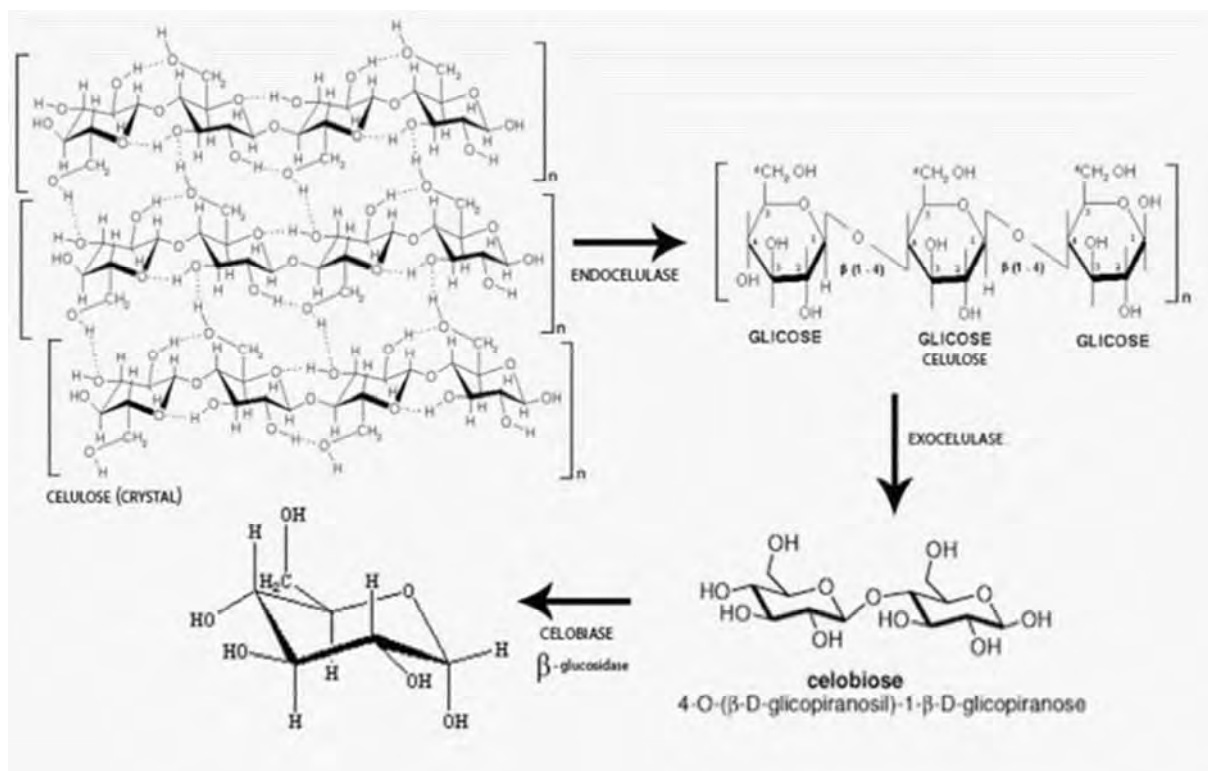


Figura 2.4: Mecanismo de degradação da celulose e o sinergismo do complexo enzimático.

Na literatura vários microrganismos são reportados como produtores de celulases, e um dos trabalhos de seleção mais conveniente para a produção de celulases extracelulares foi desenvolvido pelo grupo de Natick da U.S. Army Research and Development Command em Natick, laboratório norte americano que se interessou nos estudos desse complexo enzimático e dos microrganismos produtores (MONTI, 1989). Esse grupo destacou como o principal microrganismo promissor para produção de celulase o fungo filamentoso *Trichoderma viride* (MONTI, 1989; AGBHEVOR, 2004). Os estudos se basearam em comparações com diversas espécies produtoras na qual o grupo de Natick possuía um acervo de mais de 14.000 cepas de microrganismos isolados de materiais celulolíticos em decomposição e relataram ao final do estudo que a celulase não era uma entidade simples, mais um complexo de enzimas.

O *Trichoderma reesei* se destaca entre os fungos celulolíticos, sendo sua enzima a mais frequentemente usada em processos de sacarificação do material lignocelulósico (FUJII, 2010). RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO (2004) obtiveram resultados melhores resultados de CMCase de 1,64U *T. harziannum* (V), cultivadas em meio de farelo de trigo, sendo que para FPase o melhor resultado 0,021 FPU/mL para o *Penicillium simplicissimum* (V). Wen et



al., (2004) utilizaram *Trichoderma reesei* para produção de celulase. O estudo teve interesse na degradação da forragem pela indústria leiteira através da digestão anaeróbica para conversão de produtos bioenergéticos. Alguns trabalhos apresentam como produtores de celulases o *Aspergillus niger*, Kim et al., (2004) trabalhando com esse microrganismo, pesquisaram a produção de celulases e hemicelulases em fermentações em estado sólido como substratos de palha de arroz e farelo de trigo. Recentemente Lobello (2009), isolou 164 fungos da Mata Atlântica e de bagaço de cana e encontrou cerca de 10 linhagens fúngicas que apresentaram excelentes atividades celulolíticas. Trabalhando com uma linhagem mutante do *Trichoderma reesei* RUT C-30 e usando como fonte de carbono o pó de palha de arroz sem pré-tratamento, obtiveram uma atividade enzimática de 0,71FPU/mL Sun et al.(2008). Basso et al., (2010) como melhor resultado e trabalhando com *Trichoderma reesei* QM9414 cultivado em bagaço de cana a 28°C, conseguiram em 15 dias de cultivo, 0,5 U/mL para CMCase, e 0,2 de FPU/mL para FPase. Delabona et al., (2012) conseguiram uma atividade de FPase de 0,85 FPU/mL em 72 horas de fermentação submersa, utilizando como microrganismo o *T.harzianum* P49P11 e como substrato bagaço de cana-de-açúcar mais sacarose, e quando estes autores trabalharam em biorreator (1,5L) e bagaço tratado com NaOH, em pH 6,0, a FPase subiu para 0,95 FPU/mL, para o mesmo microrganismo.

Há várias aplicações das celulases em processos biotecnológicos na qual em sua grande maioria são utilizados fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* para degradação de materiais lignocelulolíticos e produção de enzima livre para comercialização (WEN et al., 2004; KIM et al., 2004). As indústrias de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, medicina, química fina, agroindústria e de alimentação animal e silagem vem aplicando essa tecnologia enzimática para redução de custos operacionais, aumento da qualidade e buscando processos mais limpos diminuindo assim os impactos ambientais. A produção de bioetanol de segunda geração utilizando biomassa lignocelulolítica atrai as atenções de inúmeros centros de pesquisas, que buscam uma fonte de energia alternativa (AGBHEVOR, 2004; VÁSQUEZ et al., 2007). Tal processo consiste em hidrolisar a biomassa lignocelulolítica reduzindo-a principalmente em glicose e xilose, e por sua vez, serem fermentadas por microrganismos facultativos, como a *Saccharmyces cerevisiae*, sendo então convertidos em bioetanol (AGBHEVOR, 2004; KIM, 2004; VÁSQUEZ et al., 2007).

## 2.6. Imobilização de enzimas: Tecnologia para processos biotecnológicos

O elevado custo das enzimas torna difícil viabilizar-se economicamente a utilização destas na forma livre em bioprocessos industriais. Diversos estudos com lignocelulósicos mostram que a hidrólise enzimática vem se inviabilizando pelos altos custos com as enzimas celulasas e xilanases, um complexo de endo e exoenzimas envolvidas na degradação de celulose e xilanas. Estes estudos indicam que até 60% do custo operacional do processo enzimático corresponde à reposição do complexo enzimático de celulasas, e muito esforço vem sendo investido na obtenção de enzimas mais baratas. Além disso, um dos principais problemas na hidrólise enzimática reside na necessidade de alta estabilidade térmica das enzimas para se trabalhar com altas temperaturas e assim atingir altas velocidades de reação e solubilidade dos reagentes (PHILIPPIDIS & HATZIS, 1997). Desta forma, para uma aplicação em escala industrial é necessário torná-la economicamente viável, o que pode ser conseguido através de sua imobilização.

A imobilização e estabilização de celulasas e xilanases poderá auxiliar a superar a grande desvantagem da rota enzimática, pois permite fácil recuperação da enzima e aumenta sua vida operacional, reduzindo, portanto, os custos, tornando mais viável sua utilização (GAMA et al., 2002; GU *et al.*, 2005; NABY-ABDEL et al., 1997; SHEN & XIA, 2004; TYAGI et al., 1995). A insolubilização das enzimas é tema que vem sendo estudado há vários anos. Messing, (1975), por exemplo, já enumerava diversas técnicas de imobilização até então desenvolvidas tais como, confinamento, adsorção, encapsulação, intercruzamento, união covalente, copolimerização. Essas eram soluções para a recuperação das enzimas e sua posterior reutilização. Contudo, se mantinha o problema de baixa resistência à desativação, o que requeria um processo de estabilização adicional do derivado enzimático (enzima ligada a suporte insolúvel), etapa chave para estender sua aplicação industrial.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos permite, além da reutilização de sua atividade catalítica, um melhor controle das reações e o projeto de biorreatores que podem ser facilmente incorporados numa linha de processo contínua (WHITAKER, 1990). A união da enzima ao suporte pode realizar-se através de seus grupos carboxílicos ou de aminos, sendo estes últimos os mais adequados pela sua reatividade, abundância e presença majoritária na superfície enzimática (GUISÁN, 1988). Aumentos maiores que 200 vezes na meia-vida da enzima imobilizada em relação à enzima solúvel podem ser obtidos (TARDIOLI et al., 2003 a, b). Assim, hidrólise do bagaço usando enzima imobilizada poderá atingir conversões superiores às obtidas com igual concentração inicial de enzima livre, pois quando a enzima

livre se desativa com o tempo a imobilizada continuará catalisando a reação de hidrólise, por ser mais estável e fácil reutilização.

A imobilização enzimática em suportes apropriados se constitui em área de interesse enquanto pode significar a melhoria de processos e barateamento de custos. O suporte ideal deve adsorver a enzima, sem afetar sua atividade e sem interferir na reação enzimática (COMERLATO, 1995). A literatura reporta inúmeros suportes para imobilização de enzimas. A quitosana é um biopolímero obtido através da desacetilação da quitina, em que a maioria dos grupamentos acetil da quitina são removidos, normalmente por tratamento com bases fortes (CANELLA E GARCIA, 2001; KHAN et al., 2000; MAO et al., 2003; WANG et al., 2001; WANG et al., 2002), possuindo dois grupos funcionais reativos, amino e hidroxila, sendo utilizados como sítios de reação e coordenação. Esse polissacarídeo é formado por uma sequência linear de açúcares monoméricos do tipo  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina). O emprego de quitosana como suporte em imobilizações torna-se uma opção atrativa, por apresentar uma maior afinidade por proteínas que sua precursora, além de apresentar um maior número de grupos aminas livres reativos em sua molécula (HIRANO, 1996; MONTEIRO-JUNIOR, 1999). No entanto, a maior quantidade de grupos aminas livres reativos e, sobretudo, o menor teor de grupos N-acetil (<40%), também confere maior solubilidade à quitosana em soluções com pH abaixo de 6,5 (KNORR, 1983; ANTHONSEN et al., 1993). Essa propriedade não é desejável, uma vez que o meio para ação de diversas enzimas, durante um processo industrial, possui pHs baixos e a insolubilidade do suporte é uma condição imprescindível para o sucesso da aplicação da enzima imobilizada. Nesse caso, existe a possibilidade de se realizar um tratamento da quitosana com tripolifosfato de sódio ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) ou glutaraldeído para promover a formação de ligações intercruzadas entre as moléculas e, conseqüentemente, a redução da solubilização em meios ácidos (COCHRANE et al., 1996; OSWALD et al., 1998; KRAJEWSKA, 2004). Sendo assim uma das mais interessantes características da quitosana é sua versatilidade para modificações químicas. A presença de grupos amino propicia inúmeras modificações químicas da superfície do polímero.

Outro suporte muito utilizado em imobilização e tecnologias de microencapsulação é o alginato (FUNDUENANU et al., 1999; VELTEN et al., 1999). Este polímero consiste em um polissacarídeo natural extraído de algas, que são compostos por cadeias alternadas de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico e resíduos de ácidos de  $\beta$ -D-manurônico (SRIAMORNSAK, 1998). Suportes de alginato normalmente são feitos por entrecruzamento do grupo carboxil do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico com uma solução catiônica geleificante como cloreto de cálcio, cloreto de bário

(DRAGET et al., 1997; SMIDSROD et al., 1990). Na imobilização utilizando alginato, este pode ser ou não misturado com a solução contendo o biocatalizador, tudo dependendo do protocolo de imobilização, sendo, a seguir, gotejada sobre uma solução de íon bivalente ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ). Quando a mistura contendo o alginato entra em contato com a solução de íon bivalente formam-se microesferas rígidas de alginato de cálcio, em que a enzima ficará retida (RUCKA E TURKIEWICZ, 1989).

Na busca de melhores suportes para imobilização os géis híbridos, ou hidrogéis, aparecem como alternativas interessantes (TAQIEDDIN et al., 2002). Estes hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de sorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação químicos ou físicos (BERGER et al., 2004). Estes géis híbridos são formados pela associação de dois ou mais polímeros complementares, os quais são ligados, principalmente, devido às forças eletrostáticas, a interações hidrofóbicas, a pontes de hidrogênio, a forças de van der Waals, ou pela combinação destas interações (LEE et al., 1999). Híbridos de quitosana-alginato são relatados na literatura como suportes para imobilização de enzimas (VILLALONGA et al., 2006), a quitosana é um polímero policatiónico e o alginato um polianiónico, as interações iônicas entre eles permitem formar géis rígidos (HUGUEST & DELLACHERIE, 1996).

Para uma melhor imobilização e estabilização da enzima, muitos suportes necessitam ser ativados, e o método mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeídos deve-se à reversibilidade da ligação amino-aldeído, que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura protéica, enquanto reagem reversivelmente com grupos amino da enzima (PEREIRA, 1996). Esta modificação química, objetiva aumentar a resistência mecânica, alterar a hidrofobicidade, biocompatibilidade e estabilidade química tornando-a mais resistente (VIEIRA, 2004). Para ativação de diversos suportes, vários agentes bifuncionais têm sido utilizados, sendo que o glutaraldeído aparece como sendo um dos mais satisfatórios e comumente utilizados (BROUN, 1976; GUISÁN, 1988).

A imobilização enzimática pode induzir a modificação de algumas propriedades da enzima, muitos fatores levam a alteração dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação à livre, diminuindo o rendimento do processo de imobilização. Dentre as características que descrevem os diversos sistemas de imobilização de enzimas, merecem destaque aquelas que levam em consideração o *Rendimento da Imobilização*, que é definido

como a razão entre a quantidade de enzima oferecida ao suporte e a quantidade desaparecida do sobrenadante, *Rendimento de atividade imobilizada*, que é a razão da atividade oferecida menos à atividade do sobrenadante, pela atividade oferecida ao suporte, *Atividade Recuperada* (atividade do derivado), neste caso é a razão entre a atividade oferecida ao suporte pela atividade desaparecida do sobrenadante e a *Atividade perdida*, sendo esta a porcentagem da atividade enzimática oferecida no início do processo que desapareceu durante a imobilização.

### **3. Justificativa e Objetivos:**

#### **3.1. Justificativa**

Soluções práticas e viáveis economicamente são de extrema importância para o aproveitamento de resíduos agro-industriais, visando a produção de alimentos e energia, com destaque para os resíduos de maior abundância, os lignocelulósicos. Neste contexto, a seleção de microrganismos celulolíticos eficientes é estratégica, bem como a produção econômica destas enzimas utilizando-se de meios de baixo custo. Outra forma de viabilizar a hidrólise enzimática destes resíduos consiste nos estudos do desenvolvimento e aperfeiçoamento da tecnologia de imobilização destas enzimas, a fim de reutilizá-las no processo, acarretando assim uma diminuição nos custos deste insumo. A busca de uma nova tecnologia de aproveitamento do bagaço de cana que envolverá: a linhagem, forma de cultivo e produção de extrato celulolítico, protocolo de imobilização do complexo enzimático, e forma de aplicação da enzima imobilizada no bagaço de cana e celulosas diversas; visando a obtenção de açúcares fermentescíveis abrirá espaço para novas perspectivas para a indústria biotecnológica, sobretudo para a produção de biocombustíveis e alimentos.

#### **3.2. Objetivo geral**

O objetivo geral foi selecionar fungos celulolíticos mais promissores, e destes realizar cultivos de forma econômica visando obter extrato enzimático com atividade celulolítica diferenciada. Outro estudo foi a imobilização enzimática deste extrato e de celulasas comerciais, bem como a reutilização destas enzimas imobilizadas na hidrólise da celulose e produção de açúcares fermentescíveis.

### 3.2.1. Objetivos específicos:

- Produzir extratos enzimáticos a partir de microrganismos recentemente isolados, utilizando unicamente o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como fonte de carbono, e avaliar a atividade celulolítica visando à seleção dos mais promissores, assim como estudar o efeito das variáveis: temperatura e pH na produção do extrato celulolítico;
- Comparar os extratos obtidos dos melhores microrganismos quanto a atividade celulolítica através das técnicas de FPase e CMCase;
- Determinar o microrganismo mais promissor em relação ao rendimento do processo, entre a atividade celulolítica produzida e a biomassa fornecida;
- Realizar testes preliminares de adsorção da enzima comercial em zeólita e resina de troca iônica e poliestireno, visando o melhor agente de adsorção a ser utilizado durante a imobilização;
- Estabelecer protocolos de imobilização do extrato celulolítico produzido e da enzima comercial lendo-1,4- $\beta$ -glucanase (celulase) da marca ROHAMENT® CL, a partir de microesferas ou biofilmes dos suportes sólidos: alginato de cálcio e géis híbridos (alginato e quitosana); e avalia-los através da porcentagem de enzima imobilizada e da atividade enzimática quantificada pela técnica FPase;
- Determinar a capacidade de reciclo enzimático dos derivados produzidos nos diferentes protocolos.

## 4. Materiais e Métodos:

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Industrial e Microbiologia da Faculdade de Ciências e Letras – Campus de Assis da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Microrganismos

Foram utilizadas 13 linhagens fúngicas as quais estão depositadas na coleção de culturas da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP. Dez destas foram isoladas por Lobello (2009), as quais apresentaram excelentes atividades celulolíticas e estão pré-codificadas com as seguintes numerações: FS09, MT09, MG18B, FS11A, MT13B, FS08A, MT45B, MT31B, MT06, MG10A. Duas, das demais linhagens, pré-codificadas como M51 e

N51, foram recentemente isoladas de amostras de bagaço de cana de destilarias de Médio Vale do Paranapanema, e o *Trichoderma reesei* CCT 2768 como referência na produção de enzimas celulolíticas.

#### **4.1.2 Suportes utilizados na imobilização enzimática.**

Para o preparo dos suportes foram utilizados: quitosana ( $C_{12}H_{24}N_2O_9$ ) de alto peso molecular, da marca Aldrich® (cód. 419419-50 G); alginato de sódio, da marca LabSynth® (cód. A1089.01.AF); zeólita ( $M_x/n [(AlO_2)_x (SiO_2)_y] \cdot wH_2O$ ); resina de troca iônica (Amberlite® MB-20), poliestireno (isopor®), conforme o protocolo de imobilização.

#### **4.1.3. Celulase (E.C.3.2.1.4)**

Foram utilizadas preparações de celulasas (1,4- $\beta$ -glucanase) de origem microbiana de *Trichoderma reesei* adquirida da empresa AB Enzymes (ROHAMENT® CL), com atividade mínima de 15.000 ECU/g, de acordo com a empresa, sendo esta unidade é definida como a produção de um nmol de açúcar redutor (glicose) em um segundo. Diluída nas concentrações desejadas em tampão acetato a 0,2 mol/L, pH 5,6, para sua utilização na sua forma livre nos ensaios de atividade celulolíticas e para os protocolos de imobilização.

#### **4.1.4. Reagentes e Substratos**

Foi utilizado glutaraldeído da marca Nuclear, 25% em água (P.A.), o qual foi diluído em água para concentração desejada; cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) à 0,15 mol/L; tampão Acetato (0,2 mol/L - pH 5,6); e como substrato para dosagem da atividade hidrolítica, papel de filtro Whatman nº1 para a técnica de FPase, e Carboximetilcelulose (Sigma) para a técnica de CMCase, e bagaço de cana *in natura*, ou seja, sem nenhum pré-tratamento, para o cultivo dos microrganismos.

#### **4.1.5. Equipamentos**

Os seguintes equipamentos foram utilizados: espectrofotômetro UV/Vis (Ultrospec 1100 Pro - Pharmacia); balança analítica (Gehaka mod. AG 200); incubadora com agitação orbital e controle de temperatura marca Tecnal mod;TE 421 (Piracicaba – SP); demais equipamentos em nível analítico.

## **4.2 Metodologias:**

### **4.2.1. Cultivo, Preservação e Inoculação dos microrganismos**

Os microrganismos foram cultivados em tubos contendo 5mL de meio PDA 39g/L (potato, dextrose e ágar) inclinado (*slants*) e colocados em ambiente refrigerado (4°C).

Para preservação duradoura, foram adicionados 20% de glicerol estéril à suspensão de conídios e 1mL da suspensão de cada linhagem foi transferida para um tubo tipo Eppendorf e congelado a -20°C (LOBELLO, 2009).

A reativação destes deu-se da mesma forma, sendo repicados periodicamente. Assim, cinco dias após a passagem dos microrganismos para novos tubos com meio PDA 39g/L, estes foram repicados para placas de Petri contendo aproximadamente 30mL de meio descrito a seguir (item 4.2.2) com adição de Agar na concentração de 20g/L. Estas placas foram mantidas por sete dias em temperatura ambiente a fim de se obter um crescimento fúngico desejável, sendo em seguida transferidos para Erlenmeyers de 250mL para fermentação e obtenção do extrato celulolítico, protocolo descrito a seguir (item 4.2.2).

### **4.2.2. Produção do extrato enzimático**

Os 12 microrganismos selecionados, mais o *Trichoderma reesei*, foram cultivados e fermentados. Porém foi feita uma fermentação inicial, no qual se objetivava selecionar, dentre eles, os 4 melhores para produção do extrato celulolítico. Desta forma os fungos foram transferidos assepticamente a Erlenmeyers de 250mL contendo 80mL de meio líquido, formado por 3% (p/v) de bagaço de cana, 0,4% de sulfato de amônia, 0,1% de fosfato de potássio e 0,5% de extrato de levedura. Cada fungo foi inoculado em meios contendo três diferentes pHs (3,5; 4,5 e 5,5) e fermentados por cinco dias em uma incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal – Piracicaba - SP) a 180 rpm. Nas temperaturas: 28, 30 e 35°C.

Após o término dos cultivos, os meios fermentados foram filtrados para a separação da parte sólida e parte líquida (extrato enzimático). Em seguida, mediu-se a atividade celulolítica de cada extrato pela técnica FPase (item 4.2.5), e assim foram selecionados os 4 melhores.

Para os 4 melhores fungos mais o *Trichoderma reesei* CCT 2768, uma nova fermentação em triplicada foi feita, utilizando-se o mesmo volume e meio citado acima, e nas mesmas condições de pHs, temperaturas e tempo. Porém, após o término dos cultivos e filtração do extrato fúngico, foi medida a atividade celulolítica pelas técnicas de FPase (item 4.2.5) e CMCase (item 4.2.6).



#### **4.2.3. Teste de adsorção da enzima comercial em zeólita, resina de troca iônica e poliestireno.**

Testes preliminares foram realizados para adsorção da enzima comercial (E.C.3.2.1.4) para determinar qual agente adsorvente ou agente de ligação seria utilizado durante o processo de imobilização em biofilmes (protocolo *E* e *E'* - Tabela 4.1): zeólita, resina de troca iônica ou poliestireno. O melhor derivado foi empregado na imobilização em biofilme (Tabela 4.1).

Para o suporte poliestireno, foi feita um tratamento precedente, em que este foi previamente autoclavado por 15 min a 120°C, e posteriormente mantidos de 1:2 (m/v) em uma solução de etanol 50 % (v/v) por 30 min a fim de excluir o ar contido dentro das partículas. Em seguida, estes suportes foram lavados com água deionizada e filtrados, estando assim, pronto para o teste de adsorção da enzima comercial.

Para cada agente adsorvente foi adicionado solução enzimática na proporção de 1% de proteína por suporte (zeólita, resina ou poliestireno) (m/m), isto é, para 1,5g de suporte foram adicionados 0,15g de proteína e mantidos por 24 horas em agitação branda e temperatura ambiente para adsorção da enzima ao suporte. Após esta etapa foi feita a separação da fase sólida da líquida, em ambas as fases e foi determinada a concentração de proteínas (BRADFORD, item 4.2.7) e a atividade enzimática (FPase, item 4.2.5), assim como o rendimento da atividade enzimática. O melhor foi selecionado para que este fosse utilizado nos protocolos de imobilização (Tabela 4.1).

#### **4.2.4. Imobilização do extrato fúngico produzido e/ou enzima comercial**

Foram estudadas duas formas de preparação para os suportes sólidos na imobilização (derivados), o biofilme e peletes. Desta forma foram realizados 10 protocolos diferentes de imobilização e preparo dos derivados para cada solução de biocatalizadores (extrato fúngico dos 4 melhores mais o *T.reesei* e enzima comercial), descritos resumidamente na Tabela 4.1. Cada imobilizado teve sua atividade celulolítica determinada através da técnica de FPase (item 4.2.5).

**Tabela 4.1.** Protocolos de imobilização de acordo com o suporte de imobilização e a utilização do glutaraldeído.

| <i>Protocolo</i>   | <i>Formato</i>  | <i>Suporte</i>                                              |
|--------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------|
| A                  | <b>Pelete</b>   | <i>Alginato de Cálcio</i>                                   |
| A' (glutaraldeído) | <b>Pelete</b>   | <i>Alginato de Cálcio</i>                                   |
| B                  | <b>Pelete</b>   | <i>Quitosana + Alginato de Cálcio</i>                       |
| B' (glutaraldeído) | <b>Pelete</b>   | <i>Quitosana + Alginato de Cálcio</i>                       |
| C                  | <b>Biofilme</b> | <i>Alginato de Cálcio</i>                                   |
| C' (glutaraldeído) | <b>Biofilme</b> | <i>Alginato de Cálcio</i>                                   |
| D                  | <b>Biofilme</b> | <i>Quitosana + Alginato de Cálcio</i>                       |
| D' (glutaraldeído) | <b>Biofilme</b> | <i>Quitosana + Alginato de Cálcio</i>                       |
| E                  | <b>Biofilme</b> | <i>Alginato de Cálcio com agente adsorvente<sup>1</sup></i> |
| E' (glutaraldeído) | <b>Biofilme</b> | <i>Alginato de Cálcio com agente adsorvente<sup>1</sup></i> |

<sup>1</sup>Agente a ser determinado (item 4.2.3).

Os protocolos de preparo dos peletes para imobilização tiveram como base a metodologia utilizada por Albarghouthi et al. (2000) e Tanriseven (2001), com algumas modificações. Para a preparação dos biofilmes, a base da metodologia teve o trabalho de Rodrigues (2008) modificado.

#### **4.2.4.1. Imobilização do extrato fúngico.**

Após serem escolhidos os melhores fungos e produzidos seus extratos, estes foram imobilizados em biofilmes de acordo com a Tabela 4.1 e descritos nos protocolos a seguir (item 4.2.4.3). Posteriormente, foram feitas análises da atividade celulolítica pela técnica FPase (item 4.2.5) para cada protocolo de imobilização, assim como consecutivos ciclos dos derivados, para determinar a estabilidade destes.

#### **4.2.4.2. Imobilização da celulase comercial**

A imobilização utilizando a enzima comercial (Iendo-1,4- $\beta$ -glucanase) foi realizada de duas formas: na primeira foi fornecida uma concentração total de 1% de proteína (m/m) em relação ao peso final dos derivados. Por exemplo, para o preparo de 5 gramas de derivados, seria adicionado 0,05g de proteína; no qual foi adicionada nas soluções de alginato de sódio, para que em seguida fossem realizados os protocolos de imobilização. Na segunda forma, após a preparação dos suportes para imobilização (Tabela 4.1), estes passaram por um

tratamento enzimático em que se tratou de fornecer uma concentração de 1% de proteína em relação ao peso final de cada suporte, seguindo o mesmo exemplo supracitado. Posteriormente foram feitas análises da atividade celulolítica pela técnica FPase (item 4.2.5), assim como sucessivos ciclos dos derivados, para determina a estabilidade destes.

#### **4.2.4.3. Protocolos de imobilização adicionando diretamente o biocatalisador.**

##### **4.2.4.3.1. Protocolos A e A': Peletes de Alginato de Cálcio**

Para o protocolo A foi preparada uma solução de alginato de sódio 3% (m/v) em água deionizada, nesta solução foi adicionado uma solução enzimática que no final a concentração em relação ao derivado foi 1% (m/m). Foi preparada, uma solução  $\text{CaCl}_2$  (0,15M). A solução de alginato de sódio foi gotejada na solução de cloreto de cálcio, em proporção 1:2 e mantida por 24 horas sob agitação branda para a formação dos peletes, a temperatura ambiente. Após esse período, os peletes formados foram lavados com água deionizada, pesados e feitas às reações enzimáticas.

No protocolo A' foram realizados os mesmos procedimentos do protocolo A, porém após a formação dos peletes, estes foram tratados com glutaraldeído (0,5%) durante 1 hora em agitação, para ativação do derivado.

##### **4.2.4.3.2. Protocolos B e B': Peletes de Quitosana + Alginato de Cálcio**

Para o protocolo B foi preparada uma solução de alginato de sódio 3% (m/v) em água deionizada, nesta solução foi adicionado uma solução enzimática que no final a concentração em relação ao derivado foi 1% (m/m). Foi preparada, uma solução de quitosana 1% (m/v) em ácido acético (1%), com adição de  $\text{CaCl}_2$  (0,15M). A solução de alginato de sódio foi gotejada na solução de quitosana, em proporção 1:2 e mantida por 24 horas sob agitação branda para a formação dos peletes, a temperatura ambiente. Após esse o período, os peletes formados foram lavadas com água deionizada, pesados e feitas às reações enzimáticas.

No protocolo B' foram realizados os mesmos procedimentos do protocolo B, porém após a formação dos peletes, estes foram tratados com glutaraldeído (0,5%) durante 1 hora em agitação, para ativação do derivado.

#### 4.2.4.3.3. Protocolos *C* e *C'*: Biofilme de Alginato de Cálcio

Para o protocolo *C* foi preparada uma solução de alginato de sódio (3%) em água deionizada contendo uma solução na proporção 1:1 do extrato fúngico ou uma solução enzimática que no final a concentração em relação ao derivado foi 1% (m/m), assim como uma solução de  $\text{CaCl}_2$  (0,15M). Em seguida, foi realizada a *técnica de preparo do biofilme*: a solução de alginato de sódio foi misturada sob agitação mecânica constante. Após a homogeneização, a mistura foi transferida para uma placa de petri de polipropileno e colocada para secar em estufa a 30°C, por um período entre 20 e 24 horas. Em seguida, solução de  $\text{CaCl}_2$  (0,15M) foi adicionada ao biofilme seco que permaneceu sob agitação branda por 12 horas, a temperatura ambiente. O biofilme foi lavado com água deionizada, pesado e feita às reações enzimáticas.

No protocolo *C'* foram realizados os mesmos procedimentos do protocolo *C*, adicionando o tratamento com glutaraldeído (0,5%) durante 1 hora em agitação, para ativação do derivado.

#### 4.2.4.3.4. Protocolos *D* e *D'*: Biofilme de Quitosana + Alginato de Cálcio

Para o protocolo *D* foi preparada uma solução de quitosana (1% - m/v) em ácido acético (1%), e outra de alginato de sódio (3% - m/v) contendo uma solução na proporção 1:1 do extrato fúngico ou uma solução enzimática que no final a concentração em relação ao derivado foi 1% (m/m), assim como uma solução de  $\text{CaCl}_2$  (0,15M). Em seguida, foi realizada a *técnica de preparo do biofilme*, contudo, foi feito uma mistura de 1:1 da solução de quitosana e alginato de sódio em agitação mecânica constante, no final o biofilme foi lavado com água deionizada, pesado e feita às reações enzimáticas.

No protocolo *D'* foram realizados os mesmos procedimentos do protocolo *D*, porém após o período de formação do biofilme, foi realizado o tratamento com o glutaraldeído (0,5%) durante 1 hora em agitação, para ativação do derivado.

#### 4.2.4.3.5. Protocolos *E* e *E'*: Biofilme de Alginato de Cálcio com Agente adsorvente

Para o protocolo *E* foi preparada uma solução de alginato de sódio (3% - m/v), solução na proporção 1:1 o extrato fúngico ou uma solução enzimática que no final a concentração em relação ao derivado foi 1% (m/m), nas quais foram adicionado 2% do melhor agente adsorvente (item 4.2.3), assim como uma solução de  $\text{CaCl}_2$  (0,15M). Em seguida, foi

realizada a *técnica de preparo do biofilme*, que no final foi pesado e feita as reação enzimáticas.

No protocolo *E'* foi realizados os mesmos procedimentos do protocolo E, porém após o período de formação do biofilme, foi realizado o tratamento com o glutaraldeído (0,5%) durante 1 hora em agitação, para ativação do derivado.

#### **4.2.4.4. Protocolos de imobilização com posterior tratamento enzimático, para enzima comercial**

Para esta etapa do trabalho, foram realizados os mesmos protocolos do item 4.2.4.3, porém, contrariamente, não foi adicionada juntamente com as soluções do suporte, qualquer solução enzimática. Desta forma, foram realizados apenas os protocolos para a preparação dos suportes (peletes e/ou biofilmes), com ou sem glutaraldeído. Contudo, após o término desta etapa, foi feito um tratamento enzimático, para que a enzima pudesse se ligar e/ou ser adsorvida pelo suporte, e assim formar os derivados. Este tratamento envolveu pegar os suportes já prontos (peletes ou biofilmes), e colocá-los em uma solução enzimática que no final possuía 1% de proteínas em relação ao peso final de cada suporte, que permaneceu em agitação branda por 24 horas em temperatura ambiente. Após esta etapa os derivados foram lavados com água deionizada e feitos à reação enzimática.

#### **4.2.5. Determinação da Atividade celulolítica (FPase):**

A atividade enzimática do extrato produzido pelos fungos e da enzima comercial foi medida através da técnica de FPase, no qual à uma solução com 0,5mL de extrato estéril ou solução enzimática é adicionada 1mL de solução tampão acetato 0,2M e pH 5,6, e uma tira de papel Whatman nº1 de 0,5 X 3,0cm colocada para reagir por 60 minutos a 50°C (Mandels et al., 1976), onde ocorre a hidrólise da celulose do papel, liberando açúcares redutores (glicose), quantificados no início e após 60 minutos de reação. A liberação de açúcar redutor foi quantificada a partir da amostra obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

A unidade utilizada para determinação da atividade celulolítica foi unidades de FPase (Filter Paper Units) por volume de enzima ou FPU/mL, onde 1 FPU é a liberação de 1 micromol de açúcar redutor por min por ml de enzima nas condições descritas. A atividade específica foi determinada como unidades de FPU/g de proteína na amostra (GHOSE, 1987).

Para o cálculo da atividade enzimática segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0mg de glicose

equivalente em mols (2,0/0,18016  $\mu\text{mol}$ ) do volume de enzima adicionada a cada ensaio (0,5 mL), e no tempo de incubação requerido (60 minutos) para a geração dos equivalentes (enzima diluída), para quando necessário. Este conceito é mostrado na calculo 1.

#### **Calculo 1**

$$\frac{FPU}{mL} = \left( \frac{2,0}{0,1816 \cdot 0,5 \cdot 60} \right) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\frac{FPU}{mL} = \left( \frac{0,37}{\text{concentração [enzima diluída] da enzima que libera 2 mg de glicose}} \right)$$

#### **4.2.6. Determinação da Atividade da Endoglucanase (CMCase):**

A atividade da endoglucanase foi determinada através da determinação de açúcares redutores liberados durante a degradação da carboximetilcelulose (CMC), seguindo a técnica de Ghose (1987) modificada.

Em tubos de ensaio, 100 $\mu\text{L}$  solução enzimática bruta foram adicionadas em 650 $\mu\text{L}$  de suspensão de carboximetilcelulose (CMC) (Sigma) 0,5% (m/v) em tampão acetato 0,2M e pH 5,6. Essa mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos seguidos por um resfriamento imediato no gelo por 5 minutos. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

Uma unidade de atividade celulolítica endoglucanase ou CMCase (carboximetilcelulase) é expressa em U/mL, e é definida como de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto e por de enzima a partir do substrato CMC (carboximetilcelulose), conforme protocolo descrito neste item. A atividade específica foi determinada como unidades de U/g de proteína na amostra (item 4.2.7), ambas utilizando curva padrão de glicose.

O cálculo da atividade segundo Ghose (1987) modificado baseia-se no conceito da unidade da atividade de Endoglucanase (CMC), a qual é a liberação de exatamente 0,5mg de glicose equivalente em mols (0,5/0,18016), convertida por 0,1mL de extrato enzimático em 10 minutos de reação. Este conceito é mostrado na calculo 2.

#### **Calculo 2**

$$\frac{CMC}{mL} = \left( \frac{0,5}{0,1816 \cdot 0,1 \cdot 10} \right) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\frac{CMC}{mL} = \left( \frac{2,75}{\text{concentração [enzima diluída] da enzima que libera 0,5 mg de glicose}} \right)$$

#### 4.2.7. Determinação da concentração de proteína

O teor de proteína das amostras de preparações enzimáticas foi dosado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Este método foi escolhido por não sofrer interferências significativas de cátions e carboidratos, possivelmente presentes nas amostras. Soro albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para construir a curva de calibração.

#### 4.2.8. Cálculo dos parâmetros de imobilização

##### 4.2.8.1. Cálculo do rendimento de proteína imobilizada

O rendimento de imobilização de proteínas foi estimado com base na quantidade de proteína oferecida e a quantidade dela presente no meio reacional após o processo de imobilização, como mostrado na equação 1.

##### *Equação 1*

$$RP (\%) = \frac{E_0 - E_f}{E_0} \times 100$$

Em que RP representa a porcentagem de proteína imobilizada (%);  $E_0$ , a quantidade total de proteína oferecida no início da imobilização (g) e  $E_f$ , a quantidade total residual de proteínas presente no sobrenadante após a imobilização (g).

##### 4.2.8.2. Cálculo do rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização foi estimado com base na atividade enzimática oferecida e a atividade enzimática presente no meio reacional após o processo de adsorção, como mostrado na equação 2.

##### *Equação 2*

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

Em que RI é a porcentagem de atividade da enzima imobilizada (%);  $U_0$  é a atividade oferecida no início da imobilização ( $FPU_{Total}$ ) e  $U_f$  é a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização ( $FPU_{Total}$ ).

#### 4.2.8.3. Cálculo da atividade recuperada

O cálculo da atividade recuperada foi determinado pela relação entre a atividade hidrolítica contida no suporte e as atividades iniciais e finais presentes no sobrenadante, conforme mostrado na equação 3.

$$AR (\%) = \frac{U_{\text{suporte}}}{U_0 - U_f} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que AR (%) representa a porcentagem de atividade enzimática recuperada;  $U_{\text{suporte}}$ , a atividade hidrolítica contida no suporte ( $FPU_{Total}$ );  $U_0$ , a atividade oferecida no início da imobilização ( $FPU_{Total}$ ), e  $U_f$ , a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização ( $FPU_{Total}$ ).

#### 4.2.8.4.. Cálculo da atividade perdida

O cálculo da atividade perdida foi determinado pela relação entre a atividade hidrolítica oferecida e a atividade enzimática presente no meio reacional após o processo de adsorção somado a atividade hidrolítica contida no suporte, conforme mostrado na equação 4.

$$AP (\%) = \frac{(U_0 - (U_{\text{suporte}} + U_f))}{U_0} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que AP (%) representa a porcentagem de atividade enzimática perdida durante a imobilização;  $U_0$ , a atividade oferecida no início da imobilização ( $FPU_{Total}$ ),  $U_{\text{suporte}}$ , a atividade hidrolítica contida no suporte ( $FPU_{Total}$ );  $U_f$  é a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização ( $FPU_{Total}$ ).



#### 4.2.9. Tratamento Estatístico

Os testes de atividade enzimática serão conduzidos em triplicata, e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), enquanto que as médias foram comparadas pelo teste Tukey, através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University). Os tratamentos analisados estatisticamente serão considerados significativos para  $p < 0,05$ .

### 5. Resultados e Discussão

Em uma primeira etapa do trabalho foi feita uma triagem entre os 12 microrganismos propostos inicialmente, dos quais quatro se destacaram na produção de um extrato celulolítico a partir de um meio contendo apenas bagaço de cana-de-açúcar (*in natura*) como fonte de carbono. Partindo destes 4 microrganismos mais o *T.reesei* CCT 2768 foi feito um novo cultivo, e avaliada a atividade celulolítica para as técnicas de FPase e CMCase, e assim foi determinado o melhor microrganismo, a melhor temperatura e pH de cultivo para este, na produção de um extrato celulolítico a partir de uma biomassa lignocelulolítica (*in natura*). A segunda etapa constituiu em estudar a imobilização dos extratos produzidos e a imobilização da enzima comercial celulase (Iendo-1,4- $\beta$ -glucanase), em diferentes protocolos (peletes e biofilmes), e compará-los em rendimento de imobilização, assim como em estabilidade através de sucessivo ciclos de suas atividades celulolíticas.

#### 5.1. Obtenção dos Extratos Enzimáticos

##### 5.1.1. Triagem dos fungos mais promissores para produção do extrato celulolítico

Na primeira parte do trabalho, foi realizada uma triagem dos 12 microrganismos propostos a fim de selecionar os mais promissores em relação à produção do extrato celulolítico, a partir de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, para posteriormente repetir as fermentações destes, nas mesmas variáveis de temperatura e pH, e assim avalia-los para as técnicas de FPase e CMCase.

As atividades enzimáticas dos extratos obtidos pelos 12 diferentes microrganismos (FS09, MT09, MG18B, FS11A, MT13B, FS08A, MT45B, MT31B, MT06, MG10A, M51, N51) e *Trichoderma reesei* CCT 2768, nas temperaturas: 28°C, 30°C e 35°C; e nos pHs: 3,5; 4,5 e 5,5; estão representadas abaixo. A Figura 5.1 refere-se à atividade enzimática volumétrica, expressa em FPU/mL (item 4.2.5) de todos os microrganismos nas condições de fermentação citadas acima. A Figura 5.2 representa a atividade enzimática específica, ou seja, o quociente entre a atividade volumétrica (FPU/mL) e o total de proteínas (item 4.2.7) obtido para cada extrato enzimático (g/mL), sendo expressa em FPU/g de proteína (item 4.2.5).

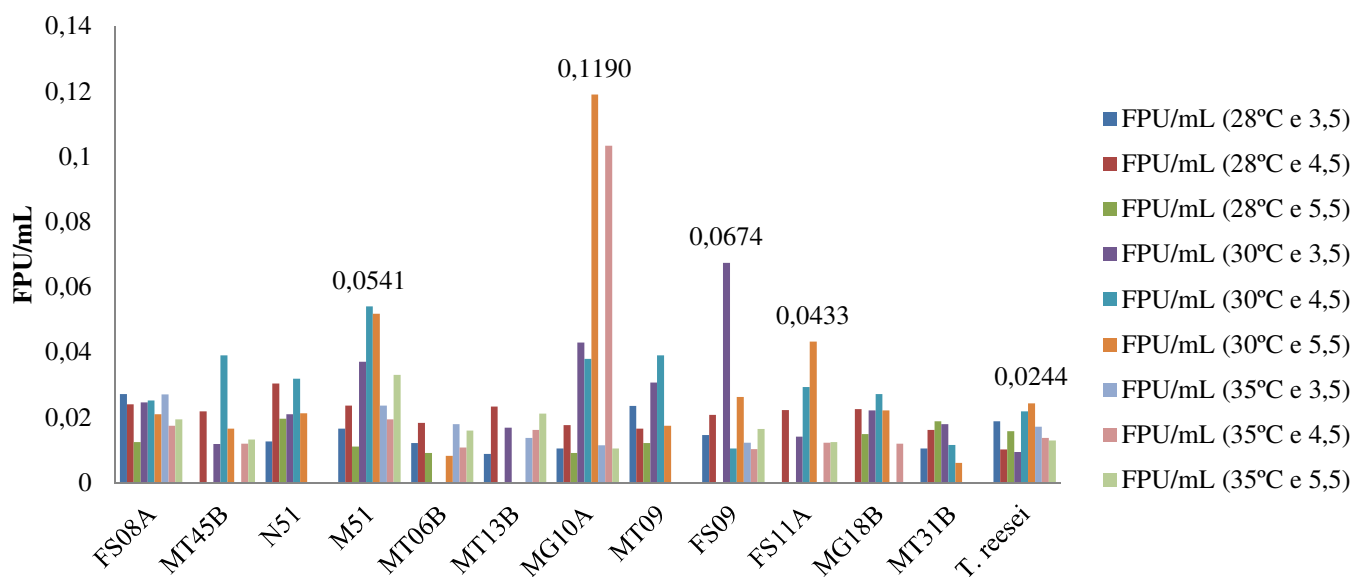


Figura 5.1: Atividade enzimática volumétrica dos extratos celulolíticos de todos os microrganismos estudados nas temperaturas de 28, 30 e 35°C durante cinco dias a 180 rpm e nos três diferentes pHs (3,5; 4,5 e 5,5).

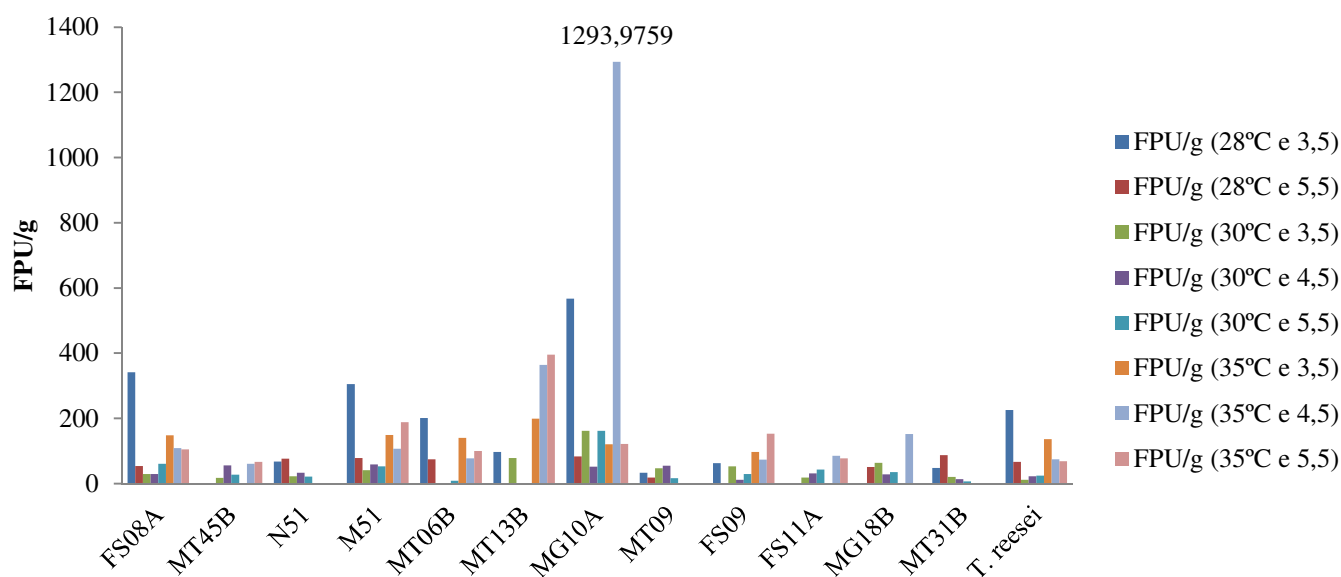


Figura 5.2: Atividade enzimática específica dos extratos celulolíticos de todos os microrganismos estudados nas temperaturas de 28, 30 e 35°C durante cinco dias a 180 rpm e nos três diferentes pHs (3,5; 4,5 e 5,5).

O fungo que apresentou maior atividade enzimática foi o MG10A, à temperatura de 30°C e pH 5,5 (0,1190 FPU/mL). Além deste, outros 3 microrganismos, como o M51 (0,0541 FPU/mL - 30°C e pH 4,5), FS09 (0,0674 FPU/mL - 30°C e pH 3,5) e FS11A (0,043 FPU/mL - 30°C e pH 5,5) apresentaram valores de atividade enzimática superiores ao *T. reesei* CCT 2768 (0,0244 FPU/mL – 30° e pH 5,5). Indicando, em um primeiro momento, que estes microrganismos são mais efetivos em produzir o extrato celulolítico que o próprio *T.reesei*.

Resultados muitos superiores foram obtidos por Sun et al.(2008), trabalhando com uma linhagem mutante do *Trichoderma reesei* RUT C-30 e usando como fonte de carbono o pó de palha de arroz sem pré-tratamento, obtiveram uma atividade enzimática de 0,71FPU/mL.

Se uma amostra apresentar atividade enzimática satisfatória e concentração protéica baixa em relação às demais, sua atividade específica será alta. Esse valor representa um extrato enzimático em que a maioria das proteínas presentes apresenta a característica hidrolítica testada (PESSOA-Jr, 2005), que nesse caso seria as enzimas do complexo celulolítico que irá hidrolisar a celulose do meio reacional. Neste primeiro momento o fungo MG10A apresentou a maior atividade específica, chegando a 1293,97 FPU/g, nas condições de 35°C e pH 4,5.

Outra maneira de apresentar as atividades enzimáticas é sob a denotação atividade enzimática (FPU) por grama de substrato. Desse modo, pode-se analisar, de forma geral, o rendimento do processo, uma vez que é dado o potencial enzimático gerado por quantidade de substrato ofertado no processo fermentativo. Na Tabela 5.1 estão representadas as atividades enzimáticas por grama de substrato (FPU/g substrato) dos 12 microrganismos estudados, nas diferentes temperaturas: 28, 30 e 35°C, nos três diferentes pHs: 3,5; 4,5 e 5,5.

**Tabela 5.1:** Atividade Enzimática por grama de substrato (FPU/g substrato) – Fermentações a 28, 30 e 35°C por 5 dias em agitador orbital a 180 rpm, nos pH 3,5; 4,5 e 5,5.

| <i>Microrg.</i>         | <i>pH 3,5</i><br><i>28°C</i> | <i>pH 4,5</i><br><i>28°C</i> | <i>pH 5,5</i><br><i>28°C</i> | <i>pH 3,5</i><br><i>30°C</i> | <i>pH 4,5</i><br><i>30°C</i> | <i>pH 5,5</i><br><i>30°C</i> | <i>pH 3,5</i><br><i>35°C</i> | <i>pH 4,5</i><br><i>35°C</i> | <i>pH 5,5</i><br><i>35°C</i> |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>FS08A</b>            | 0,9065                       | 0,8031                       | 0,4163                       | 0,8233                       | 0,8418                       | 0,7030                       | 0,9050                       | 0,5833                       | 0,6493                       |
| <b>MT45B</b>            | 0,0000                       | 0,7320                       | 0,0000                       | 0,3978                       | 1,3043                       | 0,5550                       | 0,0000                       | 0,4018                       | 0,4430                       |
| <b>N51</b>              | 0,4255                       | 1,0163                       | 0,6568                       | 0,7030                       | 1,0638                       | 0,7123                       | 0,0000                       | 0,0000                       | 0,0000                       |
| <b>M51</b>              | 0,5550                       | 0,7913                       | 0,3700                       | 1,2395                       | 1,8038                       | 1,7298                       | 0,7895                       | 0,6493                       | 1,1030                       |
| <b>MT06B</b>            | 0,4070                       | 0,6136                       | 0,3053                       | 0,0000                       | 0,0000                       | 0,2775                       | 0,5998                       | 0,3605                       | 0,5338                       |
| <b>MT13B</b>            | 0,2960                       | 0,7794                       | 0,0000                       | 0,5643                       | 0,0000                       | 0,0000                       | 0,4595                       | 0,5420                       | 0,7070                       |
| <b>MG10A</b>            | 0,3515                       | 0,5899                       | 0,3053                       | 1,4338                       | 1,2673                       | 3,9683                       | 0,3853                       | 3,4461                       | 0,3523                       |
| <b>MT09</b>             | 0,7863                       | 0,5544                       | 0,4070                       | 1,0268                       | 1,3043                       | 0,5828                       | 0,0000                       | 0,0000                       | 0,0000                       |
| <b>FS09</b>             | 0,4903                       | 0,6965                       | 0,0000                       | 2,2478                       | 0,3515                       | 0,8788                       | 0,4100                       | 0,3440                       | 0,5503                       |
| <b>FS11A</b>            | 0,0000                       | 0,7439                       | 0,0000                       | 0,4718                       | 0,9805                       | 1,4430                       | 0,0000                       | 0,4100                       | 0,4183                       |
| <b>MG18B</b>            | 0,0000                       | 0,7557                       | 0,4995                       | 0,7400                       | 0,9065                       | 0,7400                       | 0,0000                       | 0,4018                       | 0,0000                       |
| <b>MT31B</b>            | 0,3515                       | 0,5425                       | 0,6290                       | 0,6013                       | 0,3885                       | 0,2035                       | 0,0000                       | 0,0000                       | 0,0000                       |
| <b><i>T. reesei</i></b> | 0,6290                       | 0,3411                       | 0,5273                       | 0,3145                       | 0,7308                       | 0,8140                       | 0,5750                       | 0,4595                       | 0,4348                       |

As atividades celulolíticas por grama de substrato foram mais elevadas nos extratos produzidos pelas linhagens MG10A e M51, e superaram a apresentada pelo *T. reesei* CCT 2768. O valor mais alto foi referente ao MG10A quando cultivado a 30°C e pH 5,5, sendo de

3,968 FPU/g de substrato, o FS09 apresentou 2,2478FPU/g de substrato a 30°C e pH 3,5, enquanto o M51 apresentou 1,803 FPU/g de substrato a 30°C e pH 4,5, enquanto o *T.reesei* apresentou no máximo 0,8140 FPU/g de substrato a 30°C e pH 5,5. De acordo com um trabalho realizado por Szakács et al. (2000), utilizando a linhagem selvagem *Trichoderma hamatum* TUB F-105, obtiveram cerca de 7,0 FPU/g substrato em massa seca, em apenas três dias de fermentação em estado sólido, contudo o substrato utilizado como fonte de carbono foi a fibra de milho, um material muito mais fácil e simples de se degradar. No mesmo trabalho quando os autores procederam à fermentação em estado sólido, utilizando a mesma fonte de carbono, contudo com mais um inoculante, além da linhagem selvagem, a variável mutante *Trichoderma reesei* Rut C30, após 10 dias de incubação obteve-se uma atividade extremamente mais alta, 31 FPU/g substrato em massa seca. É interessante lembrar que no presente trabalho, foi utilizado como fonte de carbono, unicamente o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, ou seja, sem nenhum pré-tratamento de hidrólise. Desta forma, objetivava-se isolar microrganismos mais eficazes em crescer utilizando uma biomassa mais complexa. Tal fato dificultou o acesso dos fungos à fonte de carbono e, logo, limitou tanto o crescimento, como a produção de enzimas celulolíticas, tendo em vista que esta biomassa apresenta altas concentrações de hemicelulose (26%) e lignina (25%) (PANDEY et al., 2000).

Os microrganismos M51, MG10A, FS09 e FS11A, em um primeiro momento, apresentaram atividade celulolítica acima do *Trichoderma reesei* CCT 2768, considerado o microrganismo modelo para a produção de celulase (GHOSE, 1987). A figura 5.3 e 5.4 apresenta, respectivamente, a atividade enzimática volumétrica, e a atividade por grama de substrato dos cinco microrganismo, nas diferentes de temperaturas e pHs.

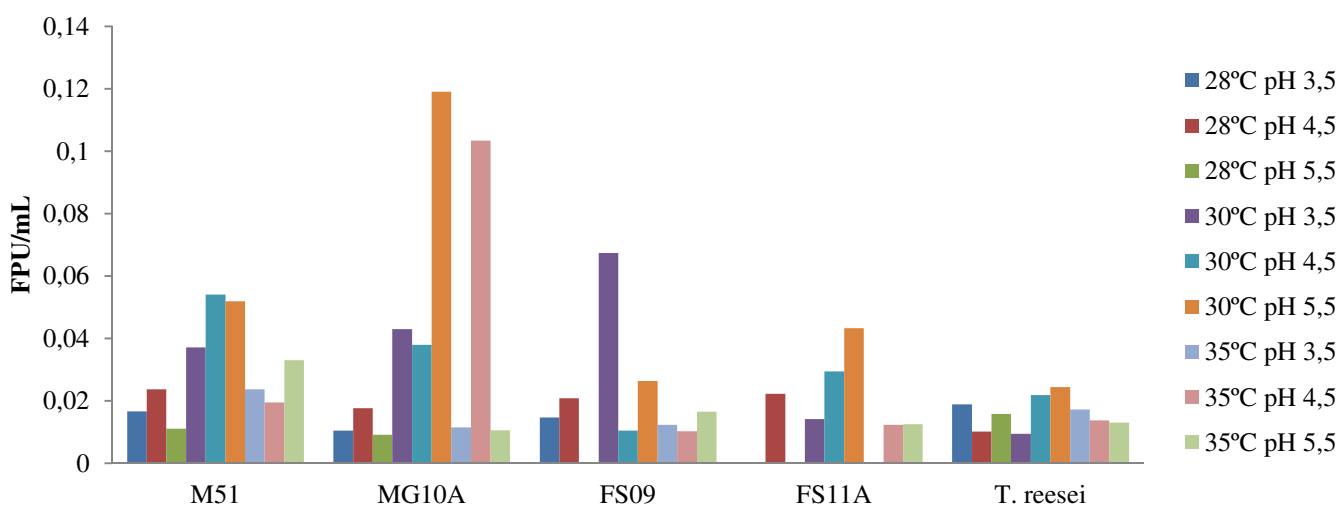


Figura 5.3: Atividade enzimática volumétrica dos extratos celulolíticos dos 4 melhores mais o *T.reesei* nas temperaturas de 28, 30 e 35°C e pHs 3.5; 4,5 e 5,5.

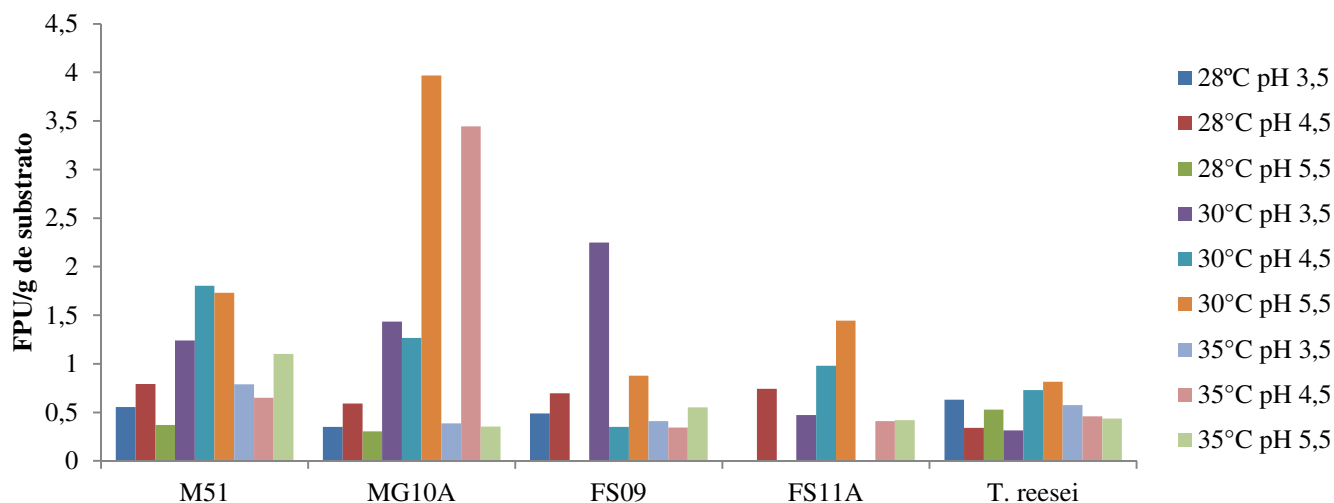


Figura 5.4: Atividade enzimática por grama de substrato dos microrganismos mais promissores e do *T.reesei* CCT 2768, nas diferentes temperaturas e pHs de fermentação – (a) M51, (b) MG10A, (c) FS09, (d) FS11A e (e) *T.reesei* CCT 2768.

A partir dos resultados obtidos nas fermentações, em condições supracitadas de temperaturas e pHs, foram estabelecidos 4 microrganismos mais promissores, dentre os 12 propostos inicialmente, foram: M51, MG10A, FS09 e FS11A. Juntamente com o *Trichoderma reesei* CCT 2768, as suas fermentações foram refeitas. E a partir disso, com uso de ferramentas estatísticas. O fungo e sua condição de cultivo mais favorável à produção do extrato celulolítico foi determinado (item 5.1.2). E com o extrato enzimático destes 4 microrganismos previamente selecionados foi utilizado no estudo de imobilização em biofilmes.

### 5.1.2. Obtenção dos Extratos Enzimáticos dos fungos mais promissores

Após a triagem inicial e seleção dos 4 microrganismos mais promissores (M51, MG10A, FS09 e FS11A) em relação a produção do extrato celulolítico (item 5.1.1), foi refeita as fermentações e do *T.reesei* CCT 2768, seguindo os mesmos critérios já estabelecidos em relação ao volume, tempo, temperaturas e pHs do meio fermentativo. Depois de obtido o extrato fúngico de cada microrganismo foi realizada uma análise das atividades celulolíticas utilizando as técnicas de FPase e CMCase.

As atividades enzimáticas volumétricas para a técnica de FPase (FPU/mL – item 4.2.5) e para técnica de CMCase (UI/mL – item 4.2.6) dos extratos celulolíticos obtidos após a fermentação desses microrganismos, e em todas as condições testadas, estão representadas abaixo, nas tabelas 5.2 e 5.3, e figuras 5.5 e 5.6, respectivamente.

**Tabela 5.2:** Atividade Enzimática Volumétrica da técnica FPase (FPU/mL) dos microrganismos selecionados, nas fermentações a 28, 30 e 35°C e pHs 3,5; 4,5 e 5,5.

| FPase (FPU/mL) |       |        |       |        |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 28°C           |       |        |       |        |       |        | 30°C   |        |        |        |        |        | 35°C   |        |        |        |        |        |
| pH 3,5         |       | pH 4,5 |       | pH 5,5 |       |        | pH 3,5 |        | pH 4,5 |        | pH 5,5 |        | pH 3,5 |        | pH 4,5 |        | pH 5,5 |        |
| Micror         | média | ±SD    | média | ±SD    | média | ±SD    | média  | ±SD    | média  | ±SD    | média  | ±SD    | média  | ±SD    | média  | ±SD    | média  | ±SD    |
| M51            | 0,015 | 0,0008 | 0,011 | 0,0031 | 0,018 | 0,0054 | 0,026  | 0,0011 | 0,025  | 0,0049 | 0,022  | 0,0012 | 0,049  | 0,0041 | 0,021  | 0,0020 | 0,026  | 0,0014 |
| MG10           | 0,010 | 0,0006 | 0,012 | 0,0008 | 0,011 | 0,0029 | 0,000  | 0,0000 | 0,000  | 0,0000 | 0,000  | 0,0000 | 0,022  | 0,0013 | 0,017  | 0,0021 | 0,022  | 0,0038 |
| FS09           | 0,000 | 0,0000 | 0,003 | 0,0045 | 0,012 | 0,0113 | 0,054  | 0,0127 | 0,021  | 0,0060 | 0,015  | 0,0147 | 0,016  | 0,0042 | 0,011  | 0,0102 | 0,023  | 0,0068 |
| FS11A          | 0,000 | 0,0000 | 0,012 | 0,0022 | 0,004 | 0,0075 | 0,000  | 0,0000 | 0,000  | 0,0000 | 0,010  | 0,0088 | 0,014  | 0,0006 | 0,011  | 0,0105 | 0,000  | 0,0000 |
| T.reesei       | 0,000 | 0,0000 | 0,020 | 0,0014 | 0,013 | 0,0005 | 0,015  | 0,0017 | 0,000  | 0,0000 | 0,017  | 0,0026 | 0,018  | 0,0028 | 0,011  | 0,0094 | 0,021  | 0,0013 |

**Tabela 5.3:** Atividade Enzimática Volumétrica da técnica CMCase (UI/mL) dos microrganismos selecionados, nas fermentações a 28, 30 e 35°C e pHs 3,5; 4,5 e 5,5.

| CMCase (UI/mL) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                | 28°C   |        |        |        |        |        | 30°C   |        |        |        |        |        | 35°C   |        |        |        |        |        |
|                | pH 3,5 |        | pH 4,5 |        | pH 5,5 |        | pH 3,5 |        | pH 4,5 |        | pH 5,5 |        | pH 3,5 |        | pH 4,5 |        | pH 5,5 |        |
| Micror         | média  | ± SD   | média  | ± SD   | média  | ± SD   | média  | ± SD   | média  | ± SD   | média  | ± SD   | média  | ± SD   | média  | ± SD   | média  | ± SD   |
| M51            | 0,227  | 0,0051 | 0,177  | 0,0044 | 0,193  | 0,0068 | 0,821  | 0,1250 | 0,381  | 0,0601 | 0,518  | 0,0213 | 1,094  | 0,0110 | 0,578  | 0,0110 | 0,679  | 0,0170 |
| MG10           | 0,140  | 0,0179 | 0,141  | 0,0266 | 0,160  | 0,0102 | 0,173  | 0,0053 | 0,157  | 0,0091 | 0,170  | 0,0030 | 0,242  | 0,0106 | 0,205  | 0,0091 | 0,233  | 0,0185 |
| FS09           | 0,240  | 0,0382 | 0,190  | 0,0449 | 0,209  | 0,0068 | 0,874  | 0,0635 | 0,515  | 0,0271 | 0,194  | 0,0140 | 0,186  | 0,0110 | 0,198  | 0,0213 | 0,247  | 0,0106 |
| FS11A          | 0,177  | 0,0044 | 0,187  | 0,0068 | 0,154  | 0,0346 | 0,265  | 0,0110 | 0,175  | 0,0081 | 0,180  | 0,0170 | 0,194  | 0,0536 | 0,191  | 0,0061 | 0,194  | 0,0106 |
| T.reesei       | 0,168  | 0,0089 | 0,172  | 0,0230 | 0,228  | 0,0267 | 0,212  | 0,0122 | 0,182  | 0,0030 | 0,171  | 0,0220 | 0,215  | 0,0106 | 0,226  | 0,0346 | 0,170  | 0,0213 |

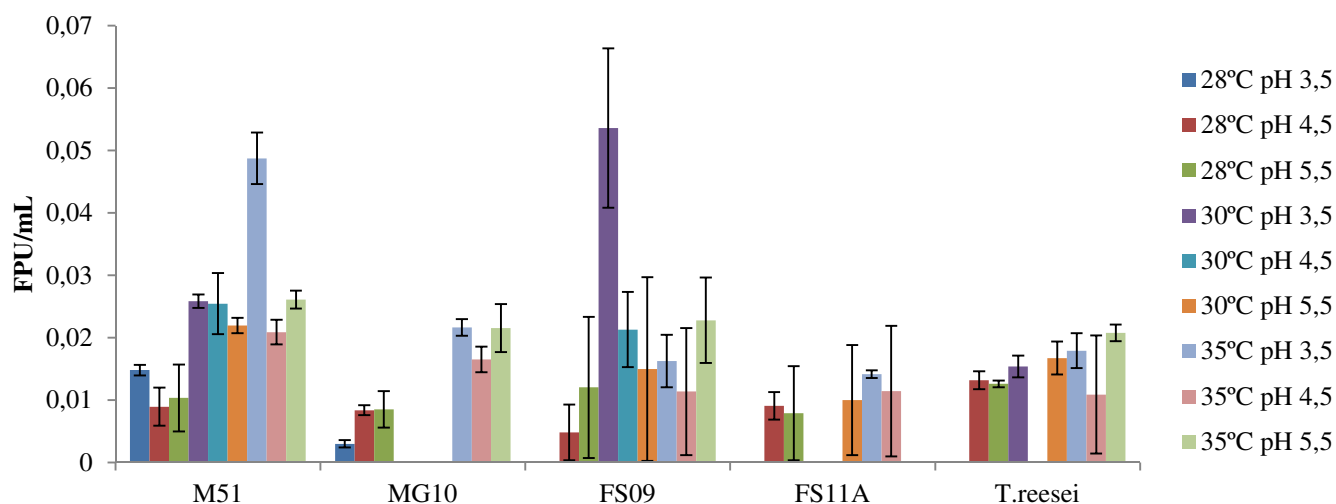


Figura 5.5: As atividades enzimáticas volumétricas para a técnica de FPase (FPU/mL) dos 4 microrganismos previamente selecionado mais o *T.reesei* CCT 2768.

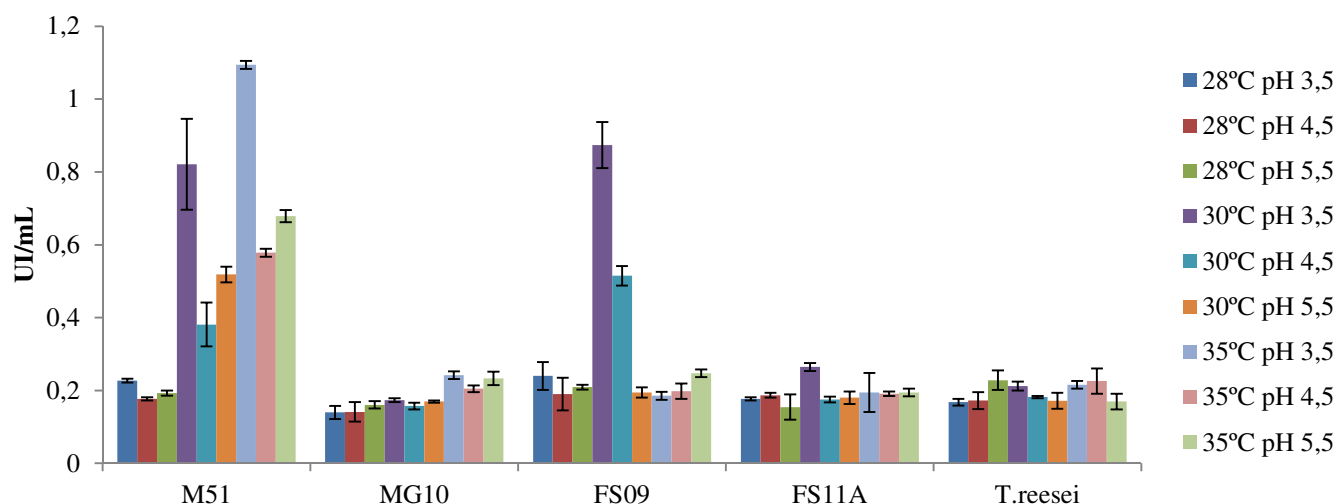


Figura 5.6: As atividades enzimáticas volumétricas para a técnica de CMCase (UI/mL) dos 4 microrganismos previamente selecionado mais o *T.reesei* CCT 2768.

Como se pode observar, contrariamente ao apresentado na primeira etapa deste trabalho (Tabela 5.1 e figura 5.3), o fungo que apresentou maior atividade enzimática para a técnica de FPase nesta segunda fermentação foi o FS09 com 0,054 FPU/mL em 30°C e pH 3,5, seguido pelo M51 com 0,049 FPU/mL em 35°C e pH 3,5, porém sem diferença estatísticas (ANOVA  $F=15,83$  e Tukey  $p>0,05$ ). Ambos foram muito superiores aos maiores valores do MG10A (0,022 FPU/mL em 35°C e pH 5,5) e *T.reesei* CCT 2768 (0,021 FPU/mL em 35°C e pH 5,5) (ANOVA  $F=15,83$  e Tukey  $p<0,05$ ) (Tabela 5.2 e figura 5.5). Resultados bem superiores foram apresentados por Sun et al.(2008), que trabalhando com uma linhagem mutante do *Trichoderma reesei* RUT C-30 e usando como fonte de carbono o pó de palha de arroz conseguiram uma atividade enzimática de 0,71FPU/mL, utilizando substrato sem pré-tratamento, contudo utilizando o mesmo microrganismo. Porém, com substrato pré-tratado com NaOH 10%, a atividade enzimática subiu para 1,07 FPU/mL. Estes valores são compreensíveis, devido à constituição deste substrato, já que a palha de arroz possui em sua estrutura uma menor concentração de lignina quando comparada a do bagaço de cana, 17,2% para 25,2%, respectivamente (PANDEY et al., 2000; TAMANINI & HAULY, 2004; BOFO, 2005). Essa diferença pode resultar em maior facilidade de acesso dos fungos à celulose, e assim induzir um melhor crescimento e produção do extrato enzimático. Basso et al. (2010), trabalhando com *Trichoderma reesei* QM9414 cultivado em bagaço de cana a 28°C, conseguiram em 15 dias de cultivo 0,2 de FPU/mL para FPase, valores estes compreensíveis visto que, o tempo de cultivo foi muito superior ao utilizado neste trabalho, que foi de apenas 5 dias de cultivo. Resultados bem superiores foram apresentados por Delabona et al., (2012)

que, ao trabalharem com 72 horas de fermentação submersa, conseguiram uma atividade de FPase de 0,85 FPU/mL utilizando o fungo *T.harzianum* P49P11. Porém além do bagaço de cana-de-açúcar, neste meio de cultivo foi adicionado sacarose, o que pode ter fornecido um auxílio no início do processo fermentativo como fonte de carbono. E neste mesmo trabalho, quando trabalharam em biorreator (1,5L) e bagaço tratado com NaOH, em pH 6,0, a FPase subiu para 0,95 FPU/mL, para o mesmo microrganismo.

Ribeiro (2010), utilizando bagaço de caju tratado alcalinamente (NaOH 1M) e *Trichoderma reesei* ATCC 2768, conseguiram resultados não muito superiores ao apresentado neste trabalho. As máximas atividades obtidas foram de 0,074UI/mL e 1,337 UI/mL de FPase e CMCase, respectivamente. O trabalho de isolamento de fungos celulolíticos a partir da estação ecológica de Juréia-Itatins (SP) feito por Ruegger et al. (2004) mostrou resultados ligeiramente inferior ao apresentado neste trabalho, sendo que os microrganismos que apresentaram maiores valores de atividade celulolítica FPase foram o *Scopulariopsis carbonaria* com 0,023 FPU/mL, seguido pelo *Penicillium decumbens* com 0,021FPU/mL, e foi utilizado para o cultivo desses microrganismos um meio farelo de trigo.

Um ponto interessante que vale ressaltar é em relação ao fungo MG10A que em um primeiro momento mostrou-se o mais promissor microrganismo para produção do extrato celulolítico, apresentando atividade de 0,1190 FPU/mL na temperatura de 30°C e pH 5,5. Contudo, para as mesmas condições de trabalho, a atividade caiu para 0. Isso pode ter acontecido devido a alguma mutação sofrida por este microrganismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

As endoglucanases são enzimas que hidrolisam aleatoriamente as ligações  $\beta 1 \rightarrow 4$  D-glicosídicas internas (DASHTBAN et al., 2010) e ao analisar a atividade dessas enzimas, pela técnica de CMCase (Tabela 5,3 e figura 5,6), observa-se que os melhores resultados, seguiram o padrão da técnica FPase, contudo com valores invertidos, ou seja, o fungo com o maior atividade foi o M51 com 1,094 U/mL na temperatura de 35°C e pH 5,5, seguido do FS09 com 0,874 U/mL na temperatura de 30°C e pH 3,5, contudo desta vez, apesar de pequena a diferença entre eles, foi significativa para  $p < 0,01$  (ANOVA  $F=342,51$ ). E ambos os fungos apresentaram um valor muito superior ao maior valor de *T.reesei* (CCT 2768) (0,228 U/mL em 28°C e pH 5,5) (ANOVA  $F=342,51$  e Tukey  $p < 0,001$ ). Ribeiro (2010) conseguiu resultados de endoglucanase (1,337 U/mL) não muito superior aos obtidos neste trabalho (1,094 U/mL), mesmo trabalhando com uma fonte lignocelulolítica pré-tratada de bagaço de caju e *Trichoderma reesei* ATCC 2768. Já no trabalho de Basso et al., (2010) utilizando o



fungo *Trichoderma reesei* QM9414 conseguiram 0,5 U/mL para CMCase, bem inferior ao apresentado neste trabalho que o maior valor foi de 1,094U/mL para mesma técnica.

O mesmo aconteceu nos fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins em São Paulo (RUEGGER et al., 2004), em que obtiveram, em relação a atividade das endoglucanases, valores superiores em que o maior valor foi de 1,64U/mL para o *Trichoderma harzianum* V, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo. Ressalta-se que para a hidrólise de biomassa lignocelulósica deve ser considerada a necessidade de um complexo celulolítico, que terá que agir em sinergismo para hidrolisar essa biomassa, pois sua conversão enzimática em glicose é difícil tendo em vista a natureza física do substrato, que é composta de fibras cristalinas insolúveis de celulose mantidas unidas por pontes de hidrogênio, e são enterradas em uma matriz de hemicelulose e lignina (COELHO et al., 2001; PANDEY et al., 2000). Devido essa estrutura complexa das biomassas lignocelulósicas, as enzimas tem uma difícil acessibilidade ao substrato (BÉGUIN, 1990). Ao avaliar a existência de diferentes enzimas deste complexo celulolítico, pode-se propor biotecnologias para converter a biomassa em carboidratos fermentescíveis, ao sugerir a utilização de diferentes extratos celulolíticos simultaneamente, como por exemplo, ao indicar a utilização dos extratos dos microrganismos M51 e FS09, estudados neste trabalho e produzidos em diferentes condições de cultivo, que poderão agir em sinergismo para degradar uma biomassa lignocelulósica.

Quando comparada à atividade específica, (Tabelas 5.4 e 5.5, e figuras 5.7 e 5.8) entre os fungos destacou-se o FS09, que apresentou a maior atividade em ambas as técnicas (FPase e CMCase). Para a técnica de FPase o maior valor apresentado por este fungo foi de 535,28 FPU/g de proteína (35°C e pH 3,5), sendo superior aos maiores valores apresentado pelos outros microrganismos, inclusive o *T.reesei* CCT 2768 (Tabela 5.3 e figura 5.7) (ANOVA F= 6,003 e Tukey p<0,05).

**Tabela 5.4:** Atividade Específica para a técnica de FPase (FPU/g de proteínas) dos microrganismos selecionados, nas fermentações a 28, 30 e 35°C e pHs 3,5; 4,5 e 5,5, por cultivo no meio a base de bagaço de cana em 5 dias em incubadora com agitação orbital.

|          |  | FPase (FPU/g de proteína) |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |        |        |        |        |       |        |       |
|----------|--|---------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|
|          |  | 28°C                      |       |        |       |        |       | 30°C   |       |        |       |        |        | 35°C   |        |        |       |        |       |
|          |  | pH 3,5                    |       | pH 4,5 |       | pH 5,5 |       | pH 3,5 |       | pH 4,5 |       | pH 5,5 |        | pH 3,5 |        | pH 4,5 |       | pH 5,5 |       |
| Micror   |  | média                     | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD   | média  | ± SD   | média  | ± SD  | média  | ± SD  |
| M51      |  | 212,52                    | 11,47 | 135,69 | 49,03 | 176,29 | 45,12 | 141,00 | 11,37 | 203,13 | 61,64 | 122,37 | 7,05   | 163,28 | 10,17  | 185,64 | 23,07 | 155,70 | 8,87  |
| MG10     |  | 145,22                    | 6,17  | 152,23 | 33,60 | 143,77 | 65,16 | 0,00   | 0,00  | 0,00   | 0,00  | 0,00   | 0,00   | 240,87 | 94,74  | 176,96 | 85,02 | 113,57 | 19,52 |
| FS09     |  | 0,00                      | 0,00  | 16,91  | 29,29 | 77,45  | 71,48 | 122,39 | 8,60  | 112,00 | 30,56 | 94,91  | 103,51 | 535,28 | 180,01 | 81,76  | 74,69 | 111,33 | 34,21 |
| FS11A    |  | 0,00                      | 0,00  | 64,43  | 8,53  | 27,80  | 48,15 | 0,00   | 0,00  | 0,00   | 0,00  | 33,56  | 58,05  | 166,37 | 14,10  | 98,77  | 89,83 | 0,00   | 0,00  |
| T.reesei |  | 0,00                      | 0,00  | 107,07 | 6,36  | 76,65  | 3,61  | 222,13 | 8,22  | 47,32  | 81,96 | 135,73 | 12,01  | 232,50 | 75,91  | 70,26  | 61,02 | 92,67  | 7,19  |

**Tabela 5.5:** Atividade Específica para a técnica de CMCase (U/g de proteínas) dos microrganismos selecionados, nas fermentações a 28, 30 e 35°C e pHs 3,5; 4,5 e 5,5, , por cultivo no meio a base de bagaço de cana em 5 dias em incubadora com agitação orbital.

|          |  | CMCase (U/g de proteína) |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |        |        |       |        |       |
|----------|--|--------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|
|          |  | 28°C                     |       |        |       |        |       | 30°C   |       |        |       |        |       | 35°C   |        |        |       |        |       |
|          |  | pH 3,5                   |       | pH 4,5 |       | pH 5,5 |       | pH 3,5 |       | pH 4,5 |       | pH 5,5 |       | pH 3,5 |        | pH 4,5 |       | pH 5,5 |       |
| Micror   |  | média                    | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD  | média  | ± SD   | média  | ± SD  | média  | ± SD  |
| M51      |  | 3258,8                   | 212,1 | 2054,1 | 249,8 | 1875,3 | 178,7 | 4454,1 | 500,8 | 3025,8 | 804,3 | 2886,9 | 46,0  | 3672,9 | 171,8  | 2280,5 | 69,5  | 4052,7 | 278,1 |
| MG10     |  | 2089,1                   | 324,0 | 1761,4 | 113,2 | 1965,0 | 519,1 | 1977,4 | 282,6 | 2434,9 | 125,8 | 2134,1 | 339,2 | 2679,2 | 1010,2 | 1417,3 | 781,9 | 1229,5 | 97,4  |
| FS09     |  | 1906,9                   | 414,2 | 1210,7 | 337,4 | 1426,1 | 113,9 | 2067,5 | 504,0 | 2709,7 | 152,1 | 1139,7 | 98,7  | 6010,0 | 468,8  | 1335,6 | 230,2 | 1207,1 | 26,4  |
| FS11A    |  | 1076,1                   | 84,0  | 1002,6 | 259,7 | 936,7  | 189,3 | 2457,6 | 395,1 | 1508,3 | 77,5  | 863,3  | 746,7 | 2302,3 | 724,3  | 1090,5 | 582,7 | 1963,7 | 235,2 |
| T.reesei |  | 1114,8                   | 43,2  | 910,8  | 128,6 | 1379,6 | 40,5  | 3086,4 | 411,6 | 1791,8 | 133,0 | 1393,8 | 136,1 | 2748,8 | 471,9  | 1077,9 | 296,7 | 757,3  | 103,0 |

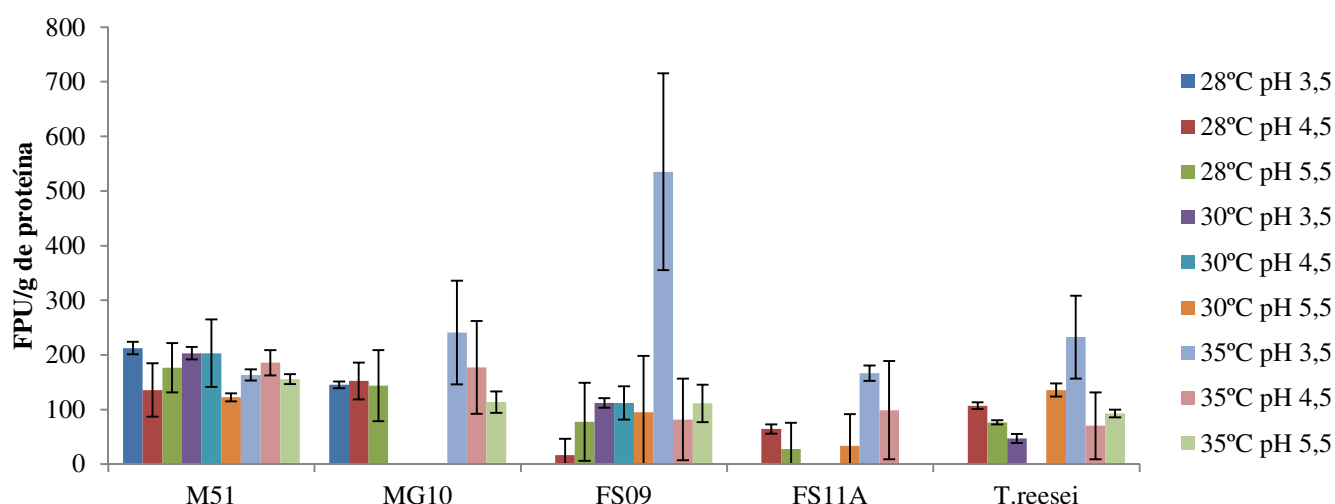


Figura 5.7: As atividades específica para a técnica de FPase (FPU/g de proteínas) dos 4 microrganismos previamente selecionado mais o *T.reesei* CCT 2768.

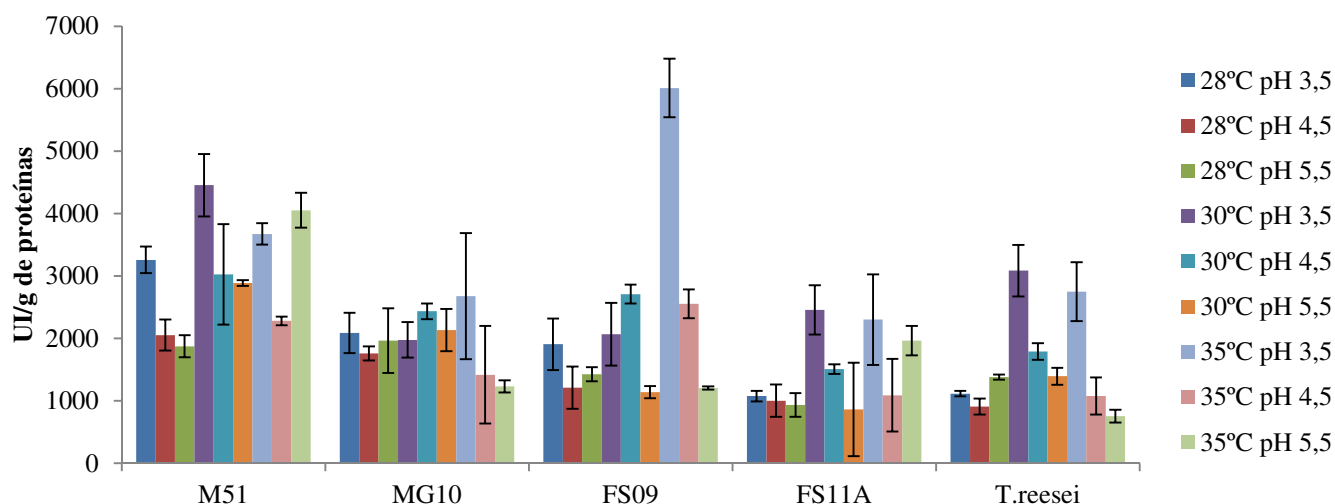


Figura 5.8: As atividades específicas para a técnica de CMCase (U/mL) dos 4 microrganismos previamente selecionado mais o *T.reesei* CCT 2768.

Quando analisado a atividade específica pela técnica CMCase, observa-se um resultado semelhante ao demonstrado pela FPase, nas mesmas condições de temperatura e pH, em que o fungo FS09 foi superior aos demais, obtendo uma atividade de 6010,0 U/g de proteína (35°C e pH 3,5), seguido pelo M51 com 4454,1 U/g de proteína (30°C e pH 3,5), contudo, ambos sem diferença estatística para  $p > 0,05$  (ANOVA  $F=17,63$ ). Estes resultados são interessantes, pois uma alta atividade específica demonstra uma maior produção de enzimas hidrolíticas de interesse (PESSOA-Jr, 2008) Isso poderia ser aplicado quando se objetivar a purificar e separar essas proteínas no extrato fúngico, ou seja, uma alta concentração de proteínas com a atividade enzimática de interesse facilitaria no momento de purificação, diminuindo assim os custos e as etapas deste processo.

As atividades enzimáticas por grama de substrato em peso seco, para ambas as técnicas, FPase (FPU/ g de substrato) e CMCase (U/g de substrato), estão apresentadas na Tabela 5.6 e figuras 5.9 e 5.10. Esta forma de analisar a atividade celulolítica apresentada para os extratos fúngico desses microrganismos, resulta em um rendimento mais real do processo de produção enzimática, já que é dado o potencial de produção desta enzima por grama de substrato ofertado durante a fermentação, assim temos um valor mais verdadeiro dos possíveis custos para a produção deste complexo enzimático.

**Tabela 5.6:** Atividade Enzimática por grama de substrato (FPU/g substrato e U/g substrato) dos microrganismos selecionados mais o *T.reesei* CCT 2768 – Fermentações a 28, 30 e 35°C, nos pH 3,5; 4,5 e 5,5.

| FPase (FPU/g de substrato) e CMCase (UI/g de substrato) |             |           |             |           |             |           |             |           |             |           |             |           |             |           |             |           |             |           |
|---------------------------------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|
| 28°C                                                    |             |           |             |           |             |           | 30°C        |           |             |           |             |           | 35°C        |           |             |           |             |           |
| pH 3,5                                                  |             | pH 4,5    |             | pH 5,5    |             | pH 3,5    |             | pH 4,5    |             | pH 5,5    |             | pH 3,5    |             | pH 4,5    |             | pH 5,5    |             |           |
| Micror                                                  | FPU/g subst | U/g subst | FPU/g subst | U/g subst | FPU/g subst | U/g subst | FPU/g subst | U/g subst | FPU/g subst | U/g subst | FPU/g subst | U/g subst | FPU/g subst | U/g subst | FPU/g subst | U/g subst | FPU/g subst | U/g subst |
| M51                                                     | 0,49        | 7,56      | 0,38        | 5,89      | 0,61        | 6,43      | 0,86        | 27,37     | 0,85        | 12,70     | 0,73        | 17,28     | 1,62        | 36,47     | 0,70        | 19,27     | 0,87        | 22,62     |
| MG10                                                    | 0,32        | 4,66      | 0,40        | 4,71      | 0,38        | 5,35      | 0,00        | 5,77      | 0,00        | 5,25      | 0,00        | 5,66      | 0,72        | 8,06      | 0,55        | 6,83      | 0,72        | 7,77      |
| FS09                                                    | 0,00        | 8,00      | 0,09        | 6,33      | 0,40        | 6,97      | 1,79        | 29,13     | 0,71        | 17,16     | 0,49        | 6,48      | 0,54        | 6,19      | 0,38        | 6,60      | 0,76        | 8,24      |
| FS11A                                                   | 0,00        | 5,89      | 0,41        | 6,23      | 0,15        | 5,15      | 0,00        | 8,83      | 0,00        | 5,83      | 0,33        | 6,01      | 0,47        | 6,48      | 0,38        | 6,36      | 0,00        | 6,48      |
| T.reesei                                                | 0,00        | 5,59      | 0,68        | 5,74      | 0,42        | 7,61      | 0,51        | 7,07      | 0,00        | 6,07      | 0,56        | 5,72      | 0,60        | 7,18      | 0,36        | 7,54      | 0,69        | 5,66      |

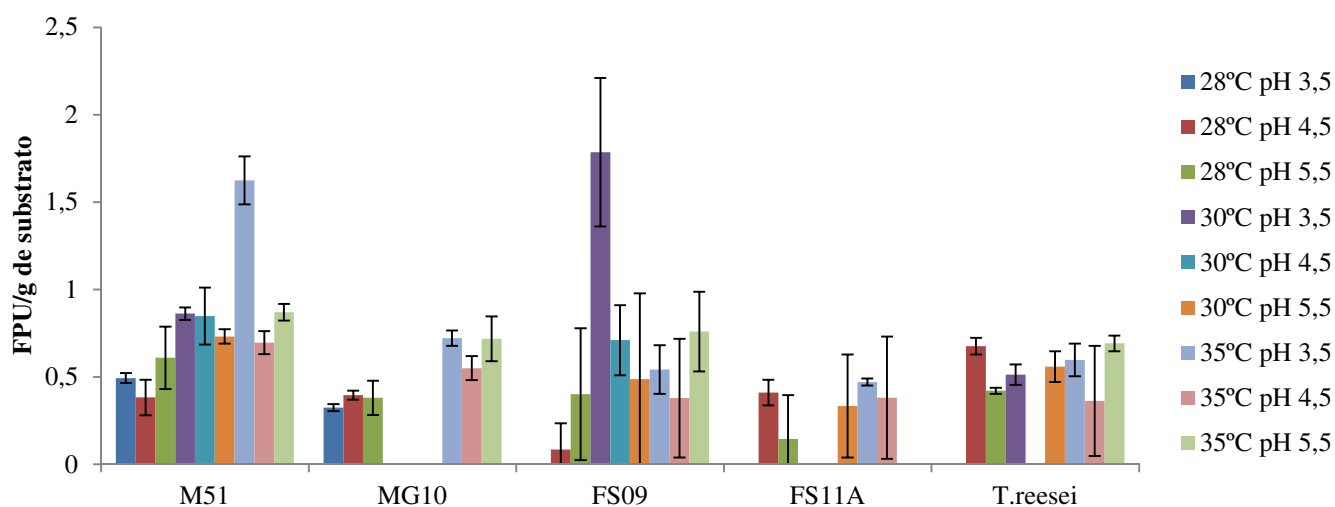


Figura 5.9: Atividade enzimática por grama de substrato, para técnica de FPase, dos extratos 4 melhores microrganismos mais o *T.reesei* CCT 2768, nas diferentes temperaturas e pHs de fermentação.

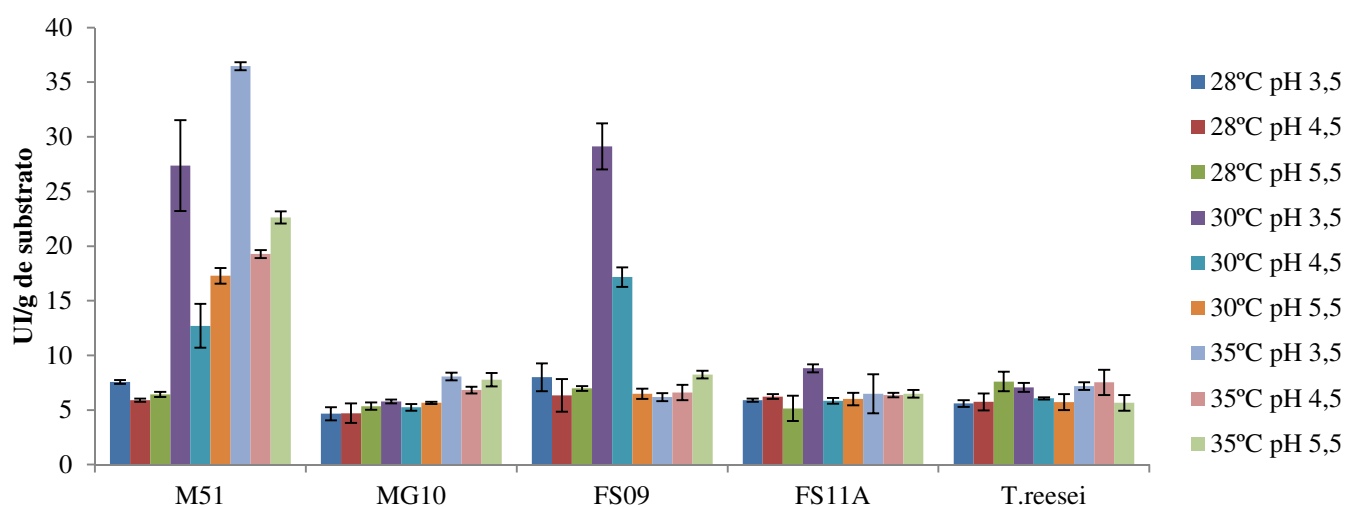


Figura 5.10: Atividade enzimática por grama de substrato, para técnica de CMCase, dos extratos 4 melhores microrganismos mais o *T.reesei* CCT 2768, nas diferentes temperaturas e pHs de fermentação.

As atividades celulolíticas por grama de substrato medida pela técnica de FPase foram mais elevadas nos extratos produzidos pelos fungos FS09 (1,79 FPU/g de substrato) e M51 (1,62 FPU/g de substrato), sendo muito superior a apresentada pelo *T. reesei* CCT 2768 (0,069 FPU/g de substrato) (ANOVA  $F=15,19$  e Tukey  $p<0,05$ ). No caso da CMCase, o fungo M51 obteve 36,46 U/g de substrato, mostrando-se neste caso superior ao o FS09 com 29,13 U/g de substrato, (ANOVA  $F=373,35$  e Tukey  $p<0,01$ ). Szakács et al., (2000), conseguiram um total de 7,0FPU/g substrato em peso seco, utilizando a linhagem selvagem de *Trichoderma hamatum* TUB F-105, tendo a fibra de milho como fonte de carbono e durante três dias de fermentação. Valor máximo de 31 FPU/g substrato seco foi obtido no mesmo trabalho quando utilizaram este substrato, porém com a linhagem selvagem supracitada e o *Trichoderma reesei* Rut C30, em 10 dias de incubação.

Vale ressaltar que no presente trabalho utilizou-se, como fonte de carbono para a fermentação, unicamente o bagaço *in natura*, ou seja, sem nenhum processo prévio de hidrólise, visando o mínimo custo de produção. Este fato pode ter dificultado o acesso dos fungos ao carbono.

Contudo os resultados apresentados neste trabalho foram muito superiores quando comparados ao do Farinas et al., (2008) que utilizaram o bagaço de cana como substrato e produziram celulasas com *Aspergillus niger*, e verificaram 1 FPU/g e valores abaixo de 2 U CMCase/g de substrato seco. No presente trabalho, com as linhagens FS09 e M51 obteve-se, respectivamente, 1,79 FPU/g para FPase e 36,46 U/g de substrato seco para CMCase.

De uma forma geral, os resultados obtidos nesta etapa do trabalho mostraram-se bastante promissores, dado que os parâmetros operacionais relevantes no processo de incubação como temperatura, aeração, formulação do meio, tempo de fermentação e até um possível pré-tratamento do substrato poderão ainda serem otimizados. Por exemplo, o bagaço de cana pré-hidrolisado, o estudo da fonte de nitrogênio, os parâmetros de processo poderão potencializar o crescimento fúngico, com consequente aumento da concentração de enzimas celulolíticas.

## **5.2. Caracterização da enzima comercial livre estudada: ROHAMENT® CL-ABEnzyme**

Para a caracterização da enzima comercial na sua forma livre foram investigadas a atividade enzimática pela técnica da FPase e a concentração total de proteínas, determinando assim a atividade volumétrica (FPU/mL) e a atividade específica (FPU/g de proteína), nas concentrações de 3, 5, 12 e 20% (v/v), nas temperaturas de 40 e 50°C e em pH 5,6. A Tabela

5.7 fornece os valores das atividades enzimáticas volumétricas e específicas nas respectivas concentrações.

**Tabela 5.7:** Valores das atividades enzimáticas (FPU/mL) e específica (FPU/g de proteína) da enzima livre em diferentes concentrações (3, 5, 12 e 20% – v/v), nas temperaturas de 40 e 50°C em pH 5,6.

| Concentração de enzima (%) (v/v) | Concentração de proteínas <sup>a</sup> (g/mL x 10 <sup>-4</sup> ) | 40°C <sup>b</sup> |       | 50°C <sup>b</sup> |        |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------|-------|-------------------|--------|
|                                  |                                                                   | FPU/mL            | FPU/g | FPU/mL            | FPU/g  |
| 3                                | 13,83                                                             | 0,1255            | 90,75 | 0,3401            | 245,95 |
| 5                                | 37,43                                                             | 0,1681            | 44,93 | 0,4389            | 117,28 |
| 12                               | 77,89                                                             | 0,3798            | 48,76 | 0,6114            | 78,50  |
| 20                               | 92,71                                                             | 0,4562            | 49,21 | 0,6762            | 72,94  |

<sup>a</sup> Concentração total determinada pela técnica de Bradford (item 4.2.7);

<sup>b</sup> Atividade enzimática realizada pela técnica de PFase (item 4.2.5).

Observa-se que os valores para a atividade enzimática e específica foram maiores a 50°C, isso demonstra que esta enzima tem uma atividade ótima de reação mais próxima a esta temperatura. Como se pode observar na Tabela 5.8, ocorreu uma queda de mais de 65%, no caso da concentração de 20% (v/v), para a atividade volumétrica (FPU/mL), quando se compara a atividade em ambas as temperaturas. De tal modo, decidiu-se continuar o trabalho, utilizando-se nos demais ensaios de atividade enzimática, a temperatura de 50°C.

**Tabela 5.8:** Valores em porcentagem da queda de atividade enzimática (FPU/mL) em relação a diferença de temperatura.

| Concentração de enzima (%) (v/v) | % de queda de FPU/mL de 50 para 40°C |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| 3                                | 36,90                                |
| 5                                | 38,31                                |
| 12                               | 62,11                                |
| 20                               | 67,47                                |

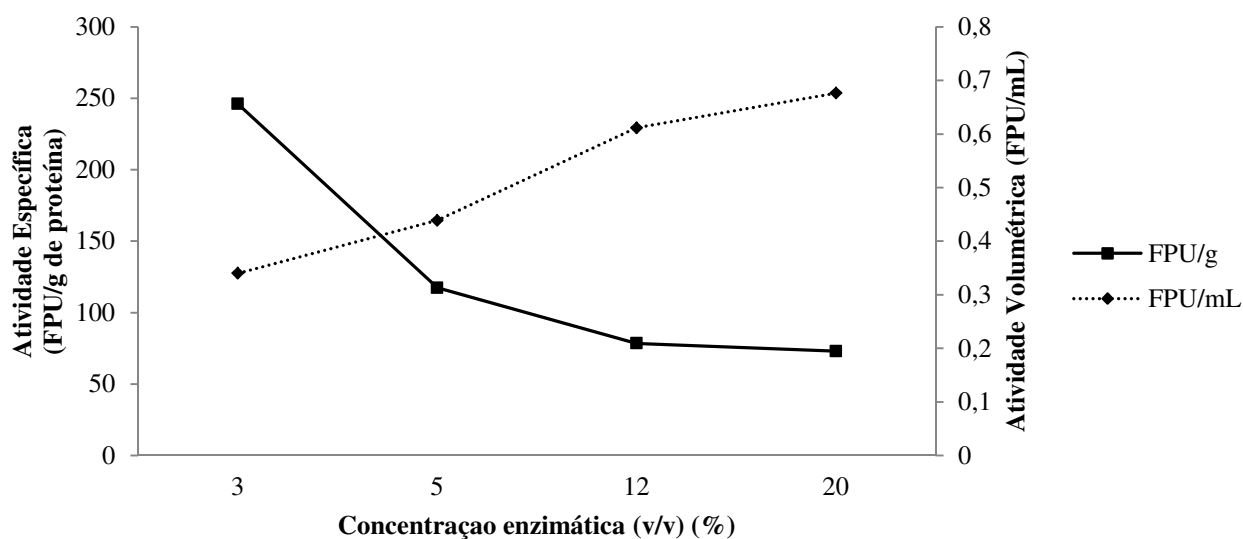


Figura 5.11: Atividade enzimática volumétrica e atividade específica das concentrações enzimáticas – 3, 5, 12 e 20% a temperatura de 50°C de reação.

Um importante dado deve ser observado com relação à pureza desta enzima: quando se eleva a concentração da solução enzimática, o que se desejava era um aumento proporcional de sua atividade. Contudo como se nota, ao elevar a concentração enzimática, por exemplo, de 5 para 20%, ou 4 vezes, ocorreu um aumento de aproximadamente 2,5 vezes na concentração de proteína (Tabela 5.7). Para uma concentração de 3% (v/v) a 50°C, a atividade específica foi de 245,95 FPU/g de proteína, enquanto a 20% (v/v) foi de apenas 72,94 FPU/g de proteína. Provavelmente houve uma interferência do extrato concentrado na técnica de medição de proteína, pois deveria haver um aumento proporcional do teor de proteína, utilizando-se o extrato mais concentrado, já que o veículo da diluição foi água deionizada. Outra hipótese seria a possível presença de inibidores presentes na solução original, e quando se diluiu esta solução, diluiu também estes possíveis inibidores elevando assim a atividade enzimática específica. Esta hipótese poderia explicar o comportamento da atividade enzimática (FPU/mL) onde ocorreu um aumento de apenas 2 vezes (Tabela 5.6) elevando-se a concentração de enzima de 3 para 20% (aumento de 6,66 vezes), o que pode ser devido a eficiência do biocatalisador operar de forma melhor com a enzima mais diluída.

### 5.3. Imobilização enzimática

#### 5.3.1. Imobilização da celulase comercial (1endo-1,4-β-glucanase) em peletes

Foi realizado o processo de imobilização e obtenção dos derivados com enzima comercial em peletes de acordo com a Tabela 4.1 Neste primeiro estudo, realizaram-se os protocolos: A, A', B e B' com posterior tratamento enzimático conforme descrito no item

4.2.4.4. A concentração de proteínas totais das soluções originais adicionadas ao suporte, bem como das soluções residuais do processo (incluindo a solução utilizada para descanso dos derivados após a imobilização), foi quantificada e, por diferença, determinou-se a quantidade de proteínas imobilizadas por grama de suporte, assim como o rendimento da imobilização (item 4.2.8.1 – equação 3) (Tabela 5.9).

**Tabela 5.9:** Quantidade de proteína imobilizada em peletes com tratamento enzimático (item 4.2.4.4), e Rendimento de proteína Imobilizada (RP).

| Derivados                                | Quantidade de proteína imobilizada (mg de proteína/grama de suporte)<br><sup>a</sup> | Rendimento de proteína Imobilizada (RP) (%) <sup>b</sup> |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>A (Alginato)</i>                      | 5,00                                                                                 | 48,81                                                    |
| <i>A' (Alginato - glut.)</i>             | 5,31                                                                                 | 51,96                                                    |
| <i>B (Alginato + quitosana)</i>          | 4,99                                                                                 | 48,64                                                    |
| <i>B' (Alginato + quitosana - glut.)</i> | 5,36                                                                                 | 52,44                                                    |

<sup>a</sup> Concentração de proteínas da solução ofertadas para cada suporte 1% (m/m), ou seja para cada 5g de suporte foi ofertado 0,05g de proteína, calculado por Bradford (item 4.2.7);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 1 (item 4.2.8.1).

Nestes protocolos de imobilização em peletes foram obtidos bons resultados de imobilização de proteínas visto que, para quase todos os derivados, obteve-se aproximadamente 50% de proteínas imobilizadas. O maior valor de proteína imobilizada e, conseqüentemente, maior quantia de celulase imobilizada por grama de suporte, foi o apresentado pelo derivado *B'* (5,36 mg de proteína/g de suporte), sendo este produzido por um gel híbrido de alginato de cálcio e quitosana tratados com glutaraldeído a 0,5%. Contudo não muito distante do derivado *B* (4,99 mg de proteína/g de suporte), o menor valor apresentado (Tabela 5.8).

Para estes protocolos de imobilização foram preparados dois diferentes tipos de derivados em forma de peletes, aqueles compostos somente com alginato de cálcio, tratado ou não com glutaraldeído a 0,5%, e peletes formados pelos hidrogéis, tratados ou não com glutaraldeído a 0,5% (Tabela 4.1). A Tabela 5.10 apresenta os parâmetros de imobilização para estes derivados de celulasas obtidos.



**TABELA 5.10:** Atividade por grama de suporte (FPU/g de suporte), Rendimento de Atividade Imobilizada (RAI) e Rendimento da Atividade Recuperada (AR) e Atividade Perdida (AP), para os protocolos com posterior tratamento enzimático (item 4.2.4.4).

| Derivados                                | FPU/g de sup.      | RI <sup>b</sup> (%) | AR <sup>c</sup> (%) | AP <sup>d</sup> (%) |
|------------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Solúvel (5%)</i>                      | 0,438 <sup>a</sup> | 100,00              | 100,00              | -                   |
| <i>A (Alginato)</i>                      | 0,134              | 15,42               | 76,01               | 3,70                |
| <i>A' (Alginato - glut.)</i>             | 0,093              | 51,52               | 15,91               | 43,32               |
| <i>B (Alginato + quitosana)</i>          | 0,080              | 13,59               | 51,43               | 6,60                |
| <i>B' (Alginato + quitosana - glut.)</i> | 0,086              | 13,48               | 55,69               | 5,97                |

<sup>a</sup> Atividade enzimática (FPU/mL) da solução enzima (5%);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 2 (item 4.2.8.2);

<sup>c</sup> Cálculo efetuado através da equação 3 (item 4.2.8.3);

<sup>d</sup> Cálculo efetuado através da equação 4 (item 4.2.8.4).

Pode-se observar que os derivados *A* e *A'* apresentaram os maiores valores de FPU por grama de suporte, com 0,134 e 0,093 FPU/g de suporte, respectivamente, contra 0,080 e 0,086 FPU/g de suporte, para *B* e *B'*, respectivamente.

Apesar de ter demonstrado uma melhora do Rendimento de Imobilização (RI – item 4.2.8.2), quando foi tratado com glutaraldeído (0,5% - v/v), devido, principalmente, ao seu mecanismo de ação em fazer crosslinking tanto entre enzima-enzima e enzima-suporte (MIGNEAULT et al., 2004), observa-se que a Atividade Recuperada destes derivados (AR – item 4.2.8.3), foi de 15,91% do *A'* contra 76,01% do *A*. Este processo refletiu, não somente na atividade por grama de substrato, como também na Atividade Perdida (AP – item 4.2.8.4), em que os derivados *A* apresentaram apenas 3,70% de atividade perdida, para 43,32% no *A'* (Tabela 5.9). Essa perda de atividade pode ter sido causada por várias razões, mas é bastante presumível que tenha ocorrido algum dano na estrutura da enzima durante o processo de imobilização, devido, sobretudo, à ação degradante do glutaraldeído sobre as enzimas. Por outro lado, o agente bifuncional pode ter induzido a enzima a ligar-se de várias formas ao suporte e assim, sua atividade pode ter sido afetada por uma ligação que tenha comprometido o sítio catalítico da molécula ou dificultado a sua disponibilidade para o substrato. Spagna et al., (1998) e Lopes, (2006) confirmam resultados degradantes deste agente bifuncional, quando afirmaram que vários compostos podem agir como inibidores enzimáticos, induzindo uma perda total ou parcial de sua atividade, que pode ser atribuída a diversos fatores, no qual cada enzima responde diferentemente a diferentes tratamentos químicos e físicos. Lima et al., (2007), trabalhando com a enzima aldeído desidrogenase, verificaram que o glutaraldeído utilizado como agente bifuncional em imobilização, desnaturou parcialmente a enzima. A natureza da enzima é a principal responsável pela ação desnaturante destes agentes. No caso, estudos mostram que enzimas ricas em lisina são mais resistentes à ação negativa do

glutaraldeído (BROUN, 1976). A concentração da enzima e do glutaraldeído devem ser cuidadosamente consideradas para se obterem derivados via crosslinking ativos. Baixas concentrações de enzima e do agente bifuncional tende a induzir ligações cruzadas intramolecular, ou seja, ocorrer ligações entre a mesma enzima (ZABORSKY, 1973), contudo a atividade enzimática é inversamente proporcional à concentração de glutaraldeído, no qual um excesso de crosslinking, ou ligação cruzada, pode resultar em uma distorção na estrutura da enzima (CHUI & WAN, 1997), e essa modificação conformacional pode induzir uma perda do sítio catalítico, reduzindo assim, a sua atividade enzimática.

Em uma segunda etapa de imobilização em peletes, o preparo dos derivados de celulasas foi com a enzima comercial já adicionada durante seu preparo (Tabela 4.1). A concentração de proteínas totais das soluções originais adicionadas ao suporte, bem como das soluções residuais do processo (incluindo a solução utilizada para descanso dos derivados após a imobilização), foi quantificada e, por diferença, determinou-se a quantidade de proteínas imobilizadas por grama de suporte, assim como o rendimento da imobilização (Tabela 5.11).

**Tabela 5.11:** Quantidade de proteína imobilizada em peletes com enzima já adicionada (item 4.2.4.3), e Rendimento de proteína Imobilizada (RP).

| Derivados                                | Quantidade de proteína imobilizada (mg de proteína/grama de suporte) <sup>a</sup> | Rendimento de enzima Imobilizada (RP) (%) <sup>b</sup> |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>A (Alginato)</i>                      | <b>11,91</b>                                                                      | <b>85,60</b>                                           |
| <i>A' (Alginato - glut.)</i>             | <b>11,99</b>                                                                      | <b>86,15</b>                                           |
| <i>B (Alginato + quitosana)</i>          | <b>12,01</b>                                                                      | <b>86,35</b>                                           |
| <i>B' (Alginato + quitosana - glut.)</i> | <b>12,04</b>                                                                      | <b>86,52</b>                                           |

<sup>a</sup> Concentração de proteínas da solução ofertadas para cada suporte 1% (m/m), ou seja para cada 5g de suporte foi ofertado 0,05g de proteína, calculado por Bradford (item 4.2.7);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 1 (item 4.2.8.1).

Nestes protocolos de imobilização em peletes com adição da enzima durante o preparo dos suportes, houve uma imobilização considerável visto que todos os derivados desta etapa obtiveram mais de 85% de rendimento de proteínas imobilizadas (RP) (Tabela 5.10).

Para os quatro diferentes derivados, a concentração de proteína por grama de suporte foi de aproximadamente 12 mg de proteína/g de suporte, que no caso foi de 2,4 vezes superior ao apresentado pela técnica de imobilização anterior (Tabela 5.9), na qual foi feito um tratamento enzimático após o preparo dos suportes.

Nestes protocolos de imobilização foram preparados dois diferentes tipos de derivados em forma de peletes (item 4.2.4.2): *A*, *A'*, *B* e *B'* (Tabela 4.1). Os resultados destas imobilizações estão apresentados na Tabela 5.12.

**TABELA 5.12:** Atividade por grama de suporte (FPU/g de suporte), Rendimento de Atividade Imobilizada (RI) e Rendimento da Atividade Recuperada (AR) e Atividade Perdida (AP), para os protocolos com adição da enzima durante a produção dos suportes (item 4.2.4.3).

| Derivados                                | FPU/g de suporte   | RI <sup>b</sup> (%) | AR <sup>c</sup> (%) | AP <sup>c</sup> (%) |
|------------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Solúvel (5%)</i>                      | 0,438 <sup>a</sup> | 100,00              | 100,00              | -                   |
| <i>A (Alginato)</i>                      | 0,1412             | 13,47               | 96,05               | 0,53                |
| <i>A' (Alginato - glut.)</i>             | 0,0771             | 13,53               | 52,21               | 6,47                |
| <i>B (Alginato + quitosana)</i>          | 0,1535             | 56,17               | 25,02               | 42,12               |
| <i>B' (Alginato + quitosana - glut.)</i> | 0,1723             | 55,39               | 28,49               | 39,61               |

<sup>a</sup> Atividade enzimática (FPU/mL) da solução enzima (5%);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 2 (item 4.2.8.2);

<sup>c</sup> Cálculo efetuado através da equação 3 (item 4.2.8.3);

<sup>d</sup> Cálculo efetuado através da equação 4 (item 4.2.8.4).

Para esta segunda etapa de imobilização envolvendo suportes no formato de peletes, pode-se observar que os derivados *B* e *B'* obtiveram maiores valores de FPU por grama de suporte, chegando a 0,1535 e 0,1723 FPU/g de suporte, respectivamente. Estes resultados foram no mínimo 1,2 vezes superiores ao de maior valor de atividade apresentados pelos derivados dos protocolos anteriores, sendo o maior com 0,134FPU/g de suporte (Tabela 5.10).

Neste caso, percebe-se que o glutaraldeído não auxiliou no aumento de rendimento de imobilização (RI – item 4.2.8.2) já que para ambos os derivados, tratados ou não com este agente bifuncional, os resultados de rendimento foram próximos (Tabela 5.12). Contrastando com o resultado apresentado anteriormente, para os protocolos *A* e *A'* (Tabela 5.10), em que pelo menos no Rendimento de Imobilização (RI) foi elevado pela utilização do glutaraldeído. O mesmo aconteceu com Cardias et. al. (1999) que, trabalhando com Penicilina G Acilase em sílica-glutaraldeído, obtiveram uma atividade relativa em torno de 70% superior ao não tratado, mostrando que a utilização deste agente bifuncional pode melhorar o rendimento de imobilização, e assim melhorar a atividade catalítica do derivado. Contudo, como já citado, diferentes enzimas possuem diferentes comportamentos perante esse agente de crosslinking (BROUN, 1976), ou mesmo uma concentração muito baixa perante o tipo de suporte pode não ser o suficiente para melhorar a imobilização (ZABORSKY, 1973).

Os protocolos a base dos géis híbridos conseguiram atingir um maior valor de Rendimento de Imobilização (RI – item 4.2.8.2) provavelmente devido à existência de grupamentos aminas livres reativos presentes na quitosana e assim apresentar uma maior afinidade por proteínas (MONTEIRO-JUNIOR, 1999). Como foi feito a adição da enzima comercial durante o preparo dos peletes, provavelmente foi facilitado o contato da enzima com a quitosana. Este processo pode ser o responsável por elevar o rendimento da imobilização (RI), o que não aconteceu nos protocolos anteriores, já que a enzima só foi adicionada aos suportes após seu preparo.

Porém, como é observável, a Atividade Recuperada (AR – item 4.2.8.3) para estes protocolos que utilizaram a quitosana ( $B = 28,49\%$  e  $B' = 25,02\%$ ), foram bem inferiores quando comparados aos derivados A e A' ( $A = 96,05\%$  e  $A' = 52,21\%$ ). Este evento provavelmente aconteceu devido à ligação da enzima aos grupamentos aminas da quitosana, a qual pode ligar-se de várias formas e assim, comprometer o sítio catalítico das celulasas imobilizadas, tendo a sua atividade afetada, ou mesmo pela baixa acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada (problemas difusionais), já que a enzima ativa pode ter sido imobilizada no interior dos peletes, devido ao processo de produção desses derivados.

Sendo assim, devido à cinética enzima/substrato, a enzima imobilizada pode não estar sendo governada apenas por interações entre enzima e substrato, mas pode também estar sendo limitada pela taxa de difusão do substrato à superfície do suporte, ou internamente, por entre os poros do suporte. Por este motivo, mesmo as celulasas estando imobilizadas ativamente no interior dos peletes de quitosana/alginato, não conseguem entrar em contato direto com o substrato da técnica FPase, devido a incapacidade destes penetrarem eficientemente nos poros destes hidrogéis.

Para os protocolos A e A' ocorreu uma diminuição da Atividade Recuperada quando tratados com o glutaraldeído (0,5% - v/v), podendo ser o mesmo problema enfrentado nos protocolos anteriores, em que o glutaraldeído, provavelmente tenha inibido a atividade enzimática.

Os possíveis problemas que afetaram a atividade recuperada refletiram na Atividade Perdida, mostrando que para os protocolos que utilizaram a quitosana, a atividade perdida foi de aproximadamente 40%, contra 6,47% para o derivado A' e de apenas 0,53% para o derivado A (Tabela 5.10). Martins (2007), ao imobilizar celulasas comerciais em hidrogéis de alginato/quitosana conseguiu como melhor resultado 42,2% de rendimento de imobilização e com atividade recuperada de 46,3%. Quando este mesmo autor trabalhou com hidrogéis

ativados com glutaraldeído, o resultado foi de 40,6% de rendimento de imobilização com 56,3% de atividade recuperada.

Após ter finalizado as imobilizações em peletes e preparo dos derivados, estes foram submetidos a testes de estabilidade através de ciclos da atividade celulolítica pela técnica FPase . Os resultados destes testes estão dispostos nas figuras 5.13 e 5.14, para ambos os protocolos de preparo dos derivados.

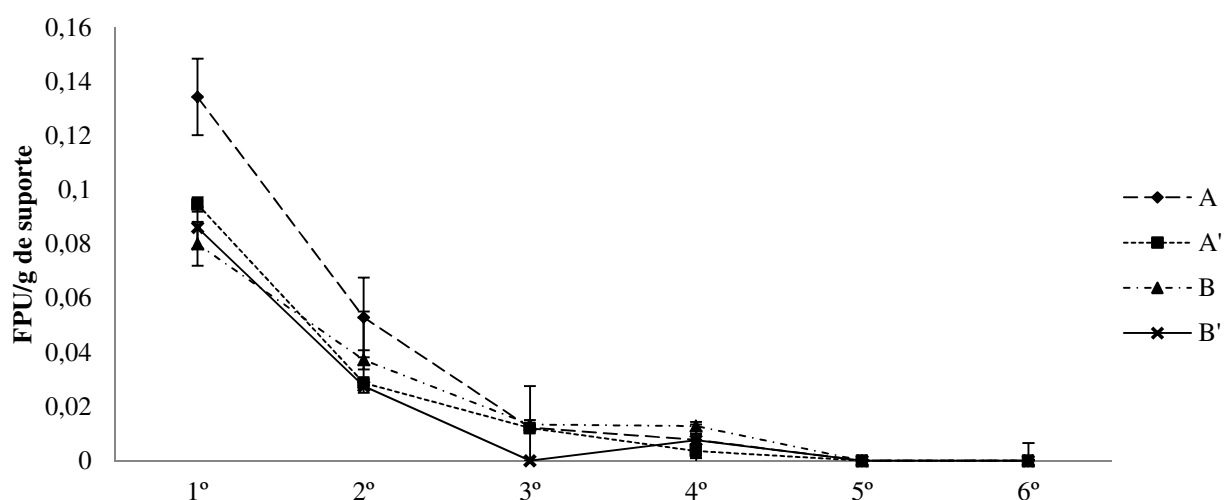


Figura 5.13: Reciclo das atividades enzimáticas dos derivados pela técnica FPase (50°C por 60 minutos) nos protocolos com posterior tratamento enzimático (item 4.2.4.4).

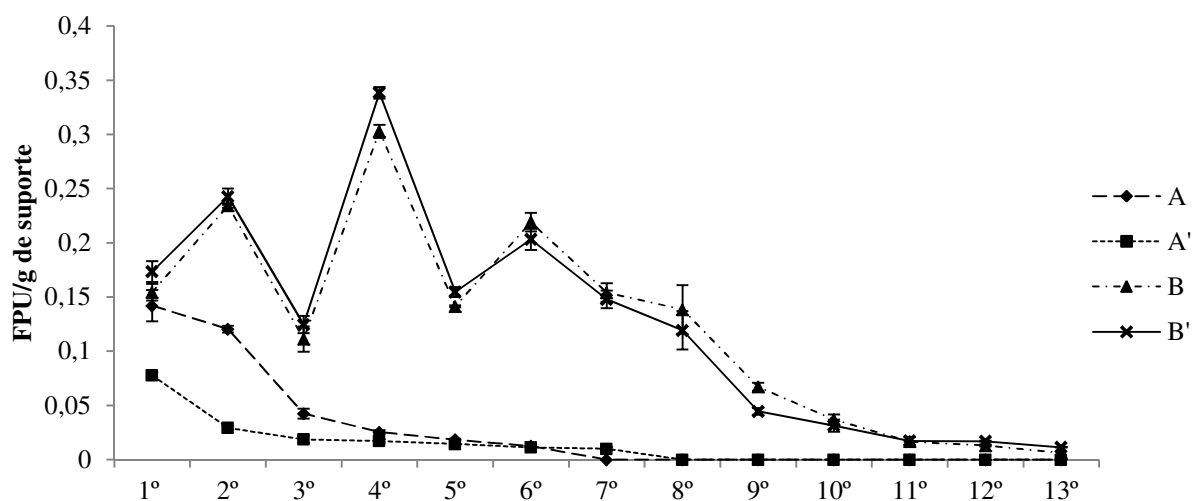


Figura 5.14: Reciclo das atividades enzimáticas dos derivados pela técnica FPase (50°C por 60 minutos), com suportes preparados já com a enzima adicionada (item 4.2.4.3).

Observa-se que a técnica de preparo dos derivados com suportes preparados já com a enzima adicionada conseguiram atingir uma estabilidade maior, ao longo de sucessivos ciclos de atividade celulolítica. Na Figura 5.14 mostra-se que foi conseguido até 12 reutilizações da enzima imobilizada para os derivados *B* e *B'*, enquanto os derivados do protocolo de preparo com posterior tratamento enzimático, a atividade celulolítica foi zerada já no 5º reciclo, para todos os derivados (Figura 5.13).

Cabe ressaltar, nestes casos, que em nenhum protocolo de produção dos derivados utilizando o glutaraldeído demonstrou um ganho em estabilidade (Figura 5.13 e 5.14).

O derivado *B* com enzima já adicionada apresentou o melhor resultado no final de suas reutilizações (Figura 5.14 – item 4.2.4.3), com um total somado em 13 ciclos foi de 1,59 FPU/g de suporte, e ao comparar com a enzima livre a 5% (0,4389 FPU/mL), pode-se dizer que este derivado teve aproximadamente 4 vezes mais atividade celulolítica do que a enzima livre.

Em outro cálculo, para produzir o derivado *B* foi ofertado 15,28 FPU Total (equivalente a 1% de proteína em relação ao peso final do suporte). Como foi preparado 15g de suporte, e após 13 ciclos obteve-se 1,59FPU/g de suporte, portanto conseguiu-se 23,85 FPU Total, com um saldo positivo de 8,57 FPU entre o que foi gasto para a imobilização e o que se obteve com a reutilização dos derivados. Sendo assim, conseguiu-se um aumento real de 56% da atividade celulolítica com o uso desta tecnologia de imobilização, isso sem considerar a enzima que não foi imobilizada, mas continua ativa no líquido residual e que poderá ser utilizada numa nova imobilização.

### **5.3.2. Testes preliminares de adsorção da enzima comercial (1endo-1,4- $\beta$ -glucanase) em zeólita e resina de troca iônica e poliestireno**

Testes preliminares para a adsorção da celulase comercial em diferentes agentes adsorventes foram realizados visando o melhor para que este fosse usado nos protocolos de imobilização em biofilmes de acordo com a Tabela 4.1, que no caso são os protocolos *E* e *E'*. A concentração de proteínas totais das soluções originais adicionadas ao suporte, bem como das soluções residuais do processo (incluindo a solução utilizada para descanso dos derivados após a imobilização) foi quantificada e, por diferença, determinou-se a quantidade de proteínas imobilizadas por grama de suporte, assim como o rendimento da imobilização (item 4.2.8.1 – equação 1) (Tabela 5.13).

**Tabela 5.13:** Quantidade de 1-endo-1,4- $\beta$ -glucanase adsorvidas pelos agentes adsorventes (item 4.2.4.5), e Rendimento de proteína Imobilizada (RP).

| Derivados                     | Quantidade de proteína adsorvida (mg de proteína/grama de suporte) <sup>a</sup> | Rendimento de proteína Imobilizada (RP) (%) <sup>b</sup> |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>Zeólita</i>                | 0,46                                                                            | 4,67                                                     |
| <i>Resina de troca iônica</i> | 0,97                                                                            | 9,75                                                     |
| <i>Poliestireno</i>           | 2,26                                                                            | 22,71                                                    |

<sup>a</sup> Concentração de proteínas da solução ofertadas para cada suporte 1% (m/m), ou seja para cada 1,5g de suporte foi ofertado 0,15g de proteína, calculado por Bradford (item 4.2.7);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 1 (item 4.2.8.1).

Nestes protocolos de adsorção para estes agentes os resultados foram insatisfatórios, em que o maior valor alcançado no rendimento de proteína imobilizada (RP) foi de 22,71%. Contrastando com os resultados observados quando se imobilizou essas proteínas em peletes, nos protocolos com posterior tratamento enzimático os valores chegaram a 50% de proteínas imobilizadas (Tabela 5.9), e alcançando mais de 80% quando a enzima já adicionada durante o preparo dos derivados (Tabela 5.13). Neste caso o maior valor de proteína por grama de suporte, foi o apresentado pelo poliestireno (2,26 mg de proteína/g de suporte) (Tabela 5.11).

Nestes testes preliminares de adsorção foram utilizados três diferentes suportes: zeólita, resina de troca iônica e o poliestireno, em que todos passaram pelos mesmos processos de tratamento enzimático. A Tabela 5.14 e figura 5.15 apresentam os parâmetros de imobilização para estes derivados de celulasas obtidos.

**TABELA 5.14:** Atividade por grama de suporte (FPU/g de suporte), Rendimento de Atividade Imobilizada (RAI) e Rendimento da Atividade Recuperada (AR) e Atividade Perdida (AP), para os protocolos com adsorção em diferentes agentes adsorventes (item 4.2.4.5).

| Derivados                     | FPU/g de sup.      | RI <sup>b</sup> (%) | AR <sup>c</sup> (%) | AP <sup>d</sup> (%) |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Solúvel (5%)</i>           | 0,438 <sup>a</sup> | 100,00              | 100,00              | -                   |
| <i>Zeólita</i>                | 0,1311             | 83,30               | 13,45               | 72,10               |
| <i>Resina de troca iônica</i> | 0,3182             | 33,34               | 81,57               | 6,14                |
| <i>Poliestireno</i>           | 0,1613             | 68,81               | 20,04               | 55,02               |

<sup>a</sup> Atividade enzimática (FPU/mL) da solução enzima (5%);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 2 (item 4.2.8.2);

<sup>c</sup> Cálculo efetuado através da equação 3 (item 4.2.8.3);

<sup>d</sup> Cálculo efetuado através da equação 4 (item 4.2.8.4).

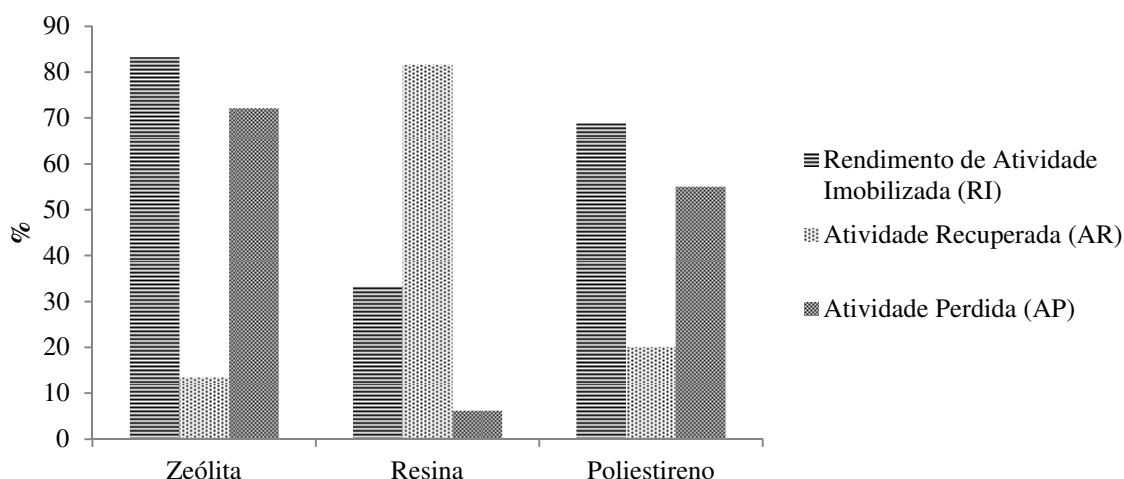


Figura 5.15: Rendimento de Atividade Imobilizada (RI) e Rendimento da Atividade Recuperada (AR) e Atividade Perdida (AP), para os protocolos com adsorção em diferentes agentes adsorventes (item 4.2.4.5).

Pode-se observar que os maiores valores de FPU por grama de suporte foi da resina de troca iônica, com 0,3182 FPU/g de suporte, sendo praticamente o dobro dos demais agentes adsorvente (Tabela 5.12).

O suporte zeólita e o poliestireno, apesar de terem apresentado melhores Rendimentos de Imobilização (RI – item 4.2.8.2) (83,30% e 68,81% respectivamente), suas Atividades Recuperada (AR – item 4.2.8.3) foram de apenas 13,45% para zeólita e de 20% para o poliestireno, refletindo tanto na Atividade Perdida (AP – item 4.2.8.4), como no FPU por grama de suporte. Sendo assim o melhor derivado em adsorção da celulase comercial foi à resina de troca iônica, que mesmo apresentando um RI de 33,34%, seu AR foi de 81,57%, que atuou diretamente na AP (6,14%) como no FPU/g de suporte (0,3182) (Tabela 5.14 e figura 5.15).

Desta forma, observa-se que os valores para a atividade enzimática dos derivados constituídos a partir da resina de troca iônica mostrou-se, neste primeiro momento, uma maior eficiência em adsorver a enzima comercial. Desta forma, decidiu-se utilizá-lo como agente adsorvente nos protocolos *E* e *E'* (Tabela 4.1 e item 4.2.4.3.5), objetivando-se uma melhora tanto na imobilização como na estabilidade da celulase comercial nos biofilmes.

### 5.3.3. Imobilização da celulase comercial (1endo-1,4- $\beta$ -glucanase) em biofilmes

O processo de imobilização e obtenção dos derivados em forma de biofilme foram realizados com enzima comercial de acordo com a Tabela 4.1, que neste caso, foram realizados os protocolos: *C*, *C'*, *D*, *D'* e *E*, *E'* com posterior tratamento enzimático conforme



descrito no item 4.2.4.4. A concentração de proteínas totais das soluções originais adicionadas ao suporte, bem como das soluções residuais do processo (incluindo a solução utilizada para descanso dos biofilmes após a imobilização), foi quantificada e, por diferença, determinou-se a quantidade de proteínas imobilizadas por grama de suporte, assim como o rendimento da imobilização (item 4.2.8.1 – equação 3) (Tabela 5.15).

**Tabela 5.15:** Quantidade de 1-endo-1,4- $\beta$ -glucanase imobilizadas em biofilmes com posterior tratamento enzimático (item 4.2.4.4), e Rendimento de proteína Imobilizada (RP).

| Derivados                                             | Quantidade de proteína imobilizada (mg de proteína/grama de suporte) <sup>a</sup> | Rendimento de proteína Imobilizada (RP) (%) <sup>b</sup> |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>C (Alginato)</i>                                   | 2,78                                                                              | 27,96                                                    |
| <i>C' (Alginato - glut.)</i>                          | 3,21                                                                              | 32,34                                                    |
| <i>D (Alginato + quitosana)</i>                       | 0,11                                                                              | 1,13                                                     |
| <i>D' (Alginato + quitosana – glut.)</i>              | 4,56                                                                              | 45,87                                                    |
| <i>E (Alginato + agente adsorvente <sup>c</sup>)</i>  | 1,49                                                                              | 15,05                                                    |
| <i>E' (Alginato + agente adsorvente <sup>c</sup>)</i> | 1,60                                                                              | 16,08                                                    |

<sup>a</sup> Concentração de proteínas da solução ofertadas para cada suporte 1% (m/m), ou seja para cada 5g de suporte foi ofertado 0,05g de proteína, calculado por Bradford (item 4.2.7);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 1 (item 4.2.8.1);

<sup>c</sup> Agente adsorvente determinado no item 5.3.2.

Nestes protocolos de imobilização em biofilmes obtiveram resultados de imobilização de proteínas abaixo da média, em que todos os valores foram abaixo de 50% de proteínas imobilizadas. O maior valor, por grama de suporte, foi o apresentado pelo biofilme *D'* (4,56 mg de proteína/g de suporte), chegando a 45,87% de Rendimento de Proteína (RP) sendo que este biofilme foi produzido por um gel híbrido de alginato de cálcio e quitosana tratados com glutaraldeído a 0,5% (Tabela 4.1), o que demonstra uma ação de crosslinking realizado por este agente bifuncional. Valor não muito distante foi verificado pelo biofilme *C'* (3,21mg de proteína/g de suporte), com 32,24% de RP (Tabela 5.15).

Para estes protocolos de imobilização em biofilmes foram preparados três diferentes tipos de derivados, aqueles compostos somente com alginato de cálcio, tratado ou não com glutaraldeído a 0,5%, os formados pelos hidrogéis (alginato de cálcio e quitosana), tratados ou não com glutaraldeído a 0,5%, e o terceiro tipo são os biofilmes formado por alginato de cálcio com adição do agente adsorvente (item 5.3.2) (Tabela 4.1). A Tabela 5.16 apresenta os parâmetros de imobilização obtidos, para estes biofilmes de celulasas imobilizadas.

**TABELA 5.16:** Atividade por grama de suporte (FPU/g de suporte), Rendimento de Atividade Imobilizada (RAI) e Rendimento da Atividade Recuperada (AR) e Atividade Perdida (AP), para os protocolos em biofilmes com posterior tratamento enzimático (item 4.2.4.4).

| Derivados                                            | FPU/g de sup.      | RI <sup>b</sup> (%) | AR <sup>c</sup> (%) | AP <sup>d</sup> (%) |
|------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Solúvel (5%)</i>                                  | 0,438 <sup>a</sup> | 100,00              | 100,00              | -                   |
| <i>C (Alginato)</i>                                  | 0,105              | 28,54               | 15,03               | 24,25               |
| <i>C' (Alginato - glut.)</i>                         | 0,093              | 35,33               | 10,74               | 31,54               |
| <i>D (Alginato + quitosana)</i>                      | 0,047              | 55,46               | 3,50                | 53,52               |
| <i>D' (Alginato + quitosana - glut.)</i>             | 0,089              | 46,13               | 7,91                | 42,48               |
| <i>E (Alginato + agente adsorvente<sup>e</sup>)</i>  | 0,075              | 23,11               | 13,29               | 20,04               |
| <i>E' (Alginato + agente adsorvente<sup>e</sup>)</i> | 0,091              | 24,59               | 15,20               | 20,85               |

<sup>a</sup> Atividade enzimática (FPU/mL) da solução enzima (5%);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 2 (item 4.2.8.2);

<sup>c</sup> Cálculo efetuado através da equação 3 (item 4.2.8.3);

<sup>d</sup> Cálculo efetuado através da equação 4 (item 4.2.8.4);

<sup>e</sup> Agente adsorvente determinado no item 5.3.2.

Pode-se observar que os biofilmes *C* e *C'* apresentaram os maiores valores de FPU por grama de suporte, com 0,105 e 0,093 FPU/g de suporte, respectivamente, contra 0,047 e 0,089 FPU/g de suporte, para *D* e *D'*, respectivamente e 0,075 e 0,091 para os biofilmes *E* e *E'*, respectivamente.

Para os biofilmes *C* e *C'* apesar de ter demonstrado uma melhora no Rendimento de Imobilização (RI – item 4.2.8.2), quando este tratado com glutaraldeído (0,5% - v/v), observa-se que a Atividade Recuperada (AR – item 4.2.8.3) foi levemente inferior sendo que o biofilme *C'* obteve 10,74% de AR para 15,03 de AR no biofilme *C*. Para os demais biofilmes o glutaraldeído não demonstrou, para estes protocolos, um ganho significativo, sendo que na realidade seus valores foram inferiores aos biofilmes não tratados, o que demonstrou uma ineficiência em sua utilização como agente de crosslinking.

Quando comparado com os derivados em peletes com posterior tratamento enzimático (Tabela 5.10), estes biofilmes mostraram-se menor eficiência na imobilização, visto que o derivado *A* apresentou um FPU/g de suporte de 0,134, com um RI de 15,42% e um AR de 76,01%.

Em uma segunda etapa de imobilização em biofilmes, o preparo destes foi com a enzima comercial já adicionada durante seu preparo (Tabela 4.1). A concentração de proteínas totais das soluções originais adicionadas ao suporte, bem como das soluções residuais do processo (incluindo a solução utilizada para descanso dos derivados após a imobilização), foi quantificada e, por diferença, determinou-se a quantidade de proteínas imobilizadas por grama de suporte, assim como o rendimento da imobilização (Tabela 5.17).

**Tabela 5.17:** Quantidade de 1-endo-1,4- $\beta$ -glucanase imobilizadas em biofilmes com enzima já adicionada (item 4.2.4.3), e Rendimento de proteína Imobilizada (RP).

| Derivados                                            | Quantidade de proteína imobilizada (mg de proteína/grama de suporte) <sup>a</sup> | Rendimento de proteína Imobilizada (RP) (%) <sup>b</sup> |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>C (Alginato)</i>                                  | 9,35                                                                              | 94,78                                                    |
| <i>C' (Alginato - glut.)</i>                         | 9,64                                                                              | 97,54                                                    |
| <i>D (Alginato + quitosana)</i>                      | 5,91                                                                              | 33,15                                                    |
| <i>D' (Alginato + quitosana – glut.)</i>             | 5,91                                                                              | 33,15                                                    |
| <i>E (Alginato + agente adsorvente<sup>c</sup>)</i>  | 10,61                                                                             | 88,89                                                    |
| <i>E' (Alginato + agente adsorvente<sup>c</sup>)</i> | 11,24                                                                             | 93,89                                                    |

<sup>a</sup> Concentração de proteínas da solução ofertadas para cada suporte 1% (m/m), ou seja para cada 5g de suporte foi ofertado 0,05g de proteína, calculado por Bradford (item 4.2.7);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 1 (item 4.2.8.1);

<sup>c</sup> Agente adsorvente determinado no item 5.3.2.

Nestes protocolos de imobilização em biofilmes com adição da enzima durante o preparo dos derivados, houve uma imobilização considerável para os biofilmes *C* e *C'*, *E* e *E'*, visto que todos ficaram acima de 88% de RP, no qual o *C'* chegou a 97,54% de RP (Tabela 5.17). O maior valor de concentração de proteína por grama de suporte foi para o biofilme *E'* de 11,24 mg de proteína/g de suporte, sendo de aproximadamente 2,5 vezes superior ao maior valor apresentado pela técnica de imobilização em biofilmes anterior (Tabela 5.15).

Nestes protocolos de imobilização foram preparados três diferentes tipos de biofilmes, tratados ou não com glutaraldeído (Tabela 4.1). Os resultados destas imobilizações estão apresentados na Tabela 5.18.

**TABELA 5.18:** Atividade por grama de suporte (FPU/g de suporte), Rendimento de Atividade Imobilizada (RI) e Rendimento da Atividade Recuperada (AR) e Atividade Perdida (AP), para os protocolos com adição da enzima durante a produção dos biofilmes (item 4.2.4.3).

| Derivados                                            | FPU/g de sup.      | RI <sup>b</sup> (%) | AR <sup>c</sup> (%) | AP <sup>d</sup> (%) |
|------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Solúvel (5%)</i>                                  | 0,438 <sup>a</sup> | 100,00              | 100,00              | -                   |
| <i>C (Alginato)</i>                                  | 0,063              | 36,35               | 12,58               | 31,78               |
| <i>C' (Alginato - glut.)</i>                         | 0,050              | 53,55               | 6,78                | 49,92               |
| <i>D (Alginato + quitosana)</i>                      | 0,120              | 22,45               | 54,08               | 10,31               |
| <i>D' (Alginato + quitosana – glut.)</i>             | 0,015              | 17,76               | 8,77                | 16,20               |
| <i>E (Alginato + agente adsorvente<sup>e</sup>)</i>  | 0,085              | 36,23               | 14,71               | 30,90               |
| <i>E' (Alginato + agente adsorvente<sup>e</sup>)</i> | 0,049              | 30,82               | 10,03               | 27,73               |

<sup>a</sup> Atividade enzimática (FPU/mL) da solução enzima (5%);

<sup>b</sup> Cálculo efetuado através da equação 2 (item 4.2.8.2);

<sup>c</sup> Cálculo efetuado através da equação 3 (item 4.2.8.3);

<sup>d</sup> Cálculo efetuado através da equação 4 (item 4.2.8.4);

<sup>e</sup> Agente adsorvente ou de ligação determinado no item 5.3.2.

Nestes protocolos de imobilização em biofilmes com enzima já adicionada durante o preparo, pode-se observar que o biofilme *D* obteve o maior valor de FPU por grama de suporte, chegando a 0,120 FPU/g de suporte. Para estes protocolos de imobilização percebe-se que o glutaraldeído elevou o Rendimento de Imobilização (RI – item 4.2.8.2) excepcionalmente para o biofilme *C'* (53,55%) em contrapartida do biofilme *C* (36,35%). Contudo como se percebe na Atividade Recuperada (AR – item 4.2.8.3) foi bem inferior ao não tratado com glutaraldeído (0,5% - v/v) de 12,58% caiu para a 6,78%. Este fato, provavelmente ocorreu devido à ação desnaturante provocada por este agente bifuncional sobre a enzima (Lopes, 2006). No restante dos protocolos de imobilização em biofilmes com a enzima já adicionada, o glutaraldeído não auxiliou no aumento de RI, já que para estes biofilmes, quando tratado com este agente de crosslinking, seus valores foram inferiores (Tabela 5.16). Contrastando com o resultado apresentado nas imobilizações em peletes que para os protocolos *A* e *A'* (Tabela 5.10), em que pelo menos no Rendimento de Imobilização (RI) foi elevado pela utilização do glutaraldeído, subindo de 15,42% para 51,52% quando o mesmo protocolo foi tratado com o agente bifuncional. Como já referido, o glutaraldeído pode atuar de diferentes maneiras perante diferentes enzimas e suportes (ZABORSKY, 1973; BROUN, 1976).

Ao imobilizar celulasas comerciais em hidrogéis de alginato/quitosana, Martins (2007) conseguiu, como melhor resultado de Atividade Recuperada, 46,3%. Quando o autor tratou esses hidrogéis com glutaraldeído a Atividade Recuperada subiu para 56,3%, resultados não muito distantes dos apresentados neste trabalho.

Após ter finalizado as imobilizações nos biofilmes e preparo destes derivados, estes foram submetidos a testes de estabilidade através de ciclos da atividade celulolítica pela técnica FPase (item 4.2.5). Os resultados destes testes estão dispostos nas figuras 5.16 e 5.17, para ambos os protocolos de preparo dos biofilmes.

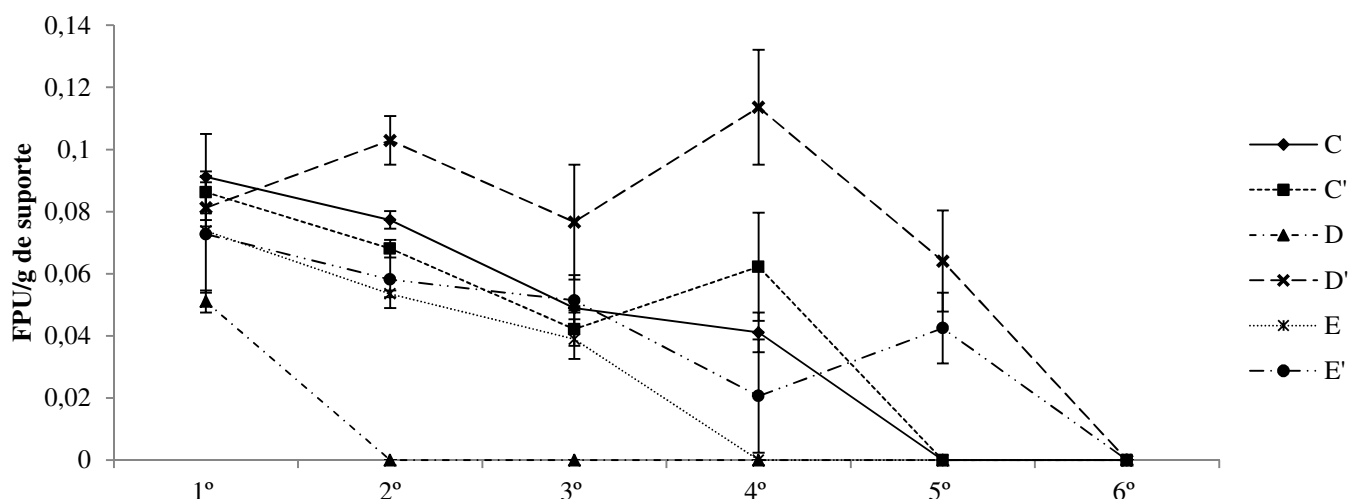


Figura 5.16: Reciclo das atividades enzimáticas dos biofilmes pela técnica FPase (50°C por 60 minutos) nos protocolos com posterior tratamento enzimático (item 4.2.4.4).

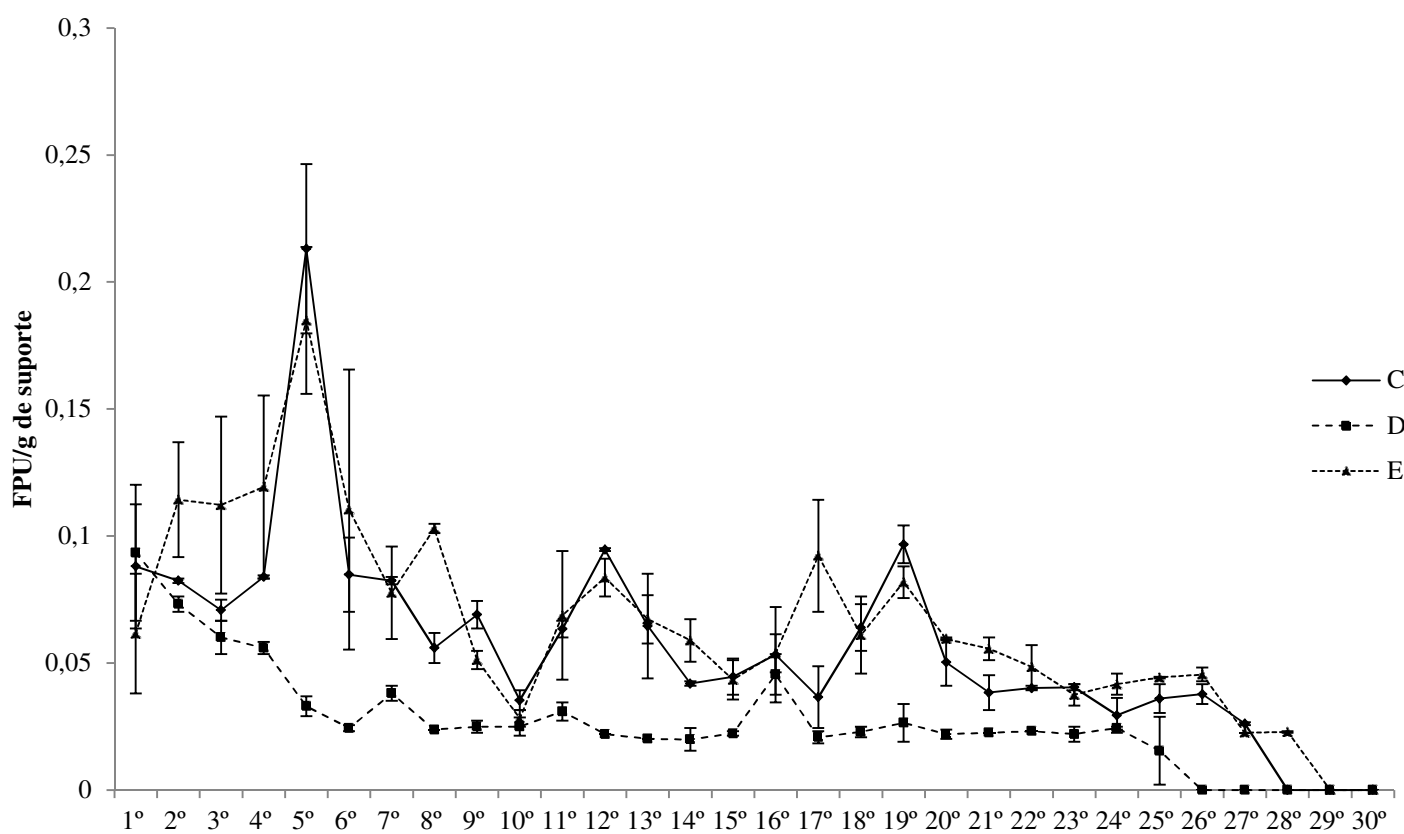


Figura 5.17: Reciclo das atividades enzimáticas dos biofilmes pela técnica d FPase (50°C por 60 minutos) com suportes preparados já com a enzima adicionada, para os biofilmes sem tratamento com glutaraldeído (item 4.2.4.3).

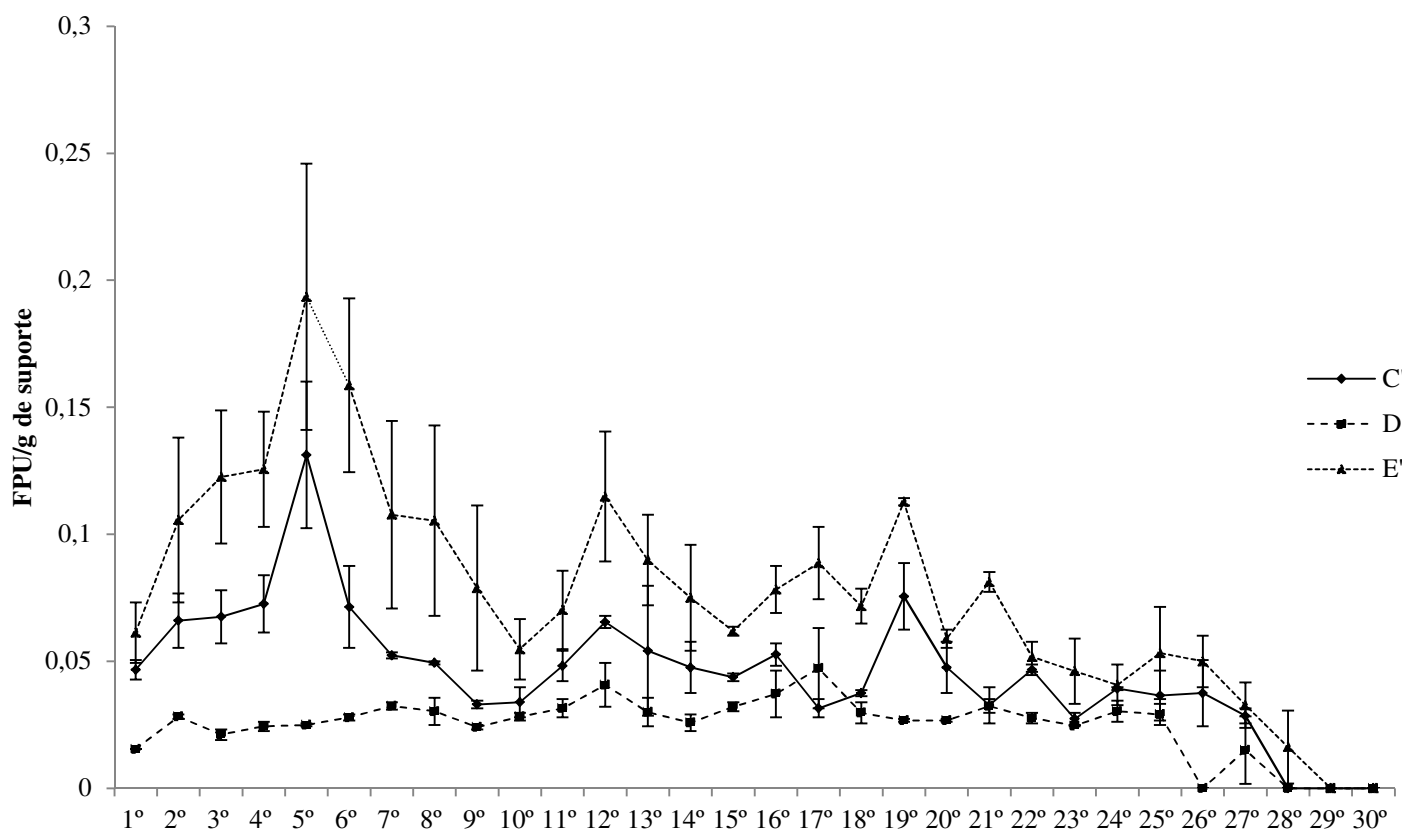


Figura 5.18: Reciclo das atividades enzimáticas dos biofilmes pela técnica d FPase (50°C por 60 minutos) com suportes preparados já com a enzima adicionada, para os biofilmes tratados com glutaraldeído (item 4.2.4.3).

Os resultados apresentados demonstram que os biofilmes que tiveram seu preparo com posterior tratamento enzimático, tiveram uma baixa estabilidade, visto que seus reciclos para à atividade celulolítica não apresentaram atividade para todos os biofilmes já no 6º reciclo (Figura 5.16). Igualmente aos resultados obtidos nas imobilizações utilizando peletes como derivados, observa-se que a técnica de preparo destes biofilmes, com derivados preparados já com a enzima adicionada conseguiram atingir uma maior estabilidade ao longo de sucessivos reciclos de atividade celulolítica. Contudo, contrariamente ao apresentado no primeiro teste de atividade enzimática, em que o biofilme *D* apresentou resultados superiores aos demais, na Figura 5.17 mostra-se que foi alcançado até 28 reutilizações da enzima imobilizada, contudo com os biofilmes *E* e *E'*.

Compete notar, nestes casos, que os biofilmes que tiveram a adição dos agentes adsorventes mostraram-se superiores aos demais (Figura 5.17), porém sem ganho expressivo ao utilizar o agente bifuncional. Que no caso o biofilme *E* obteve-se somados os 28 reciclos 1,95 FPU/g de suporte, enquanto *E'* alcançou 2,3 FPU/g de suporte.

Quando comparado com o derivado *B* (Figura 5.14), na forma de peletes, onde somando-se as 13 reutilizações obteve um total de 1,59 FPU/g de suporte, com o *E'* este último foi 44,6% superior em FPU/g de suporte, que em um primeiro momento mostra-se uma maior vantagem nessa forma de imobilização. Entretanto ao se comparar pela quantidade de atividade ofertada para produção destes imobilizados, e assim determinar o ganho real em atividade enzimática, ao biofilme *E* foi ofertado 4,79 FPU Total (equivalente a 1% de proteína em relação ao peso final do suporte), e como foi preparado 3g deste biofilme com 2,3 FPU/g de suporte, alcançou-se um total de 6,9 FPU Total, com um saldo positivo de 2,11 FPU. Assim sendo, ocorreu um aumento real de 44,05% da atividade celulolítica para a imobilização neste biofilme, contra 56% de aumento real para a imobilização em peletes.

Estes resultados demonstraram mais uma vez que a tecnologia de preparo de derivados propostos neste trabalho, tanto utilizando o formato de peletes como biofilmes, mostrou uma economia e ganho quando comparado à utilização da enzima livre.

Considerando-se ainda que este é apenas um início dos estudos com esta técnica, e que é possível melhorá-la considerando vários parâmetros de imobilização, tais como: a relação mais apropriada entre proteína enzimática e massa de suporte, temperatura, pH e tempo de imobilização, associações entre diferentes suportes, ativação destes suportes com outras concentrações e outros agentes funcionais tais como o glicidol caminhando para a imobilização multipontual, pureza do extrato enzimático, etc. Com estes estudos pode-se avançar no desenvolvimento desta tecnologia com aumento do rendimento e estabilidade das enzimas imobilizadas.

Tais resultados abrem caminho para utilização de resíduos celulósicos tais como papelão, papel, jornal, e também os lignocelulósicos que podem sofrer pré-tratamento e assim liberar a porção celulósica. O objetivo final será a produção de açúcares fermentescíveis de baixo custo, com ampla aplicação na indústria biotecnológica atendendo aos objetivos iniciais deste trabalho, bem como a redução de lixo e danos ambientais.

#### **5.3.4. Imobilização do extrato celulolítico produzido em biofilmes**

Posteriormente a produção e obtenção dos extratos enzimáticos dos fungos mais promissores (item 5.1.2), foram selecionados os dois mais efetivos, nas melhores condições de cultivo e fermentação para produção de extratos com atividade celulolítica, sendo estes: a linhagem FS 09 (pH 3,5 e temperatura 30°C) e M51 (pH 3,5 e temperatura 35°C) (Tabela 5.2 e Figura 5.5).

Após esta seleção foi realizado o processo de imobilização e obtenção dos derivados em forma de biofilme (Tabela 4.1 e item 4.2.4.1), que neste caso foram os protocolos: *C*, *C'*, *D*, *D'* e *E*, *E'* com adição de 1:1 (v/v) do extrato fúngico e das soluções referentes a cada biofilme. Em seguida, foi feita análises da atividade celulolítica pela técnica FPase (item 4.2.5) para cada protocolo de imobilização, assim como consecutivos ciclos dos derivados para determinar a estabilidade destes. Contudo, nenhum protocolo de imobilização e produção dos biofilmes, tratados ou não com glutaraldeído, apresentou atividade celulolítica. Porém foram realizados sucessivos ciclos para determinar uma possível atividade após alguns ciclos, e novamente os resultados foram negativos para atividade celulolítica.

Estes resultados negativos provavelmente ocorreram devido à baixa atividade celulolíticas apresentada pelos extratos produzidos por estes fungos que foram de 0,054 FPU/mL para o FS09 (30°C e pH 3,5) e 0,049 FPU/mL para M51 (35°C e pH 3,5). Ao realizar a execução destes protocolos de imobilização, ocorreu uma nova diluição destas atividades enzimáticas, tornando-as ainda mais baixas, contrastando com os resultados obtidos quando se utilizou a enzima comercial imobilizada em biofilmes (item 5.3.3), onde a atividade das enzimas comerciais usadas para imobilização foram cerca de 7-8 vezes superior aos extratos produzidos. Esta pode ser uma provável razão para o sucesso na imobilização da enzima comercial que atingiu 28 ciclos mantendo atividade. Uma alternativa para confirmar esta teoria seria a purificação dos extratos produzidos e posterior imobilização, mas esta etapa não estava prevista neste projeto, mas certamente será investigada pelo grupo de pesquisa.

Parece consenso pela literatura já citada que será fundamental uma etapa enzimática no processo de hidrólise dos lignocelulósicos, e certamente o custo das enzimas é o grande limitador. Porém sua eficácia já foi bem comprovada. Apesar de este trabalho ter sido realizado em escala de bancada para a produção dos extratos celulolíticos com meios econômicos a base de bagaço de cana sem pré-tratamento, obteve-se microrganismos com potencial celulolítico. Outro aspecto importante foi o desenvolvimento de uma técnica de imobilização de celulasas capaz de reutilizar a enzima por 28 ciclos, o que certamente abre uma perspectiva para diminuição do custo do tratamento enzimático se estes estudos forem aprofundados. O que está em jogo atualmente é a possibilidade de aumentar a oferta de alimentos e energia renovável, sem que haja grandes aumentos de áreas agriculturáveis, pois estas já são limitadas em escala global. A utilização biotecnológica dos resíduos agroindustriais é um dos poucos caminhos disponíveis para este fim.



## 6. Conclusões

- A partir do cultivo em meio de cultura a base de bagaço de cana foi possível selecionar linhagens de fungos filamentosos com maior atividade celulolítica do que o *Trichoderma reesei* CCT 2768. O destaque foi para os fungos ainda não identificados denominados FS09 e M51. As condições de pH e temperatura de cultivo influenciaram significativamente na produção enzimática com destaque para o pH 3,5 e temperaturas de 30 e 35°C;
- Na imobilização da enzima comercial em peletes e biofilmes, os protocolos em que a solução enzimática foi adicionada durante o processo de produção dos derivados mostraram-se superiores. O protocolo *B*, onde os peletes foram constituídos de apenas alginato e quitosana apresentou a melhor atividade e rendimento ao longo dos 13 ciclos. O protocolo *E'*, onde o biofilme foi constituído de alginato de cálcio e resina de troca iônica, com tratamento com glutaraldeído, apresentou a maior estabilidade ao longo de 28 ciclos. Com estes protocolos de imobilização houve um incremento de 56% na atividade celulolítica para o derivado *B*, e 44,05% para o biofilme *E'*, através da soma das atividades residuais nos ciclos em relação à enzima gasta no processo de imobilização. Tais resultados são promissores e devem ser aperfeiçoados visando o desenvolvimento de uma tecnologia competitiva para a produção de glicose a partir de resíduos de celulose.
- A imobilização dos extratos celulolíticos produzidos pelos melhores microrganismos, nas melhores condições de fermentação estudados neste trabalho, não demonstrou resultados positivos provavelmente pela falta de concentração e pureza quando comparados com a enzima comercial.

## 7. Referência bibliográfica:

ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIK, H.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J.. “*Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production*”. **Carbohydrate Polymers**, v.57, p.67-72, 2004.

AGBHEVOR, F.A.; WEBER, J.. “*Microbubble fermentation of Trichoderma reesei for cellulase production*”. **Process Biochemistry**, v.40, p.669-679, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Dados Estatísticos**, Disponível em [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Acessado em setembro de 2011.

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B.. “*Produção de celulasas e xilanases por Aspergillus niger IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar*”. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.18, n.1, 2000.

ALBARGHOUTH, M.; FARA, D.A.; SALEEM, M.; EL-THAHER, T.; MATAKA, K.; BADWAN, A.. “*Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads*”. **International Journal of Pharmaceutics**, v.206, p.23-34, 2000.

ANTHONSEN, M.W.; WARUM, K.M.; SMIDSRØD, O.. “*Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation*”. **Carbohydr. Polym.**, v.22, p.193-201, 1993

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL (BEN), Disponível em [ben.epe.gov.br](http://ben.epe.gov.br). Acessado em setembro de 2011.

BASTOS, V.D.. “*Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias*”. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.25 p.5-38. 2007.

BÉLGUIN, P.. “*Molecular biology of cellulase degradation*”. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p.219-248, 1990.

BERGER, J.; REIST, T.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R.. “*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.

BOFO, D.C.; CASTRO, H.F.; MEDEIROS, M.B.. “*Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S. cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar*”. **Braz. J. Food Technol.**, 5ºSIPAL, P.121-124, 2005.

BRADFORD, M. M.. “*Determination of total proteins*”. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248, 1976

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

BROUN, G.B.. “*Chemically aggregated enzymes*”. **Methods in Enzymology.**, v.44, p.263-280, 1976.

CARDIAS, H.C.T.; GRININGER, C.C.; TREVISAN, H.C.; GUISÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C.. “*Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin g acylase on macroporous silica*”. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.16, p 141-148, 1999.

CANELLA, A.M.N.C.; GARCIA, R.B.. “*Caracterização de Quitosana por Cromatografia de permeação em Gel – Influência do Método de Preparação e do Solvente*”. **Química Nova**, v.24, 2001.

CENBIO - COELHO; GOLDEMBERG, J.; LUCON, O.; GUARDABASSI, P.M.. “*Brazilian Sugarcane Ethanol: Lessons Learned Suani*”. **Artigo publicado no STAP Workshop on Liquid Biofuels. Delhi, Índia. 29 de agosto a 02 de setembro de 2005.**

CHUI, W.K.; WAN, L.S.. “*Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres*”. **J. Microencapsulation.** v.14, p.51-61, 1997.

CLAEYSSSENS, M. & TOMME, P.. “*Structure function relationships of cellulolytic proteins from *Trichoderma reesei**, In KUBICEK, C.P. et al.. “*Ed *Trichoderma reesei* Cellulases*”.

**Biochemistry, Genetics, Physiology and Application, Technical Communications and Springer Gmb H.**, p.1-11, 1989.

COCHRANE, F.C.; PETACH, H.H.; HENDERSON, W.. “*Application of this(hydroxymethy)phosphine as a coupling agent for alcohol dehydrogenase immobilization*”. **Enzyme Microb. Tech.**, v.18, p.373-378, 1996.

COELHO, M.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.A.L.. “*Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde*”. **CEPP**, v.19, n.1, p.33-42, 2001.

COMERLATO, M.H.. “*Imobilização de enzimas no suporte crisotila*”. **Dissertação (Doutorado em Química)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 90 p., 1995.

CORTEZ, E.V.; PESSOA JUNIOR, A.; ASSIS, A.N.. “*Xylanase recovery by ethanol and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation*”. **Appl. Bioch. And Biotech.**, v.70, n.72, p.661-666, 1988.

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

CUNHA, M.A.A.; SILVA, S.S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.. “*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**, Londrina, v.26, n.1, 2005.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K.T.; MAO, C.; QIN, W.. “*Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison*”. **Critical Review in Biotechnology**, v.30, n.4, p.302-309, 2010.

DELABONA, P.S.; FARINAS, C.S.; SILVA, M.R.; AZZONI, S.F.; PRADELLA, J.G.C.. “*Use of a new Trichoderma harzianum strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production*”. **Bioresource Technology**, v.107, p.517-521, 2012.

DRAGET, K.I.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O.. “*Alginate based new materials*”. **International Journal Biological Macromolecules**, v.21, p.47-55, 1997.

DU TOIT, P.J.; OLIVIER, S.P.; VAN BILJON, P.L.. “*Sugarcane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide. Hemicellulose and amino acid composition*”. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26. p.1071-1078, 1984.

FAPESP (Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo). “*Propriedades do bagaço da cana-de-açúcar*”. **Revista Pesquisa FAPESP**, ed.30, abril 1998.

FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L.. “*Global bioenergy potentials through 2050*”. **Biomass & Bioenergy**, Pergamon, v.20, n.3, p.151-159, 2001.

FICK, T.A.. “*Celulose para produção de etanol*”. **Momento Florestal**, Curitiba, n.4, 2008.

FUJII, T.; MURAKAMI, K; SAWAYANA, S.. “*Cellulase Hyperproducing Mutants Derived from the Fungus Trichoderma reesei QM9414 Produced Large Amounts of Cellulase at the Enzymatic and Transcriptional Levels*”. **Biomass Technology Research Center, Nacional Institute Of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)**, 2-2-2 Hiro-suehiro, Kure, Hiroshima. Japan, 2010.

FUNDUENANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M.. “*Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced by different methods*”. **Biomaterials**, v.20, p.1427-1435, 1999.

GAMA, F.M.; MOTA, M.; BASTOS, M.; DOURADO, F.. “*Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate*”. **Journal of Biotechnology**, v.99, p.121-131, 2002.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C.. “*Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production*”. **J. Food Eng.**, n.52, p.211-218, 2002.

GHOSE, T.K.. “*Measurement of cellulose activities*”. **Pure Appl Chem**, v.59, p.257-268, 1987.

GIORDANO, R.L.C.. “*Perspectivas 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.

GU, L.; MAO, X.; GUO, G.; HUANG, J.; DU, Z.; HUANG, Z.; MA, L.; LI, P.. “*A novel methodo to prepare chitosan powder and its aplication in cellulase immobilization*”. **Journal Chem Technol Biotechnol**, (in press), 2005.

GUISÁN, J.M.. “*Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes*”. **Enzume and Microbial Technology**, v.10, p.375-382, 1988.

GURGEL, P.V.; FURLAN, S.A.; MARTINEZ, S.E.R.; MANCILHA, I.M.. “*Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolyzate treatments for xylitol production*”. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.15, n.3, 1998.

HIRANO, S.. “*Chitin biotechnology application*”. **Biotechnonology Annual Review**, v.2, p.237-258, 1996.

HUGUET, M.L.; DELLACHERIE, E.. “*Calcium-alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulate materials on their release*”. **Process Biochemistry**, v.31, p.745-751, 1996.

KIN, S.W.. “*Production of cellulase and hemicellulase by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass*”. **Bioresourse Techonology**, v.91, p.153-156, 2004.

KHAN, T.A.; PEH, K.K.; CH'NG, H.S.. “*Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing*”. **Journal of. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.3, p.303-311, 2000.

KNORR, D.. “*Dye Binding Properties of Chitin and Chitosan*”. **J. Food Science**, v.48, p.36-37, 1983.

KRAJEWSKA, B.. “*Chitin and its derivatives as supports for immobilization of enzymes*”. **Acta Biotechnol.**, v.11, p.269-277, 1991.

KUHAD, R.C.; SINGH, A.. “*Critical Reviews in Biotechnonology*”. **Cleveland**, v.13, p.126-139, 1993.

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

LAUS, R.; LARANJEIRA, M.C.M.; MARTINS, A.O.; FÁVERE, V.T.. “*Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, FERRO (III) e MANGANÊS (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão*”. **Quim. Nova**, v.29, n.1, p.34-39, 2006.

LEE, J.W.; KIM, S.Y.; KIM, S.S.; LEE, Y.M.; LEE, K.H.; KIM S.J.. “*Synthesis and Characteristics of Interpenetrating Polymer network Hydrogel Composed of Chitosan and Poly (acrylic acid)*”. **Journal of Applied Polymer Science**, v.73, p.113-120, 1999.

LEHNINGER, A.L.. “*Princípios de Bioquímica*”, **Editora. Sarvier**, São Paulo, p.42-43, 205-220, 1993.

LIMA, R.S., NUNES, G.S., NOGUER, T., MARTY, J.L.. “*Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos: estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor*”. **Quim. Nova.**, v.30, p.9-17, 2007.

LOBELLO, E.A.. “*Seleção de fungos celulolíticos isolados da Mata Atlântica e de bagaço de cana*”, [Monografia]. **Laboratório de biotecnologia industrial**, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, 2009.

LOPES, J.L.S.. “*Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de Acacia plumosa Lowe*”. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, pp.107, 2006.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.E.; ROCHE, C.. “*Measurement of scarifying cellulose*”. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, v.6, p.1471, 1976.

MARTINS, R.E.. “*Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana*”. **Dissertação (Mestrado)** – Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, pp.97, 2007.

MAO, J.S.; Feng Liu, H.; YIN, Y. J.; DE YAO, K.. “*The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods*”. **Biomaterials**, v.24, p.1621-1629, 2003.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Secretaria de produção e Agroenergia. Departamento de cana-de-açúcar e agroenergia. **Dados Estatísticos**, Disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br), Acessado em setembro de 2011.

MESSING, R.A.. “*Immobilized enzymes for industrial reactors*”. Ed. Messing R.A., **Academic Press**, p.63, 1975.

MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M.J., WALDRON, K.C., “*Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*”. **BioTechniques**. V.37, p.790-802, 2004.

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

MONTEIRO-JUNIOR., 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 xilanase pelo fungo termófilo Humicola grisea variedade thermoidea RP-17: fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas*”. **Pós-graduação em Bioquímica** – FMRP – USP. Ribeirão Preto, 1989.

MULLINGS, R.. “*Measurement of saccharification by cellulases*”. **Enzyme Microbiology Technology**, v.7, p.586-590, 1985.

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C.. “*Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz*”. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.28, p.34-39, 2002.

NABY-ABDEL, M.A.; NABY-ABDEL, A.F.; OSMAN, M.Y.. “*Production and immobilization of cellobiase from Aspergillus niger A20*”. **Chemical Engineering Journal**, v.68, p.189-196, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M.. “*Lehninger Princípios de bioquímica*”. Tradução de W.R. Loodi e A.A. Simões. São Paulo: Sarvier, 4ª Edição, 1202p, 2006.

ODAC – The Oil Depletion Analysis Centre. Disponível em [www.odac-info.org](http://www.odac-info.org). Acesso em setembro de 2011.

OSWALD, P.R.; EVANS, R.A.; HERNDERSON, W.; DANIEL, R.M.; FEE, C.J.. “*Properties of a thermostable  $\beta$ -glucosidase immobilized using tris(hydroxymethyl)phosphine as a highly effective coupling agent*”. **Enzyme Microb. Tech.**, v.23, p.14-19, 1998.

PADUA, A.D.; PLÁ, J.A.; BENEDETTI, O.; RATHMANN, R.. “*Biodiesel: Uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira?* 20 p, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.. “*Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse*”. **Bioresource Technology**, Northern Ireland. v.74, p.69-80, 2000.

PEREIRA, G.H.A.. “*Estudos da Imobilização Multipontual da Penicilina G Acilase em Sílica Ativada com Grupos Glioxil*”. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)**,

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M.. “*Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery*”. In **Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p, 2008.

PESSOA-Jr., A.; KILIKIAN, B.V.. “*Purificação de produtos biotecnológicos*”. **Editora Manole**, v.59, p. 95, 2005.

PESSOA Jr., A.; MANCILHA, I.M.; SATO S.. “*Acid Hydrolysis Of Hemicellulose From Sugarcane Bagasse*”. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo. v.14, n.3, 1997.

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

PITARELO, A.P.. “*Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha da cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática*”. **Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná**, 125 p., Curitiba, 2007.

RADZICKA, A.; WOLFENDEN, R.. “*A proficient enzyme*”. **Science**, 6(267), p.90-931, 1995.

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

RIBEIRO, J.A.B.. “*Hidrolise de resíduos lignocelulósicos utilizando extrato enzimático celulolítico produzido por Trichoderma reesei ATCC 2768*”. **Dissertação (Mestrado) – Engenharia Química – PPGEQ – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN**, pp.92, 2010

RODRIGUES, A.P.. “*Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões*”. **Tese (Doutorado em Engenharia Química)**, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

RUCKA, M., TURKIEWICZ, B.. “*Hydrolysis of sunflower oil by means of hydrophobic membrane with lipolytic activity*”. **Biotechnology Letters**, v.11, n.3, p.167-172, 1989.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.. “*Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins*”, **Revista Brasil. Bot.**, Rio Claro, v.27, n.2, p.205-211, 2004.

SANTOS, A.M.; OLIVA-NETO, P.. “*Estudo do enriquecimento protéico do capim Tifton (Cynodon rich) e produção de celulasas por Trichoderma reesei*”. **Revista Científica Plural**, Assis, v.2, p.35-46, 2001.

SASAKI, M.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K.. “*Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment*”. **Bioresource Technology**, v.86, n.3, p.301-304, 2003.

SHEN, X.L.; XIA, L.M.. “*Production and immobilization of cellobiase from Aspergillus niger ZU07*”. **Process Biochemistry**, v.39, p.1363-1367, 2004.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A.R.. “*A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria prima?*”. **Química Nova**, v.24, n.2, p.247-251, 2001.

SMIDSROD, O.; SKAKA-BREAK, G.. “*Alginate as immobilization matrix for cell*”. **Trends of Biotechnology**, v.8, p.71-79, 1990.

SPAGNA, G., ANDREANI, F., SALATELLI, E., ROMAGNOLI, D., PIFFERI, P.G.. “*Immobilization of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase on chitin and chitosan*”. **Process. Biochemistry**, v.33, p. 57-62, 1998.

SRIAMORNSAK, P.. “*Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment*”. **European Journal Pharm Biopharm**, v.46, p.226-233, 1998.

SUN, W.C.; CHENG, C.H.; LEE, W.C.. “*Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by Trichoderma reesei Rut C-30 on rice straw*”. **Metabolic. Eng.**, v.43, p.1083-1087, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J.. “*Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*”. **Bioresource Technology**, v.83, n.1, p.1-11, 2002.

SZAKÁCS, G.; URBÁNSZKI, K.; TENGERTDY, R.P.. “*Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*”. **American Chemical Society**, p.190-203, 2000.

TAMANINI, C.; HAULY, M.C.O.. “*Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de xilitol*”. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.25, n.4, p.315-330, 2004.

TANNER, D.R.; et al.. “*The effect of pH on the foam fractionation of  $\beta$ -glucosidase and cellulase*”. **Bioresource Technology**, v.87, p.247-253, 2002.

TANRISEVEN, A.. “*Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules*”. **Process Biochemistry**, v.36, n.11, p.1081-1083, 2001.

TAQIEDDON, E.; LEE, C.; AMIJI, M.. “*Perm-selective chitosan-alginato hybrid microcapsules for enzyme immobilization technology*”. **Journal of ISPE Reprinted from Pharmaceutical Engineering**, v.22, n.6, p.1-3, 2002.

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

TARDIOLI, P.T.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R.L.C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.. “*Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose*”. **Biotechnology Progress**, v.19, p.352-360, 2003 a.

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

ÚNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo). “*Cana-de-Açúcar: Qual a dimensão da cana-de-açúcar no Brasil e no mundo?*”. São Paulo. Disponível em: <http://www.unica.com.br/FAQ>. Acessado em: setembro de 2011.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N.. “*Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation*”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137-140, issues 12, 2007.

VELTEN, F.; LAUCE, C.; SCHREZENMEIR, J.. “*The effect of alginate and hyaluronate on the viability and function of immunoisolated rat islets*”. **Biomaterials**, v.20, p.2161-2167, 1999.

VIEIRA, R.S.. “*Remoção e Recuperação de Hg (II) utilizando quitosana natural e reticulada*”. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)**, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

VILLALONGA, R.; GÓMEZ, L.; RAMÍREZ, H.L.; VILLALONGA, M.L.; HERNÁNDEZ, J.. “*Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation*”. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38 (1-2), p.22-27, 2006.

WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L.Y.. “*Chitosan-alginate-CaCl<sub>2</sub> system for membrane coat application*”. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, p.1134-1142, 2001.

WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A.; LIM, L.Y.. “*Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing*”. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.63, p.610-618, 2002.

WHITAKER, J.R.. “*Microbial pectolytic enzymes*”. In: FOGARTY, W.. “*Microbial Enzymes and Biotechnology*”. **Dublin: Applied Science Publisher**, p.133-137, 1990.

WULFF, N.A.. “*Caracterização enzimática das celulasas XF-810, XF-818 e XF-2708 de Xylella fastidiosa e purificação da proteína XF-818, expressas em Escherichia coli*”. **Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Microbiologia Agrícola**

(Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros” – USP. Piracicaba, São Paulo, 2002.

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

ZABORSKY, O.R.. “*Immobilized Enzymes*”. CRC Press, Cleveland, OH., 1973.