



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional
Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CELULASES PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Maria Samara Costa do Nascimento

Orientadora: Prof.^ª Dr^ª Nataly Albuquerque dos Santos

JOÃO PESSOA
2015



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional
Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CELULASES PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Maria Samara Costa do Nascimento

Trabalho de Conclusão do Curso de
Tecnologia em Produção Sucroalcooleira
apresentado no Centro de Tecnologia e
Desenvolvimento Regional da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito para a obtenção do Título de
Tecnólogo em Produção Sucroalcooleira.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Nataly Albuquerque dos Santos

JOÃO PESSOA
2015

N244c Nascimento, Maria Samara Costa do.

Celulases para produção de etanol de segunda geração. [recurso eletrônico] / Maria Samara Costa do Nascimento. -- 2015.

29 p. : il. + CD.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Orientador: Dra. Nataly Albuquerque dos Santos.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Tecnologia em Produção Sucroalcooleira) – CTDR/UFPB.

1. Etanol - Biotecnologia. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Hidrólise. 4. Enzimas. 5. Celulases. I. Santos, Nataly Albuquerque dos. II. Título.

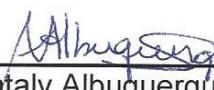
CDU: 604.2:661.722

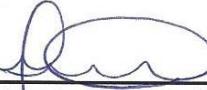
MARIA SAMARA COSTA DO NASCIMENTO

**CELULASES PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

TCC aprovado em 19/02/2015 como requisito para a conclusão do curso de tecnologia em produção sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba.

BANCA EXAMINADORA:


Profª. Dra. Nataly Albuquerque dos Santos - (UFPB -Orientador)


Profª. Dra. Márcia Helena Pontieri - (UFPB – Membro Interno)


Profª. Dra. Márcia Aparecida Cezar - (UFPB – Membro interno)

João Pessoa, 19 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar dedico este trabalho a Deus por ter me guiado a todo o momento, a meu namorado Jhonatas Wagner que me sempre incentivou na realização dos meus ideais, encorajando-me a enfrentar todos os momentos difíceis da vida, a minha família pela compreensão, e apoio, e a meus professores pela contribuição para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, este que me forneceu sabedoria, paciência, e esperança em cada momento de minha vida.

Agradeço também a minha família que me apoio e me deu forças a cada momento em especial minha mãe Verônica Belizário e ao meu pai Edvaldo Moura.

Meus amigos Tatiana, Thiago, Hugo, Segundo, Felipe, Cleiton e Kellyane, só tenho à agradecer. A todos que conheci no curso, que serão sempre lembrados em minha vida.

A minha Professora orientadora Dra. Nataly Albuquerque, agradeço pela orientação e paciência durante o desenvolvimento da monografia e pela receptividade. Agradeço-a ainda por me ajudar em obter cada vez mais conhecimentos. Agradeço a todos os professores do curso, pois foram essenciais em minha formação.

A professora Ana Braga, agradeço por ter me dado suporte no entendimento de imobilização .

De modo geral, agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

O etanol produzido por matérias-primas renováveis surge como fonte substituta dos combustíveis fósseis, o qual permite a realização de um processo biotecnológico de menor impacto ambiental. A utilização de biomassa lignocelulósica para a bioprodução se tornou vital para a economia, devido ao seu caráter renovável, abundante e de baixo custo. Os resíduos lignocelulósicos (bagaço e palha) proveniente da cana-de-açúcar são fontes abundantes em carboidratos e a sua bioconversão tem recebido grande atenção. Tais resíduos são formados por: celulose, hemicelulose e lignina. Uma das linhas de estudo está a hidrólise desse resíduo, que pode ser ácida ou enzimática, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis. A hidrólise enzimática é a mais empregada por ter menores taxas de degradação da glicose, menor formação de coprodutos inibidores e por apresentar bons rendimentos. A conversão do componente celulósico dessas biomassas residuais, a glicose, requer o uso de enzimas celulolíticas. O grande potencial que as celulases assumem nas emergentes indústrias de bioenergia e bioproductos se torna uma motivação para o desenvolvimento de melhores preparações enzimáticas para a hidrólise da celulose. Entretanto, uma das maiores dificuldades na implantação de um processo de bioconversão da biomassa consiste no alto custo e na baixa atividade específica das enzimas necessárias à sacarificação da celulose. Uma maneira de fazer o processo economicamente viável é imobilizar as celulases de tal forma que as propriedades catalíticas sejam mantidas. Imobilização consiste no confinamento da enzima em uma suporte sólido para posterior reutilização do biocatalizador.

Palavras Chave: etanol, biomassa lignocelulósica, hidrólise, enzimas, celulases, imobilização.

OBSTRACT

Ethanol produced from renewable raw materials arises as a substitute source of fossil fuels, which allows the realization of a biotechnological process with less environmental impact. The use of lignocellulosic biomass to bioproduction has become vital to the economy due to their renewable nature, abundance and low cost. The lignocellulosic residues (bagasse and straw) from the sugarcane are abundant sources of carbohydrates and their bioconversion has received great attention. Such residues are formed by: cellulose, hemicellulose and lignin. A study of the lines is the hydrolysis of the residues, which can be acid or enzyme, in order to obtain fermentable sugars. Enzymatic hydrolysis is the most used to have lower glucose degradation rates, lower formation of byproducts inhibitors and to present good yields. The conversion of cellulosic component of such waste biomass, glucose, requires the use of cellulolytic enzymes. The potential cellulases assume that the emerging industry bioenergy and bioproducts becomes a motivation for the development of improved enzyme preparations for hydrolysis of cellulose. However, a major difficulty in the implementation of a biomass bioconversion process is the high cost and low specific activity of the enzymes necessary for the saccharification of cellulose. One way to make the process economically viable immobilized cellulase is such that the catalytic properties are maintained. Immobilization is the enzyme confinement in a solid support for reuse of the biocatalyst.

Keywords: ethanol, lignocellulosic biomass hydrolysis, enzymes, cellulases, immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinados pelo pré-tratamento.....	14
Figura 2 - Representação esquemática da produção de etanol lignocelulósico.....	16
Figura 3 - Cadeia linear da celulose.....	19
Figura 4 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.....	20

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Diferentes tipos de pré-tratamento em materiais lignocelulósico.....	14
Tabela 2: Classificação dos suportes conforme a composição.....	24

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	11
2.0	ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	13
2.1	Hidrólise de material lignocelulósico.....	16
3.0	ENZIMAS.....	17
3.1	Enzimas celulolíticas.....	19
4.0	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA.....	21
4.1	Classificação de Sistemas de imobilização de enzima.....	22
4.2	Parâmetros e Suportes de imobilização.....	23
4.3	Imobilização de celulases.....	25
5.0	CONCLUSÃO.....	27
6.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1.0 INTRODUÇÃO

O aumento do uso dos combustíveis fosseis como fonte de energia, acarretou transformações econômicas, sociais e principalmente ambientais. Desta forma, a sua escassez pelo uso prolongado acelera o esgotamento das reservas petrolíferas mundiais, principal fonte de energia na Terra. Com isso, aumenta o colapso ambiental de tal forma que a natureza não consegue se recompor, sendo necessário à busca de fontes renováveis de energia.

Segundo Silva (2012), a possibilidade de utilização dos combustíveis renováveis tem despertado um interesse cada vez maior em todo o mundo. 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 de efeito estufa, e desta forma diminui o impacto ambiental causado pela queima dos combustíveis fósseis. O principal agente para a substituição dos derivados de petróleo são os biocombustíveis.

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis- (ANP), biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia.

O etanol produzido por matérias-primas renováveis aparece como fonte substituta dos combustíveis fósseis, o qual permite a realização de um processo biotecnológico de menor impacto ambiental (PEREIRA Jr. et al., 2008 Apud SILVA, 2012).

Internacionalmente, algumas das mais promissoras alternativas para obtenção de energia renovável estão focadas na utilização de resíduos agroindustriais, dentre os quais, resíduos fibrosos da indústria de açúcar têm atraído especial atenção (BOTHÁ e BLOTTNITZ, 2006 Apud RODRIGUES, 2012).

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. A utilização de biomassa lignocelulósica para a bioprodução se tornou vital para a economia, devido ao seu caráter renovável, abundante e de baixo custo.

No Brasil encontra-se bastante resíduo agrícola (bagaço, palha) para produção de etanol combustível (etanol de segunda geração). De acordo com CONAB (2014) estima-se que a produção de cana-de-áçucar a ser moída é de 652 milhões de toneladas de cana na safra de 2013/2014. Considerando-se que cada tonelada de cana gera em torno de 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (ambos em massa seca), estima-se uma geração de 84 milhões de toneladas de bagaço e 84 milhões de toneladas de palha. É um enorme potencial que não pode ser subestimado e que dita que estes resíduos necessitam ter um aproveitamento mais racional. Nenhum outro lugar no mundo apresenta essas vantagens, uma vez que o acoplamento dos processos de produção do etanol, de primeira e segunda gerações, traz vantagens competitivas significantes. Desta forma o Brasil pode contribuir para o combate ao aquecimento global de maneira decisiva, e impulsionar seu desenvolvimento econômico (PETRAGLIA *et al.*, 2009; LEITE; CORTEZ, 2008).

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos naturais do mundo. A dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. A conversão do componente celulósico dessas biomassas residuais a glicose, requer o uso de enzimas celulolíticas. As enzimas hidrolíticas têm papel fundamental nessa bioconversão, que são utilizadas em vários setores industriais, como indústria de papel e celulose, alimentos e têxtil. Apesar da existência dessa alternativa a dificuldades na ativação das enzimas hidrolíticas responsáveis pela conversão dos componentes celulósico da biomassa, devido ao seu alto custo e baixa atividade específica das enzimas necessárias à sacarificação da celulose no contexto da produção do etanol, a partir da biomassa lignocelulósica (BONOMI, 2011 Apud QUEIROZ *et al.*, 2013). Diante dessa realidade torna-se imprescindível o uso da imobilização de enzimas sobre substratos sólidos, de tal forma que as propriedades catalíticas sejam mantidas, além de serem reutilizadas muitas vezes.

2.0 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O etanol de segunda geração, mas precisamente é o etanol produzido a partir da celulose de matérias-primas lignocelulósica (Silva *et al.*, 2010).

A utilização de resíduos celulósicos é uma alternativa emergente para produção de *bio-commodities* (LYND *et al.*, 1996 Apud RODRIGUES, 2012). O etanol celulósico é especialmente promissor, pois é obtido a partir de matérias-primas abundantes e de baixo custo, tem alta octanagem, pode ser misturados a combustíveis originados do petróleo ou usados puro em alguns motores, além de ser considerado ambientalmente correto.

Celulose é um polissacarídeo constituído por cerca de quarenta cadeias glicosídica unidas em um feixe compacto. Cada cadeia tem grau de polimerização em torno de 10000 unidades de glicose, unidas por ligações β -1,4. As muitas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares presentes na estrutura da celulose torna esse polímero muito recalcitrante à hidrólise. A biodegradação da celulose por celulases e celulossomos tem grande importância para a agricultura e processos de reciclagem, e poderia ser completamente utilizada na obtenção de produtos sustentáveis e bioenergia que substituíssem a utilização de combustíveis fósseis (ZHANG *et al.*, 2006 Apud RODRIGUES, 2012).

A produção de etanol por fermentação da celulose requer a sua separação dos outros dois componentes (hemicelulose e lignina) presentes na estrutura da biomassa lignocelulósica e posterior hidrólise para geração de glicose.

A presença de hemicelulose e lignina envolvendo as cadeias de celulose dificulta o acesso de reagentes e catalisadores, sendo necessário um tratamento prévio para a remoção destes componentes, facilitando o acesso das enzimas à celulose. Sendo necessária a separação de cada fração do complexo celulose-hemicelulose-lignina por técnicas de pré-tratamento para degradação enzimática. Na tabela 1 mostra os diferentes tipos de pré-tratamento.

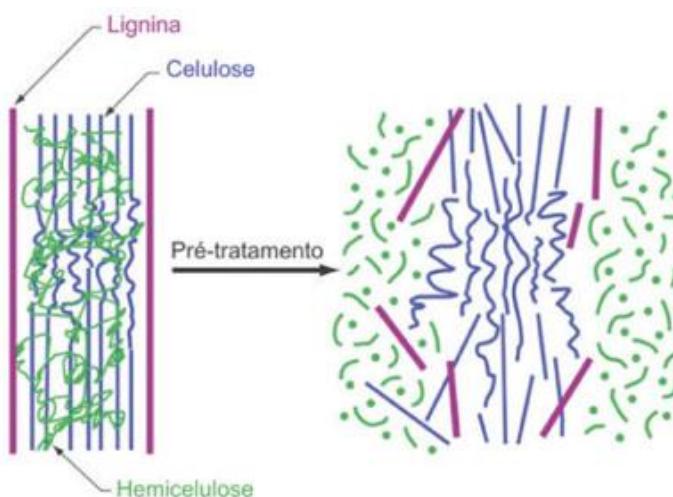
Tabela 1: Diferentes tipos de pré-tratamento em materiais lignocelulósico

Pré-tratamento		Características compostionais			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, altas produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
	ARP	Menor que 5% de despolimerização	~50% de solubilidade	~70% de solubilização	Efetiva deslignificação	Recuperação alcalina, relativamente caro
Químico	Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial (~40%)	Efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	Menor efetividade devido a pouca solubilidade da cal
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Caro, necessidade de mais ozônio
	Organosolv	Considerável inchação	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
Combinado	AFEX	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Menor perda de xilan, não formação de inibidores	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina

Fonte : Santos et,.al (2012)

O pré-tratamento é requerido a fim de tornar a celulose mais acessível às enzimas que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentescíveis. A Figura 1 representa a ruptura do complexo celulose-hemicelulose-lignina e a remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento.

Figura 1: Alteração estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinados pelo pré-tratamento.



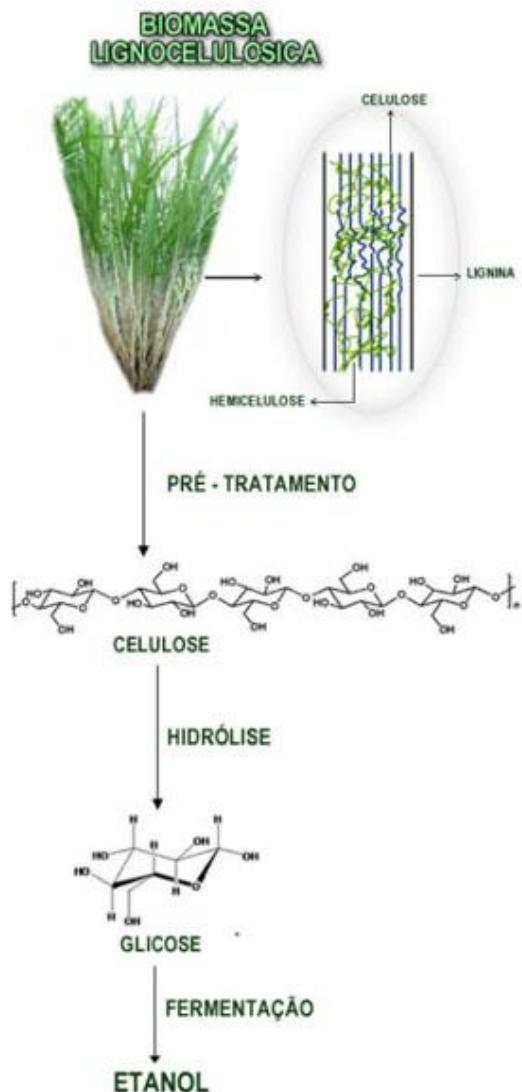
Fonte: SANTOS (2012).

Após a etapa de pré-tratamento é necessária a hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis. A hidrólise é apontada como a rota de maior potencial de promover o incremento da produção de etanol. Nessa etapa, a celulose é convertida em glicose, que podem ser catalisada por ácidos ou por enzimas (QUEIROZ *et al.*, 2013).

A hidrólise enzimática é a mais bem empregada por ter menores taxas de degradação da glicose, menor formação de coprodutos inibidores e por apresentar bons rendimentos. Trata-se de um complexo enzimático que representa alto grau de sinergismo representado pelas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. Entretanto, ainda é necessário o avanço no desenvolvimento de enzimas para tornar viável a implantação dos processos de hidrólise enzimática em escala comercial, o custo elevado e baixa atividade específica das enzimas, têm acarretado incertezas quanto a viabilidade econômica do processo de hidrólise enzimática no contexto da produção do etanol, a partir da biomassa lignocelulósica (BONOMI, 2011 Apud QUEIROZ *et al.*, 2013).

A celulose convertida em glicose passa para o processo de fermentação onde são metabolizados pelos microrganismos a etanol. Na Figura 2 mostra de forma esquemática a produção de etanol lignocelulósico.

Figura 2: Representação esquemática da produção de etanol lignocelulósico.



Fonte: SANTOS (2012).

2.1 Hidrólise de material lignocelulósico

A biomassa lignocelulósica é composta por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e pela lignina, polímero complexo de grupos metoxi e fenilpropânicos, que mantém as células unidas. A fração celulósica (40%-60% da matéria seca) é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose), rígido e difícil de ser quebrado; sua hidrólise gera glicose, um açúcar de seis carbonos, cuja fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* já é bem conhecida. Por sua vez, a fração hemicelulósica (20%-40%), em geral, é

constituída de uma cadeia principal de xilose (ligações β -1,4) com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glicurônico etc. A hemicelulose é muito mais fácil de ser hidrolisada do que a celulose, mas a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose. Já a estrutura bioquímica da fração de lignina (10%-25%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida, pois, para a produção de bioetanol por rotas fermentativas (MAEDA, 2010). De forma geral, a primeira etapa do processo consiste no pré-tratamento mecânico da matéria-prima, que visa à limpeza e à “quebra” do material, a fim de causar a destruição da sua estrutura celular e torná-la mais acessível aos tratamentos químicos ou biológicos posteriores. A etapa seguinte consiste na remoção da lignina e na hidrólise da hemicelulose, que também pode ser denominada pré-tratamento. Para essa etapa, existem diversos tipos de processos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e consequente impacto nas etapas subsequentes.

Para tornar a hidrólise de resíduos lignocelulósicos mais eficiente, é necessário que os substratos sejam pré-tratados, a fim de aumentar a susceptibilidade de ataque das enzimas aos polissacarídeos (MOSIER *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2009).

A conversão do componente celulósico dessas biomassas residuais a glicose, requer o uso de enzimas celulolíticas. Atualmente, está bem estabelecido que a eficiência de hidrólise de celulose deve-se a um sistema enzimático multicomponente, constituído de três principais grupos: endo- β -glucanases, exo- β -glucanases e β -glucosidases. O mecanismo mais aceito de hidrólise enzimática da celulose envolve o efeito sinérgico entre esses três tipos de celulases (LYND *et al.*, 2002; MAEDA, 2010).

3. ENZIMAS

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 Apud SILVA, 2012).

A atividade catalítica depende da integralidade de sua conformação protéica nativa, sendo que esta pode ser perdida caso haja a desnaturação ou dissociação das mesmas em subunidades (VIEIRA, 2003, citado por CAMPESTRINI *et al.*, 2005).

A estrutura e o centro ativo enzimático são decorrentes de sua estrutura tridimensional, onde sua atividade funcional da atividade catalítica depende da integridade conformacional da proteína ativa. Portanto, a atividade é perdida caso esta enzima sofra alterações em sua conformação estrutural. Isso torna a atividade enzimática dependente das características do meio, principalmente o pH e a temperatura reacionais (MARZZOCO *et al.*, 1999 Apud FRADE, 2011).

Para serem ativas, algumas não requerem nenhum outro grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos.

As enzimas catalisam reações químicas específicas sem serem consumidas, além de não haver a formação de produtos colaterais e agem em soluções aquosas diluídas (tampões), em condições muito suaves de temperatura e pH, sendo que cada enzima possui uma temperatura e um pH ótimos, onde sua atividade é máxima, ou seja, esta velocidade é aumentada devido ao abaixamento da energia de ativação necessária para converter o substrato em produto, sendo que, quanto maior for a energia de ativação, mais lenta a reação ocorrerá. O aumento na velocidade da reação ocorre devido ao fato de a enzima aumentar o número de moléculas ativadas, ou seja, capazes de reagir. Após terem reagido com o substrato, as enzimas se separam dos produtos, liberando a molécula de catalisador para novas reações (Marzzoco *et al.*, 1999).

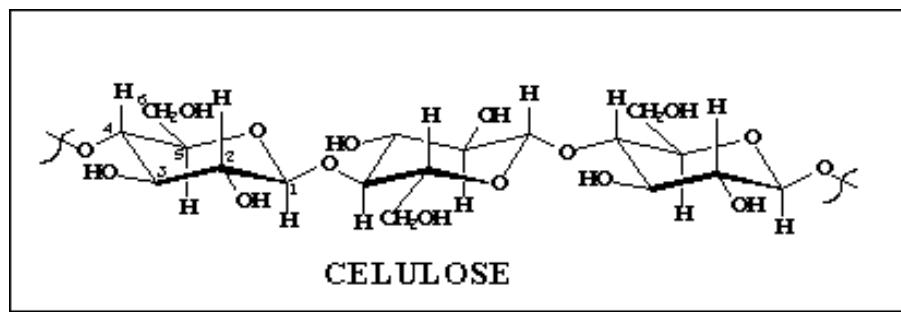
Reações catalisadas por enzimas se dão em duas etapas, sendo que na primeira, a enzima liga-se reversivelmente ao substrato, formando um complexo enzima-substrato, enquanto que na segunda etapa, o produto é libertado e a enzima fica livre para se ligar à outra molécula de substrato. A velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração de substrato, devido ao fato de a concentração do complexo enzima-substrato ser muito elevada, significando que não há enzimas em solução em sua forma livre. Neste ponto, diz-se que a velocidade de reação é máxima, a partir do qual, qualquer aumento na concentração de substrato não provocará efeitos

perceptíveis sobre a velocidade da reação. Contudo, a velocidade reacional também é proporcional à concentração de enzimas presentes no meio, o que possibilita a determinação da atividade enzimática (MARZZOCO *et al.*, 1999).

3.1 Enzimas celulolíticas

As celulases são compostas por um complexo enzimático, que juntamente são capazes de hidrolisar a celulose, que é a matéria-prima mais abundante do planeta, principal fonte de carbono (ZHANG *et al.*, 2006), sendo encontradas nas paredes celulares de vegetais. Do ponto de vista químico, a celulose é um polissacarídeo composto de unidades β -Dglucopiranósil, ligados por pontos β -(1,4), formando um polímero linear (RAMOS, 2003). A Figura 3 apresenta estrutura linear da celulose.

Figura 3: Cadeia linear da celulose.



Fonte: POLYMAR (2014)

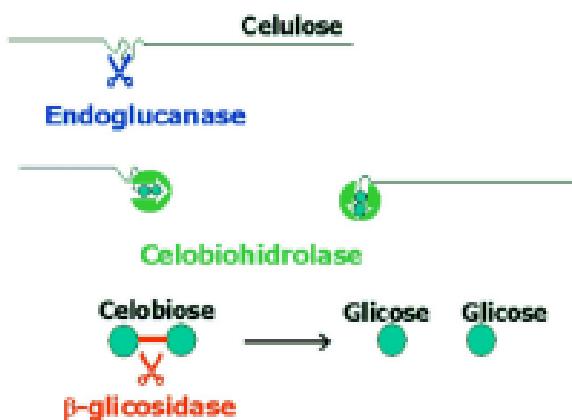
Estas enzimas são classificadas como hidrolases e, segundo a nomenclatura enzimática (E.C. 3.2.1), hidrolases O-glicosídicas são baseadas em sua especificidade ao substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. De acordo com a nomenclatura, o número 3 refere-se à hidrolases; 3.2 glicosilases e 3.2.1 glicosidases, isto é, uma enzima que hidrolisa compostos O-glicosil ou S-glicosil.

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.

O complexo celulase envolve pelo menos três enzimas que apresentam modos de ação distintos: -1,4-glicano-glicanoidrolase (endoglicanase), -1,4 glicanocellobioidrolase (exoglicanase) e -1,4-glicosidase (celobiase). As endoglicanases atacam, de forma randômica, ligações glicosídicas em regiões internas da molécula de celulose, gerando oligossacarídeos de cadeias menores de celotriose, celobiose e glicose. As exoglicanases (celobiohidrolases) atuam nas extremidades dos oligossacarídeos produzidos pela ação das endoglicanases, formando principalmente, moléculas de celobiose, que por sua vez, são clivadas por -glicosidases, liberando glicose (Beguin e Aubert, 1994; Bhat e Bhat, 1997; NG, 2004, citado por Daroit, 2007 Apud RODRIGUES, 2012). As enzimas possuem um complexo enzimático extracelular que facilita a extração e pode hidrolisar celulose em condições suaves sem gerar subprodutos tóxicos e, consequentemente, sua utilização pela indústria biotecnológica (CLAEYSEN e TOMME, 1989). A Figura 4 é a representação simplificada da ação enzimática de cada classe de enzimas.

Figura 4: Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.



Fonte: PETRI e OGEDA (2010).

As celulases apresentam múltiplos domínios, podendo possuir domínios catalíticos ligadores de celulases e sequenciadores de ligações (GILKES *et al.*, 1991 Apud WULff, 2002). As enzimas dos domínios são menos viáveis do que

as dos domínios com atividade catalítica, pois nos domínios com atividade catalítica conferem diferenças sutis na especificidade e no mecanismo. Embora os domínios ligadores da celulose não sejam essenciais para atividade catalítica, eles modulam a atividade específica das enzimas em substrato celulolíticos solúveis e insolúveis.

O grande potencial que as celulases assumem nas emergentes indústrias de bioenergia e bioproductos se torna uma motivação para o desenvolvimento de melhores preparações enzimáticas para a hidrólise da celulose.

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 Apud SILVA, 2012). A produção de etanol utilizando biomassa lignocelulolítica atrai atenção de pesquisadores em busca de energia alternativa.

4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso (MENDES *et al.*, 2011).

O elevado custo das enzimas inviabiliza economicamente a sua utilização livre em bioprocessos. Trabalhos para otimização de processos enzimáticos vem sendo explorados, e uma das tecnologias empregada é a imobilização de enzimas (MARTINS, 2007). As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são: o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador; aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo a sua reutilização sem perda significativa de sua atividade catalítica, bem como o aumento da estabilidade. As principais desvantagens deste processo são: a alteração da conformação nativa da enzima; o custo de suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização; a interação suporte-enzima ; e a

redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais (ARROYO,1998; VILOTO,2001;GAMA,2003 Apud MARTINS,2007).

Apesar de muitas pesquisas utilizadas nos últimos anos para imobilizar enzimas não há atualmente uma padronização de qual método ou material é o ideal para cada tipo de imobilização.

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

- Físicos: área superficial disponível, forma, porosidade, volume do poro, densidade;
- Químicos: disponibilidade de grupos reativos, hidrofobicidade;
- Estabilidade: estocagem, atividade recuperada, estabilidade mecânica;
- Resistencia: ataque a fungos, pH, temperatura, solventes orgânicos;
- Segurança: toxicidade de reagentes, segurança de utilização.
- Econômicos: disponibilidade e custo suporte e reagentes, equipamentos, impacto ambiental;
- Reacionais: cinética de reação, tipo de reator utilizado, limites difusionais.

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

4.1 Classificação de Sistemas de imobilização de enzima

De acordo com Martins (2007) os métodos de imobilização de enzimas podem ser separados em duas grandes classes:

- Método químico: envolve a formação de pelo menos uma ligação covalente entre uma ou mais moléculas de enzima e um polímero insolúvel. O processo é irreversível e a enzima geralmente não pode ser recuperada posteriormente. Nos métodos químicos depende-se de ligação covalente formada e essa ligação pode ocorrer de diferentes maneiras a seguir: ligação covalente, ligação cruzada e copolimerização.
- Método físico: a imobilização não depende de formação de ligação covalente e sim forças físicas, como a eletrostática, iônica, interação proteína – proteína. Nos métodos físicos ocorre de diferentes maneiras: Adsorção, Aprisionamento, Encapsulação e Membrana.

4.2 Parâmetros e Suporte de imobilização

Algumas propriedades da enzima e seu comportamento podem mudar com a imobilização. Muitos fatores levam a alteração dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação á livre, diminuindo o rendimento do processo de imobilização.

Algumas propriedades da enzima e seu comportamento podem mudar com a imobilização. Muitos fatores levam a alteração de parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação a valores da enzima livre:

- Efeito conformacional: a conformação tridimensional da molécula da enzima pode ser modificada durante o processo de imobilização, ocasionando a alteração dos valores dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada.
- Efeitos eletrostáticos: a concentração de espécies químicas importantes no micro-ambiente da enzima imobilizada pode ser diferentes das concentrações devido a propriedades físico-químicas do suporte e de efeitos difusionais.
- Efeitos difusionais: a cinética observada da enzima imobilizada pode não estar sendo governada apenas por interações entre enzima e substrato, mas pode também estar sendo limitada pela taxa de difusão do

substrato a superfície suporte, ou internamente por entre os poros do suporte.

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Se de um lado um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema.

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo, dentre outras. Eles podem ser classificados orgânicos e inorgânicos e conforme sua composição e morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (FREITAS *et al.*, 2007; VILLENEUVE *et al.*, 2000 Apud MENDES *et al.*, 2011). A Tabela 2 mostra a classificação de suportes em termos de composição.

Tabela 2: Classificação dos suportes conforme a composição

ORGÂNICOS		INORGÂNICOS		
Naturais	Sintéticos	Minerais	Fabricados	
Polissacarídeo	Seda	Poliestireno	Areia	Vidro de porosidade controlada
Celulose	proteínas	Poliacrilatos	Betonita	Cerâmica de porosidade controlada
Ágar	Albumina	Polivinilos	Homeblerda	Sílica de porosidade controlada
Amido	Colágeno	Nylon	Pedra-Póme	Óxido de ferro

Fonte: MARTINS (2007).

Suportes inorgânicos são mais resistentes devido as suas propriedades físicas. Contudo, a maioria de enzimas imobilizadas e comercializadas é obtida com matrizes orgânicas, provavelmente devido a grande variedades de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos em suportes orgânicos.

A partir das informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos empregados, é possível fazer generalizações que permitam uma primeira seleção do método de imobilização. Enzimas podem ser

imobilizadas por diferentes protocolos, isto é, podem ser encapsuladas; adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; copolimerizadas com algum monômero ou se ligar a uma matriz insolúvel por ligações covalentes.

4.3 Imobilização de celulases

Atualmente a aplicação de celulases para a desconstrução de biomassa vegetal tem ganhado grande destaque devido à crescente demanda por combustíveis e outros produtos de interesse da indústria química, os quais sejam obtidos a partir de fontes renováveis e por meio de processos ambientalmente favoráveis.

Os processos em larga escala que visam à utilização de celulases para a desconstrução de biomassa devem apresentar elevados valores de rendimento, concentração de açúcares fermentescíveis e produtividade. Entretanto, nesta escala, as dificuldades relacionadas ao custo, estabilidade, recuperação e reuso das enzimas são grandes desafios para viabilizar técnica e economicamente o processo (UNGUREAN *et al.*, 2013). Uma maneira de fazer o processo economicamente viável é imobilizar enzimas de tal forma que as propriedades catalíticas sejam mantidas. O grande desafio é que ao imobilizar a enzima, esta mantenha sua estrutura nativa. O uso de celulases imobilizadas é interessante porque possibilita o reuso das enzimas, e consequentemente o aumento da quantidade de açúcares fermentescíveis produzida por massa do catalisador.

Desde 1980, muitos esforços vêm sendo feitos para viabilizar a aplicação de celulases em diferentes processos industriais, mas a descoberta de celulases estáveis e de estratégias adequadas para reutilização destas ainda é grande desafio para a comunidade científica. A imobilização de celulases é complexa, pois trata da interação de, no mínimo, nove enzimas diferentes (considerando os complexos enzimáticos comerciais) com diferentes suportes que suporte e/ou método de imobilização devem ser adequados para acomodar todo o conjunto de enzimas com o mínimo possível de perda de suas atividades catalíticas (UNGUREAN *et al.*, 2013).

Várias estratégias de imobilização têm sido propostas para celulases, por exemplo, entrecruzamento, sistema de ultrafiltração, sistema de duas fases aquosas, encapsulamento, adsorção e ligação covalente em suportes insolúveis, solúveis ou reversivelmente solúveis (VIEIRA *et al.*, 2011; LIANG e CAO, 2012; MAO *et al.*, 2006 Apud PACHECO *et al.*, 2014). Cada uma destas estratégias apresenta vantagens e desvantagens relacionadas a toxicidade, biodegradabilidade, custo de materiais e reagentes utilizados para a imobilização, tempo gasto e complexidade no preparo do biocatalisador, desempenho do biocatalisador, etc.

De acordo com Pacheco *et.al* (2014), entre as estratégias de imobilização de celulases, o entrecruzamento e a ligação em suporte sólido são as mais descritas na literatura.

5. CONCLUSÃO

A aplicação de celulases imobilizadas na desconstrução de biomassas lignocelulósicas possibilita melhorias para o processo de produção de etanol de Segunda geração, como reuso de enzimas e maior quantidade de açúcar produzido por massa de biocatalizador. Mas para imobilização deve ser feito um estudo sobre qual parâmetro e suporte deve ser usados sem que danifique as propriedades catalíticas da enzima.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CAMPESTRINI, E; SILVA, V. T. M; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime.** V. 2. Nº. 6, novembro/dezembro 2005.
- CLAEYSSENS, 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.
- 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.
- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira. Safra 2013/2014 Segundo levantamento. Disponível em : <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_bol etim cana portugues - abril 2013 1o lev.pdf> Acesso em : 10 de Agosto de 2014.
- DAROIT, D. J. Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul –Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2007.
- FRADE, Verônica M. F. Estudo do aumento de escala do processo enzimático de hidrólise da celulose obtida a partir de resíduos lignocelulósicos do bagaço de cana (*Saccharum officinarum* L.). 2011. 41 f.. Projeto de Iniciação científica- Laboratório de Química do Centro Universitário da Faculdade de Engenharia Industrial. São Bernardo do Campo- São Paulo, 2011.
- GHOSE, T.K.; Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry 59 (1987).
- LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O Etanol Combustível no Brasil. Revista Biocombustíveis no Brasil, 2008. Publicações EMBRAPA. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/etanol. 15p. Acesso em: 20 de dezembro de 2013.>
- LI, X.L.; LJUNGDAHL, L.G.; XIMENES, E.A.; CHEN, H.; FELIX, C.R.; COTTA, M.A.; DIEN, B.S. Properties a recombinant β -glucosidase from polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and its application for cellulose hydrolysis. Appl Biochem Biotechnol, v. 113-116, p. 233-250, 2009.
- LYND, L.R.; WEMER, P.J.; ZYL, W.H.V.; Pretorius, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 66, n. 3, p.506-577, 2002.

MAEDA, R. N. Produção de celulases por *penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração, Tese de doutorado, Rio de Janeiro, 2010.

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

MARTINS, R. E. Estudo da Imobilização de Celulases em Geis de Quitosana. 2007. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos – SP. 2007.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica Básica. Guanabara Koogan, 1999.

Miller, G.L.(1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428,

MOSIER N.; WYMAN C.E.; DALE B.E.; ELANDER R.T.; LEE Y.Y.; HOLTZAPPLE M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. v. 96, p. 673–686, 2005.

PACHECO, T. F; MENDES, T. D ; PLETTO, C.M ; SALUM, T. F ; LEITE, T. C. R ; GAMBETTA, D. S. R; Aplicação de Celulases Imobilizadas na Hidrólise de *Brachiariabrizantha*. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – CBEQ. Florianópolis – SC. 2014.

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.

PETRAGLIA, J. et al. Infraestrutura logística sob o prisma da exportação de etanol brasileiro. *Gestão & Regionalidade*, v. 25, n. 74, mai/ago, 2009.

PETRI, D. F.S; OGEDA, T. L. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010.

POLYMAR. Fig.1. "A Quitina, precursora da Quitosana, é a fibra natural mais abundante depois da celulose." Disponível em: < http://www.polymar.com.br/pagina.php?diretorio=ped/&menu=0&cod_secao=30&arquivo=quitina.php > Acesso em : 14 de Agosto de 2014.

QUEIROZ, J.H.; SANTOS, F.; COLODETTE, J. Bioenergia e Biorrefinaria: Cana-de-açúcar e Espécies Florestais. Viçosa, Minas Gerais: Os editores, 2013.

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

RODRIGUES, Marina Q. R. B. Expressão Heteróloga de Celulases *Kluyveromyces marxianus* para Utilização em Bioprocesso Consolidado na Produção de Etanol Celulósico. 2012. 121 f.. Dissertação (Pós-graduação em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

SANTOS, F. A.; REZENDE, S. T.; QUEIRÓZ, J. H.; GUIMARÃES, V. M.; FERNANDES, S. A.; COLODETTE, J. L. Potencial da Palha de Cana-de-açúcar para Produção de Etanol. Química Nova, Vol 35, No 5, 1004- 1010, 2012.

SILVA, Douglas F. Seleção de Microrganismos Celulolíticos, Imobilização e Aplicação das Celulases, Produzidas e Comercial, na Hidrólise da Celulose. 2012. 86 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2012.

SILVA, M. G. E; JUNIOR, J. L. S; JUNIOR, C. R. T. P. Produção de etanol de Segunda Geração: Uma Revisão. Pensamento Plural: Revista Científica da UNIFAE, São João da Boa Vista, v.4, n.2, 2010.

UNGUREAN, M.; PAUL, C.; PETER, F. Cellulase immobilized by sol-gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose. Bioprocess Biosyst. Eng., v. 36, p. 1327–1338, 2013.

WUFF, N. A. Caracterização enzimática das celulases XF-818 e XF-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína XF-818, expressa em *Escherichia coli*. Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Micribiologia Agrícola (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “ Luis 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.