UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Química Fundamental

Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas

THAIS LUCY OGEDA

Dissertação de Mestrado

SÃO PAULO

Data de depósito na SPG:

10/03/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Química Fundamental

Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas

THAIS LUCY OGEDA

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade de São Paulo, Instituto de Química, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª Drª Denise Freitas Siqueira Petri

SÃO PAULO

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ogeda, Thais Lucy
O34h *Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas / Thais Lucy Ogeda. -- São Paulo, 2011.*
110 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Petri, Denise Freitas Siqueira.

1. Adsorção: Físico-química 2. Hidrólise I. T. II. Petri, Denise Freitas Siqueira, orientador.

541.3453 CDD

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thais Lucy Ogeda

"Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em:.....

Banca Examinadora

Prof. Dr.: .....

Instituição: .....

Assinatura: .....

Prof. Dr.: .....

Instituição: .....

Assinatura: .....

Prof. Dr.: .....

Instituição: .....

Assinatura: .....

São Paulo, ... de ..... de 2011.

À minha mãe,
Diva,
que me ensinou a sonhar.
Hoje, mais do que nunca, você vive
em mim.

In memoriam.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Antonio, por acreditar em mim, por me oferecer tudo que era imprescindível para que eu pudesse buscar meu sonho. Por me amar e proporcionar sempre um recanto de carinho, descanso e cuidado.

À minha tia Lourdes, pelos valiosos ensinamentos de vida, de gênios. Por me amar, como só uma mãe faria.

Ao meu querido irmão, Itamar, por se irritar por qualquer coisinha; foi por isso que enxerguei a vida como ela é. Por cuidar e torcer por mim, mesmo em silêncio.

Ao meu namorado, Caio, por estar comigo nos momentos de inspiração e angústia. Tudo foi mais fácil tendo você ao meu lado.

À minha orientadora Denise, pelos preciosos ensinamentos sobre o que é ser uma pesquisadora, professora e química. Agradeço pela paciência de esperar o meu tempo e realmente me oferecer possibilidades de aprender e crescer.

Aos amigos e colegas do laboratório de Filmes Finos Poliméricos que, sem o seu "olhar clínico", este trabalho demoraria muito mais a sair... Edla, Jorge, Leandro, Vânia, Aline, Alfredo, Artur, Henrique e todos os demais. Em especial à Dani, amiga e companheira de experimentos, que ainda me leva em sua moto apesar dos meus cinco minutos de pânico.

Ao profº Drº Chuck Farah e seu aluno Maxuel, pelas discussões e auxílio com as temperamentais bactérias.

Ao profº Drº Gianluca, pelas conversas sobre a molécula mais complicada jamais vista, e sua aluna Cristina, pelo apoio.

Aos amigos Carol H. e Carlos, por acreditarem e torcerem por mim. Por estarem aqui desde o início e por sempre me oferecerem momentos de alegria, ironias e sarcasmo, amizade, sorrisos e cor.

Aos amigos de Campinas, especialmente André, Renata, Inaê e Adriana, dos quais sempre sentirei falta. Obrigada por me agüentarem durante todos os anos da graduação. Às nossas tardes de discussão e filosofia!

Ao grupo de amigos do Cavalo Verde, por alegrar e iluminar o meu final de semana (e minha semana), pelas risadas e comentários sempre bem-vindos.

À Livres Pensadores e à todos meus queridos Irmãos, pelos preciosos ensinamentos...

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, que, pela concessão das bolsas e apoio financeiro à pesquisa do laboratório, possibilitou minha dedicação à realização dessa pesquisa. Ao IQ-USP, pelas instalações.

Agradeço sinceramente a todos aqueles e aquelas que direta e indiretamente colaboraram para minha formação e para a realização desta pesquisa.

"Bichano de Cheshire (...) poderia me dizer, por favor, que caminho devo tomar para ir embora daqui?"

"Depende bastante de para onde quer ir", respondeu o Gato.

"Não me importa muito para onde", disse Alice.

"Então não importa que caminho tome", disse o Gato.

"Contanto que eu chegue a 'algum lugar'", Alice acrescentou à guisa de explicação.

"Oh, isso você certamente vai conseguir", afirmou o Gato, "desde que ande o bastante."

Lewis Carrol, Aventuras de Alice no País das Maravilhas

You know what happens when you dream of falling? Sometimes you wake up. Sometimes the fall kills you. And sometimes, when you fall, you fly.

Neil Gaiman, Sandman

SUMÁRIO

SUMÁRIO i

ÍNDICE DE FIGURAS iii

ÍNDICE DE TABELAS vi

SÍMBOLOS E ABREVIAÇÕES vii

RESUMO ix

ABSTRACT x

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 – Estrutura e Propriedades da Celulose 5

1.2 – Pré-tratamentos de Celulose 10

1.3 – Complexo Enzimático Celulase 14

1.3.A – Modo de ação e sinergismo 14

1.3.B – Adsorção da celulase sobre celulose 16

1.4 – Hidrólise Enzimática – Enzimas Livres e Imobilizadas 18

2 OBJETIVOS 22

3 MATERIAIS E MÉTODOS 23

3.1 – Materiais 23

3.1.A – Celuloses 24

3.2 – Pré-tratamentos de Celulose Microcristalina Avicel 24

3.2.A – Dissolução em líquido iônico EMIMAc 24

3.2.B – Dissolução e degradação em ácido fosfórico 85% 25

3.2.C – Pré-tratamento enzimático com endoglucanase imobilizada 25

3.3 – Caracterização das Amostras de Celulose 26

3.3.A – Viscosimetria capilar 26

3.3.B – Índices de cristalinidade por raios-X 28

3.3.C – Morfologia 29

3.3.D – Medida da capacidade de absorção de água 29

3.3.E – Titulação potenciométrica 31

3.4 – Crescimento das Bactérias XCC e Obtenção das Endoglucanases 32

3.4.A – Ensaios de produção de endoglucanases 32

3.4.B – Purificação das endoglucanases 32

3.5 – Ensaios de Adsorção e Dessorção das Enzimas *33*
3.5.A – Adsorção de celulase 33
3.5.B – Adsorção de endoglucanases 34
3.5.C – Experimentos de dessorção 34
3.5.D – Dicroísmo circular 34
3.5.E – Elipsometria 37
3.5.F – Microscopia de força atômica (AFM) 40
3.6 – Hidrólise Enzimática Livre e Adsorvida *41*
3.7 – Atividade Enzimática *41*
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
4.1 – Caracterização das Celuloses *45*
4.1.A – Caracterização da CP: cálculo do pI 51
4.2 – Filmes Finos de Enzimas *53*
4.2.A – Adsorção das enzimas celulase 53
4.2.B – Ensaios de adsorção das enzimas endoglucanases 55
4.3 – Avaliação do Pré-tratamento com EGBs Imobilizadas e Hidrólise *58*
4.3.A – Pré-tratamento com EGBs imobilizadas 58
4.3.B – Hidrólise enzimática da avicel tratada com EGB imobilizada 59
4.4 – Hidrólise com Enzimas Livres e Imobilizadas *61*
4.5 – Avaliações de Reuso das Enzimas Imobilizadas *68*
5 CONCLUSÕES 70
6 REFERÊNCIAS 72
ANEXOS 85
Anexo A – Difratogramas de raios-X com deconvolução dos picos *85*
Anexo B – Determinação do Cw *87*
Anexo C – Gráficos de Huggins *88*
Anexo D – Teste de Atividade do Vermelho-Congo *89*
CURRICULUM VITAE 90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.A. Estrutura molecular da celulose (KLEMM, 1988). 5

Figura 1.B. Representação das ligações inter- e intramoleculares nas cadeias de celulose. (MORGENSTERN & KAMMER, 1996). 6

Figura 2. Polimorfos da celulose (KADLA, 2000). 7

Figura 3.A. Modelo molecular da celulose I e II. As conformações dos grupos hidroximetila, t-g ou g-t, estão marcados e as ligações intramoleculares indicadas (GARDNER, 1975). 8

Figura 3.B. Projeção da cela unitária da celulose no plano a,b, representando: *(a)* a celulose I (cadeia paralela); e *(b)* a celulose II (cadeia antiparalela); ("-----" representa as ligações de hidrogênio entre as cadeias) (KROON-BATENBURG & KROON, 1997). 9

Figura 4. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose. 14

Figura 5. Estrutura geral das celulases. Na imagem, temos um modelo hipotético de uma CBH I agindo na celulose microcristalina (DIVNE, 1998). 17

Figura 6. (a) Mecanismo de *retenção* por reação de substituição, através de um intermediário glicosil-enzima covalente (mecanismo S_N1). *(b)* Mecanismo de *inversão* por reação de substituição (mecanismo S_N2) (DAVIES & HENRISSAT, 1995). 18

Figura 7. Combinação de duas ondas linearmente polarizadas, defasadas em 90°. 35

Figura 8. Esquema de funcionamento de um elipsômetro. 38

Figura 9. Reação entre açúcares redutores, no caso, D-glicose na sua forma aberta, e o ácido 3,5-dinitro-salicílico (*DNS*). 42

Figura 10. (a) Espectro eletrônico obtido para a reação entre o DNS a 0,05 x 10^{-3} mol.L^{-1} e glicose variando a concentração de 1,0 x 10^{-3} mol.L^{-1} a 10,0 x 10^{-3} mol.L^{-1}. *(b)* Espectro eletrônico típico obtido para DNS puro a 0,05 x 10^{-3} mol.L^{-1}. *(c)* e *(d)* mostram a dependência da absorbância com a concentração de glicose. 43

Figura 11. Difratograma de raios-X obtido para: *(a)* Avicel, Avicel após seu pré-tratamento com EMIMAc (CIL), e Avicel após seu pré-tratamento com H_3PO_4 (CP); *(b)* Celulose algodão (CC) e algodão mercerizado (MCC); *(c)* Celulose eucalipto (EC) e *(d)* eucalipto mercerizado (MEC). 46

Figura 12. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para celulose Avicel: *(a)* sem pré-tratamento com aumento *x*300; *(b)* com aumento *x*5.000; *(c)* tratamento com H_3PO_4,CP; *(d)* tratamento com LI, CIL. 48

Figura 13. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para celulose CC: *(a)* sem pré-tratamento (aumento *x*400); e após mercerização, MCC, com dois aumentos: *(b)* *x*400, *(c)* *x*5.000 49

Figura 14. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para celulose EC: *(a)* sem pré-tratamento (aumento *x*400); e após mercerização, MEC, com dois aumentos: *(b)* *x*400, *(c)* *x*5.000 50

Figura 15. Curvas de titulação potenciométrica experimental obtidas para a Avicel ou eletrólito de fundo (KNO_3 0,05 M) (preto) e para a amostra de CP (vermelho); (a) titulação com NaOH 0,05 M; (b) titulação com HCl 0,02 M. 51

Figura 16. Isoterma da quantidade de prótons liberados ou adsorvidos obtida para a amostra CP, a (24 ± 1)°C. 52

Figura 17. Imagens topográficas de AFM no modo intermitente obtidas da celulase *T. reesei* adsorvida sobre lâminas de Si. *(a)* Área de varredura 5,0 μm x 5,0 μm, com z = 8,0 nm. *(b)* Área de varredura 1,0 μm x 1,0 μm, com z = 20,0 nm. 54

Figura 18. Imagens topográficas de AFM no modo intermitente obtidas das endoglucanases de *X. campestris* adsorvidas em lâminas de Si: *(a)* Área de varredura 5,0 μm x 5,0 μm, com z = 25,0 nm; *(b)* Área de varredura 1,0 μm x 1,0 μm, com z = 20,0 nm; *(c)* e *(d)* se referem aos cross sections correspondentes das imagens em *(a)* e *(b)*, respectivamente, cujas alturas representadas no eixo *y* estão em nm. 56

Figura 19. *(a)* Quantidade de EGB adsorvida (Γ) (estimada teoricamente utilizando uma área de 6 cm^2 e densidade dos filmes de 1,37 g/cm^3) em função da temperatura (T) sobre lâminas de Si; *(b)* gráfico de Arrhenius obtido a partir da linearização de (a), linha vermelha corresponde a uma ajuste linear com declive = 3634,56 K. O tempo de adsorção foi mantido constante em 24 h para todos os experimentos. 57

Figura 20. Taxas de conversão de celulose em glicose obtida para hidrólise da Avicel, antes e após pré-tratamento com EGB imobilizada, utilizando celulase livre ($4{,}1.10^{-4}$ mg/mL) ou imobilizada em Si ($2{,}7.10^{-4}$ mg/m^2). 60

Figura 21. Taxas de conversão de celulose em glicose obtida para hidrólise de diferentes celuloses, antes e após pré-tratamento, utilizando celulase livre ($4{,}1.10^{-4}$ mg/mL) ou adsorvida sobre Si ($2{,}7.10^{-4}$ mg/m^2). 62

Figura 22. Espectros de dicroísmo circular do complexo enzimático celulase em água, e em proporções de EMIMAc na solução. Proporções dadas em v/v. 63

Figura 23. Correlação entre os dados de capilaridade (*Cw*) de cada amostra de celulose, com seus respectivos valores de conversão à glicose, após a hidrólise com celulase livre. 65

Figura 24. Correlação entre os dados de capilaridade (*Cw*) de cada amostra de celulose, com seus respectivos valores de conversão à glicose, após a hidrólise com celulase imobilizada sobre lâminas de Si. 65

Figura A.1. Difratogramas de raios-X com a deconvolução de picos, utilizada no cálculo do índice de cristalinidade (*Ic*): *(a)* Avicel; *(b)* CP; e *(c)* CIL. 85

Figura A.2. Difratogramas de raios-X com a deconvolução de picos, utilizada no cálculo do índice de cristalinidade (Ic): *(a)* CC; e *(b)* MCC..... 86

Figura A.3. Difratogramas de raios-X com a deconvolução de picos, utilizada no cálculo do índice de cristalinidade (Ic): *(a)* EC; e *(b)* MEC. 86

Figura A.4. Curvas típicas do ganho de massa para as diferentes amostras de celuloses, após a subtração da medida de controle do cilindro. Elas mostram o aumento de massa, devido à capilaridade, em função do tempo. 87

Figura A.5. Determinação da viscosidade intrinseca das celuloses CP e CIL em soluções de CUEN:H_2O, a (25,0 ± 0,5)°C, onde η_{rel} é a viscosidade relativa..... 88

Figura A.6. Determinação da viscosidade intrinseca da celulose Avicel em soluções de CUEN:H_2O, a (25,0 ± 0,5)°C, onde η_{sp} e η_{rel} são, respectivamente, a viscosidade específica e a viscosidade relativa. 88

Figura A.7. Foto tirada das placas obtidas do teste de vermelho-congo, para medir a atividade do sobrenadante de EGBs..... 89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Solubilidade de celulose de alta massa molar (DP~1000) em líquidos iônicos. DMIM, AMIM, EMIM, BMIM, HMIM e OMIM representam os cátions 1,3-dimetilimidazólio, 1-alil-3-metilimidazólio, 1-etil-3-metilimidazólio, 1-butil-3-metilimidazólio, 1-hexil-3-metilimidazólio e 1-octil-3-metilimidazólio, respectivamente.... 12

Tabela 2. Nomenclatura, substratos, massa molar média ponderal (*Mw*), ponto isoelétrico (pI) e teores relativos das celulases produzidas pelo *T. reesei* (OLSSON, 2005). A família diz respeito à classificação de enzimas com seqüências homólogas de aminoácidos similares, as quais geram estruturas tridimensionais e sítios ativos semelhantes e, portanto, mecanismos catalíticos semelhantes..... 15

Tabela 3. Características das amostras de celulose. 47

Tabela 4. Viscosidades reduzidas (η_{sp}/C) obtidas para amostras de celulose Avicel após o pré-tratamento com endoglucanase adsorvida em diferentes temperaturas. 58

Tabela 5. Viscosidades reduzidas (η_{sp}/C) obtidas para Avicel, antes e após o pré-tratamento com endoglucanase livre e adsorvida (experimento de adsorção realizado a 40°C, hidrólise a 60°C). 59

Tabela 6. Taxas de conversão de celulose em glicose obtidas para a hidrólise das diferentes celuloses utilizando celulase livre ou imobilizada..... 61

Tabela 7. Constantes de capilaridade (*Cw*) obtidas para as amostras de celulose. 64

Tabela 8. Dados de reuso das placas de silício com celulase imobilizada..... 68

Tabela 9. Dados de reuso das placas de silício com endoglucanase imobilizada..... 69

SÍMBOLOS E ABREVIAÇÕES

T. reesei	Fungo filamentoso *Trichoderma reesei*
XCC	Bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris*
EGB	Endoglucanase
CBH	Celobiohidrolase
CBM	*Cellulose binding module* (módulo de ligação na celulose)
CP	Celulose avicel tratada com H_3PO_4
CIL	Celulose avicel tratada com LI
CC	Celulose algodão
MCC	Celulose algodão mercerizada
EC	Celulose eucalipto
MEC	Celulose eucalipto mercerizada
CUEN	Etilenodiamina cúprica
LI	Líquido iônico
EMIMAc	Acetato de 1-etil-3-metil-imidazólio
DNS	Ácido 3,5-dinitro-salicílico
ANS	Ácido 3-amino-5-nitrosalicílico
λ	Comprimento de onda
γ	Tensão superficial
η	Viscosidade
DP	Grau de polimerização viscosimétrico
M_v	Massa molar viscosimétrica
UAG	Unidade anidra de glicose
ρ	Densidade
Γ	Quantidade de material adsorvido na interface
E_a	Energia de adsorção
d	Espessura elipsométrica da camada
T	Temperatura
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CD	Dicroísmo circular
AFM	Microscopia de força atômica
rms	*Root mean square* (rugosidade expressa em valores de média quadrática)
Ic	Índice de cristalinidade
A_{am}	Área da região amorfa

A_c	Área da região cristalina
Q	Quantidade de prótons consumidos ou liberados
pI	Ponto isoelétrico
Cw	Capilaridade
m	Massa
S_N1	Substituição nucleofílica unimolecular
S_N2	Substituição nucleofílica bimolecular
CMC	Carboximetilcelulose
E.C.	*Enzyme Commission number* (classificação numérica para enzimas)

RESUMO

OGEDA, T. L. **Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas**. 2011. (107 p). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2011.

A hidrólise enzimática de celulose representa, em relação à hidrólise ácida, uma alternativa limpa para produção de etanol. No entanto, existem duas dificuldades: o alto custo das enzimas e recalcitrância das regiões cristalinas da celulose. Para o primeiro problema, propomos a imobilização de celulase, um complexo enzimático que sinergicamente promove a degradação da celulose em glicose e celobiose, sobre *wafers* de silício. Apesar da atividade enzimática de celulase adsorvida ser em geral menor que a de celulase livre, a imobilização de celulases provou ser vantajosa, pois permite até seis reusos, mantendo um nível de atividade apenas 20% inferior ao original. Quanto à questão da recalcitrância das regiões cristalinas da celulose, utilizamos diferentes pré-tratamentos de celulose, a fim de reduzir a sua cristalinidade e o seu grau de polimerização, além de também modificar a estrutura supramolecular da celulose e a quantidade de poros que esta apresenta, avaliando todos estes parâmetros quantitativamente frente à atividade enzimática livre e imobilizada. A sacarificação enzimática de celulase livre e imobilizada foi determinada na hidrólise de celulose microcristalina (Avicel), e dois tipos de celulose nativa, algodão e eucalipto. Avicel foi pré-tratada a partir da (i) dissolução e degradação em ácido fosfórico, (ii) dissolução em acetato de 1-etil-3-metil-imidazólio (EMIMAc), e (iii) da hidrólise por endoglucanases adsorvidas, uma enzima do complexo enzimático celulase. Celulose de eucalipto e algodão foram mercerizadas a fim de se retirar contaminantes. A hidrólise com celulase livre levou a taxas de conversão de celulose à glicose que não apresentaram correlação com o índice de cristalinidade, nem com o grau de polimerização, mas apresentaram correlação direta com a capacidade de absorção de água, também chamada de constante de capilaridade. As taxas de conversão obtidas na presença de celulase adsorvida apresentaram correlação inversa com a constante de capilaridade, evidenciando que o mecanismo de hidrólise neste caso é fortemente dependente da camada de hidratação da celulose.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Celulose. Pré-tratamentos. Celulase. Filmes finos de biomacromoléculas.

ABSTRACT

OGEDA, T. L. **Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Cellulose.** 2011. (107 p). Dissertation (Masters Degree) – Institute of Chemistry, University of São Paulo, 2011.

Enzymatic hydrolysis of cellulose represents, in relation to acid hydrolysis, a clean alternative for production of ethanol. However, there are two difficulties: the high cost of enzymes and the recalcitrance of the crystalline regions of cellulose. For the first problem, we propose the immobilization of cellulase, an enzymatic complex which synergistically promotes the degradation of cellulose to glucose and cellobiose, onto Si wafers. Although the enzymatic activity of immobilized cellulase is generally lower than that of free cellulase, immobilization has proven to be advantageous since it allows up to six reuses maintaining the activity level at 80% of the original one. Concerning the recalcitrance of the crystalline regions of cellulose, we used different cellulose pretreatments in order to reduce its crystallinity and degree of polymerization, and to modify the cellulose supramolecular structure along with the amount of pores. All these parameters were quantitatively correlated with the activity of free and immobilized cellulase. The enzymatic activity of free and immobilized enzyme was determined by the hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel), and two types of native cellulose, cotton and eucalyptus. Avicel was pretreated in three different ways: (i) dissolution and degradation in phosphoric acid, (ii) dissolution in 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate (EMIMAc), and (iii) hydrolysis by immobilized endoglucanase, an enzyme that is part of the cellulase enzyme complex. Eucalyptus and cotton pulp were mercerized in order to remove contaminants. Hydrolysis with free cellulase yielded cellulose to glucose conversions that were neither correlated with the crystallinity index nor with the degree of polymerization, but were directly correlated with the cellulose ability to absorb water (capillary constant). The conversion rates obtained in the presence of immobilized cellulase correlated inversely with the capillary constant values, indicating that hydrolysis mechanism in this case is strongly dependent on the hydration layer of cellulose.

Keywords: Enzymatic hydrolysis. Cellulose. Pretreatments. Cellulase. Biomacromolecules thin films.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o sistema energético internacional é fortemente dependente de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), pois cerca de 80% do consumo mundial de energia se originam dessas fontes; o consumo apresenta um crescimento anual de cerca de 2% (média em 20 anos) e cresceu 3,1% ao ano (média dos últimos 5 anos) (GOLDEMBERG, 2008; W.E.A., 2000). Esta é uma situação que merece mudanças não só pela exaustão gradativa das reservas de combustíveis fósseis como também pelos efeitos negativos ao meio ambiente que resultam do seu uso, entre os quais o aquecimento global. A busca por combustíveis alternativos levou alguns países a optar por biocombustíveis devido principalmente a esse recente interesse na energia da biomassa, o que gerou combustíveis líquidos tais como o etanol produzido pela fermentação de açúcares (etanol de primeira geração) extraído, principalmente, da cana-de-açúcar, do milho, da beterraba, entre outras fontes (MARQUES, 2008). Outra via para a produção de etanol é pela hidrólise de biomassa celulósica (GOYAL, 1991; WYK, 2001), com geração de glicose, a qual pode ser fermentada produzindo etanol (etanol de segunda geração).

O Brasil está avançado quando se trata de substituir combustíveis fósseis, como a gasolina, por etanol renovável; o Estado de São Paulo é um dos maiores produtores de

cana-de-açúcar (68% do total das plantações no país) (GOLDEMBERG, 2007; GALEMBECK, 1997; GALEMBECK, 2009; HAHN-HAGERDAL, 2006). O Brasil produz cerca de 18 bilhões de litros de etanol combustível (dado da safra 2008/09 de maio/2009) (*site* UNICA, 2011), o que representa 36% do total mundial. O Projeto Bioetanol *("Produção de Bioetanol através de Hidrólise Enzimática de Biomassa de Cana-de-açúcar")*, iniciado em 2006 e financiado pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) através do Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT) tem como meta viabilizar uma tecnologia para a conversão da celulose do bagaço e da palha da cana ao combustível etanol, já que apenas um terço da biomassa contida na planta cana é aproveitado para a produção de açúcar e etanol (ERENO & CESAR, 2007), minimizando a expansão dos canaviais. O Projeto Bioetanol é uma grande rede de pesquisa que agregou competências geradas ao longo da história brasileira, em especial pelo Proálcool, para desenvolver o processo de hidrólise enzimática de modo a torná-lo viável comercialmente (STAMBUCK, 2008).

Outro projeto da FAPESP que também objetiva a produção de bioenergia no Brasil é o Programa BIOEN, voltado para aprimorar a produtividade do etanol brasileiro de 1ª e 2ª geração e avançar tanto em ciência básica quanto em desenvolvimento tecnológico relacionados à geração de energia a partir de biomassa (MARQUES, 2008; *site* BIOENFAPESP, 2011). O programa já gerou uma série de trabalhos, indo desde o seqüenciamento do genoma da cana-de-açúcar por um equipamento chamado Pirossequenciador 454 até diversos workshops, como o *Bioen on Sugarcane Improvement*, onde se discutiu tanto características intrínsecas da cana-de-açúcar – o seu genoma – como os parâmetros ambientais que aperfeiçoariam o crescimento e rendimento da planta (GUIMARÃES, 2009). Em outro workshop, o BIOEN/PPP *Etanol on Sugarcane Photosynthesis*, que uniu o programa BIOEN a outro programa da FAPESP, o Programa de Pesquisa em Políticas Públicas (PPPP), responsável por financiar atividades de pesquisa que beneficiem a formulação e implementação de políticas públicas, cujos resultados tenham

impacto no Estado de São Paulo, discutiram-se as características da fotossíntese na cana-de-açúcar, os mecanismos de fixação de energia da planta e os meios para se alcançar uma melhor produtividade.

Basicamente, a biomassa celulósica é composta de cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações β-1,4-glicosídicas) unidas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses (polissacarídeos ramificados formados principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico) e ligninas (redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas) (WYMAN, 2005). As porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa, representando em torno de 40-50% e 20-30% do peso seco das plantas, respectivamente, são polissacarídeos que podem ser hidrolisados a açúcares e fermentados. As ligninas, quando degradadas a frações de massas molares menores, podem ser utilizadas na fabricação de espumas de poliuretanas, resinas fenólicas e epóxi, como fontes de fenol e etileno (LORA & GLASSER, 2002), e podem ser convertidas em fibras de carbono (KADLA, 2002).

Pode se dizer de uma maneira simples que a obtenção de etanol a partir de biomassa envolve duas etapas (OLSSON, 2005). A primeira etapa consiste na hidrólise dos polissacarídeos, gerando mono e dissacarídeos. A segunda etapa envolve a fermentação dos monos e dissacarídeos em etanol. A hidrólise de celulose gera glicose e celobiose (um dímero de glicose). Por outro lado, a hidrólise de ligninas e hemicelulose geram açúcares e subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana.

Os processos hidrolíticos não são triviais devidos (i) às complexas interações entre hemicelulose e celulose presentes nas paredes celulares dos vegetais e entre estes polissacarídeos e ligninas, (ii) à natureza cristalina da celulose e (iii) à barreira física formada

por ligninas ao redor das fibras celulósicas. Por esta razão, a biomassa sofre um pré-tratamento para separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose, a qual sofre tratamento específico para a obtenção de glicose.

A hidrólise de celulose pura à glicose pode ocorrer *via* ácida ou *via* enzimática, e segue a reação geral (1).

$$(C_6H_{10}O_5)_n + n\,H_2O \rightarrow n\,C_6H_{12}O_6 \qquad (1)$$

A hidrólise ácida, apesar do seu baixo custo, apresenta as desvantagens de corrosão e meio reacional agressivo, com formação de subprodutos (WYMAN, 2005). Se, por um lado, o uso de ácidos diluídos (como 1,0% ácido sulfúrico) é mais brando, sua reação requer temperaturas muito mais altas (cerca de 220°C) que provocam a degradação da glicose a subprodutos como hidroximetil furfural. Por outro lado, o uso de ácidos concentrados (como, por exemplo, 75% ácido sulfúrico) requer temperaturas mais moderadas para alcançar altas produtividades semelhantes às das enzimas celulase. Porém, o meio reacional torna-se, nesse último caso, altamente corrosivo.

Enzimas celulase são muito específicas em catalisar apenas a adição de água às cadeias de celulose; a temperatura ótima necessária para a reação é de cerca 50°C, praticamente eliminando reações de degradação. Assim, somente a glicose é formada pela hidrólise enzimática da celulose, e os rendimentos teóricos podem se aproximar de 100%. Entretanto, os processos hidrolíticos enzimáticos não são triviais devido ao (i) alto custo das enzimas celulases e (ii) à recalcitrância das regiões cristalinas da celulose (OGEDA, 2010). Como a hidrólise enzimática de celulose em glicose tem recebido um interesse cada vez maior nos últimos 10 anos, a demanda por biocombustíveis economicamente sustentáveis indica uma necessidade urgente de reduzir os custos associados à sua produção (LYND, 2008). Apesar do custo das enzimas ser elevado, o que torna inviável a sua aplicação industrial, o processo enzimático é muito mais atraente, pois sua eficiência pode

ser ajustada através da adequação das condições ou mesmo por modificação genética da enzima. A principal vantagem está no fato de ser um método mais "limpo" do que os processos químicos, sendo considerada uma "alternativa verde" para a produção de etanol.

Esta introdução descreve as características estruturais e propriedades da celulose (1.1), pré-tratamentos de biomassa (1.2), além da estrutura e função do complexo enzimático celulase (1.3) e, finalmente, a hidrólise enzimática (1.4).

1.1 – Estrutura e Propriedades da Celulose

A celulose é um polímero linear com ligações glicosídicas β-1,4 entre unidades D-glicopiranose. Tipicamente, cadeias de celulose em paredes celular primária de plantas têm graus de polimerização (*DP*s) na faixa de 5.000 a 7.500; o DP de celulose de madeira é em torno de 10.000, enquanto que a celulose algodão varia ao redor de 15.000 (O'SULLIVAN, 1997). A Figura 1.A, abaixo, mostra a estrutura molecular da celulose.

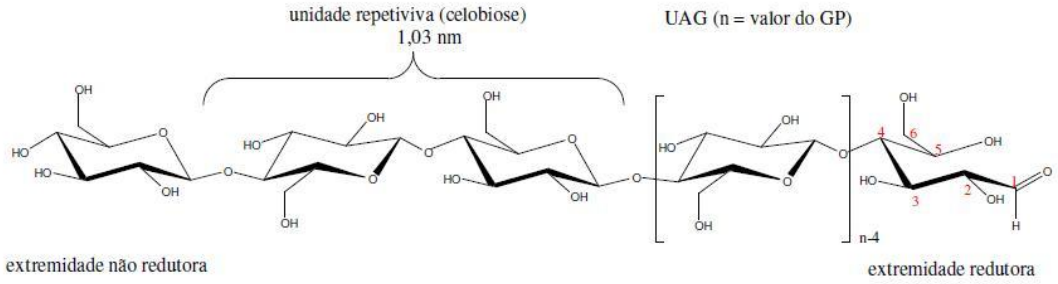


Figura 1.A. Estrutura molecular da celulose (KLEMM, 1988).

À temperatura ambiente, os anéis relativamente rígidos de glicose se encontram em sua energia mais baixa, em conformação cadeira, com os grupos volumosos em posição equatorial, sem transições para outra conformação *cadeira* ou para várias possíveis formas (*barco* ou *barco-torcido)* (OGEDA, 2010). A presença de grupos hidroxilas na glicose gera fortes ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares ao longo da cadeia polimérica. Na Figura 1.B encontram-se representadas essas ligações, sendo OH(6)---OH(3") e OH(3)---OH(5'), ligações intermolecular e intramolecular, respectivamente.

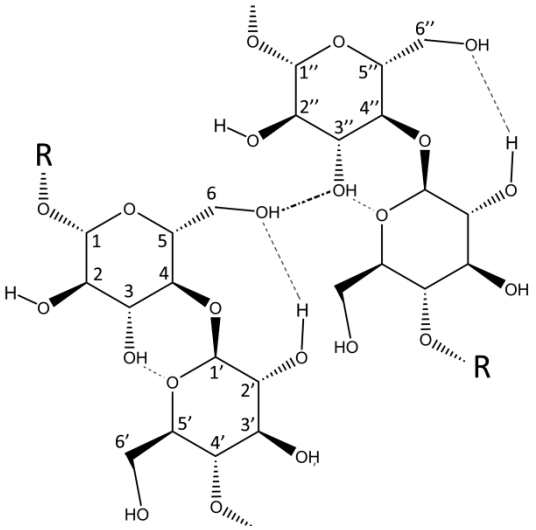


Figura 1.B. Representação das ligações inter- e intramoleculares nas cadeias de celulose. (MORGENSTERN & KAMMER, 1996).

A celulose é um polímero semicristalino, isto é, apresenta regiões cristalinas, altamente organizadas e também regiões amorfas, onde as cadeias estão agrupadas de maneira mais irregular (FRENCH, 1985; MARCHESSAULT, 1983). Isso acontece devido ao empacotamento das cadeias, que se unem pela rede de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, conforme explicitado acima. Essas ligações são responsáveis por certas propriedades da celulose, pois geram uma alta rigidez na estrutura e proporcionam um elevado grau de organização cristalina – sob condições normais, celulose é extremamente insolúvel em água, necessário para sua própria função como armação estrutural nas paredes celulares vegetais (SJÖHOLM, 2000).

As ligações intramoleculares são responsáveis pela rigidez da cadeia polimérica, enquanto que as intermoleculares levam à formação da fibra vegetal (KLEMM, 1988). A porção de material cristalino em um polímero, inclusive na celulose, é denominada *Índice de Cristalinidade* (*Ic*). O *Ic* influencia uma série de propriedades da celulose, sendo uma característica estrutural muito importante, e será discutida extensivamente ao longo deste trabalho.

A estrutura cristalina da celulose foi primeiramente descrita por Mark e Meyer, em 1928 (MARK, 1928). Desordem e polidispersidade no comprimento das cadeias impedem

a formação de cristais simples, e estudos de difração de raios-X da estrutura cristalina da celulose são limitados para experimentos de difração da fibra (WYMAN, 2005). A combinação de difração de raios-X com cálculos de modelo indica que cadeias de celulose cristalina estão em conformação de duplas hélices, achatadas e estendidas; pequenas variações nesta conformação ou no empacotamento das cadeias celulósicas dentro dos cristais levam a um bom número de polimorfos cristalinos, muitos dos quais podem ser interconvertidos por vários processos de tratamento (KROON-BATENBURG, 1996).

Sete cristais polimorfos foram identificados para celulose, e são designados como Iα, Iβ, II, III_I, III_{II}, IV_I, e IV_{II}, como indicado na Figura 2 (KADLA, 2000).

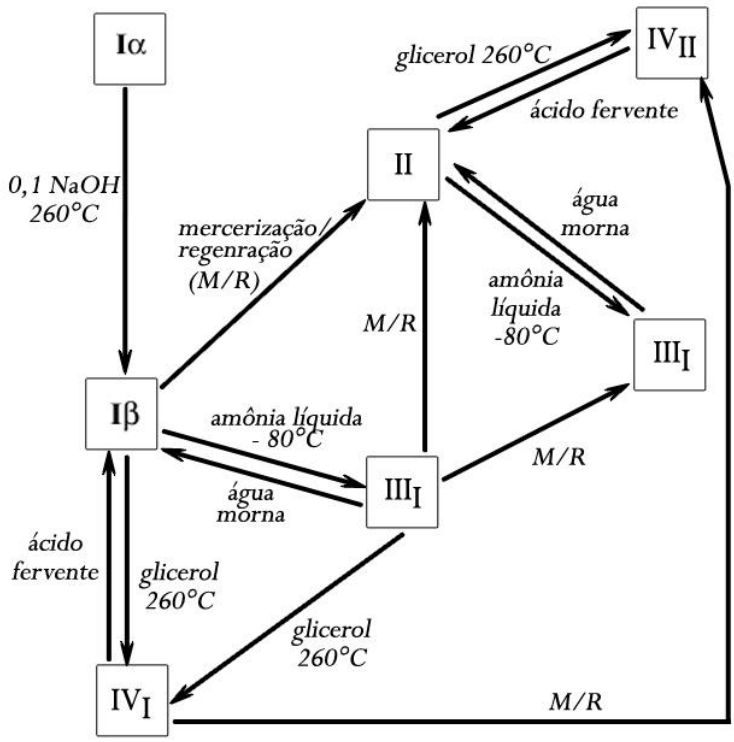


Figura 2. Polimorfos da celulose (KADLA, 2000).

Cada uma destas formas cristalinas apresenta características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, ponto de fusão, forma do cristal, além de propriedades ópticas e elétricas (LI, 1991; GILBERT, 1992). Na natureza, celuloses Iα e Iβ são as mais abundantes e, logo, conhecidas por *celulose nativa*.

Celulose Iα é o alomorfo majoritário produzido por fontes de bactérias e fungos e é um cristal triclínico P_1 com um resíduo de celobiose por cela unitária (CHEN, 1998). As cadeias de celulose são orientadas de modo paralelo como seria esperado para uma cela unitária com uma cadeia. Celulose Iα é convertida à forma mais estável Iβ através de um processo de recozimento a 270ºC em várias fontes (MORGAVI, 1994). Celulose Iβ é a forma cristalina majoritária em plantas superiores sendo monoclínica na natureza, com duas metades de celobiose por cela unitária. Celulose II é o polimorfo majoritário na indústria de processamento de celulose. Celulose II pode ser formada a partir de regeneração ou mercerização da celulose I e é também o alomorfo mais estável termodinamicamente.

Na Figura 3.A, temos a representação da estrutura de celulose I (nativa) e celulose II (regenerada) (GARDNER, 1975; LANGAN, 2001). Nota-se que os grupos hidroximetila da celulose I encontram-se na conformação *t-g* (*trans-gauche*), enquanto para a celulose II essa conformação é *g-t*. A conseqüência desta diferença conformacional dos grupos hidroximetila faz com que a celulose I apresente uma ligação intramolecular adicional (HO–2' ..... O-6) ao longo da cadeia, não existente na celulose II.

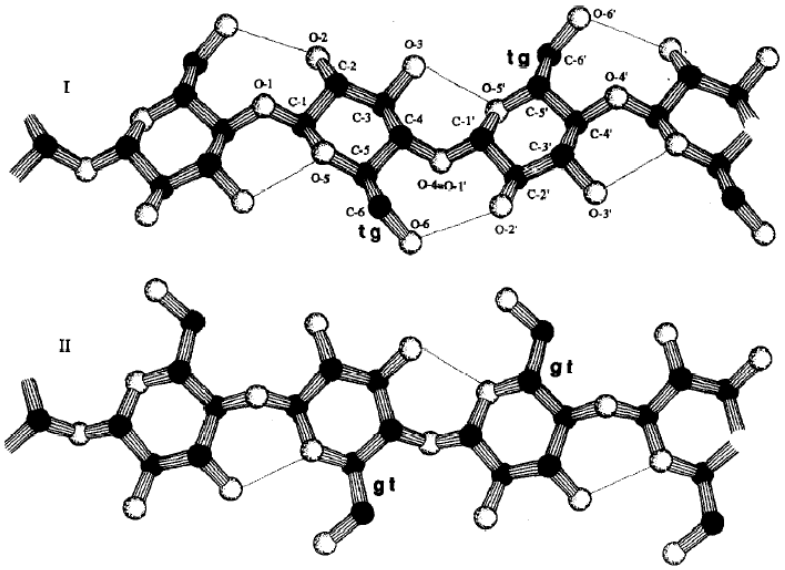
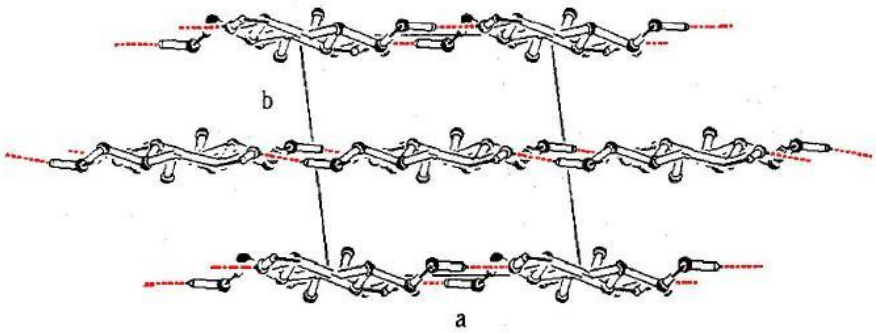


Figura 3.A. Modelo molecular da celulose I e II. As conformações dos grupos hidroximetila, t-g ou g-t, estão marcados e as ligações intramoleculares indicadas (GARDNER, 1975).

Como conseqüência das diferentes conformações que o grupo hidroximetila pode assumir, torna-se possível duas estruturas de empacotamento das cadeias de celulose em um microcristal: estrutura de cadeia *paralela* e *antiparalela*, característica da celulose I e celulose II, respectivamente. A estrutura paralela ocorre quando os grupos $–CH_2OH$ das cadeias adjacentes encontram-se no mesmo lado, enquanto que na estrutura antiparalela esses grupos se encontram em lados diferentes do "*backbone*" do polímero. Na Figura 3.B, estão ilustradas essas estruturas.

(a)



(b)

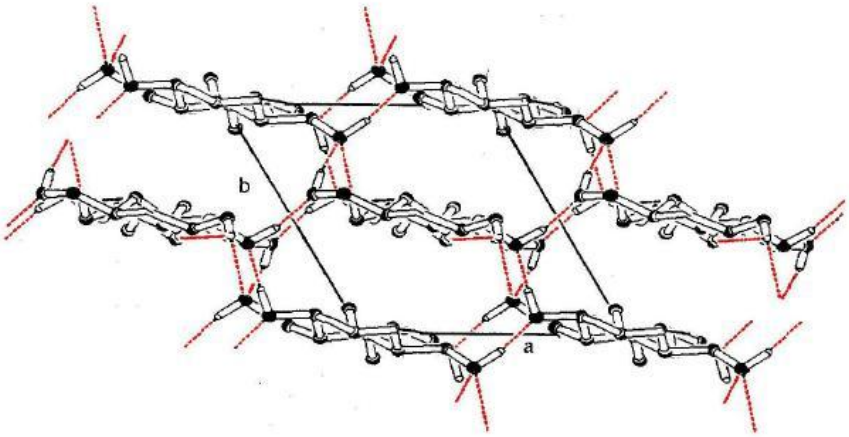


Figura 3.B. Projeção da cela unitária da celulose no plano a,b, representando: *(a)* a celulose I (cadeia paralela); e *(b)* a celulose II (cadeia antiparalela); ("-----" representa as ligações de hidrogênio entre as cadeias) (KROON-BATENBURG & KROON, 1997).

O empacotamento antiparalelo (celulose II, Figura 3.B.b) permite a formação de ligações de hidrogênio em maior extensão ao longo das cadeias, gerando arranjos em escala tridimensional, resultando numa estrutura de menor energia e, conseqüentemente, mais estável. Esta característica estrutural pode ser uma explicação plausível do fato da celulose

II não ser convertida para a celulose I (menos estável, Figura 3.B.a) (KROON-BATENBURG & KROON, 1997).

1.2 – Pré-tratamentos de Celulose

Geralmente a estrutura altamente ordenada da celulose é quebrada em uma etapa de pré-tratamento, para aumentar a eficiência da hidrólise da celulose em açúcares fermentáveis para produção de biocombustíveis ou biofermentação a outros produtos. Hidrólises enzimáticas possuem um rendimento de produção de açúcar menor que 20%, enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, o rendimento pode alcançar até >90% (GHOSH & GHOSE, 2003). Atualmente, há uma grande quantidade de processos de pré-tratamentos disponíveis, podendo estes serem físicos, químicos, biológicos ou de fracionamento por solvente (SOUSA, 2009), cada voltado aos seus substratos específicos, com vantagens e desvantagens (OGEDA, 2010).

As operações físicas de pré-tratamento são baseadas na redução do tamanho da partícula de celulose através de moagem, aumentando o desempenho da enzima pelo aumento da área superficial e, em alguns casos, pela redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose (FAN, 1981).

Os pré-tratamentos biológicos normalmente utilizam fungos e algumas bactérias (actinomicetos) e são utilizadas em substratos mais complexos, como biomassa lignocelulósica (SOUSA, 2009). Durante o processo, estes microrganismos secretam enzimas extracelulares como lignina peroxidases e lacases que ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa.

As principais tecnologias de pré-tratamento estão representadas junto aos pré-tratamentos químicos, incluindo pré-tratamentos ácidos, alcalinos ou oxidativos. Neste tipo de processo, a maior parte dos pré-tratamentos difere nos tipos de reagentes e mecanismos

responsáveis pelas modificações estruturais e químicas, que resultam numa acessibilidade melhorada da enzima, além de rendimentos maiores (SOUSA, 2009).

A categoria de pré-tratamento de fracionamento por solvente aplica o conceito da solubilização diferencial e do fracionamento dos vários componentes da parede celular vegetal (lignocelulose), incluindo a celulose, pelo rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibras (HEINZE & KOSCHELLA, 2005). A dissolução da celulose por um solvente de celulose não é considerada o método mais fácil para perturbar a estrutura cristalina da celulose, pois há poucos solventes capazes de dissolver celulose por completo. Recentemente, líquidos iônicos (DADI, 2006; LIU & CHEN, 2006; RAYNE & MAZZA, 2007), N-metil-morfolina-N-óxido (*NMMO*) (KUO & LEE, 2009), solução aquosa de NaOH e uréia (CAI, 2004; RUAN, 2004) e ácido fosfórico concentrado (WEI, 1996; ZHANG, 2006; ZHANG, 2007) têm sido empregados para a dissolução da celulose. Estes solventes oferecem condições amenas de dissolução, com temperatura < 130°C e pressão atmosférica, quando comparados com os pré-tratamentos convencionais, tais como ácido diluído, explosões de vapor, *organosolv*, e etc (MOSIER, 2005; PAN, 2005).

O H_3PO_4 concentrado (> 82%) é usado para tratar (intumescer) materiais lignocelulósicos (ZHANG, 2007). Ele é utilizado principalmente para (i) dissolver as microfibrilas de celulose, quebrando as ligações de hidrogênio entre as cadeias e (ii) hidrolisar fracamente a celulose a fragmentos de baixos graus de polimerização. O ácido fosfórico concentrado aqui deve ser considerado principalmente como um solvente de celulose e, secundariamente, como um catalisador de hidrólise da celulose.

O uso de líquidos iônicos como meio para dissolução e hidrólise de biomassa se caracteriza como um potencial pré-tratamento (SWATLOSKI, 2002). O interesse nestes compostos, comumente anunciados como o "meio verde" e a "alta tecnologia do futuro", está aumentando devido à baixíssima pressão de vapor, estabilidade térmica, além das

várias propriedades ajustáveis, como polaridade, hidrofobicidade e miscibilidade com solventes (pela modificação apropriada do cátion e do ânion).

Especialmente na química de carboidratos e polissacarídeos os líquidos iônicos vêm ganhando um espaço especial (SWATLOSKI, 2002; ZHU, 2006; EL SEOUD, 2007). Por exemplo, alguns líquidos iônicos como o cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio e cloreto de 1-alil-3-(1-metil)imidazólio são excelentes solventes para celulose. A Tabela 1 nos dá exemplos de solubilidade, utilizando celulose de alta massa molar (DP ≈ 1000), sem pré-tratamento.

Tabela 1. Solubilidade de celulose de alta massa molar (DP~1000) em líquidos iônicos. DMIM, AMIM, EMIM, BMIM, HMIM e OMIM representam os cátions 1,3-dimetilimidazólio, 1-alil-3-metilimidazólio, 1-etil-3-metilimidazólio, 1-butil-3-metilimidazólio, 1-hexil-3-metilimidazólio e 1-octil-3-metilimidazólio, respectivamente.

Líquido iônico	**Método**	**Solubilidade (m/m %)**
[DMIM][$(CH_3)_2PO_4$]	Aquecimento (30°C)	2
[AMIM]Cl	Aquecimento (80ºC)	2,9–5
[EMIM]Cl	Aquecimento (97°C)	4
[EMIM]Ac	Aquecimento (80ºC) + 900 rpm	3–4
	Aquecimento (110ºC)	~10
[BMIM]Cl	Aquecimento (70ºC)	3
	Aquecimento (80ºC) + ultrassom	5
	Aquecimento (100ºC)	10
	Aquecimento por microondas, pulsos de 3–5-s	25, solução viscosa clara
[BMIM]Br	Microondas	5–7
[BMIM]SCN	Microondas	5–7
[BMIM][BF_4]	Microondas	Insolúvel
[BMIM][PF_6]	Microondas	Insolúvel
[HMIM]Cl	Aquecimento (100ºC)	5
[OMIM]Cl	Aquecimento (100ºC)	Pouco solúvel

A maior solubilidade de celulose em [BMIM]Cl observada a partir de análise comparativa dos dados da Tabela 1 pode ser devida à maior penetração dos íons na extensa rede de ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose, permitindo uma dissolução mais rápida. Já a presença de água no líquido iônico diminui significantemente a solubilidade da celulose (SWATLOSKI, 2002). Após a dissolução em líquido iônico a celulose pode ser

regenerada pela adição de água, etanol ou acetona à solução. A celulose regenerada possui grau de polimerização e polidispersidade semelhantes aos iniciais, indicando que não há degradação das cadeias de celulose pelo líquido iônico. Entretanto, a morfologia inicial de microfibras se transforma em uma macroestrutura homogênea, revelando perda de cristalinidade após a regeneração (FIDALE, 2009). Portanto, o uso de líquidos iônicos como solvente é um excelente pré-tratamento de celulose, o qual leva à redução de cristalinidade da celulose e conseqüente aumento dos rendimentos nos processos hidrolíticos e da produção de açúcares fermentáveis.

O processo de *mercerização* também foi analisado neste trabalho, e recebe este nome em homenagem ao seu inventor, John Mercer. Neste tratamento, a celulose é tensionada em solução aquosa de NaOH (concentrações empregadas variam de 12 a 20%), e tem como principal objetivo melhorar a resistência das fibras e fios à tração (D'ALMEIDA, 1988; SJÖSTROM, 1993). O processo de mercerização corresponde a uma das formas de aumentar a reatividade e a acessibilidade às fibras celulósicas, pois os feixes de fibras tornam-se mais separados (converte de maneira irreversível a celulose do tipo I em celulose tipo II, sem a degradação do biopolímero). Este processo também promove a purificação da celulose, pois remove as impurezas como ceras, hemiceluloses, pectinas e sais minerais eventualmente presentes, restando a α-celulose que é a celulose pura, quando o processo atinge eficiência máxima (SJÖSTROM, 1993).

Neste trabalho, investigaram-se principalmente quais são as características estruturais das celuloses que influenciam na atividade hidrolítica. Ou seja, avaliaram-se os efeitos de diferentes pré-tratamentos de dissolução e mercerização de celulose sobre a sacarificação enzimática.

1.3 – Complexo Enzimático Celulase

1.3.A – Modo de ação e sinergismo

Celulase é um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente – sinergismo é dito quando a atividade exibida por misturas de componentes é maior que a soma das atividades desses componentes avaliadas separadamente (WOOD, 1979). Endoglucanases, EGB (E.C. 3.2.1.4) clivam as cadeias de celulose em posições aleatórias dentro das próprias cadeias, atuando majoritariamente em porções amorfas; exoglucanases, CBH, (ou seja, celobiohidrolases, E.C. 3.2.1.91) degradam eficazmente as regiões cristalinas da celulose mediante a clivagem de dímeros de celobiose nas extremidades (redutora ou não-redutora) das cadeias celulósicas de forma contínua (DIVNE, 1994; LI, 2007; DAVIES, 1995). A celobiose é posteriormente convertida à glicose pela β-glicosidase (E.C. 3.2.1.21) minimizando a ação inibitória que a presença de celobiose exerce sobre as atividades endo e exo (HENRISSAT, 1994; LYND, 2002). A Figura 4 mostra esquematicamente a ação catalítica explicada acima.

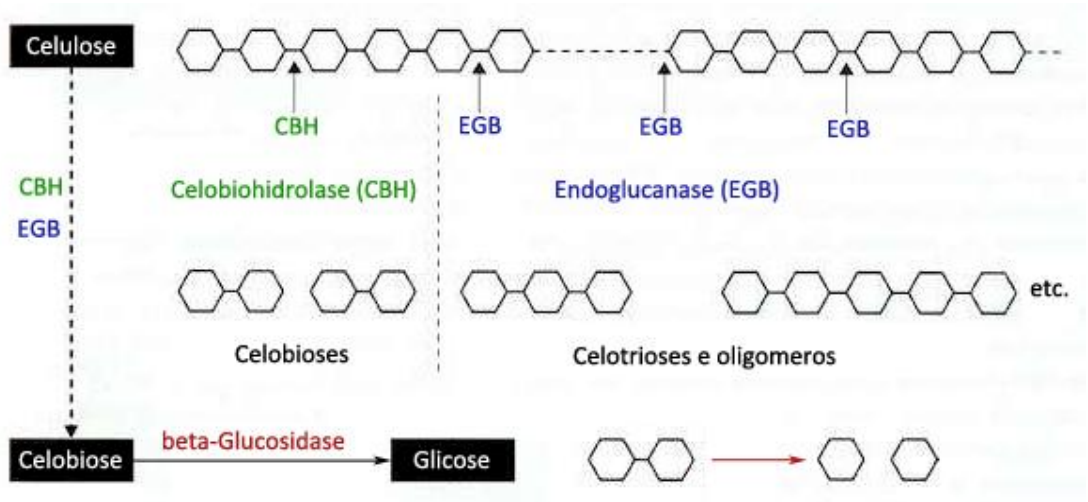


Figura 4. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.

O sinergismo exo-endo é facilmente explicado pelo fato das endoglucanases fornecerem mais fins de cadeia nos quais as celobiohidrolases podem degradar (MEDVE, 1998; HENRISSAT, 1985).

O sistema da celulase de fungos foi largamente interpretado em termos de desenvolvimento substancial biológico molecular e bioquímico para o fungo *Trichoderma reesei* – o primeiro fungo a ser utilizado na produção industrial de celulase, permanecendo ainda como a fonte mais utilizada. De várias maneiras, este sistema foi o sistema arquétipo desenvolvido de celulase. Muito da pesquisa subseqüente neste campo focou em mutação/seleção de melhores descendências para comercialização da enzima, incluindo conversão em biomassa. Além de celulases de fungos, há celulases produzidas por bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Na literatura há excelentes revisões sobre celulases bacterianas (WRIGHT, 1988; WRIGHT, 1987; LINDER, 1995; WYMAN, 1999).

Tabela 2. Nomenclatura, substratos, massa molar média ponderal (*Mw*), ponto isoelétrico (pI) e teores relativos das celulases produzidas pelo *T. reesei* (OLSSON, 2005). A família diz respeito à classificação de enzimas com seqüências homólogas de aminoácidos similares, as quais geram estruturas tridimensionais e sítios ativos semelhantes e, portanto, mecanismos catalíticos semelhantes.

Enzima[a]	***Substratos***[b]	***Família***	***Mw (kg/mol)***	***pI***	***Teor relativo (%)***
EGI (Cel7B)	CM, CA, CMC, HEC, xilana	7	48,2	4,5	6-10
EGII (Cel5A)	CM, CA, CMC, HEC, galactomanana	5	44,2	5,5	1-5
EGIII (Cel12A)	CM, CA, CMC, HEC	12	25,2	7,5	< 5
EGIV (Cel161A)	CM, CA, CMC, HEC	61	35,5	d.d	d.d.
EGV (Cel45A)	CM, CA, CMC, HEC	45	24,4	2,9	< 5
CBHI (Cel7A)	CC, CM, AC	7	54,1	3,9	60-75
CBHII (Cel6A)	CC, CM, AC, CMC	6	49,7	5,9	10-20
BGI (Cel3A)	CB, CT	3	78,4	d.d.	1-2
BGII (Cel1A)	CB, CT	1	52,2	d.d.	1-2

d.d. - dados desconhecidos

[a] Abreviações entre parênteses correspondem à classificação das famílias das glicosil hidrolases.

[b] Substratos para os quais as celulases são ativas. CM-celulose microcristalina (Avicel), CA-celulose amorfa, CMC-carboximetil celulose, HEC-hidroxietil celulose, CC-celulose cristalina, CB-celobiose, CT-celotriose.

T. reesei produz duas celobiohidrolases, ao menos cinco endoglucanases e duas β-glucosidades. A Tabela 2 mostra classificação, substratos, características e teores relativos das celulases produzidas pelo *T. reesei* (OLSSON, 2005).

A arquitetura molecular das endoglucanases e celobiohidrolases tem um papel importante nas respectivas atividades catalíticas. Celobiohidrolases CBHI apresentam terminais de pequenos glicopeptídeos, os quais se ligam à celulose e grandes núcleos protéicos que carregam o sítio ativo (SALOHEIMO, 1997). De fato, a maioria das endoglucanases e celobiohidrolases consiste de um grande núcleo protéico e um pequeno domínio ligante de celulose (CBM) unido por seqüências longas de aminoácidos (até ~60 resíduos). Os sítios ativos das endoglucanases estão expostos para fora da enzima, enquanto os sítios ativos das celobiohidrolases estão dentro de um túnel. Por exemplo, no caso da CBHI do *T. reesei*, um túnel de 50 Å de comprimento e 10 sítios ligantes de celulose garante a permanência da celulose dentro do túnel enquanto ocorre a hidrólise (DIVNE, 1994). O domínio ligante tem a função de aproximar o núcleo catalítico da superfície da celulose e será detalhado na seção a seguir.

1.3.B – Adsorção da celulase sobre celulose

A primeira e mais rápidas das etapas de degradação enzimática da celulose é a adsorção da celulase sobre a celulose (HALL, 2010).

A Figura 5 traduz a organização estrutural (geral) da maioria das celulases. O domínio catalítico, responsável pela atividade hidrolítica, liga-se ao domínio de ligação (CBM), responsável pela ligação da enzima ao substrato, através de um peptídeo ligante longo e flexível.

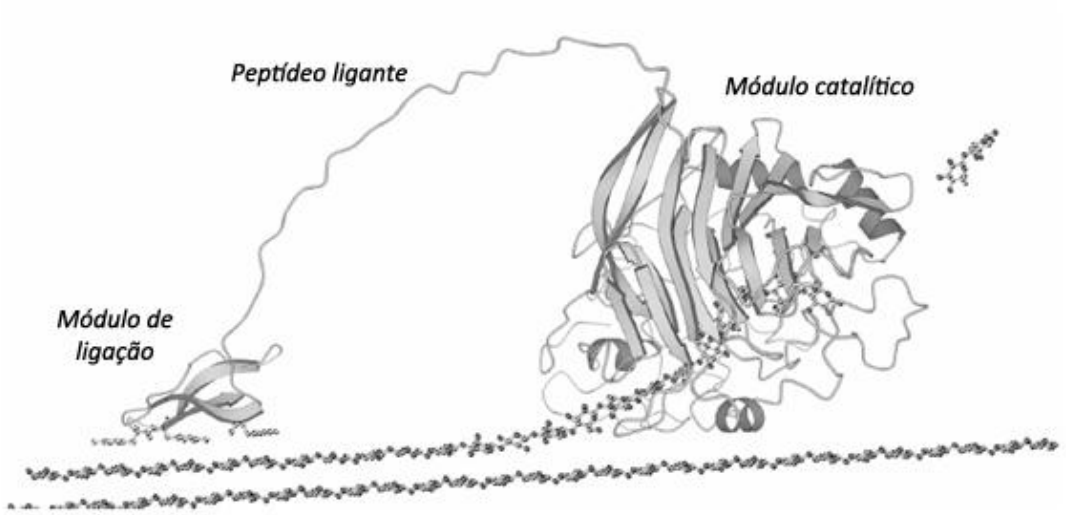


Figura 5. Estrutura geral das celulases. Na imagem, temos um modelo hipotético de uma CBH I agindo na celulose microcristalina (DIVNE, 1998).

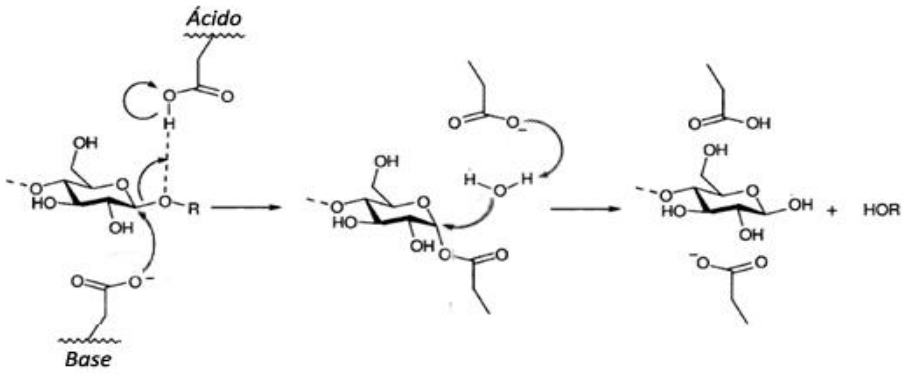
Algumas enzimas da celulase carregam um CBM livre ou um CBM ligado a um peptídeo. Embora o CBM possua um papel inquestionável na hidrólise da celulose por algumas celulases, ele pode levar à adsorção de enzimas "não-produtiva" sobre a celulose (LINDER, 1995). Por exemplo, a imobilização de enzimas celobiohidrolases sobre fibras de celulose não segue uma isoterma de adsorção de Langmuir, e tal fato foi explicado pela desigual disponibilidade de sítios de ligação para as proteínas na superfície da celulose (STÅHLBERG, 1991). A principal função do CBM é, portanto, trazer o núcleo catalisador em estreito contato com a superfície de celulose, aumentando assim o tempo de contato. A superfície do módulo ligante interage com a superfície de celulose, através de três resíduos aromáticos de aminoácidos que são capazes de interagir com as unidades glicosídicas.

Neste trabalho, procuramos estudar o efeito da imobilização das enzimas celulases em substratos sólidos, tornando o processo enzimático economicamente atrativo, pois as enzimas mantém suas propriedades catalíticas e torna possível sua re-utilização (CHIBATA, 1978).

1.4 – Hidrólise Enzimática – Enzimas Livres e Imobilizadas

A hidrólise enzimática das ligações glicosídicas ocorre através de catálise ácida geral, onde são necessários dois aminoácidos críticos, um doador de prótons e um nucleófilo/base. A hidrólise pode ocorrer via dois mecanismos principais, nos quais haverá a retenção ou inversão da configuração do carbono anomérico (DAVIES, 1995). O mecanismo pelo qual a reação ocorre depende da distância entre os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise. Nas enzimas que catalisam a reação por meio do mecanismo de retenção (Figura 6a) os resíduos do sítio ativo estão distantes entre si por um distância média de 5,5 Å, enquanto que naqueles que atuam por meio do mecanismo de inversão (Figura 6b, abaixo), a distância média é de 10 Å.

(a)



(b)

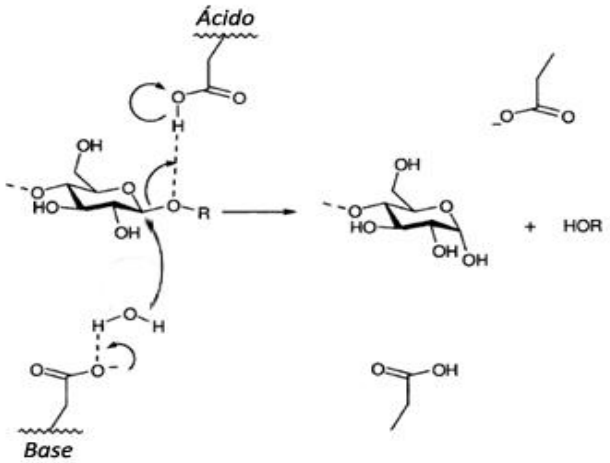


Figura 6. (a) Mecanismo de *retenção* por reação de substituição, através de um intermediário glicosil-enzima covalente (mecanismo S_N1). *(b)* Mecanismo de *inversão* por reação de substituição (mecanismo S_N2) (DAVIES & HENRISSAT, 1995).

A hidrólise enzimática de celulose pela celulase envolve basicamente três etapas: adsorção das celulases na superfície de celulose, subseqüente quebra da celulose através da ação sinérgica das celulases e dessorção da celulase do resíduo de celulose no sobrenadante. Acredita-se que a acessibilidade da celulase nos sítios de adsorção sobre a estrutura cristalina da celulose é um fator importante na determinação da taxa de hidrólise. A fim de se aumentar a área superficial acessível à adsorção de celulases, o substrato é sujeito freqüentemente a pré-tratamentos que destroem o arranjo de microfibrilas de celulose nos domínios cristalinos.

A susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática é em grande parte determinada pela acessibilidade das enzimas celulase. Contato físico direto entre as enzimas e as moléculas do substrato é um pré-requisito para a hidrólise. Qualquer característica estrutural que limite a acessibilidade das enzimas diminui o rendimento hidrolítico.

A hidrólise da celulose, um sólido insolúvel em água, é uma reação heterogênea, que não segue modelo com base na cinética de Michaelis-Menten (LYND, 2002; ZHANG, 2004; BANSAL, 2009). Após uma fase inicial de adsorção de celulases em celulose, que é uma etapa rápida em comparação à hidrólise (MEDVE, 1998), a reação prossegue a graus intermediários de conversão: nesse ponto, a velocidade da reação diminui drasticamente. A última etapa da hidrólise requer uma grande fração do tempo da reação global total (BOMMARIUS, 2008). Vários fatores, relacionados tanto com o substrato quanto com as enzimas, foram sugeridos de serem responsáveis por esta desaceleração, mas, até agora, nenhuma explicação mecanística foi validada. As características do substrato comumente ligadas a esta desaceleração incluem a área superficial, porosidade, cristalinidade, grau de polimerização e composição global (no caso de substratos mais complexos; lignocelulose *versus* celulose pura). Para as características das enzimas, temos desativação, inibição, obstrução, acúmulo e processabilidade imperfeita as quais são freqüentemente associadas com desaceleração da hidrólise (ZHANG, 2004; XU, 2007).

Uma das teorias mais controversas diz respeito à influência da cristalinidade e da mudança do grau de cristalinidade durante a hidrólise enzimática. Admite-se que o grau inicial da cristalinidade da celulose desempenhe um papel importante e determinante na velocidade de reação. Uma amostra completamente amorfa pode ser hidrolisada muito mais rapidamente do que uma celulose parcialmente cristalina (ZHANG, 2004; FAN, 1981), o que levou à idéia de que os domínios amorfos em uma amostra parcialmente cristalina são hidrolisados primeiro, deixando a parte cristalina para ser hidrolisada ao final. Conseqüentemente isto resultaria em um índice de cristalinidade que aumentaria com o decorrer da hidrólise, e explicaria a drástica queda na velocidade a graus mais altos de conversão (OOSHIMA, 1983).

Várias revisões afirmam que é difícil concluir que a cristalinidade é um fator determinante (LYND, 2002; ZHANG, 2004; MANSFIELD, 1999). Por exemplo, recentemente (HALL, 2010), o grau de cristalinidade foi medido *in situ* à medida que a hidrólise enzimática ocorria. Curiosamente, não foi observada mudanças de cristalinidade em função da taxa de hidrólise. Embora a correlação entre cristalinidade e a velocidade de hidrólise enzimática já foi demonstrado (MANSFIELD, 1999), a polêmica continua.

Outro critério importante relacionado com a velocidade de hidrólise envolve a capacidade de adsorção de celulases sobre a superfície de celulose. A velocidade mostrou-se proporcional à quantidade de enzimas adsorvidas (MEDVE, 1984; STEINER, 1988; SATTLER, 1989; LEE & FAN, 1982) até um valor crítico de saturação, o qual depende do índice de cristalinidade (HALL, 2010). A diferença de reatividade entre a celulose cristalina e amorfa pode ser relacionado à capacidade de adsorção de endoglucanases em ambos os tipos de substrato (KLYOSOV, 1986). O grau de cristalinidade de celulose influencia a adsorção a uma dada concentração de proteína, sendo que a constante de adsorção máxima mostrou-se elevada em índices de baixa cristalinidade (LEE, 1982). O mesmo estudo concluiu que a ligação eficaz foi o parâmetro limitante com relação à taxa de hidrólise no

caso da celulose com baixo grau de cristalinidade, apesar de uma alta constante de adsorção.

Neste trabalho, a hidrólise enzimática de celuloses de diferentes fontes serão pré-tratadas e avaliadas frentes à sacarificação enzimática tanto com enzimas livres quanto com enzimas imobilizadas. Como as enzimas adsorvidas retêm atividade após imobilização e o contato físico entre a enzima imobilizada e seu substrato é facilitado, esperamos um nível catalítico alto e ainda competitivo com a enzima livre. Em estudos anteriores, celulases imobilizadas em lâminas de Si puderam ser reutilizadas seis vezes, apresentando atividade apenas 20% inferior ao da celulase livre (TÉBÉKA, 2009).

2 OBJETIVOS

Esta dissertação tem por objetivos estudar:

(i) a influência dos diferentes pré-tratamentos de celulose sobre sua estrutura e propriedades físico-químicas;

(ii) a hidrólise enzimática das amostras de celulose antes e após os diferentes pré-tratamentos;

(iii) e quantificar comparativamente as atividades hidrolíticas de celulase livre e imobilizada, correlacionando-as com as propriedades físicas das amostras de celulose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

Lâminas de silício, Si, da Silicon Quest (Califórnia, EUA), cortadas em placas de dimensões típicas de 1 *x* 1 (cm^2), com camada nativa de SiO_2 de aproximadamente 2 nm, foram utilizadas como substratos para a imobilização das enzimas, após a lavagem de acordo com um método padrão (PETRI, 1999).

Enzimas celulase (C8546, do fungo *Trichoderma reesei* ATCC 26921), solução de cuproetilenodiamina hidróxido 1,0 M em água (CUEN), líquido iônico acetato de 1-etil-3-metil-imidazólio (EMIMAc), D-glicose, e ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Reagentes analíticos, tais como acetato de sódio, hidróxido de sódio, ácido acético glacial e ácido fosfórico foram adquiridos da LabSynth, Brasil, e utilizados sem prévia purificação.

Para os ensaios com endoglucanases, utilizamos uma cepa da bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*XCC*) contendo cópias adicionais do gene c*lp* no plasmídeo pUFR047. Esta cepa foi gentilmente doada pelo aluno de doutorado Maxuel Andrade, orientado do Prof. Dr. Chuck Shaker Farah (DBQ-IQUSP).

As soluções enzimáticas foram preparadas sempre no momento de sua utilização.

3.1.A – Celuloses

Celulose microcristalina comercial, Avicel (22184), foi adquirida na Fluka, EUA, e usada como recebida ou conforme descrito abaixo, seção 3.2.

Amostras de celulose algodão (CC), algodão mercerizado (MCC), eucalipto (EC) e eucalipto mercerizado (MEC) foram doadas pela aluna de doutorado Ludmila C. Fidale, orientada do Prof. Dr. Omar El Seoud (DQF-IQUSP). A mercerização foi realizada de acordo com método descrito na literatura (EL SEOUD, 2008). Detalhes sobre as amostras estão descritos abaixo:

- *Celulose linter de algodão Buckeye*, foi fornecida pela Cia. Nitro Química Brasileira (São Paulo) e triturada em moinho de facas Thomas Scientific (Swedesboro), Modelo 3383-L10 contra tela de aço inox de orifícios de 1 mm de diâmetro. Depois, foi submetida a um peneiramento mecânico, no aparelho FRITSCH Analysette 3 SPARTAN (Idar-Oberstein), a fim de se obter celulose com o diâmetro entre 100-200 mesh, referida como celulose algodão, ou CC;
- *Celulose linter de algodão mercerizado* foi obtida a partir da celulose anterior, após o processo de mercerização e em seguida triturada, referida aqui como MCC;
- *Celulose eucalipto Lwarcel*, da Lwarcel Papel e Celulose Ltda. (Lençóis Paulista, SP) foi triturada e peneirada como no caso da CC, referida aqui como EC;
- *Celulose eucalipto mercerizado* foi obtida a partir da celulose anterior, após o processo de mercerização e em seguida triturada, referida aqui como MEC.

3.2 – Pré-tratamentos de Celulose Microcristalina Avicel

3.2.A – Dissolução em líquido iônico EMIMAc

Celulose Avicel foi dissolvida em EMIMAc (5% m/m) sob agitação e temperatura de 70ºC, por 2 horas. Após este período, a celulose foi precipitada em água destilada e

lavada exaustivamente com uma solução de NaCl 15% m/m para a completa remoção do EMIMAc residual. A dissolução da celulose em EMIMAc ocorre rapidamente, resultando em uma solução límpida, porém extremamente viscosa.

A celulose regenerada resultante será chamada de CIL.

3.2.B – Dissolução e degradação em ácido fosfórico 85%

Celulose Avicel foi dissolvida em H_3PO_4 85% (12,5% m/m) sob agitação e temperatura de 50ºC, por um período de 45 minutos (ZHANG, 2007). Depois deste período, a celulose foi precipitada em acetona gelada, sendo a acetona evaporada e o sólido resultante lavado exaustivamente com água destilada e neutralizado com NaOH 1%.

A dissolução da celulose em ácido fosfórico concentrado é muito eficiente: praticamente instantânea, ocorrendo em meio aquoso a baixas temperaturas. Além disso, o ácido fosfórico residual na celulose regenerada não possui nenhum efeito inibitório na hidrólise enzimática (ZHANG, 2007). A precipitação da celulose e o resfriamento da reação foram realizados com acetona gelada, já que este solvente também ajuda na remoção e reutilização do ácido fosfórico sendo ela própria de fácil remoção por evaporação.

A celulose regenerada resultante será chamada de CP.

3.2.C – Pré-tratamento enzimático com endoglucanase imobilizada

O pré-tratamento enzimático de amostras de celulose com endoglucanase foi feito sob as mesmas condições utilizadas para a hidrólise. Suspensões de celulose Avicel (1% m/m, 10 mL) foram preparadas em tampão de acetato (0,050 $mol.L^{-1}$) no pH 4,6. Endoglucanases imobilizadas sobre 6 lâminas de Si (6 cm^2) foram deixadas em contato com a suspensão durante 24 horas, a 40°C. Após este período, a celulose resultante foi lavada abundantemente com água destilada.

Todas as celuloses regeneradas foram dialisadas a fim de remover resíduos de sais, liofilizadas e mantidas em dessecador até uso. Todas as amostras de celulose foram caracterizadas conforme seção 3.3.

3.3 – Caracterização das Amostras de Celulose

3.3.A – Viscosimetria capilar

A viscosidade de uma solução aumenta pela presença de solutos macromoleculares devido ao elevado atrito intermolelular. O efeito é notável, mesmo em concentrações baixas, pois as moléculas de grande porte alteram o escoamento do fluido ao longo de extensas regiões nas vizinhanças delas (ATKINS, 2008). Em concentrações baixas, a viscosidade, η, da solução está relacionada à viscosidade do solvente puro, η_0, por:

$$\eta = \eta_0 \cdot \left(1 + [\eta] \cdot c + k_H [\eta]^2 c^2 + \ldots\right) \qquad (1)$$

onde a viscosidade intrínseca, $[\eta]$, pode ser interpretada como o volume hidrodinâmico da macromolécula. Quanto maior for o valor de $[\eta]$, mais solvatada está a macromolécula.

A Equação de Huggins descreve a relação entre a viscosidade intrínseca e as concentrações das soluções diluídas de polímeros como:

$$\frac{\eta/\eta_0 - 1}{c} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot c \qquad (2)$$

onde η é a viscosidade da solução polimérica, η_0 é a viscosidade do solvente puro, k_H é o coeficiente de Huggins, e c é a concentração do polímero.

A viscosidade intrínseca, $[\eta]$, é definida como o valor da viscosidade reduzida à diluição infinita ($c \rightarrow 0$).

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \frac{\eta - \eta_0}{c \cdot \eta_0} = \lim_{c \to 0} \frac{\eta/\eta_0 - 1}{c} \qquad (3)$$

A viscosidade de fluidos newtonianos pode ser medida em viscosímetros capilares, onde se mede o tempo de escoamento do fluido através do capilar e relaciona-se esse tempo ao do escoamento do solvente. O método é conveniente para a medida de $[\eta]$, pois a razão entre a viscosidade da solução e a do solvente puro é proporcional à razão entre os tempos de escoamento t e t_0, feitas as correções das densidades, como mostra a Equação 4:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \times \frac{\rho}{\rho_0} \approx \frac{t}{t_0} \qquad (4)$$

A massa molar viscosimétrica e o grau de polimerização das amostras de celulose foram determinados para todas as amostras através do tempo de escoamento, utilizando-se sistema Schott AVS 350 e um viscosímetro do tipo Ubbelohde modelo I e 0c, a 25°C e solução de cuproetilenodiamina (CUEN)/água (1:1, v/v) como solvente, de acordo com o método ASTM D1795-94. Inicialmente, determinou-se o tempo (em segundos) de escoamento do solvente e em seguida da solução. Celulose foi dissolvida numa proporção 1 g para 2 mL, e a partir desta solução foram feitas as diluições, sendo que para cada concentração o tempo de escoamento foi determinado. Todas as amostras foram saturadas com N_2, para evitar reações de oxidação. Os sistemas foram deixados dissolvendo *overnight*, sob agitação magnética. As análises foram realizadas em triplicata (ASTM D1795-94, 2001).

Determinou-se então a viscosidade relativa, η_{rel} ou η/η_0. A viscosidade intrínseca foi determinada pelo gráfico de Huggins, e a partir deste valor a massa molar média viscosimétrica, *Mv*, foi determinada (GRÖBE, 1989):

$$[\eta] = K \cdot \langle Mv \rangle^{a} \qquad (5)$$

sendo K = $13{,}13.10^{-3}$ e a = 0,905, parâmetros para este sistema de polímero e solvente a 25°C (KLEMM, 1998), e considerando que a massa molar de uma unidade anidra de glicose (UAG) corresponde a 162 g/mol:

$$\langle Mv \rangle = \langle DP \rangle \times 162 \qquad (6)$$

tem-se, então:

$$DP = 0{,}75 \times \eta^{0{,}905} \qquad (7)$$

Os desvios entre os *DP* calculados a partir das triplicatas foram ≤ 2%.

3.3.B – Índices de cristalinidade por raios-X

O índice de cristalinidade dos polímeros (*Ic*) expressa a porção de regiões cristalinas presentes na molécula com relação às regiões amorfas. Esta propriedade está relacionada com a acessibilidade dos grupos hidroxilas presentes na celulose, sendo que as amostras de alto *Ic* possuem uma estrutura altamente ordenada e pouca acessibilidade do solvente (TASKER, 1994). As regiões cristalinas na celulose estão agrupadas em núcleos denominados *cristalitos*. Os cristalitos, por sua vez, são rodeados de regiões amorfas.

A celulose I (nativa) apresenta difrações próximas aos seguintes ângulos de difração 2θ = 23° (plano 002), 21° (plano 021), 17° (plano 104) e 15° (plano 101). Para a celulose II (regenerada), 2θ = 23° (plano 002) e 20° (plano 104) e 13° (plano 101) (TASKER, 1994). Celulose possui espectros de raios-X com picos largos e não muito bem resolvidos, principalmente devido aos diversos tamanhos de cristalitos.

Os *Ic* foram obtidos através de difração de raios-X. Foi utilizado um difratômetro Rigaku Miniflex operando a 30 kV, corrente anódica de 15 mA e λ(CuKα) a 0,154 nm. Os difratogramas foram obtidos na faixa de ângulo de incidência 2θ variando de 10° a 40° medidos nos intervalos de 0,02°/minuto. O *Ic* foi calculado através da Equação 8 (BUSCHLEDILLER, 1992):

$$I_c = 1 - \left(\frac{A_{am}}{A_c} \right) \qquad (8)$$

onde A_{am} corresponde à da região amorfa da celulose (halo amorfo dos difratogramas), A_c a área das regiões cristalinas. As áreas foram calculadas através da deconvolução dos picos, no aplicativo OriginPro 8.0.

3.3.C – Morfologia

Todas as amostras de celulose foram analisadas em sua morfologia através de imagens de MEV, com um Field Emission Scanning Electrons Microscope da JEOL modelo JSM 7401F, equipado com microssonda de energia dispersiva de raios-X (EDS) da NORAN Instruments Model System SIX. A amostra foi depositada sobre uma fita adesiva de cobre dupla face (suspensa em um *stub* de carbono), aderida ao porta-amostra de cobre. A teoria sobre o funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura pode ser encontrada na literatura (CANEVAROLO JR, 2004).

3.3.D – Medida da capacidade de absorção de água

A molhabilidade de um pó é uma propriedade importante envolvida em muitos problemas práticos como, por exemplo, a dispersabilidade de um pó em um líquido, a biodisponibilidade de um medicamento, a seleção de um ligante líquido para um pó granulado, entre outros (GALET, 2010). A molhabilidade de um sólido por um líquido é dada pelo ângulo de contato (θ), definido pela equação de Young (YOUNG, 1805) como o ângulo resultante do equilíbrio de forças na interface de três fases: sólido (s), líquido (l) e vapor (v).

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \qquad (9)$$

onde γ_{SV} é a tensão interfacial sólido/vapor, γ_{SL} é a tensão interfacial sólido/líquido e γ_{LV} é a tensão superficial do líquido.

Este ângulo pode ser determinado diretamente através da medida do ângulo de uma gota de líquido colocada em uma superfície sólida e lisa. Com sólidos na forma de pó, a determinação da molhabilidade envolve técnicas menos diretas e mais complicadas, como,

por exemplo, calorimetria de imersão, cromatografia gasosa inversa (IGC), isotermas de sorção de vapor de dinâmica (DVS) (HEERTJES & KOSSEN, 1967).

A habilidade de absorção de água das fibras de celulose na forma de pó, neste trabalho, foi determinada a partir da dinâmica do fluxo capilar, conhecido também como método de Washburn. Uma determinada massa da amostra de celulose foi inserida em um cilindro (ou *holder*) de fundo poroso e pressionada, a fim de que o volume ocupado pela amostra e, portanto, o empacotamento, fosse sempre constante. Para este estudo, a massa de celulose variou de 0,2 g até 0,5 g. O *holder* foi então conectado à unidade de medição, o Tensiômetro Krüss K100 (Hamburgo, Alemanha). Um recipiente com água destilada foi colocado sobre a plataforma com movimentação, que se aproxima automaticamente do *holder* até que este toque a superfície do líquido. Neste ponto, o líquido começa a penetrar e molhar as fibras por capilaridade. O aumento de massa (m) com sensibilidade de 0,00005 g em função do tempo foi registrado pelo *software* K100 Krüss. Como controle, as mesmas medidas foram realizadas com o *holder* vazio.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata a (24,5 ± 0,5)°C. Os desvios entre os valores de Cw obtidos a partir de triplicatas variaram entre 10% e 15%.

A capacidade de absorção de água das fibras foi avaliada através da equação de Washburn, modificada para um único capilar (Equação 10), que resulta da combinação da expressão para a pressão de Laplace e da equação de Hagen-Poiseuille para condições de fluxo constante:

$$\frac{m^2}{t} = \frac{\pi^2 D_{tubo}^5}{64} \frac{\rho_l^2 \gamma}{\eta} \cos\theta = Cw \frac{\rho_l^2 \gamma}{\eta} \cos\theta \qquad (10)$$

onde Cw é a constante de capilaridade, ρ a densidade do líquido, γ a tensão superficial, η a viscosidade do líquido, m o ganho de massa, t o tempo, e θ é o ângulo de contato sólido/líquido. Considerando que cos θ é igual a 1,0, porque todas as amostras de celulose são completamente molhadas pela água, e que os valores, ρ, γ e η para a água são aqueles

tabelados (CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 2010), *Cw* pôde ser determinado a partir da inclinação no gráfico de m^2 em função de *t*. Deve-se ressaltar que *Cw* é uma grandeza que depende somente da geometria dos poros do material.

3.3.E – Titulação potenciométrica

A fim de calcular o ponto isoelétrico da celulose CP, utilizou-se a técnica de titulação potenciométrica (LIMA, 1999; MASINI, 1998). Como teste de controle, Avicel também foi titulada sob as mesmas condições. Quantidades conhecidas do absorvente (0,100 ± 0,001 g) foram colocadas em erlenmeyers; 22 mL de uma solução 0,05 M de KNO_3, que foi utilizado como eletrólito de fundo, foi adicionado a cada frasco. A titulação foi feita adicionando-se quantidades conhecidas de HCl 0,02 M ou NaOH 0,05 M, a fim de se alterar o pH da solução. Após o equilíbrio, o pH foi medido com o auxílio de um eletrodo de vidro.

A quantidade de prótons (*Q*) consumida ou liberada pelo adsorvente foi calculada utilizando a Equação 11 (PUZIV, 2004):

$$Q = \left(\frac{V_0 + V_t}{m}\right) \times \left([H^+]_i - [OH^-]_i - [H^+]_e + [OH^-]_e\right) \qquad (11)$$

onde V_0 e V_t são os volumes do eletrólito de fundo e do titulante, e *m* é a massa do adsorvente. Os subscritos "*i*" e "*e*" referem-se às concentrações iniciais e no equilíbrio, respectivamente. A concentração inicial de prótons foi calculada através da quantidade adicionada do titulante. A contração no equilíbrio foi calculada através do valor medido de pH.

3.4 – Crescimento das Bactérias XCC e Obtenção das Endoglucanases

As bactérias *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*XCC*) foram cultivadas a 28°C em meio LB 1,5% ágar. O meio líquido utilizado para o crescimento foi o XVM2 (0,16 mM KH_2PO_4, 0,31 mM K_2HPO_4, 20 mM NaCl, 0,03% m/m caso-aminoácidos, 0,01 mM $FeSO_4$, 10 mM $(NH_2)SO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 6 mM $MgSO_4$) no qual as bactérias foram cultivadas sob agitação de 200 rpm por 24 horas a 28°C, contendo 8 mM de frutose e sacarose como fonte de carboidratos, cuja solução de açúcares foi filtrada em filtros Millipore 0,22 μm após a preparação, para esterilização (WOOD, 1982; GOUGH, 1988). Antibióticos foram adicionados ao meio nas seguintes concentrações finais: ampicilina, 0,1 mg/mL; gentamicina, 0,01 mg/mL.

3.4.A – Ensaios de produção de endoglucanases

Culturas de *XCC* crescidas em meio XMV2 foram centrifugadas a 7.000 rpm a temperatura ambiente, para então o sobrenadante ser transferido a *eppendorfs*. 50 μL do sobrenadante foram aplicados em poços de 5 mm de diâmetro em placas contendo 20 mL 0,125% de carboximetilcelulose (CMC) em 1,5% de Ágar e 50 mM de KH_2PO_4 (pH 6). As placas foram incubadas a 37°C por 20 h, coloridas com 0,1% de vermelho congo por 30 min, e descoloridas com 1 M NaCl (GOUGH, 1988). O diâmetro dos halos, indicando degradação de CMC, foram medidos para determinar a quantidade relativa de atividade das endoglucanases.

Mais detalhes sobre os testes de atividade enzimática podem ser vistos no Anexo D.

3.4.B – Purificação das endoglucanases

As enzimas endoglucanases (*EGB*) foram obtidas a partir do extrato protéico através da diálise de 40 mL do sobrenadante da cultura de bactérias em meio líquido,

previamente centrifugado a 7.000 rpm a temperatura ambiente. Elas foram purificadas utilizando-se membranas de diálise (Viskase Corporation, EUA) com faixa de corte de massa molar de 14.000 $g.mol^{-1}$. Foram realizadas trocas com água milliQ até a condutividade iônica da mesma ficasse em torno de 5 $\mu S.cm^{-1}$, pois este é o valor da condutividade iônica da água destilada.

3.5 – Ensaios de Adsorção e Dessorção das Enzimas

3.5.A – Adsorção de celulase

A imobilização das celulases sobre lâminas de Si/SiO_2 foi feita a partir de soluções aquosas da enzima na concentração de 0,5 g/L, durante o período de 60 minutos a 60°C. Após este período, elas foram abundantemente lavadas com água destilada e secas com jatos de N_2. Num trabalho recente (TÉBÉKA, 2009), a energia de adsorção da celulase sobre superfícies hidrofílicas foi determinada como sendo 24,2 kJ/mol, que é comparável à energia de ligações de hidrogênio (~20 kJ/mol). Evitaram-se testes a temperaturas maiores, pois a 70°C ocorre a desnaturação da celulase.

Assim, a adsorção da celulase em lâminas de silício é provavelmente regida por ligações de hidrogênio entre os resíduos polares da celulase e os grupos silanóis na superfície. Esta magnitude da energia de adsorção também explica a natureza irreversível da adsorção. Por outro lado, 24 kJ/mol não são altas o suficiente para causar cisão das ligações covalentes, explicando a elevada estabilidade térmica. Assim sendo, o aumento da quantidade adsorvida com a temperatura pode ser explicado pelo melhor empacotamento na superfície devido às diferentes orientações da celulase na superfície e cooperativismo entre as moléculas de celulase. Também são esperadas contribuições entrópicas devido à liberação de íons e água de hidratação tanto da enzima quanto da superfície sólida

decorrente da adsorção. Os filmes resultantes de enzima imobilizada foram caracterizados por meio de elipsometria (espessura) e microscopia de força atômica, AFM (topografia).

3.5.B – Adsorção de endoglucanases

A adsorção de endoglucanases em Si/SiO_2 foi feita a partir do sobrenadante purificado. O comportamento de adsorção das enzimas foi investigado a 30°C, 40°C, 50°C e 60°C por imersão das lâminas de Si na solução de endoglucanases por 24 h, para garantir que o equilíbrio de adsorção foi atingido. Em seguida, as amostras foram lavadas abundantemente com água destilada e secas sob um fluxo de N_2. Os filmes resultantes de enzima imobilizada foram caracterizados por elipsometria e AFM.

3.5.C – Experimentos de dessorção

Celulase e endoglucanase imobilizadas em lâminas de Si foram submetidas a testes de dessorção. O teste consistiu em expor o substrato após a imobilização às condições de hidrólise, ou seja, tampão de acetato a pH 4,6 e 60°C por 24 horas. Após esse tempo, as lâminas foram analisadas por elipsometria para determinar a espessura da enzima. A quantidade adsorvida de ambas as enzimas não se alterou após 24 horas em contato com o meio de hidrólise.

3.5.D – Dicroísmo circular

O fenômeno de dicroísmo circular refere-se à absorção diferenciada da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda.

Luz circularmente polarizada e a luz linearmente ou plano-polarizada são prontamente interconvertidas, sendo dois feixes plano-polarizados ortogonais a 90° ($\pi/2$)

fora de fase. Neste tipo de feixe resultante, o vetor elétrico gira na direção de propagação, realizando uma volta completa a cada período da onda de luz. Se a luz for circular para a direita (*rcp*), um observador olhando na direção da fonte de luz veria o vetor elétrico girando em sentido horário. A Figura 7 mostra a resultante da combinação de duas ondas, defasadas em 90°.

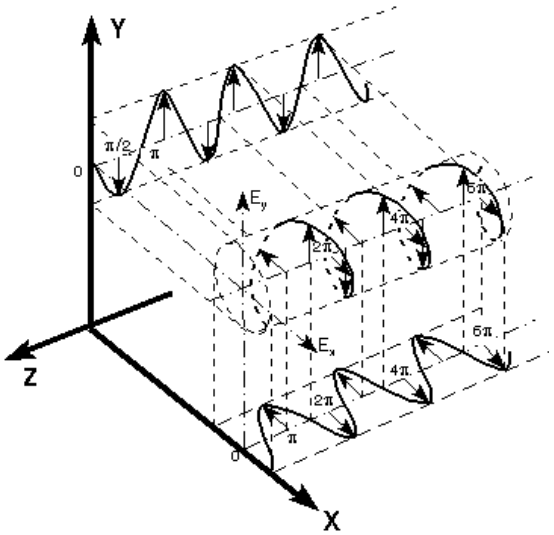


Figura 7. Combinação de duas ondas linearmente polarizadas, defasadas em 90°.

Os dois tipos de polarização obedecem à lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon.C.l \qquad (12)$$

O dicroísmo circular é definido como a diferença ante a absorção da *lcp* e *rcp*, gerando uma luz resultante que é elipticamente polarizada (na prática, o equipamento não recombina as componentes). Podemos definir a absorbância para *lcp* como:

$$A_l = \log_{10}\left(\frac{I_l^0}{I_l}\right) = \varepsilon_l \cdot C \cdot l \qquad (13)$$

onde I_l^0 e I_l são, respectivamente, a intensidade da luz *lcp* incidente na amostra e a intensidade após viajar uma distância *l* através de um meio contendo uma concentração molar C de soluto quiral, ε_l é o coeficiente de extinção molar decádico do soluto para a luz *lcp*. A mesma fórmula é válida para luz *rcp*.

Na prática, os espectropolarímetros possuem um cristal diaxial que, dependendo da voltagem aplicada, se move de modo a permitir que luzes *rcp* e *lcp* emerjam alternadamente e, assim, o sinal detectado seja a diferença de absorção entre ambas. A mesma definição é a da luz *rcp* na fórmula acima. Assim:

$$\Delta A = A_1 - A_r = \varepsilon_1 Cl - \varepsilon_r Cl = \Delta\varepsilon \cdot C \cdot l \qquad (14)$$

onde o $\Delta\varepsilon$ é o CD decádico molar.

Historicamente, o método original de medida era feito aproveitando-se do fato que, quando luz planopolarizada, atravessava um meio quiral, a absorção diferencial entre os dois componentes circular convertia a luz plano-polarizada em luz elipticamente polarizada. CD pode ser caracterizada pela relação entre os eixos da elipse, no qual a tangente o ângulo θ, é chamado de elipticidade. Por definição, $\theta = \tan^{-1}(b/a)$, onde *b* e *a* são os eixos menores e maiores da elipse resultante. Como o ângulo é geralmente pequeno, a tan θ pode ser aproximada por θ em radianos. De maneira simples, $\theta = 3298 \cdot \Delta\varepsilon$, dado em *graus.cm*^{2}*.dmol*$^{-1}$.

Para apresentar o efeito de dicroísmo circular, uma molécula deve apresentar centros assimétricos, de modo que a *rcp* seja absorvida em diferente quantidade da *lcp*. Dessa forma, as duas ondas transmitidas, quando combinadas, resultarão numa luz elipticamente polarizada, caracterizando assim o fenômeno.

A espectroscopia de CD é uma das técnicas mais úteis no estudo estrutural de proteínas, uma vez que suas unidades básicas, os resíduos de aminoácidos, possuem centro quiral (o grupo amina ligado ao carbono-α assimétrico). A análise de um espectro de CD geralmente se concentra na região do ultravioleta distante (180 a 250 nm), onde as transições $n \rightarrow \pi^*$ centrada (em torno de 210 nm – transição fraca, porém larga) e $\pi \rightarrow \pi^*$ (em torno de 190 nm – transição intensa) da amida estão compreendidas.

Além disso, de acordo com a conformação estrutural que as proteínas adquirem (α-hélices, β-folhas, estruturas desordenadas), é possível caracterizar a estrutura secundária dessas macromoléculas devido ao perfil espectral de CD particular destes arranjos, bem como estimar as frações destas estruturas na estrutura global das mesmas. Mudanças conformacionais que podem ocorrer nas proteínas em função de ligações com ligantes específicos, variações de temperatura, pH e força iônica do meio também podem ser monitoradas por CD. A estimativa de frações de estrutura secundária está apoiada no conceito de que o espectro de CD de uma proteína é uma combinação linear de todas as frações de estrutura secundária que a constitui.

O estado conformacional das enzimas celulase foi avaliado por dicroísmo circular no intervalo de 200 a 260 nm (UV distante). Este teste se fez necessário a fim de verificar se a força iônica do meio devido à presença do EMIMAc estaria influenciando a estrutura secundária da enzima celulase. Ensaios de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro JASCO J-720, utilizando-se cubetas de quartzo (l = 0,1 cm). Os espectros foram coletados em intervalos de 0,5 nm, tempo de resposta de 0,25 s, velocidade de 100 nm/min, e temperatura de 25°C. As amostras consistiam em soluções aquosas de enzima, do complexo enzimático celulase, na concentração de 50 μM. As medidas foram realizadas na presença e ausência de EMIMAc, em proporções de água:EMIMAc de 100:0, 95:5 e 0:100.

3.5.E – Elipsometria

A elipsometria é um método óptico não-destrutivo, com resolução na faixa de ângstrons, utilizada na determinação das propriedades ópticas (índice de refração) e espessura de filmes finos a partir da mudança do estado de polarização da luz após a sua reflexão da superfície refletora da amostra (TOMPKINS, 1993).

A base da técnica é a mudança do estado de polarização de uma onda eletromagnética após a reflexão a partir de uma superfície refletora. Ele não mede diretamente a espessura do filme depositado no substrato, mas sim as mudanças de fase e amplitude dos feixes incidentes e refletido a partir de uma superfície refletora (AZZAM & BASHARA, 1979; TOMPKINS, 1993). Nas interações de luz com a matéria, geralmente as mudanças no vetor campo magnético são desprezíveis, enquanto que mudanças no vetor campo elétrico são significativas.

A amostra deve ser composta por um pequeno número de camadas discretas e bem definida, opticamente homogênea e isotrópica. A violação destes pressupostos invalida o modelo elipsométrico padrão – uma variante mais avançada deve ser aplicada.

Quando uma luz planopolarizada (linearmente polarizada) reflete a partir de uma superfície refletora, há uma mudança no estado de polarização de luz, o qual depende das propriedades óticas do substrato, assim como da espessura e das propriedades óticas dos filmes resultantes (AZZAM & BASHARA, 1979; TOMPKINS, 1993).

As medidas de elipsometria foram feitas utilizando um elipsômetro vertical DRE-EL02 controlado por um computador (Ratzeburg, Alemanha) (ver Figura 8, abaixo). O ângulo de incidência foi de 70,0° (ângulo polarizante) (AZZAM & BASHARA, 1979), e o comprimento de onda λ do laser He-Ne foi fixado em 632,8 nm. Para a interpretação dos dados, um modelo multicamadas (substrato, camada desconhecida e meio circundante) foi utilizado.

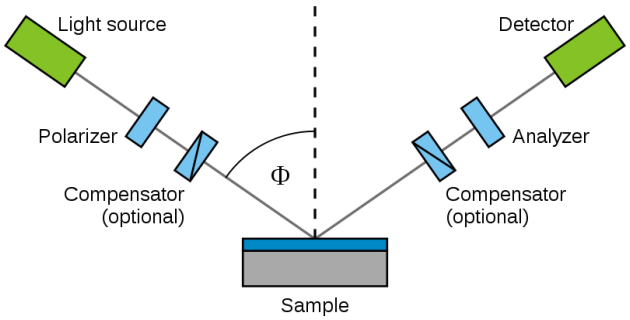


Figura 8. Esquema de funcionamento de um elipsômetro.

A espessura (d_k) e o índice de refração (n_k) da camada desconhecida puderam ser calculados pelos ângulos elipsométricos, Δ e Ψ, utilizando a equação fundamental da elipsometria em conjunto com cálculos iterativos com matrizes de Jones. De acordo com a Equação 15:

$$\rho = \tan(\Psi)\, e^{i\Delta} = \frac{R_p}{R_s} = f(n_k, d_k, \lambda, \varphi) \qquad (15)$$

onde a tan(Ψ) é a razão da amplitude da radiação antes e após a reflexão, e a Δ é a razão das fases antes e após a reflexão, R_p e R_s são os coeficientes de reflexão total para ondas paralelas e perpendiculares respectivamente (AZZAM & BASHARA, 1979; TOMPKINS, 1993). Elas são função do ângulo de incidência φ, do comprimento de onda λ da radiação, do índice de refração n_k, e da espessura d_k de cada camada do modelo. A partir dos ângulos elipsométricos Δ e Ψ e um modelo de multicamadas composto de silício, dióxido de silício, a camada de enzima e ar, é possível determinar a espessura da camada de celulase adsorvida, *d*. A espessura das camadas de SiO_2 foram determinadas em ar, considerando um índice de refração para o Si de $\tilde{n} = 3{,}88 - i0{,}018$ e sua espessura como infinita; para o meio circundante (ar), o índice de refração foi considerado 1,00. Devido à camada nativa de SiO_2 ser muito fina, o índice de refração foi fixado em 1,4620 (PALIK, 1985) e apenas sua espessura calculada.

A espessura média da camada nativa de SiO_2 de 50 amostras foi (1,9 ± 0,1) nm. Em seguida, os filmes de enzimas foram preparados e a espessura das camadas adsorvidas das proteínas determinada em ar. As camadas adsorvidas de celulase e endoglucanase foram calculadas assumindo $n_{celulase} = n_{endo} = 1{,}50$ (FUJIMOTO & PETRI, 2001). A quantidade de celulase adsorvida, Γ ($mg.m^{-2}$), pode ser estimada multiplicando a espessura da camada *d* (espessura elipsométrica da camada) pela densidade ρ de uma camada seca de enzima (ρ ~1,37 $g.cm^{-3}$) (ORTEGA-VINUESA, 1998):

$$\Gamma = \rho_{enzima} \cdot d \qquad (16)$$

3.5.F – Microscopia de força atômica (AFM)

Os microscópios de varredura por sonda ("*Scanning Probe Microscopes*") são uma família de microscópios em que uma sonda varre a superfície da amostra, registrando ponto a ponto algum tipo de interação entre a sonda e a amostra. A microscopia de força atômica (AFM) é uma forma de microscopia em que as forças de atração ou repulsão entre um superfície e a sonda são medidas. A sonda normalmente é constituída de uma ponta piramidal (~500 Å de diâmetro), que esta localizada na extremidade livre de um *cantilever* (~100 a 200 μm de comprimento).

Os sistemas de varredura dos microscópios deste tipo devem ser capazes de realizar deslocamentos com alta precisão e para isso, utiliza-se um tubo de material piezelétrico, ou seja, um material capaz de alterar sua dimensão quando sofre um potencial elétrico, apresentando também um potencial elétrico quando comprimido mecanicamente.

No sistema óptico de detecção utilizado, onde a deflexão de um feixe de laser e um fotodiodo determinam o movimento da sonda, o laser (de cumprimento de onda de 650 nm e potencia de 5 mW) incide sobre a extremidade do *cantilever*, sendo refletido no fotodiodo de quatro quadrantes. Conforme se procede a varredura, a interação ponta-amostra provoca uma mudança no ângulo de reflexão do feixe de laser, que será detectado pelo fotodiodo. Assim, através de um *software* apropriado, o computador é capaz de formar a imagem topográfica da amostra com os dados armazenados da deflexão nos eixos x, y e z. Para maiores detalhes quanto ao funcionamento do aparelho e teoria da técnica, vide (HERRMANN, 1997; VANTEENKISTE, 2000).

As imagens de AFM foram obtidas em um microscópio PICO SPM-LE (Molecular Imaging), com *cantilevers* de Si_3N_4 operando no modo de contato intermitente (modo AAC), na freqüência de ressonância de aproximadamente 323 kHz, ao ar. As áreas variaram de (5

x 5) μm^2 a (1 x 1) μm^2 com resolução de 512 x 512 pixels. O processamento das imagens e a determinação da rugosidade média quadrática (*rms*) foram feitos com o uso do *software* Pico Scan ou do *software* WSxM 4.0. Pelo menos dois filmes de cada amostra foram analisados em diferentes áreas antes e depois da imobilização das enzimas, celulase ou endoglucanase.

3.6 – Hidrólise Enzimática Livre e Adsorvida

Suspensões de celulose antes e após o pré-tratamento, na concentração de 1% m/m, 10 mL, foram preparadas em tampão de acetato (0,050 $mol.L^{-1}$) no pH 4,6 e colocadas em contato com celulase imobilizada sobre 6 placas de Si (total de 6 cm^2) durante um período de 24 horas, a 60°C. Após este período, uma alíquota foi coletada e centrifugada por 10 minutos a 13.200 rpm. A quantificação de glicose foi realizada no sobrenadante para determinação da atividade enzimática (TÉBÉKA, 2009).

Para efeitos de comparação, a atividade catalítica de celulase livre também foi avaliada. Para isso, a quantidade de celulase livre utilizada na hidrólise com enzimas livres foi a correspondente ao de celulase imobilizada, adicionada a 10 mL de dispersão de celulose. Para os experimentos comparativos, em primeiro lugar a quantidade adsorvida (massa/área) foi determinada através de elipsometria. Como a área de lâmina de silício é conhecida, a massa correspondente de celulase adsorvida pode ser estimada, bem como a concentração de enzima no meio. Este valor estimado da concentração de celulase foi utilizado para produção de celulases livre.

3.7 – Atividade Enzimática

A quantidade de glicose presente no sobrenadante após a hidrólise da celulose foi determinado por um método padrão (MILLER, 1959) baseado na redução do ácido 3,5-

dinitro-2-hidroxibenzóico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (ANS) por um açúcar redutor, como a glicose (Figura 9).

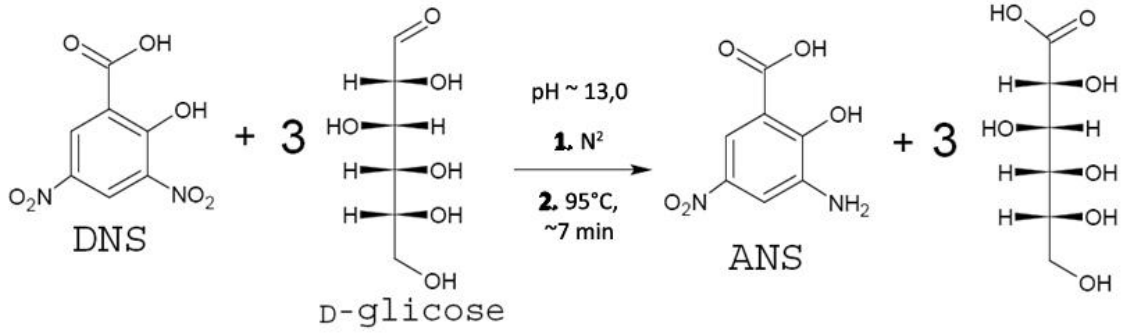


Figura 9. Reação entre açúcares redutores, no caso, D-glicose na sua forma aberta, e o ácido 3,5-dinitro-salicílico (*DNS*).

O produto ANS apresenta uma banda larga de absorbância na faixa de comprimento de onda de 400 nm até 550 nm, enquanto que o DNS (0,05 x 10^{-3} mol.L^{-1}) não absorve radiação a 500 nm, conforme apresentado nas Figuras 10a e 10b (abaixo), respectivamente.

Todos os ensaios foram analisados em 500 nm em um equipamento Beckmann Coulter DU600, em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm. Todos os testes foram feitos com alíquotas de 2,0 mL de solução de DNS, adicionados a alíquotas de 1,0 mL de soluções de glicose (ou do meio reacional de hidrólise). Como o O_2 dissolvido em água pode interferir com a reação de oxidação da glicose, N_2 foi borbulhado através da mistura resultante durante 2 minutos, a fim de retirar o oxigênio por arraste.

As reações entre DNS a 0,05 x 10^{-3} mol.L^{-1} e glicose na faixa de concentração de 1,0 x 10^{-3} a 10,0 x 10^{-3} mol.L^{-1} aconteceram pelo intervalo de tempo de sete minutos, em pH 13 e (95 ± 2)°C. Após este período, os frascos foram resfriados para a temperatura ambiente de (24 ± 1)°C e o espectro eletrônico (Figura 10a) foram obtidos. A alta temperatura e meio alcalinos favorecem a forma hemiacetal da glicose. O tempo de reação foi fixado em sete minutos, pois tempos maiores de reação não aumentaram a quantidade de ANS formada.

Um experimento de controle também foi conduzido, onde o DNS a 0,05 x 10^{-3} mol.L^{-1} foi mantido a (95 ± 2)°C, a pH 13,0 durante sete minutos. Após seu resfriamento para a temperatura ambiente, o espectro eletrônico foi obtido (Figura 10b).

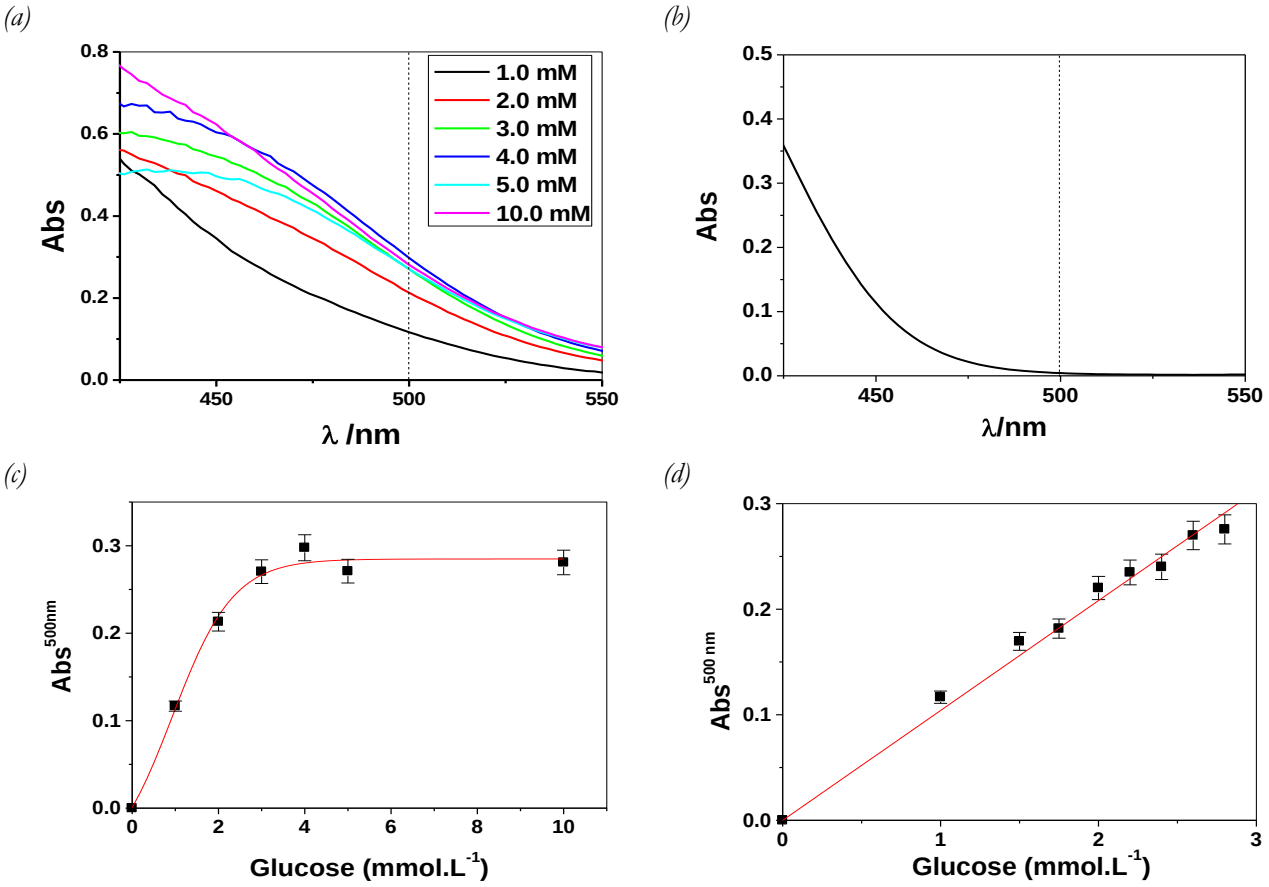


Figura 10. (a) Espectro eletrônico obtido para a reação entre o DNS a 0,05 x 10^{-3} mol.L^{-1} e glicose variando a concentração de 1,0 x 10^{-3} mol.L^{-1} a 10,0 x 10^{-3} mol.L^{-1}. *(b)* Espectro eletrônico típico obtido para DNS puro a 0,05 x 10^{-3} mol.L^{-1}. *(c)* e *(d)* mostram a dependência da absorbância com a concentração de glicose.

A absorbância a 500 nm aumenta com a quantidade de glicose na reação até o valor de 3,0 x 10^{-3} mol.L^{-1}; a partir desse valor, a absorbância não mais muda, indicando que a forma hemiacetal da glicose alcançou a sua máxima concentração a 3,0 x 10^{-3} mol.L^{-1}. Assim, uma curva de calibração para a detecção de glicose na mistura foi obtida para a faixa de concentração de 1,0 x 10^{-3} a 3,0 x 10^{-3} mol.L^{-1}, conforme apresentado nas Figuras 10c e 10d.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização das Celuloses

Desordem e polidispersidade no comprimento das cadeias impedem a formação de cristais simples de celulose (WYMAN, 2005), sendo que pequenas variações na conformação ou no empacotamento das cadeias celulósicas dentro dos cristais levam a um alto número de polimorfos cristalinos. A análise por difração de raios-X do pó das celuloses mostra os picos relativos às regiões cristalinas e halos amorfos (Figura 11). Para o cálculo das respectivas áreas, os difratogramas sofreram deconvolução, como mostra o Anexo A.

Avicel, CC e EC (Figuras 11a, 11b e 11c) apresentaram planos de difração 2θ característicos em 23° (002), 21° (021), 17° ($10\bar{4}$) e 15° (101), que correspondem ao alomorfo tipo I, a forma mais abundante e um dos polimorfos conhecido como celulose nativa. Após o tratamento da Avicel com H_3PO_4 (CP) e mercerização (MCC e MEC) (Figuras 11a, 11b e 11d) os difratogramas apresentaram 2θ em 22.5° (002), 20.5° ($10\bar{4}$), 12.5° (101), evidenciando alterações para o alomorfo tipo II, que é comumente conhecido como celulose regenerada.

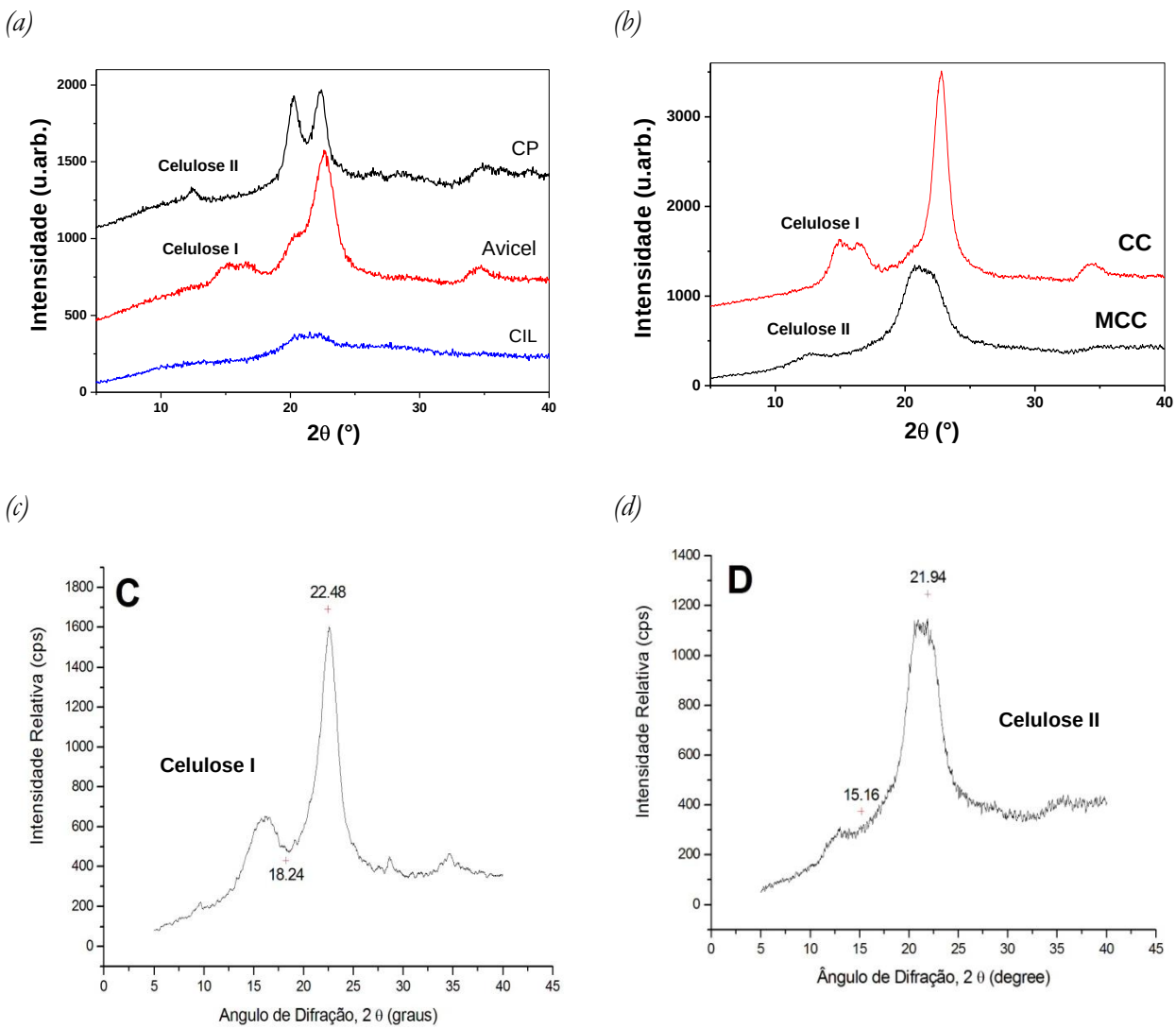


Figura 11. Difratograma de raios-X obtido para: *(a)* Avicel, Avicel após seu pré-tratamento com EMIMAc (CIL), e Avicel após seu pré-tratamento com H_3PO_4 (CP); *(b)* Celulose algodão (CC) e algodão mercerizado (MCC); *(c)* Celulose eucalipto (EC) e *(d)* eucalipto mercerizado (MEC).

No entanto, após o pré-tratamento com líquido iônico EMIMAc (CIL) (Figura 11a), houve uma sensível diminuição na intensidade dos picos correspondentes às regiões cristalinas, dificultando um pouco o processo de deconvolução do difratograma.

Os índices de cristalinidade (*Ic*), o grau de polimerização viscosimétrico (*DP*), e a capilaridade (*Cw*) determinados para Avicel, CP, CIL, CC, MCC, EC e MEC estão apresentados na Tabela 3. Detalhes sobre os procedimentos utilizados para a obtenção dos valores de *Cw* e *DP* para as amostras de celulose estão apresentados nos Anexos B e C, respectivamente.

Tabela 3. Características das amostras de celulose.

Amostra	*Ic*	*DP*	*Cw* ($\times 10^{16}$ m^5)
Avicel	0,69 ± 0,03	302 ± 15	3,1 ± 0,5
CP	0,42 ± 0,05	61 ± 5	1,6 ± 0,2
CIL	0,47 ± 0,03	226 ± 8	7,5 ± 0,8
CC	0,81 ± 0,04	958 ± 26	10 ± 1
MCC	0,77 ± 0,04	932 ± 25	4,9 ± 0,7
EC	0,74 ± 0,05	1049 ± 27	3,4 ± 0,4
MEC	0,70 ± 0,04	1022 ± 28	1,0 ± 0,3

Os pré-tratamentos da Avicel com H_3PO_4 e LI levaram a uma redução substancial (~40%) do valor do *Ic*. Já o processo de mercerização não causa diminuição significativa do *Ic*, se considerarmos os valores de desvio padrão. A mercerização provocou mudanças na forma cristalina, de celulose I para II, mas não causou a degradação significativa das cadeias. A pequena diminuição de *DP* observada após a mercerização deve-se provavelmente à dissolução de hemiceluloses presentes nas amostras nativas, ainda que em pequena quantidade.

Já a dissolução em ácido fosfórico levou a uma drástica redução (~80%) do *DP*, evidenciando que este pré-tratamento cause degradação da celulose Avicel, o que explica em parte a grande perda de cristalinidade. O tratamento com EMIMAc também degradou Avicel, pois o *DP* da CIL é ~ 75% do *DP* da Avicel. A degradação de Avicel pelo ácido fosfórico e EMIMAc certamente é a causa para os baixos valores de *Ic* observados para a CP e CIL.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtidas para as amostras de celulose estão apresentadas nas Figuras 12, 13 e 14.

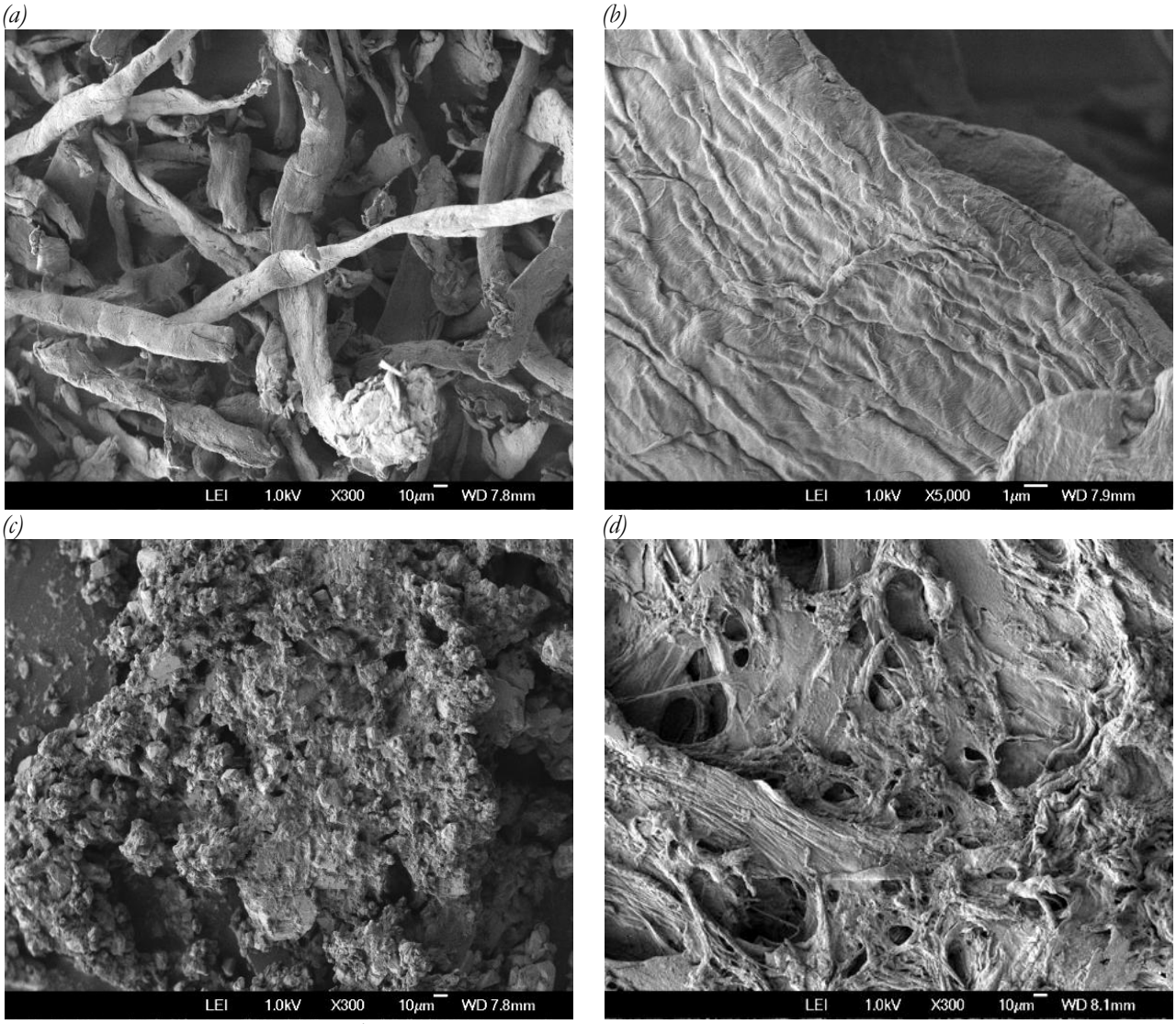


Figura 12. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para celulose Avicel: *(a)* sem pré-tratamento com aumento *x*300; *(b)* com aumento *x*5.000; *(c)* tratamento com H_3PO_4,CP; *(d)* tratamento com LI, CIL.

A celulose Avicel é formada por fibras (Figura 12a), sendo que a superfície de uma fibra individual revela a presença de muitas fibrilas (Figura 12b). Após o pré-tratamento com ácido fosfórico, amostra CP, a estrutura fibrosa desapareceu (Figura 12c), dando lugar a uma estrutura de pó muito fino. A Figura 12d ilustra micrografias eletrônicas de varredura típica obtida para CIL, ou seja, regenerada a partir de dissolução em EMIMAc. As fibras individuais observadas na Avicel (Figura 12a) parecem ter sido "desfeitas" em fibras mais finas após o tratamento com EMIMAc (Figura 12d), sofrendo uma drástica modificação. Porém, estas fibras finas estão distribuídas numa macroestrutura amorfa.

Esta mudança, no entanto, não é apenas morfológica, visto que o *Ic* decresce de 0,69 para 0,47. Na literatura, entretanto, alguns autores afirmam que a dissolução em LI não afeta a cristalinidade da celulose, mas acarreta em uma desfibrilação do material, gerando, consequentemente, um aumento na área superficial da celulose (WEI & CHENG, 2007).

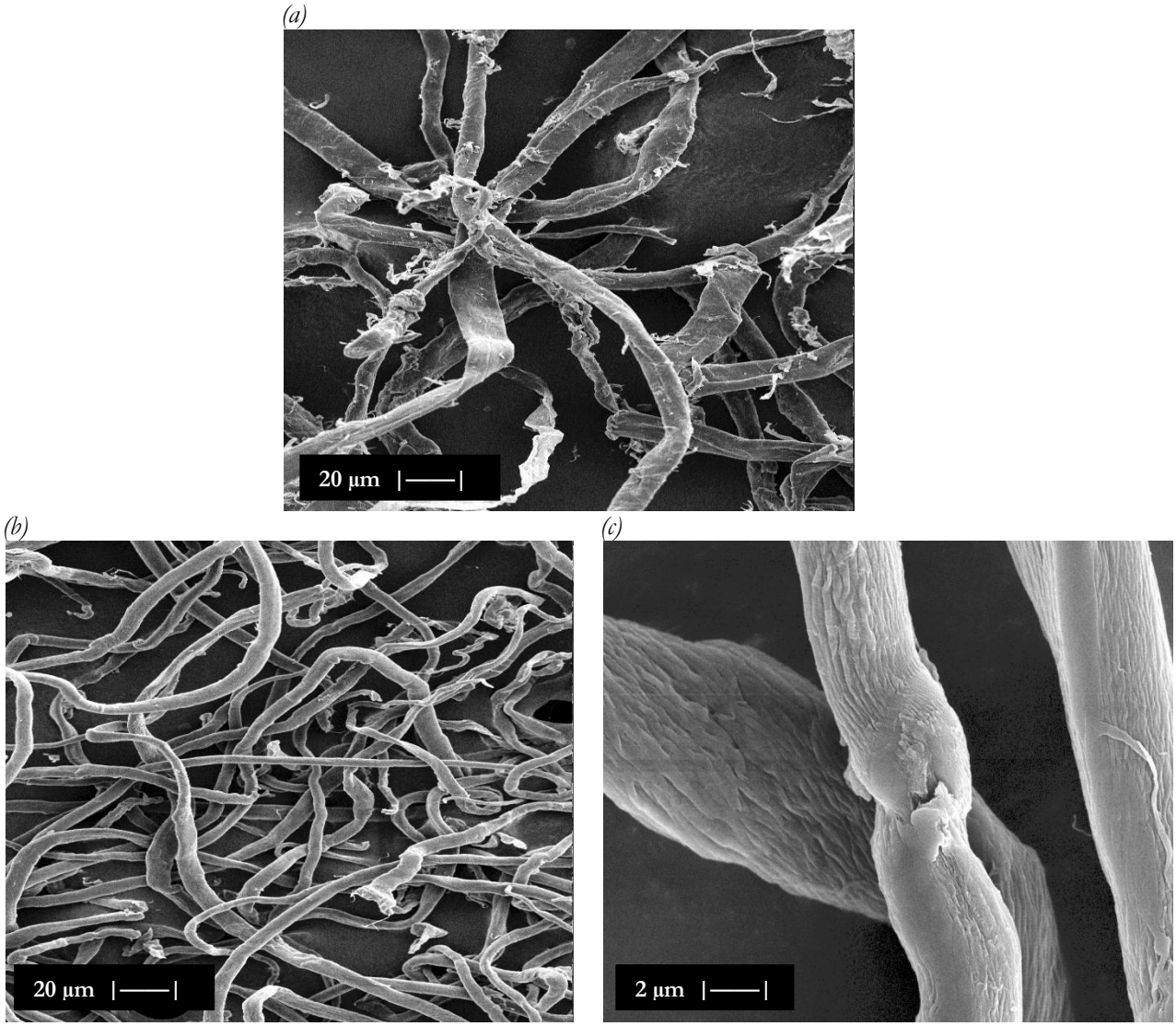


Figura 13. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para celulose CC: *(a)* sem pré-tratamento (aumento *x*400); e após mercerização, MCC, com dois aumentos: *(b)* *x*400, *(c)* *x*5.000.

As micrografias das celuloses de algodão e eucalipto, nativas e mercerizadas, apresentadas nas Figuras 13 e 14, mostram que a transformação irreversível, de celulose I em celulose II, não ocorre apenas no nível cristalográfico, mas também em um nível morfológico, concordando com resultados da literatura (DINAND, 2002).

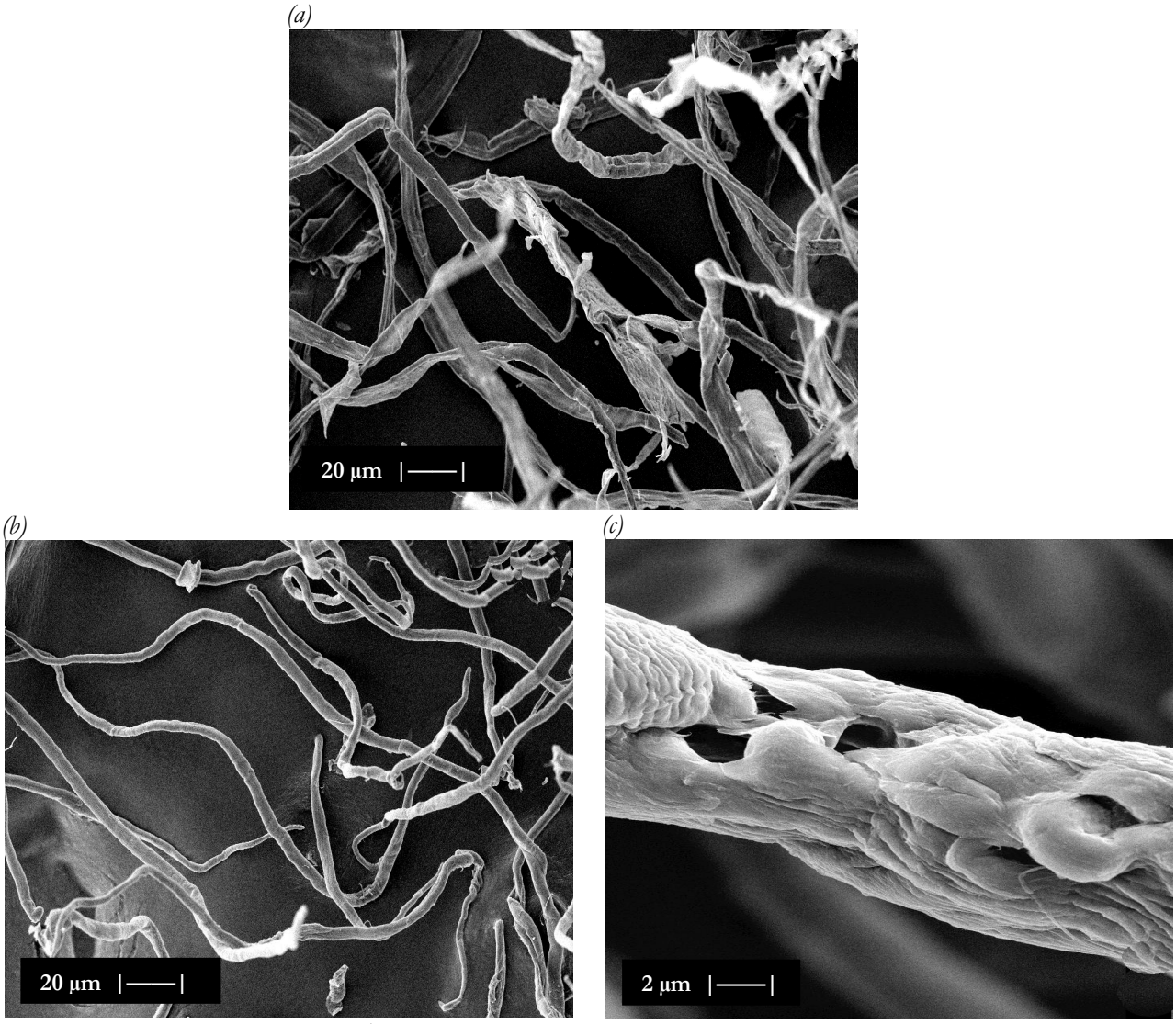


Figura 14. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para celulose EC: *(a)* sem pré-tratamento (aumento *x*400); e após mercerização, MEC, com dois aumentos: *(b)* *x*400, *(c)* *x*5.000.

Através das micrografias observa-se que o processo de mercerização, para ambas as celuloses (Figuras 13b e 14b), reduz a espessura da fibra e remove os fragmentos da superfície. Em uma ampliação maior (*x*5.000) (Figuras 13c e 14c), observam-se orifícios, ou poros, contidos nas fibras de celulose de algodão e eucalipto mercerizadas, sendo que esta última apresentou uma quantidade muito maior de poros. O tamanho e a distribuição destes orifícios são importantes para a penetração do solvente na fibra da celulose.

4.1.A – Caracterização da CP: cálculo do pI

Sabe-se que no tratamento de celulose com ácidos pode ocorrer a adsorção da base conjugada sobre a superfície das fibras. Um exemplo típico é a obtenção de *nanowhiskers* de celulose a partir do tratamento de celulose com ácido sulfúrico (EICHHORN, 2010). As *whiskers* de celulose carregam grupos sulfatos adsorvidos na superfície, gerando potencial *zeta* de ~-15 mV (EICHHORN, 2011; CAPADONA, 2009). Considerando estes fatos, suspeitou-se que a CP também poderia carregar grupos fosfatos adsorvidos na superfície. Por isso, o ponto isoelétrico (pI) da amostra CP foi determinado por titulação potenciométrica.

O método de titulação linear foi realizado, nos quais volumes constantes do titulante (NaOH ou HCl) foram adicionados, e calculados de acordo com a Equação 11. Métodos de regressão não-linear já foram utilizados com sucesso na caracterização de grupos funcionais tituláveis de proteínas (LIMA, 1999; MASINI, 1998). A Figura 15 mostra as curvas de titulação potenciométrica obtidas para a amostra de celulose CP tituladas com base (Figura 15a) e com ácido (Figura 15b).

(a) *(b)*

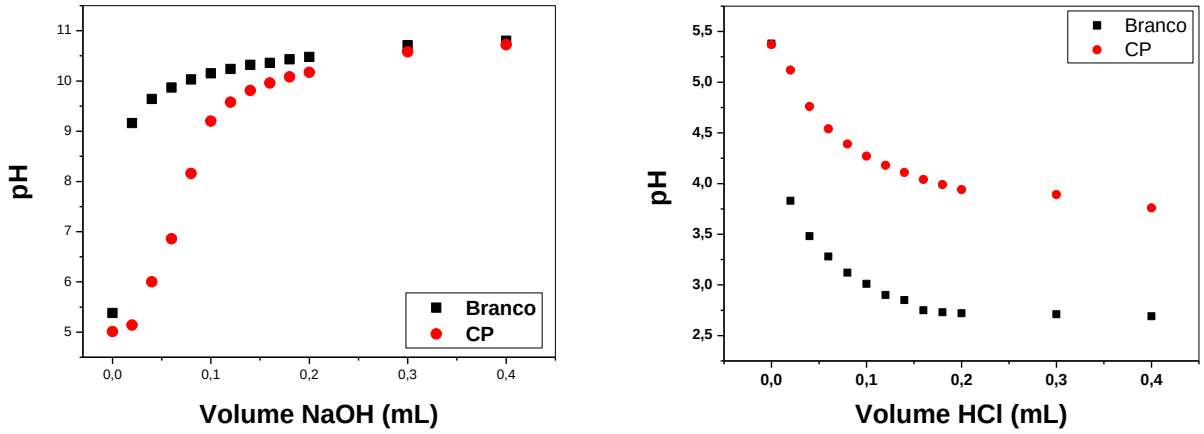


Figura 15. Curvas de titulação potenciométrica experimental obtidas para a Avicel ou eletrólito de fundo (KNO_3 0,05 M) (preto) e para a amostra de CP (vermelho); (a) titulação com NaOH 0,05 M; (b) titulação com HCl 0,02 M.

A Avicel também foi analisada pela mesma metodologia, mas seus dados não estão apresentados, pois seu comportamento frente à titulação foi o mesmo apresentado pelo *branco*, ou seja, pelo teste realizado na ausência de uma amostra de celulose.

A Figura 16 mostra a isoterma da capacidade de adsorção de prótons para a amostra de CP. Valores positivos de Q indicam que há adsorção de prótons, enquanto que valores negativos de Q representam liberação de prótons.

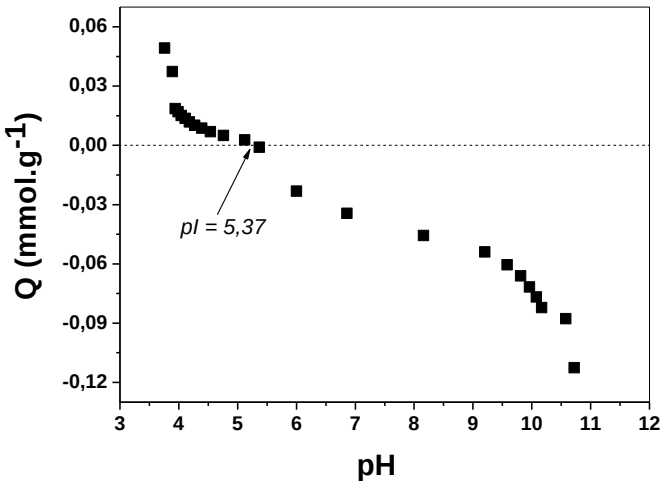


Figura 16. Isoterma da quantidade de prótons liberados ou adsorvidos obtida para a amostra CP, a (24 ± 1)°C.

O pH no qual a quantidade de prótons consumida ou liberada (*Q*) é zero define o pI e significa que, neste ponto, há um equilíbrio entre a adsorção e a liberação de prótons (não há excesso de cargas negativas ou positivas). Dessa maneira, o valor obtido para o pI da CP é 5,37 (Figura 16).

Considerando que o ácido fosfórico é um ácido triprótico, com pKa_1 = 2,15, pKa_2 = 7,1, e pKa_3 = 12,4 (ATKINS, 2008), o pI da CP em 5,3 indica que provavelmente haja grupos $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} adsorvidos na superfície da celulose. Análise de ICP-AES (Perkin Elmer) quantificando fósforo na amostra de CP resultou em uma quantidade de (314 ± 5) mg de fósforo/kg de CP presente na amostra, o que corrobora os resultados calculados do

pI. Esta característica da CP será novamente discutida na apresentação das atividades enzimáticas na seção 4.4, possuindo um papel determinante.

4.2 – Filmes Finos de Enzimas

4.2.A – Adsorção das enzimas celulase

O fenômeno da adsorção pode ser definido como sendo a ligação de partículas (ou moléculas) a uma superfície (ATKINS, 2008). A adsorção resulta das forças de interação entre o adsorbato e o substrato. Estas forças podem variar em magnitude, desde as fracas interações do tipo de van der Waals (adsorção física ou *fisissorção*) até as fortes ligações covalentes (adsorção química ou *quimissorção*).

Especialmente no caso de adsorção de proteínas sobre substratos sólidos, os principais fatores que afetam este processo são as características de proteína (pI, conformação), força iônica e pH do meio e características químicas e físicas (topografia) de superfície. A maioria dos processos de adsorção tem sido tratada termodinamicamente em termos das isotermas de Langmuir (LANGMUIR, 1918). O princípio de Langmuir se baseia em três hipóteses: (i) a adsorção não excede uma monocamada, (ii) todos os sítios de adsorção são equivalentes e a superfície do substratos é uniforme (perfeitamente plana em escala microscópica), (iii) uma molécula do adsorbato pode interagir somente com um sítio de adsorção e (iv) há equilíbrio dinâmico entre as moléculas adsorvidas e as livres em solução.

A adsorção espontânea de proteínas sobre substratos sólidos pode ser dirigida por ganho entálpico e/ou ganho entrópico. O ganho entálpico pode provir de interações favoráveis (ligações de hidrogênio, eletrostática, hidrofóbicas) entre os resíduos das proteínas e a superfície. O ganho entrópico geralmente decorre de mudanças conformacionais que a macromolécula pode sofrer ao adsorver, liberando água de

hidratação ou contra-íons. Tais mudanças conformacionais levam à desnaturação das proteínas (NORDE & LYKLEMA, 1991).

A imobilização das enzimas celulase sobre substratos sólidos foi proposta como uma solução para permitir a reutilização das mesmas sem perda de atividade, já que o uso de enzimas livres gera uma grande instabilidade, além de não ser passível de regeneração – o que traz um custo muito alto. Com a imobilização das enzimas, torna-se possível a reutilização, o que é mais vantajoso do ponto de vista econômico, além de uma maior estabilidade, com faixas de trabalho mais amplas de pH e temperatura, com menor susceptibilidade à influência de inibidores (CHIBATA, 1978).

A imobilização da celulase em substratos de Si/SiO_2 segue os padrões já definidos em trabalhos anteriores (TÉBÉKA, 2009), sendo que o comportamento de adsorção da celulase de *T. reesei* sobre lâminas de Si foi acompanhado por meio de elipsometria e AFM. A maior eficiência na adsorção das enzimas encontra-se a 60ºC com um período de incubação de 60 minutos. A topografia foi analisada e monitorada por AFM, como mostra a Figura 17.

(a) *(b)*

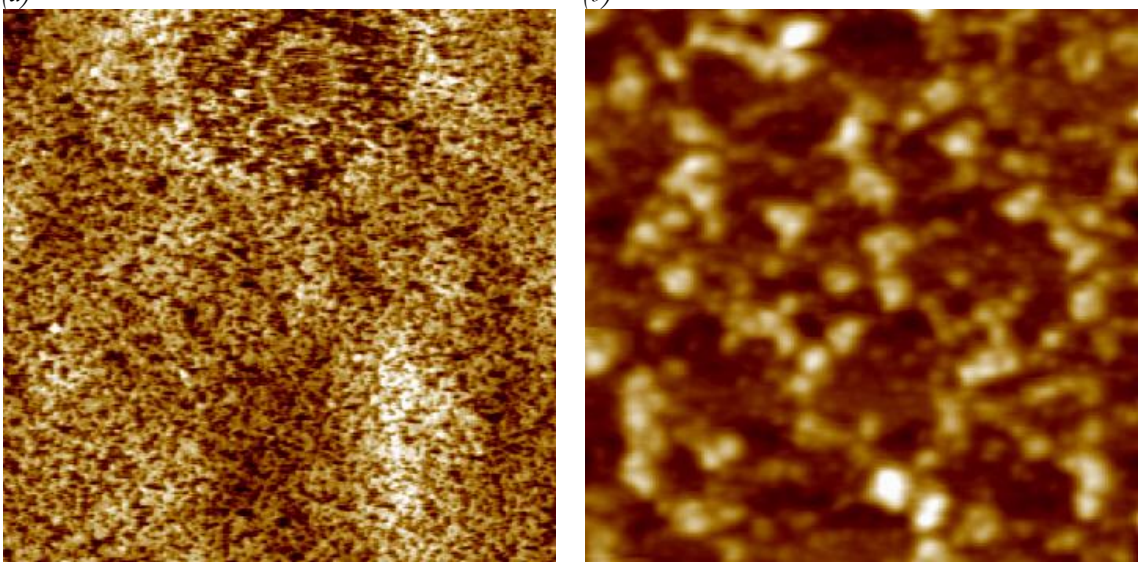


Figura 17. Imagens topográficas de AFM no modo intermitente obtidas da celulase *T. reesei* adsorvida sobre lâminas de Si. *(a)* Área de varredura 5,0 μm x 5,0 μm, com z = 8,0 nm. *(b)* Área de varredura 1,0 μm x 1,0 μm, com z = 20,0 nm.

A espessura média da camada de celulase adsorvida foi calculada como sendo (6,1 ± 0,8) nm. As imagens de AFM mostram os filmes relativamente rugosos, com uma rugosidade média quadrática (rms) de (2,3 ± 0,2) nm, e quantidade de enzimas adsorvidas de $\Gamma \sim (7{,}9 \pm 0{,}7)$ $mg.m^{-2}$, o que está de acordo com trabalhos anteriores (TÉBÉKA, 2009). Considerando que as lâminas de Si, antes da imobilização, apresentam uma rugosidade média de (0,09 ± 0,01) nm para uma área semelhante de verificação, nenhuma influência da rugosidade do Si era esperada nas imagens de AFM da celulase.

A imobilização de celulase sobre superfícies hidrofílicas deve proporcionar um ambiente altamente hidratado, que ajuda a preservar a estrutura secundária do complexo enzimático de celulases e favorece a ação sinérgica das celobiohidrolases, endoglucanases e β-glucosidase. Interações entre celulase e filmes de celulose já foram estudadas por meio de microbalança de cristal de quartzo (TURON, 2008). Foi observado que, conforme as moléculas de celulase se ligam ao filme, este se torna mais espesso e hidratado; apenas depois as endoglucanases começam a cortar as cadeias de celulose de forma aleatória, criando novos terminais de cadeia. Nesse momento, o filme de celulose torna-se mais hidratado e macio. A água de hidratação presa às lâminas de Si é o que parece manter a estrutura nativa de muitas enzimas, evitando a desnaturação depois da adsorção.

4.2.B – Ensaios de adsorção das enzimas endoglucanases

A espessura média determinada para camadas de endoglucanases (EGB), adsorvidas por 24 horas sobre lâminas de Si a 40ºC foi de (2,1 ± 0,3) nm. As imagens topográficas correspondentes estão apresentadas na Figura 18. A Figura 18b tem imagens de ponta, ou de algo que aderiu à ponta, como artefatos. É muito provável que tais artefatos ocorreram devido a interações entre a superfície e a ponta do AFM. Esta é outra evidência da atração

de endoglucanases por superfícies hidrofílicas a base de Si. O material da ponta do AFM é Si_3N_4, o qual apresenta boa molhabilidade por água.

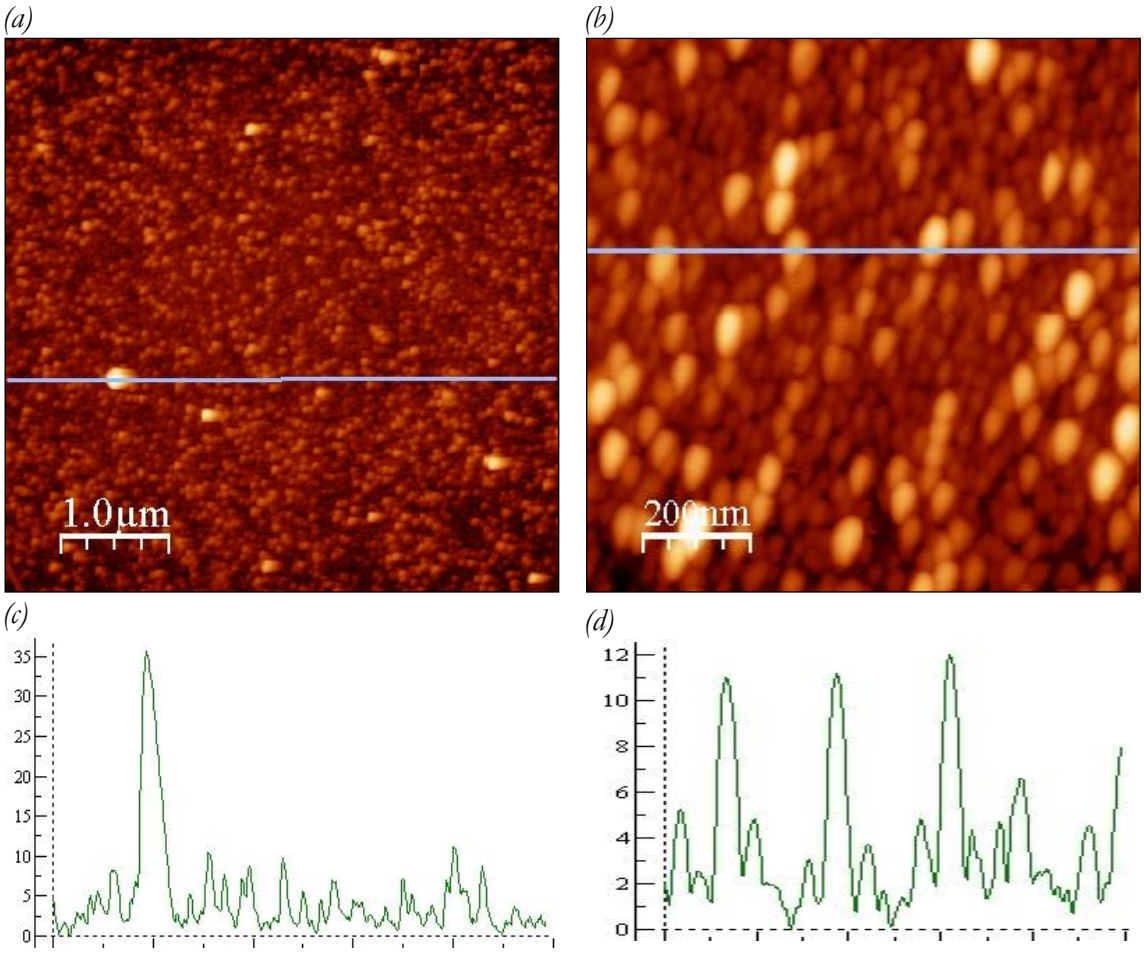


Figura 18. Imagens topográficas de AFM no modo intermitente obtidas das endoglucanases de *X. campestris* adsorvidas em lâminas de Si: *(a)* Área de varredura 5,0 µm x 5,0 µm, com z = 25,0 nm; *(b)* Área de varredura 1,0 µm x 1,0 µm, com z = 20,0 nm; *(c)* e *(d)* se referem aos cross sections correspondentes das imagens em *(a)* e *(b)*, respectivamente, cujas alturas representadas no eixo *y* estão em nm.

Endoglucanases formam filmes que cobriram completamente a superfície do silício. Nota-se nas Figuras 18a e 18b que a 40°C as lâminas de Si foram completamente recobertas por endoglucanases com Γ máximo de (2,2 ± 0,2) $mg.m^{-2}$. Os valores de Γ, entretanto, diminuiram com o aumento da temperatura. Mesmo para tempos maiores de adsorção (48 h ou 72 h), se observou diminuição de Γ com o aumento de temperatura.

A Figura 19a mostra o efeito da temperatura na quantidade de endoglucanases adsorvidas (concentração do *bulk* de 90% m/v, com tempos de adsorção de 24 h) sobre

lâminas de Si/SiO_2. O comportamento foi analisado através da equação de Arrhenius na faixa de temperatura estudada, a 30°C, 40°C, 50°C e 60°C. A fim de se estimar a energia de adsorção, os dados foram tratados como típicos de um gráfico de Arrhenius, conforme mostra na Figura 19b. Através da equação linearizada foi possível encontrar o valor da energia de adsorção para o processo, E_a.

$$\Gamma = A.e^{-\frac{E_a}{RT}} \tag{17}$$

$$\ln \Gamma = \ln A - \frac{E_a}{RT} \tag{18}$$

onde Γ é quantidade de material adsorvido; A é o fator de freqüência, uma constante pré-exponencial (que depende, entre outros, da área de contato); E_a a energia de ativação; T a temperatura em Kelvin; e R a constante universal dos gases.

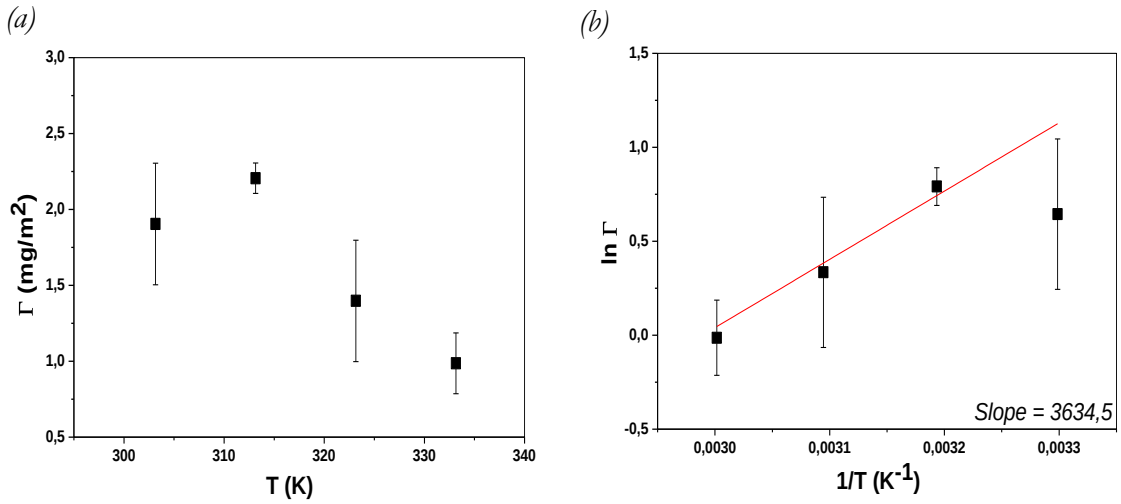


Figura 19. (a) Quantidade de EGB adsorvida (Γ) (estimada teoricamente utilizando uma área de 6 cm^2 e densidade dos filmes de 1,37 g/cm^3) em função da temperatura (T) sobre lâminas de Si; *(b)* gráfico de Arrhenius obtido a partir da linearização de (a), linha vermelha corresponde a uma ajuste linear com declive = 3634,56 K. O tempo de adsorção foi mantido constante em 24 h para todos os experimentos.

A partir do ajuste linear, a energia de ativação (E_a) pode ser estimada em -30,2 kJ/mol. Este valor negativo indica que o aumento de temperatura desfavorece a adsorção de EGBs sobre superfícies de Si/SiO_2.

4.3 – Avaliação do Pré-tratamento com EGBs Imobilizadas e Hidrólise

As endoglucanases hidrolisam as cadeias de celulose de modo aleatório. O sítio ativo das endoglucanases possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo seu grau de polimerização de maneira considerável. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas internas das cadeias de celulose.

4.3.A – Pré-tratamento com EGBs imobilizadas

A fim de verificar a atividade das endoglucanases adsorvidas nas diferentes temperaturas, celulose Avicel foi colocada em contato com os filmes das enzimas. As amostras resultantes foram analisadas através de viscosimetria capilar, um método indireto escolhido para verificar a atividade das endoglucanases, enzimas que clivam randomicamente ligações internas da celulose, gerando uma despolimerização rápida do substrato.

Tabela 4. Viscosidades reduzidas (η_{sp}/C) obtidas para amostras de celulose Avicel após o pré-tratamento com endoglucanase adsorvida em diferentes temperaturas.

Temperatura de adsorção	***Tempo de escoamento (s)***	η_{sp}/C ***(L/g)***
30°C	242,3 ± 0,2	312 ± 1
40°C	223,0 ± 0,1	267 ± 1
50°C	232,3 ± 0,2	288 ± 1
60°C	247,5 ± 0,4	324 ± 2

Pela Tabela 4 é possível observar que o menor valor de viscosidade reduzida e, portanto, seu grau de polimerização foi aquele obtido a partir dos experimentos de endoglucanases adsorvidas realizados a 40°C. Tal resultado é condizente com os dados

obtidos na formação dos filmes de enzimas, no qual o valor máximo de adsorção ocorreu também a 40°C.

Um experimento de controle foi realizado com as enzimas endoglucanases na forme livre, a fim de verificar se a adsorção das endoglucanase mudanças conformacionais. Os resultados apresentados na Tabela 5 mostraram que as EGBs livres e as adsorvidas diminuíram os valores de viscosidade reduzida da Avicel em 26% e 15% respectivamente, evidenciando que o processo de adsorção leva a certo grau de desnaturação das EGBs.

Tabela 5. Viscosidades reduzidas (η_{sp}/C) obtidas para Avicel, antes e após o pré-tratamento com endoglucanase livre e adsorvida (experimento de adsorção realizado a 40°C, hidrólise a 60°C).

Celuloses	***Tempo (s)***	η_{sp}/C ***(L/g)***
Avicel	256,2 ± 0,1	343 ± 1
Avicel (tratada com EGB livre)	198,2 ± 0,2	253 ± 1
Avicel-EGB (tratada com EGB imobilizada)	228,4 ± 0,1	289 ± 1

4.3.B – Hidrólise enzimática da avicel tratada com EGB imobilizada

A celulose *Avicel-EGB* citada refere-se à celulose caracterizada no item 4.3.A, ou seja, após sua hidrólise com endoglucanases imobilizadas, como uma forma de pré-tratamento.

A idéia deste pré-tratamento enzimático era analisar, além da própria atividade das endoglucanases, se uma exposição prolongada às enzimas que clivam as ligações internas da cadeia de celulose geraria um resultado aprimorado em relação à hidrólise sem esta etapa.

A Figura 20 mostra que a utilização de endoglucanases imobilizadas não aumentou a conversão de celulose à glicose de forma significativa, pois as taxas de conversão são similares se seus respectivos erros forem considerados.

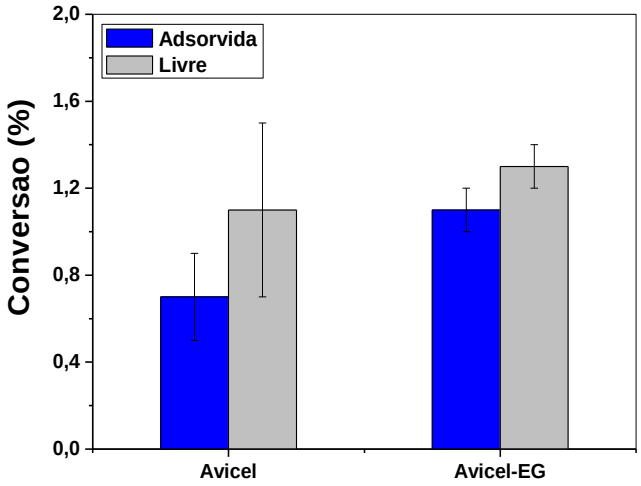


Figura 20. Taxas de conversão de celulose em glicose obtida para hidrólise da Avicel, antes e após pré-tratamento com EGB imobilizada, utilizando celulase livre ($4{,}1.10^{-4}$ mg/mL) ou imobilizada em Si ($2{,}7.10^{-4}$ mg/m^2).

Frente a esse resultado, podemos tecer algumas considerações:

(i) o substrato utilizado (celulose Avicel) talvez não seja ideal para estas endoglucanases, por ter um *Ic* elevado. Talvez as atividades sejam maiores se o substrato for CMC, que geralmente é utilizada como ensaio padrão para as EGBs;

(ii) a exposição prévia da Avicel às enzimas endoglucanases imobilizadas auxiliou, ainda que pouco, apenas no desempenho da hidrólise com enzimas adsorvidas e

(iii) a adsorção das endoglucanases nas lâminas de Si/SiO_2 causa uma desnaturação parcial das enzimas.

Na consideração (i), a literatura (MEDVE, 1997; GHOSE, 1987) reporta que estas enzimas hidrolisam majoritariamente a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis), como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). Celulose cristalina e o algodão, ambos os substratos com elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular que apresentam.

Com relação à consideração (iii), se as endoglucanases sofrerem mudanças conformacionais ao adsorver, o aumento de entropia associado à liberação das moléculas de água que antes hidratavam segmentos da macromolécula livre em solução, aumenta o

grau de liberdade translacional das moléculas de água, promovendo, assim, o ganho entrópico para todo o sistema (LYKLEMA, 1996).

4.4 – Hidrólise com Enzimas Livres e Imobilizadas

Considerando que todos os grupos hemiacetais terminais na celulose são capazes de reduzir o DNS à ANS, para cada amostra um experimento de controle foi realizado, no qual a formação de ANS foi medida na ausência de enzimas. Este controle é importante para avaliar a contribuição de cada grupo terminal de cada tipo de amostra na redução do DNS à ANS, já que, após hidrólise, o DNS é reduzido por glicose, celobiose e qualquer oligômero redutor solúvel presente no sobrenadante. Como esperado, entre todas as amostras de celulose, CP foi a única capaz de reduzir uma quantidade significativa de DNS a ANS, pois apresenta o menor *DP* e, portanto, a maior concentração de grupos terminais hemiacetal. Portanto, para todas as determinações da concentração de glicose, decorrentes da hidrólise enzimática, foram subtraídos os valores de conversão à ANS determinados nos experimentos de controle.

Tabela 6. Taxas de conversão de celulose em glicose obtidas para a hidrólise das diferentes celuloses utilizando celulase livre ou imobilizada.

Celulose	***Conversão (glicose formada/grama de celulose) (%)***	
	Adsorvida sobre Si ($2,7.10^{-4}$ mg/m²)	***Livre ($4,1.10^{-4}$ mg/mL)***
Avicel	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,4
CP	1,2 ± 0,5	1,0 ± 0,7
CIL	1,3 ± 0,6	0,8 ± 0,4
CC	1,2 ± 0,3	**6,5 ± 0,9**
MCC	1,7 ± 0,3	4,8 ± 0,7
EC	2,3 ± 0,1	3,0 ± 0,2
MEC	**3,4 ± 0,1**	2,3 ± 0,4

As conversões de celulose à glicose estão apresentadas na Tabela 6 e na Figura 20. Deve-se notar que as baixas taxas de conversão foram obtidas utilizando uma pequena

quantidade de celulase (0,43 mg) por 1,0 grama de celulose. Os procedimentos padrões recomendam 20 mg de celulase por grama de celulose (~ 50 vezes maior).

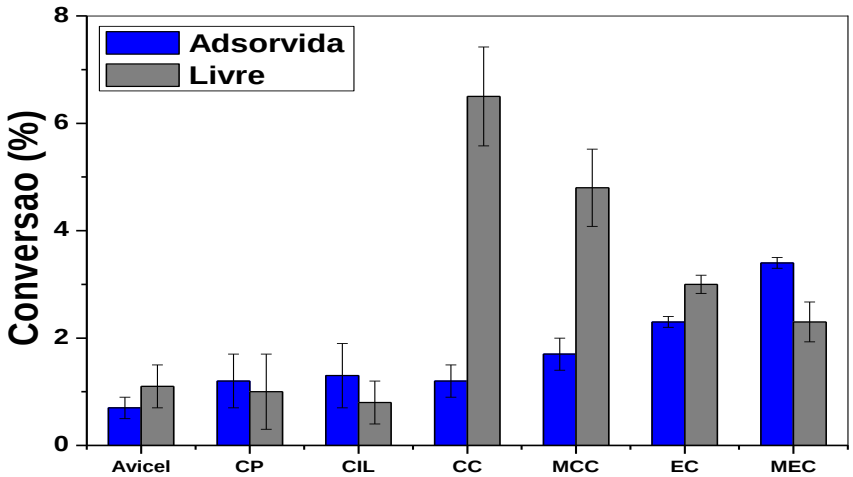


Figura 21. Taxas de conversão de celulose em glicose obtida para hidrólise de diferentes celuloses, antes e após pré-tratamento, utilizando celulase livre ($4{,}1.10^{-4}$ mg/mL) ou adsorvida sobre Si ($2{,}7.10^{-4}$ mg/m^2).

Na presença de celulase livre e adsorvida, as amostras Avicel, CP e CIL converteram quantidades similares e pequenas de glicose, apesar da CP e CIL serem menos cristalinas do que Avicel. Este resultado foi surpreendente porque, em geral, amostras menos cristalinas são mais passíveis de hidrólise enzimática, pois são mais reativas e acessíveis (HALL, 2010; BERTRAN & DALE, 1986).

No caso da CP, a primeira hipótese para explicar esse comportamento inesperado seria a presença de grupos fosfatados ligados à superfície da CP, o que impediria as enzimas celulase de se aproximarem devido à repulsão eletrostática. O pI de CP (pH em que Q é igual a zero) foi determinado na seção 4.1.A como sendo **5,3**, indicando que a Avicel, após pré-tratamento com ácido fosfórico, grupos fosfato adsorveram sobre a superfície de celulose, mesmo após lavagens exaustivas e diálise. A hidrólise enzimática ocorre em pH 4,6 (tampão acetato), onde ~ 5 μmol de fosfato por grama de CP é esperado que esteja protonada (ver Figura 16). Como o *DP* da CP é 61, a massa molar média de CP é 9.882 g/mol. Em 1,0 g de CP há ~ 1 x 10^{-4} mols de CP. Portanto, em pH 4,6 a relação entre o

número de mols de CP e grupos fosfatos protonados é de 100:5. Considerando que a etapa de adsorção da celulase e hidrólise representada na Figura 5 é aleatória, pode ser que a presença de 5% de fosfatos protonados seja suficiente para repelir a celulase ou alterar seu mecanismo de hidrólise. Assim, a presença de ácido fosfórico na superfície da CP, reduz a acessibilidade da enzima (no caso da imobilizada) e da adsorção de celulases na superfície CP (no caso da livre).

No caso da CIL, não apenas não houve favorecimento da hidrólise, como também houve uma redução do rendimento na hidrólise com a enzima livre. É possível que moléculas de EMIMAc ainda tenham permanecido fortemente adsorvidas sobre as moléculas de celulose, apesar das lavagens exaustivas com solução de NaCl, água destilada e diálise, causando desnaturação parcial da celulase.

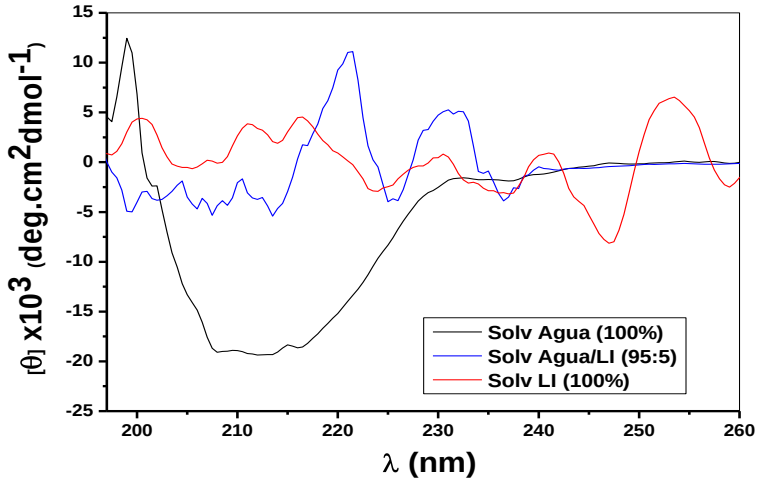


Figura 22. Espectros de dicroísmo circular do complexo enzimático celulase em água, e em proporções de EMIMAc na solução. Proporções dadas em v/v.

A Figura 21 mostra os espectros de dicroísmo circular (CD) obtidos para celulase de *T. reesei* em água, em EMIMAc puro e na mistura de EMIMAc e água (95%/5% v/v). Nota-se que a banda em 216 nm, característica de α-hélices da estrutura nativa da celulase, desaparece na presença do líquido iônico mesmo em misturas contendo somente 5% de EMIMAc, indicando a desnaturação da enzima. A literatura (TURNER, 2003) reporta

estudos sobre a hidrólise enzimática de celulose em alguns líquidos iônicos, mostrando uma perda da atividade enzimática da celulase em BMIMCl. A inibição da celulase acontece pela alta força iônica, a qual provoca desnaturação e inativação das enzimas.

Os maiores valores de conversão foram observados para as celuloses CC, MCC, EC e MEC as quais apresentam graus de polimerização e índices de cristalinidade muito similares. Os únicos parâmetros que diferem uma amostra de outra são os valores de constantes de capilaridade, *Cw* (Tabela 7) e os poros, mostrado nas imagens de MEV (Figuras 13c e 14c). As taxas de conversão obtidas com celulase livre apresentaram correlação linear com os valores de *Cw*, como mostra a Figura 23.

Tabela 7. Constantes de capilaridade (*Cw*) obtidas para as amostras de celulose.

Amostra	***Cw*** ($\times 10^{16}$ m^5)
Avicel	3,1 ± 0,5
CP	1,6 ± 0,2
CIL	7,5 ± 0,8
CC	10 ± 1
MCC	4,9 ± 0,7
EC	3,4 ± 0,4
MEC	1,0 ± 0,3

Considerando que *Cw* depende apenas da geometria do poro e que a presença de poros nas fibras influencia no rendimento hidrolítico, estando diretamente ligada ao intumescimento do polímero que favorece a hidrólise com enzimas livres, esta correlação linear é bastante coerente. Portanto, quanto maior o valor da constante de capilaridade, maior é a molhabilidade e mais favorecidas são a adsorção das enzimas sobre a celulose e a hidrólise enzimática. Assim, a difusão das proteínas em direção à celulose pode ser facilitada devido à presença de água de hidratação na superfície insolúvel da celulose. Seguindo esse raciocínio, uma vez adsorvida na superfície, um mecanismo de hidrólise no qual a enzima possua um CBM (como todas as EGBs e CBHs – à exceção de uma – do

complexo enzimático celulase da *T. reesei*), conhecido como mecanismo processivo, seria mais rápido do que um mecanismo que exija deixar o substrato para, posteriormente, re-penetrar as camadas de hidratação (WYMAN, 2005).

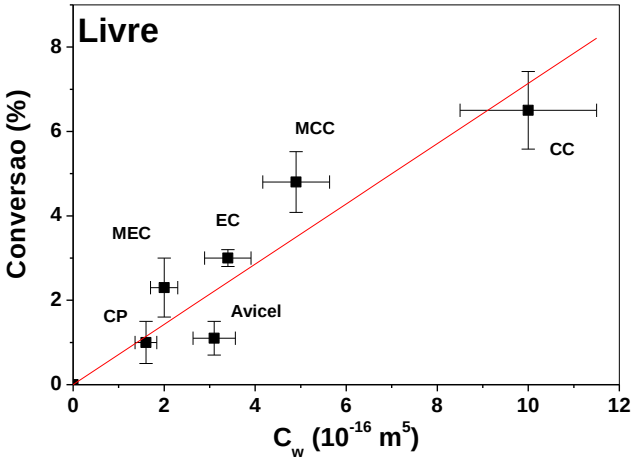


Figura 23. Correlação entre os dados de capilaridade (*Cw*) de cada amostra de celulose, com seus respectivos valores de conversão à glicose, após a hidrólise com celulase livre.

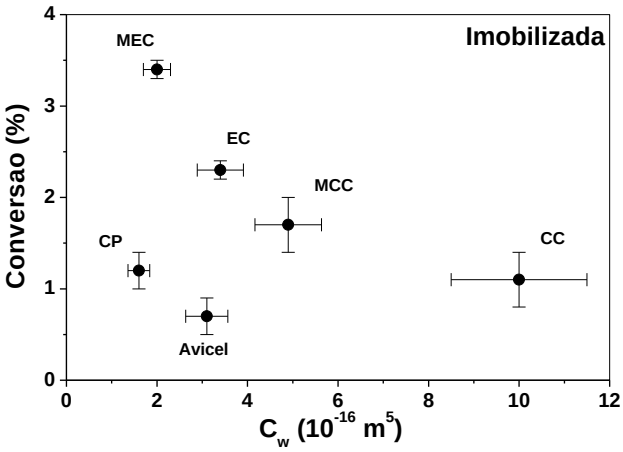


Figura 24. Correlação entre os dados de capilaridade (*Cw*) de cada amostra de celulose, com seus respectivos valores de conversão à glicose, após a hidrólise com celulase imobilizada sobre lâminas de Si.

No caso da celulase imobilizada, a correlação entre a taxa de conversão e *Cw* aparece invertida. Uma possível explicação é a perda do grau de liberdade do complexo enzimático quando adsorvido. Na prática, o contrário da hidrólise com enzimas livres ocorre, pois é a fibra que tem que adsorver sobre a celulase para que a hidrólise ocorra. Por isso, para obter rendimentos altos, a área de contato entre a fibra e a celulase imobilizada

tem que ser muito grande. Porém, se capilaridade for muito alta, a camada de água de hidratação pode ter efeito de "blindagem", reduzindo o contato efetivo entre os sítios ativos e as fibras.

Simulações mecanísticas moleculares foram utilizadas para modelar a estruturação da água adjacente a duas diferentes faces da celulose Iβ monoclínica e microcristalina (MATTHEWS, 2006). Fortes localizações da água adjacente foram encontradas por moléculas na primeira camada de hidratação, devido tanto a ligações de hidrogênio das hidroxilas das moléculas de carboidratos, como também à hidratação hidrofóbica das regiões extensivas de superfícies hidrofóbicas resultantes dos átomos de hidrogênio alifáticos axiais do "topo" das unidades de monômeros de glicose. As camadas altamente estruturadas de água podem apresentar uma barreira substancial à aproximação da celulase em direção à superfície (100) na hidrólise catalisada por enzimas, contribuindo para as taxas lentas de hidrólise observadas experimentalmente. De modo oposto, a face (110) induz muito menos estruturação e, logo, pode ser mais facilmente aproximada, resultando em altas taxas de hidrólise nesta face.

De maneira geral, existem vários fatores relacionados com o substrato que podem influenciar a conversão na hidrólise enzimática da celulose, tais como área superficial, porosidade, cristalinidade, grau de polimerização e adsorção, tanto da enzima quanto do substrato. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, é lógico afirmar que, para a quantidade de enzima utilizada, o grau de polimerização teve pouco ou nenhum efeito sobre as hidrólises. Já para os outros quatro parâmetros, temos uma relação complexa, que nos leva a questionar o papel da adsorção e da cristalinidade nos rendimentos hidrolíticos.

Em baixos índices de cristalinidade, as enzimas presentes estariam mais ativas na mesma concentração total, devido à estrutura mais aberta da celulose, resultando numa maior área superficial. Tal acessibilidade foi sugerida como um fator importante que afeta a hidrólise enzimática (HONG, 2007) e o seu aumento em menor grau de cristalinidade foi

proposto como uma razão para a maior digestibilidade (MOXLEY, 2008), sendo o resultado de uma causa dinâmica independente da fase de adsorção e diretamente relacionado à concentração da enzima. Entretanto, grupos carregados na superfície da celulose e sais residuais em sua estrutura influenciam negativamente no rendimento, quando lidamos com baixas concentrações de enzima, sendo que nem sua grande área superficial foi capaz de melhorar os rendimentos.

Melhorar o acesso da enzima a índices maiores de cristalinidade é muito limitado. A superfície interna da celulose cristalina é pouco acessível às enzimas, levando a uma baixa adsorção das mesmas. Superfícies acessíveis tem sido objeto de numerosos estudos (ZHU, 2008), mas, tendo em conta os resultados obtidos no presente estudo, este não parece ser o único parâmetro crítico com relação à conversão de hidrólise. Para amostras com *DP* e índice de cristalinidade semelhantes, uma correlação linear crescente com a constante de capilaridade, *Cw*, foi observada, mostrando que a geometria dos poros e a água de hidratação do material celulósico têm também um papel determinante na acessibilidade da celulase.

No caso das celulases imobilizadas para todas as amostras de celulose desse estudo, a correlação entre o rendimento de conversão à glicose e *Cw* foi decrescente, evidenciando que o mecanismo de ação neste caso é muito mais complexo e que são as fibras que tem que acessar o sítio catalítico da enzima imobilizada. Se as fibras estiverem muito hidratadas, a camada de água de hidratação pode vir a ser um impedimento estérico para que a adsorção ocorra, diminuindo as conversões obtidas.

4.5 – Avaliações de Reuso das Enzimas Imobilizadas

A celulase imobilizada apresentou níveis de atividade catalítica que variaram em função do substrato utilizado, com perda em relação ao nível original da enzima livre de cerca ~80% ou aumento de até ~20%. Entretanto, seu uso provou ser vantajoso, pois os *wafers* com celulase imobilizada puderam ser reutilizados, como mostra a Tabela 8. Todos os dados de reuso são referentes à hidrólise frente ao substrato de celulose Avicel.

Tabela 8. Dados de reuso das placas de silício com celulase imobilizada.

Reuso	Atividade (%)[a]
1º	0,8 ± 0,2
2º	0,8 ± 0,2
3º	0,8 ± 0,1
4º	0,7 ± 0,1
5º	0,7 ± 0,2
6º	0,6 ± 0,1

[a] dados de atividade referem-se à conversão de celulose Avicel em glicose (% m/m) após a hidrólise.

Em comparação com amostras recém-preparadas, atividade catalítica diminuiu cerca de ~25% em relação ao primeiro uso, mas o nível de atividade enzimática permaneceu constante, mesmo após cinco utilizações sucessivas. A perda de atividade em ~25% pode ser explicada pela dessorção de celulase durante o teste catalítico, ou mesmo pela deposição da celulose nas lâminas contendo a enzima, o que reduziria a atividade. A espessura média da celulase adsorvida, acompanhada por medidas elipsométricas, não sofreu alteração significativa (menos que 10% do valor original) após os seis ciclos catalíticos, o que descarta a hipótese de dessorção. O sétimo uso mostrou um nível de atividade muito baixo para fins práticos.

A possibilidade de reuso também foi analisado para as amostras de endoglucanases imobilizadas em silício, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Dados de reuso das placas de silício com endoglucanase imobilizada.

Reuso	Tempo de escoamento (s)[b]	Viscosidade relativa (η_{rel})[b]
Avicel	256,2 ± 0,1	2,37
1º	228,4 ± 0,1	2,11
2º	229,1 ± 0,1	2,12
3º	230,4 ± 0,1	2,12
4º	234,5 ± 0,1	2,17

[b] dados de atividade foram analisados indiretamente através da medida do tempo de escoamento (viscosidades) da celulose Avicel resultante, após a hidrólise.

Em comparação com amostras recém-preparadas, atividade catalítica diminuiu cerca de ~20% em relação ao primeiro uso, mas as endoglucanase imobilizadas puderam ser reutilizadas por quatro vezes consecutivas. O quinto uso se comportou como no caso de celulases imobilizadas, com um nível de atividade muito baixo para fins práticos.

5 CONCLUSÕES

Celulase imobilizada para hidrólise de celulose microcristalina Avicel apresentou desempenho semelhante ao da livre e é vantajosa porque pode ser reutilizada por seis vezes consecutivas com apenas ~20% de perda do seu nível de atividade original, reduzindo custos. Este efeito foi atribuído à hidratação da superfície, que previne a desnaturação da enzima.

Já as endoglucanases imobilizadas apresentaram desempenho inferior ao da enzima livre, mas seu uso é vantajoso pois pode ser reutilizada por até quatro vezes, com perda de ~25% de atividade catalítica com relação ao primeiro uso.

O pré-tratamento com EMIMAc reduziu a cristalinidade da celulose, mas sua forte adesão sobre a celulose prejudicou a ação enzimática; efeito mais pronunciado quando se utilizou as enzimas na forma livre.

Já o pré-tratamento com H_3PO_4 degradou e diminui drasticamente a cristalinidade da celulose original além de promover a adsorção de grupos fosfato na superfície da celulose, impedindo a enzima de se aproximar e diminuindo o rendimento enzimático.

A hidrólise com as endoglucanases, imobilizadas na forma de uma etapa de pré-tratamento, não gerou resultados satisfatórios para o substrato analisado (celulose Avicel), provavelmente pelo alto índice de cristalinidade da celulose Avicel.

As taxas de conversão de celulose à glicose pela ação da celulase livre não apresentaram correlação com o índice de cristalinidade nem com o *DP*, mas apresentaram correlação linear crescente com a constante de capilaridade, *Cw*. Este resultado mostra que a geometria dos poros do material celulósico tem papel determinante na acessibilidade da celulase.

No caso das celulases imobilizadas, a correlação entre conversão e *Cw* foi decrescente, evidenciando que o mecanismo neste caso é muito mais complexo e que são as fibras que tem que acessar o sítio catalítico da enzima imobilizada. Se as fibras estiverem muito hidratadas, a camada de água de hidratação pode vir a ser um impedimento estérico para que a adsorção ocorra.

6 REFERÊNCIAS

ASTM D1795-94; **Standard Test Methods for Intrinsic Viscosity of Cellulose**, 2001.

ATKINS, P., PAULA, J. de; **Atkins Físico-Química**, LTC: Rio de Janeiro, 2008.

AZZAM, R. M. A., BASARA, N. M.; **Ellipsometry and Polarized Light**. Amsterdam: North Holland Publication, 1979.

BANSAL, P., HALL, M.., REALFF, M. J., LEE, J. H., BOMMARIUS, A. S.; Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances** *27*, 833–848, 2009.

BERTRAN, M. S.; DALE. B. E.; Determination of cellulose accessibility by differential scanning calorimetry. **Journal of Applied Polymer Science** *32*, 4241-4253, 1986.

BIOENFAPESP; **BIOEN – Bioen Fapesp**. Disponível em <http://bioenfapesp.org/>. Acesso em: 03 jan. 2011.

BOMMARIUS, A .S., KATONA, A., CHEBEN, S. E., PATEL, A .S., RAGAUSKAS, A. J., KNUDSON, K., PU, Y.; Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering** *10*, 370–381, 2008.

BUSCHLEDILLER, G., ZERONIAN, S. H.; Enhancing the reactivity and strength of cotton fibers. **Journal of Applied Polymer Science** *45*, 967-979, 1992.

CAI, J., ZHANG, L., ZHOU, J., LI, H., CHEN, H., JIN, H.; Novel fibers prepared from cellulose in NaOH/urea aqueous solution. **Macromolecular Rapid Communications** *25*, 1558–1562, 2004.

CANEVAROLO JR., S. V.; **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 445, 2004.

CAPADONA, J. R., SHANMUGANATHAN, K., TRITTSCHUH, S., SEIDEL, S., ROWAN, S. J., WEDER, C.; Polymer Nanocomposites with Nanowhiskers Isolated from Microcrystalline Cellulose. **Biomacromolecules** *10*, 712–716, 2009.

CHEN, H., LI, X. L., BLUM, D. L., LJUNGDAHL, L. G.; Two genes of the anaerobic fungus Orpinomyces sp. strain PC-2 encoding cellulases with endoglucanase activities may have arisen by gene duplication. **FEMS Microbiology Letters** *159*, 63-68, 1998.

CHIBATA, I., TOSA, T., SATO, T., MORI, T.; In: **Immobilized Enzymes**. New York, Wiley & Sons, 1978.

CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS; Haynes, W. M., ed., 91st Ed., CRC Press, Michigan: EUA, 2010.

DADI, A. P., VARANASI, S., SCHALL, C. A., Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. **Biotechnology and Bioengineering** *95*, 904–910, 2006.

D'ALMEIDA, M. L. O.; **Composição química dos materiais lignocelulósicos**. 2ª Ed., vol. 1, São Paulo: IPT, 45-106, 1988.

DAVIES, G., HENRISSAT, B.; Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure** *3*, 853–859, 1995.

DIVNE, C., STÅHLBERG, J., REINIKAINEN, T., RUOHONEN, L., PETTERSSON, G., KNOWLES, J. K. C., TEERI, T. T., JONES, T. A.; The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from Trichoderma reesei. **Science** *265*, 524–528, 1994.

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

EICHHORN, S. J., DUFRESNE, A., ARANGUREN, M., MARCOVICH, N. E., CAPADONA, J. R., ROWAN, S. J., WEDER, C., THIELEMANS, W., ROMAN, M., RENNECKAR, S., GINDL, W., VEIGEL, S., KECKES, J., YANO, H., ABE,

K., NOGI, M., NAKAGAITO, A. N., MANGALAM, A., SIMONSEN, J., BENIGHT, A. S., BISMARCK, A., BERGLUND, L. A., PEIJS, T.; Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science** *45*, 1–33, doi 10.1007/s10853-009-3874-0, 2010.

EICHHORN, S. J.; Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. **Soft Matter** *7*, 303–315, doi: 10.1039/c0sm00142b, 2011.

EL SEOUD, O. A.; FIDALE, L. C.; RUIZ, N.; D'ALMEIDA, M. L. O.; FROLLINI, E. Cellulose swelling by protic solvents: which properties of the biopolymer and the solvent matter? **Cellulose** *15*, 371, 2008.

EL SEOUD, O. A.; KOSCHELLA, A.; FIDALE, L. C.; DORN, S.; HEINZE, T.; Applications of Ionic Liquids in Carbohydrate Chemistry: A Window of Opportunities. **Biomacromolecules** *8*, 2629, 2007.

ERENO, D., CESAR, E.; Álcool de celulose. **Pesquisa FAPESP**, *133*, 28, 2007.

FAN, L. T., LEE, Y. H., BEARDMORE, D. R., The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic-hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering** *23*, 419–424, 1981.

FIDALE, L. C., POSSIDONIO, S., EL SEOUD, O. A.; Application of 1-Allyl-3-(1-butyl)imidazolium Chloride in the Synthesis of Cellulose Esters: Properties of the Ionic Liquid, and Comparison with Other Solvents. **Macromolecular Bioscience**, *9*, 813-821, doi: 10.1002/mabi.200900034, 2009.

FRENCH, A. D.; **Cellulose Chemistry and its Applications.** Nevell, T. P. & Zeronian, S. H. eds. Chichester: Ellis Horwood, 85, 1985.

FUJIMOTO, J., PETRI, D. F. S.; Adsorption behavior of carboxymethylcellulose on amino-terminated surfaces. **Langmuir**, *17* (1), 56-60, 2001.

GALEMBECK, F., BARBOSA, C. A. S., SOUSA, R. A.; Aproveitamento Sustentável de Biomassa e de Recursos Naturais na Inovação Química. **Química Nova**, *32*, 571, 2009.

GALEMBECK, F.; **Anais do Simpósio da Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo, Brasil, 1997.

GALET, L., PATRY, S., DODDS, J.; Determination of the wettability of powders by the Washburn capillary rise method with bed preparation by a centrifugal packing technique. **Journal of Colloid and Interface Science** *346*, 470–475, 2010.

GARDNER, K. H., BLACKWELL, J., Structure of native cellulose. **Biopolymers**, *13*, 1974, 1975.

GHOSE, T. K.; Measurements of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry** *59*, 257-269, 1986.

GHOSH, P.; GHOSE, T. K.; em **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**; Scheper, T., eds.; Vol. 85; Springer: New York, 2003.

GILBERT, H. J., HAZLEWOOD, G. P.; LAURIE, J. I., ORPIN, C. G., XUE, G. P.; Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. **Molecular Microbiology**, *6*, 2065, 1992.

GOLDEMBERG, J.; em **Bioenergia no estado de São Paulo**; Nigro, F. E. B.; Coelho, S. T., eds.; São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, *110*, 2008.

GOLDEMBERG, J.; Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, *315*, 808, 2007.

GOUGH, C. L., DOW, J. M., BARBER, C. E., AND DANIELS, M. J.; Cloning of two endoglucanase genes of Xanthomonas campestris pv. campestris: Analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interact** *1*, 275-281, 1988.

GOYAL, A., GHOSH, B., EVELEIGH, D.; Characteristics of Fungal Cellulases. **Bioresource Technology**, *36*, 37, 1991.

GROBE, A.; *Properties of cellulose materials.* In: **Polymer Handbook**, Brandrup, J., Immergut, E.H. (Eds.), Wiley, New York, pp. V117–V170 e V144–149, 1989.

GUIMARÃES, M.; O projeto da superplanta. **Pesquisa FAPESP**, *158*, 65, 2009.

HAHN-HAGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M. F., LIDEN, G., ZACCHI, G.; Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, *24*, 549, 2006.

HALL, M., BANSAL, P., LEE, J. H., REALFF, M. J., BOMMARIUS, A. S., Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **FEBS Journal**, *277*, 1571–1582, 2010.

HEINZE, T., KOSCHELLA, A.; Solvents applied in the field of cellulose chemistry: A mini review. **Polymers**, *15*, 84–90, 2005.

HENRISSAT B, DRIGUEZ H, VIET, C., SCHULEIN, M.; Synergism of cellulases from Trichoderma reesei in the degradation of cellulose. **Biotechnology** *3*, 722–726, 1985.

HENRISSAT, B.; Cellulases and their interaction with cellulose. **Cellulose** *1*, 169–196, 1994.

HERMANN, P. S. P., MATOSO, L. H. C., SILVA, M. A. P.; BERNARDES FILHO, R., COLNAGO, L. A., FROMMER, J. E.; Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, São Carlos, *4*, 51-56, 1997.

HIMMEL, M. E., DING, S. Y., JOHNSON D. K., ADNEY W. S., NIMLOS M. R., BRADY J. W., FOUST T. D.; Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science** *315*, 804–807, 2007.

HONG, J., YE, X. H., ZHANG, Y. H. P.; Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. **Langmuir**, *23*, 12535–12540, 2007.

KADLA, J. F., GILBERT, R. D.; Cellulose structure: A review. **Cellulose Chemistry and Technology**, *34*, 197, 2000.

KADLA, J. K., KUBO, S., VENDITTI, R. A., GILBERT, R. D., COMPERE, A. L., GRIFFITH, W.; Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. **Carbon**, *40*, 2913, 2002.

KLEMM, D., PHIPIPP, B., HEINZE, T., HEINZE, U., WAGENKNECHT, W., **Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods**. vol. 1. Weinhein: Wiley-VCH, 1998.

KLYOSOV, A. A., MITKEVICH O. V., SINITSYN A. P.; Role of the activity and adsorption of cellulases in the efficiency of the enzymatic-hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose. **Biochemistry** *25*, 540–542, 1986.

KOSSEN, N. W. F., HEERTJES, P. M.; Measuring the contact angles of powder-liquid systems. **Powder Technology** *1*, 33-42, 1967.

KROON-BATENBURG, L. M. J., BOUMA, B., KROON, J.; Stability of cellulose structures studied by mD simulations. Could mercerized cellulose II be parallel?. **Macromolecules**, *29*, 5695. 1996.

KROON-BATENBURG, L. M. J., KROON, J; The crystal and molecular Structures of cellulose I and II. **Glycoconjucate Journal**, *14*, 677, 1997.

KUO, C. H., LEE, C. K.; Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N - methylmorpholine- N -oxide pretreatment. **Bioresource Technology**, *100*, 866–871, 2009.

LANGAN, P., NISHIYAMA, Y., CHANZY, H., X-ray structure of mercerized cellulose II at 1 Å resolution. **Biomacromolecules**, *2*, 410, 2001.

LEE, S. B., SHIN, H. S., RYU, D. D. Y., MANDELS,. M.; Adsorption of cellulase on cellulose – effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering** *24*, 2137–2153, 1982.

LEE, Y. H., FAN, L. T.; Kinetic-studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose – analysis of the initial rates. **Biotechnology and Bioengineering** *24*, 2383–2406, 1982.

LI, X. L., CALZA, R. E.; Fractionation of cellulases from the ruminal fungus Neocallimastix frontalis EB188. **Applied and Environmental Microbiology**, *57*, 3331, 1991.

LI, Y. C, IRWIN, D.C., WILSON, D.B.; Processivity, substrate binding, and mechanism of cellulose hydrolysis by Thermobifida fusca Ce19A. **Applied and Environmental Microbiology** *73*, 3165–3172, 2007.

LIMA, C. E., MASINI, J. C.; Caracterização ácido base da superfície de espécies mistas da alga spirulina através de titulação potenciométrica e modelo de distribuição de sítios discretos. **Química Nova**, *22 (5)*, 679-683, 1999.

LINDER, M., MATTINEN, M. L., KONTTELI, M., LINDEBERG, G., STÅHLBERG, J., DRAKENBERG, T., REINKAINEN, T., PETTERSSON, G., ANNILA, A.; Functional and structural roles of conserved amino acids in the cellulose binding domain of Trichoderma reesei CBH I. **Protein Science**, *4*, 1056, 1995.

LIU, L., CHEN, H.; Enzymatic hydrolysis of cellulose materials treated with ionic liquid [BMIM] Cl. **Chinese Science Bulletin**, *51*, 2432–2436, 2006.

LORA, J. S.; GLASSER, W. G.; Recent Industrial Applications of Lignin: A Sustainable Alternative to Nonrenewable Materials. **Journal of Polymers and the Environment**, *10*, 39-48, 2002.

LYKLEMA, J., NORDE, W., Interfacial behaviour of biomacromolecules. **Progress in Colloid and Polymer Science**, *101*, 9-17, 1996.

LYND, L. R., LASER, M. S., BRANDSBY, D., DALE, B. E., DAVISON, B., HAMILTON, R., HIMMEL, M., KELLER, M., MCMILLAN, J. D., SHEEHAN, J.; How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology** *26*, 169–172, 2008.

LYND, L. R., WEIMER, P. J, VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S.; Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** *66*, 506–577, 2002.

MANSFIELD, S. D., MOONEY, C., SADDLER, J. N.; Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress** *15*, 804–816, 1999.

MARCHESSAULT, R. H., SUDARARAJAN, P. R.; **The Polysaccharides**. Aspinal, G. O. ed. New York: Pergamon Press, 2, 1983.

MARK, H., MEYER, K. H.; Uber den Bau des Krystallisierten Anteils der Cellulose. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, *61*, 593, 1928.

MARQUES, F.; Vias para avançar como líder do etanol. **Pesquisa FAPESP**, *149*, 20, 2008.

MASINI, J. C., GODINHO, O. E. S., ALEIXO, L. M., LUIZ, M., ALEIXO, L. M.; Determination of ionizable groups of proteins by potentiometric titration in concentrated solutions of guanidine hydrochloride. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, *360*, 104–111, 1998.

MATTHEWS, J. F., SKOPEC, C. E., MASON, P. E., ZUCCATO, P., TORGET, R. W., SUGIYAMA, J., HIMMEL, M. E., BRADY, J. W.; Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Iβ. **Carbohydrate Research**, *341*, 138-152, 2006.

MAZZA, M., CATANA, D. A., VACA-GARCIA, C., CECUTTI, C.; Influence of water on the dissolution of cellulose in selected ionic liquids. **Cellulose**, *16*, 207-215, 2009.

MEDVE J., KARLSSON J., LEE, D., TJERNELD, F.; Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from Trichoderma reesei: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. **Biotechnology and Bioengineering** *59*, 621–634, 1998.

MEDVE, J.; **Cellulose Hydrolysis by Trichoderma reesei cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II.** Lund, Sweden, 49. *Tese (Doutorado em Bioquímica)* - Department of Biochemistry, Lund University, 1997.

MILLER, G. L.; Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, *31*, 426–428, 1959.

MORGAVI, D. P., SAKURADA, M., MIZOKAMI, M., TOMITA, Y., ONODERA, R.; Effects of ruminal protozoa on cellulose degradation and the growth of an anaerobic ruminal fungus, Piromyces sp. strain OTS1 , in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, *60*, 3718, 1994.

MORGENSTERN, B., KAMMER, H. W.; Solvation of cellulose-LiCl-DMAc solutions. **Trends in Polymer Science**, *4*, 87, 1996.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M.; Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, *96*, 673–686, 2005.

MOXLEY, G., ZHU, Z. G., ZHANG, Y. H. P.; Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *56*, 7885–7890, 2008.

NORDE, W., LYKLEMA, J.; Why proteins prefer interfaces. **Journal of biomaterials science**, *2 (3)*, 183-202, 1991.

O'SULLIVAN, A. C.; Cellulose: The structure slowly unravels. **Cellulose**, *4*, 173, 1997.

OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S.; Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, *33 (7)*, 1549-1558, 2010.

OLSSON, L., JØRGENSEN, H., KROGH, K. B. R., ROCA, C.; Bioethanol Production from Lignocellulosic Material. Em **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**; Dumitriu, S., eds.; Dekker, Cap. 42, 2005.

OOSHIMA, H., SAKATA, M., HARANO, Y.; Adsorption of cellulase from Trichoderma viride on cellulose. **Biotechnology and Bioengineering** *25*, 3103–3114, 1983.

ORTEGA-VINUESA, J. L., TENGVALL, P., LUNDSTROM, I., Molecular packing of HSA, IgG, and fibrinogen adsorbed on silicon by AFM imaging. **Thin Solid Films,** *324*, 257, 1998.

PALIK, E. D.; **Handbook of Optical Constants of Solids**, Academic Press, Inc., New York, 1985.

PAN, X., ARATO, C., GILKES, N., GREGG, D., MABEE, W., PYE, K.; Biorefining of softwoods using ethanol *organosolv* pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnology and Bioengineering**, *90*, 473–481, 2005.

PETRI, D. F. S., WENZ, G., SCHUNK, P., SCHIMMEL, T.; An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO_2 and the vapor deposition of gold layers. **Langmuir** *15*, 4520, 1999.

PUZIY, A. M., PODDUBNAYA, O. I., ZAITSEV, V. N., KONOPLITSKA, O. P.; Modeling of heavy metal ion binding by phosphoric acid activated carbon. **Applied Surface Science**, *221*, 421–429, 2004.

RAYNE, S., MAZZA, G.; Rapid dissolution of lignocellulosic plant materials in an ionic liquid. **Nature Proceedings**. Disponível em <http://hdl.handle.net/ 10101/npre.2007.637.1>. Acesso em 09/fev 2011. 2007.

RUAN, D., ZHANG, L., ZHOU, J., JIN, H., CHEN, H.; Structure and properties of novel fibers spun from cellulose in NaOH/thiourea aqueous solution. **Macromolecular Bioscience**, *4*, 1105–1112, 2004.

SALOHEIMO, M., NAKARI-SETALA, T., TENKANEN, M., PENTTILÃ, M.; cDNA cloning of a Trichoderma reesei cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **European Journal of Biochemistry**, *249*, 548, 1997.

SARKO, A., MUGGLI, R., Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. III. Valonia cellulose and cellulose II. **Macromolecules**, *7*, 486, 1974.

SATTLER, W., ESTERBAUER, H., GLATTER, O., STEINER, W.; The effect of enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering** *33*, 1221–1234, 1989.

SJÖHOLM, E., GUASTAFSSON, K., BERTHOLD, F., COLMSJÖ, A.; Influence of the carbohydrate composition on the molecular weight distribution of kraft pulps. **Carbohydrate Polymers**, *41*, 1, 2000.

SOUSA, L. C., CHUNDAWAT, S. P. S., BALAN, V., DALE, B. E.; 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, *20*, 339, 2009.

STÅHLBERG, J., JOHANSSON, G., PETTERSSON, G.; A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I. **Biotechnology**, *9*, 286, 1991.

STAMBUK, B. U., ELEUTHERIO, E. C. A., FLOREZ-PARDO, L. M., SOUTO-MAIOR, A. M., BON, E. P. S.; Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, *67*, 918, 2008.

STEINER, W., SATTLER, W., ESTERBAUER, H.; Adsorption of Trichoderma reesei cellulase on cellulose – experimental data and their analysis by different equations. **Biotechnology and Bioengineering** *32*, 853–865, 1988.

SWATLOSKI, R. P., SPEAR, S. K., JOHN, D., HOLBREY, J. D., ROGERS, R. D.; Dissolution of Cellose with Ionic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, *124*, 4974-4975, 2002.

TÉBÉKA, I. R. M., SILVA, A. G. L., PETRI, D. F. S.; Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase. **Langmuir** *25*, 1582, 2009.

TOMPKINS, H. G., In: **A User's Guide to Ellipsometry**. Academic Press Inc., 1993.

TURNER, M. B., SPEAR, S. K., HUDDLESTON, J. G., HOLBREY, J. D., ROGERS, R. D.; Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from Trichoderma reesei. **Green Chemistry**, *5*, 443, 2003.

TURON, X., ROJAS, O. J., DEINHAMMER, R. S.; Enzymatic Kinetics of Cellulose Hydrolysis: A QCM-D Study. **Langmuir**, *24*, 3880, 2008.

UNICA; União da Indústria da Cana-de-Açúcar. **Produção de Etanol no Brasil**. Disponível em <http://www.unica.com.br>. Acesso em 02/Mar. 2011.

VANTEENKISTE, S. O., CORNEILLIE, S. I., SCHACHT, E. H., CHEN, X., DAVIES, M. C., MOENS, M., VAN VAECK, L.; Direct measurement of protein adhesion at biomaterial surfaces by scanning force microscopy. **Langmuir**, *16 (7)*, 3330-3336, 2000.

W. E. A.; **World Energy Assessment; Energy and the challenge of sustainability**. United Nations Development Programme, United Nations Development of Economic and Social Affairs and World Energy Council, 2000.

WADA, M., SUGIYAMA, J., OKANO, T.; Native celluloses on the basis of 2 crystalline phase (I-alpha/I-beta) system. **Journal of Applied Polymer Science** *49*, 1491, 1993.

WEI, S., KUMAR, V., BANKER, G. S.; Phosphoric acid mediated depolymerization and decrystallization of cellulose: Preparation of low crystallinity cellulose – A new pharmaceutical excipient. **International Journal of Pharmaceutics**, *142*, 175–181, 1996.

WOOD, P. J., TEATHER, R. M.; Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied And Environmental Microbiology**, *43 (4)*, 777-780, 1982.

WOOD, T. M., MACCRAE, S. I.; *Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose*. In **Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis**, Chapter 10, pp 181–209, *Advances in Chemistry*, Vol. 181, 1979.

WRIGHT, J. D., WYMAN, C. E., GROHMANN, K., Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulose: Process Evaluation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, *18*, 75, 1987.

WRIGHT, J. D.; Ethanol from biomass by enzymatic-hydrolysis. **Chemical Engineering Progress** *62*, 1988.

WYK, J. P. H. van,; Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. **Trends in Biotechnology** *19*, 5, 172, 2001.

WYMAN, C. E., DECKER, S. R., HIMMEL, M. E., BRADY, J. W., SKOPEC, C. E., VIIKARI, L., *Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose*. Em **Polysaccharides: Strutural**

Diversity and Functional Versatility, Dumitriu, S.; (Ed)., 2nd Ed., 995-1034, 2005.

WYMAN, C. E.; Biomass ethanol: Technical progress, opportunities and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, *24*, 189, 1999.

WYMAN, C. E.; What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology** *25*, 153–157, 2007.

XU, F., DING, H. S.; A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects. **Applied Catalysis A: General** *317*, 70–81, 2007.

YOUNG, T.; An Essay on the Cohesion of Fluids. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, A**, *95*, 65–87, 1805.

ZACHARIASEN W. H; **Theory of X-ray Diffraction in Crystals**. New York: Dover Publications, 1945.

ZAVREL, M., BROSS, D., FUNKE, M., BÜCHS, J., SPIESS, A. C.; High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose. **Bioresource Technology**, *100*, 2580, 2009.

ZHANG, Y. H. P., CUI, J., LYND, L. R.; KUANG, L. R.; A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: Evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. **Biomacromolecules**, *7*, 644–648, 2006.

ZHANG, Y. H. -P., DING, S. -Y., MIELENZ, J. R., CUI, J. -B., ELANDER, R. T., LASER, M., HIMMEL, M. E., MCMILLAN, J. R., LYND, L. R.; Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, *97 (2)*, 214–223, 2007.

ZHANG, Y. H. P., LYND, L. R.; Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering** *88*, 797–824, 2004.

ZHAO, H., JONES, C. L., BAKER, G. A., XIA, S., OLUBAJO, O., PERSON, V. N.; Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, *139*, 47-54, 2009.

ZHU, L., O'DWYER, J. P., CHANG, V. S., GRANDA, C. B., HOLTZAPPLE, M. T.; Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, *99*, 3817–3828, 2008.

ZHU, S., WU, Y., CHEN, Q., YU, Z., WANG, C., JIN, S., DING, Y., WU, G.; Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: A mini-review. **Green Chemistry**, *8*, 325, 2006.

ANEXOS

Anexo A – Difratogramas de raios-X com deconvolução dos picos

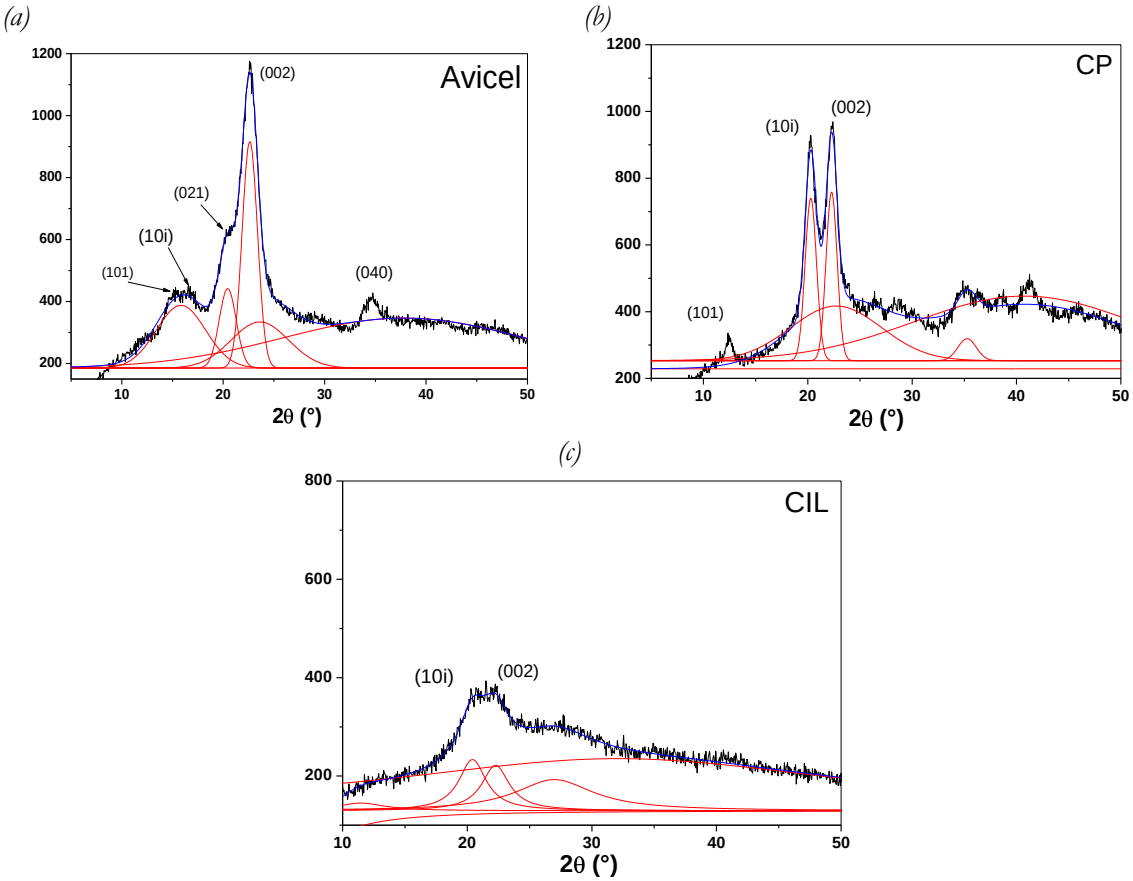


Figura A.1. Difratogramas de raios-X com a deconvolução de picos, utilizada no cálculo do índice de cristalinidade (*Ic*): *(a)* Avicel; *(b)* CP; e *(c)* CIL.

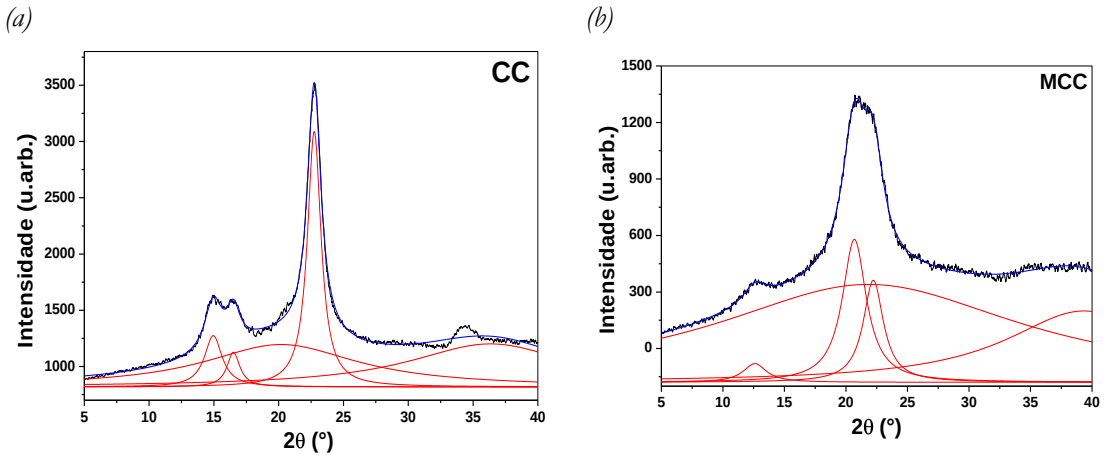


Figura A.2. Difratogramas de raios-X com a deconvolução de picos, utilizada no cálculo do índice de cristalinidade (Ic): *(a)* CC; e *(b)* MCC.

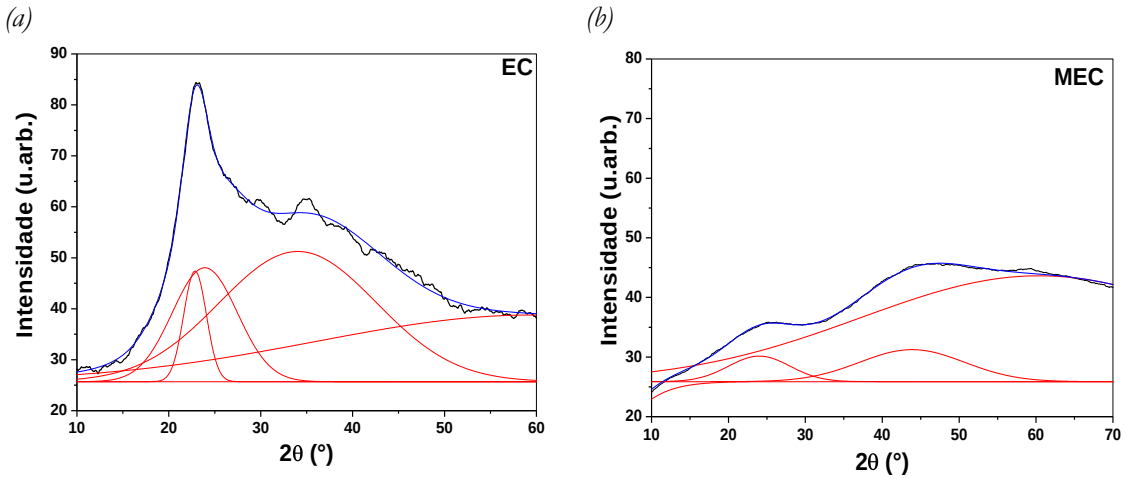


Figura A.3. Difratogramas de raios-X com a deconvolução de picos, utilizada no cálculo do índice de cristalinidade (Ic): *(a)* EC; e *(b)* MEC.

Anexo B – Determinação do Cw

A Figura abaixo apresenta uma curva típica obtida para as amostra de celulose, com as constantes de capilaridade (*Cw*) obtidas pelo método de Washburn. Os valores de massa foram primeiramente normalizados com o valor máximo de massa obtido (m/m_{max}) para só então os valores normalizados serem elevados ao quadrado, conforme apresentado na Figura A.4.

A inclinação de $(m/m_{max})^2$ em função do tempo foi utilizada para a determinação de *Cw*, através da Equação 11.

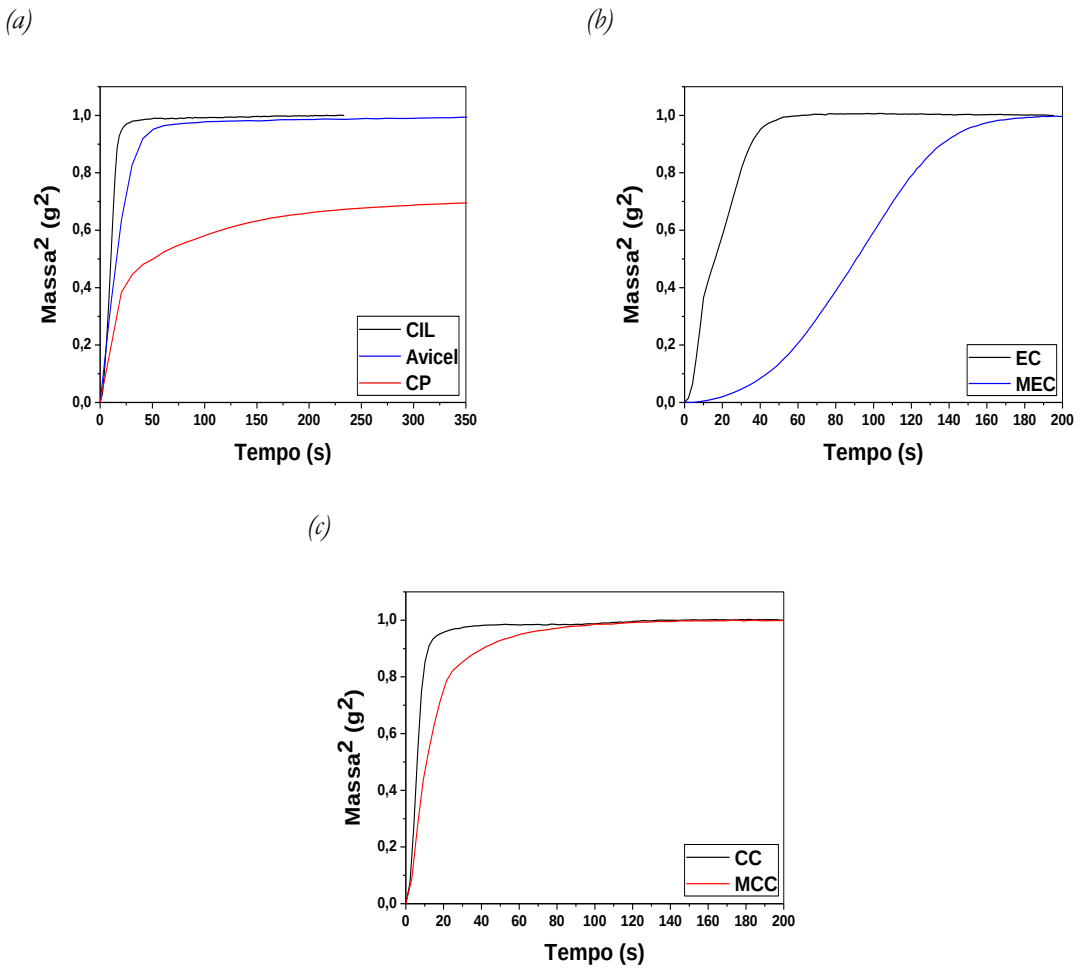


Figura A.4. Curvas típicas do ganho de massa para as diferentes amostras de celuloses, após a subtração da medida de controle do cilindro. Elas mostram o aumento de massa, devido à capilaridade, em função do tempo.

Anexo C – Gráficos de Huggins

Apresentação dos gráficos de Huggins utilizados para determinação do *DP* das amostras de celulose em soluções de CUEN:H_2O a 25°C, por teste de viscosimetria capilar.

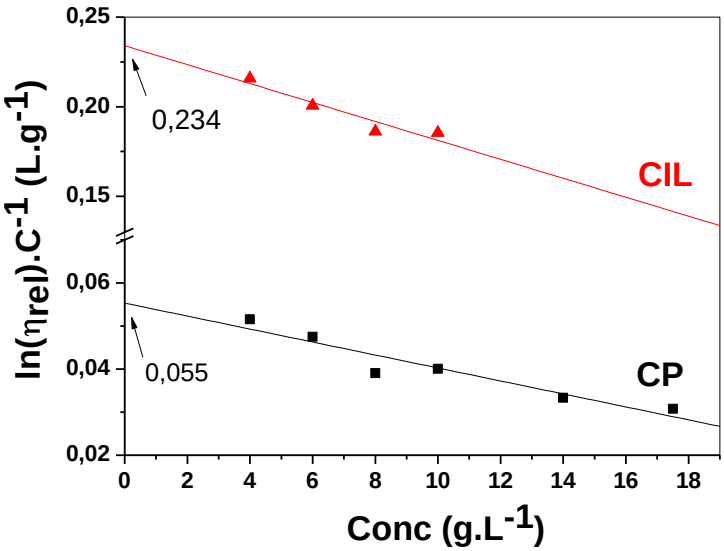


Figura A.5. Determinação da viscosidade intrinseca das celuloses CP e CIL em soluções de CUEN:H_2O, a (25,0 ± 0,5)°C, onde η_{rel} é a viscosidade relativa.

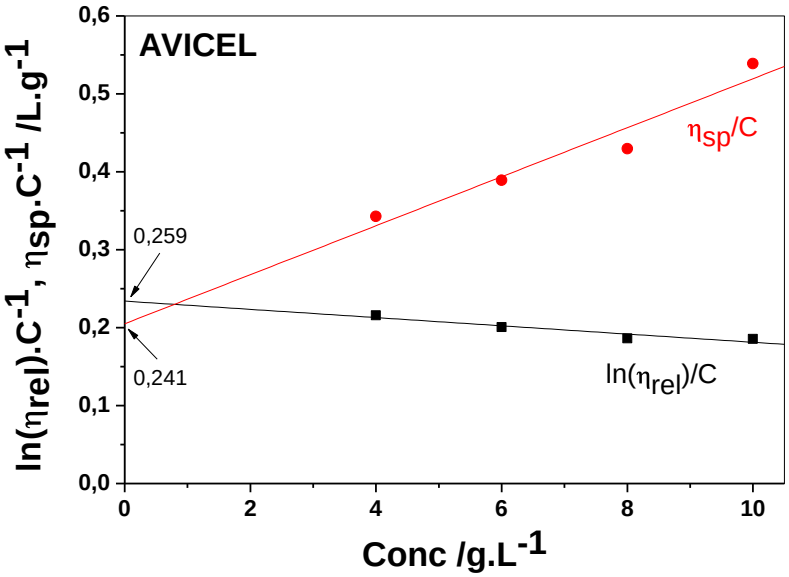


Figura A.6. Determinação da viscosidade intrinseca da celulose Avicel em soluções de CUEN:H_2O, a (25,0 ± 0,5)°C, onde η_{sp} e η_{rel} são, respectivamente, a viscosidade específica e a viscosidade relativa.

Anexo D – Teste de Atividade do Vermelho-Congo

Apresentação da imagem obtida das placas coradas com vermelho-congo, após o teste de atividade. Neste teste, o quanto as enzimas degradaram a CMC presente no ágar é medido através do tamanho do halo formado (WOOD, 1982), onde a atividade encontra-se tabelada. O halo obtido para as endoglucanases purificadas rendeu uma atividade de 94%.

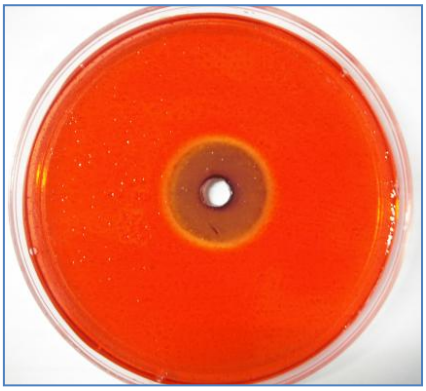


Figura A.7. Foto tirada das placas obtidas do teste de vermelho-congo, para medir a atividade do sobrenadante de EGBs.

CURRICULUM VITAE

Thais Lucy Ogeda

Local e Data de Nascimento: São Paulo/SP, aos 4 de julho de 1985.

Formação Acadêmica

2000-2002 *Ensino Médio*. Colégio São Judas Tadeu – São Paulo/SP.

2003-2008 *Bacharelado e Licenciatura em Química*. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP – Campinas/SP.

2009-2011 *Mestranda em Química (Físico-Química)*. Universidade de São Paulo, USP – São Paulo/SP.

Título: Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-Tratadas.

Orientadora: Denise Freitas Siqueira Petri.

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Estágios em Ensino

Bolsista PAE (Programa de Aperfeiçoamento de Ensino), USP

- Preparação pedagógica e auxiliar didático em laboratórios de Físico-Química Experimental no período de mar/2010 a jul/2010.
- Estágio Supervisionado em Docência na disciplina de Química Geral no período de ago/2010 a dez/2010.

Bolsista PAD (Programa de Apoio Didático), UNICAMP

- Auxiliar didático de laboratórios de Química Experimental no período de mar/2007 a dez/2007.

Resumos de Trabalhos Apresentados em Congressos

- OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S., *"Pré-tratamento de Celulose com Líquido Iônico (EMIMAc) seguido de Hidrólise Enzimática Livre e Adsorvida"*. In: 5º Encontro Nacional de Química Ambiental, **V ENQAmb**, subordinado ao tema Meio Ambiente: Uma Química de Interfaces em São Pedro (S.P., Brasil), Março de 2010.
- OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S., *"Effect of Cellulose pretreatments on the enzymatic activity of free and immobilized cellulase"*. In: 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites, **VII ISNaPol**, em Gramado (R.S., Brasil), Setembro de 2010.
- SILVA, A. L. G., OGEDA, T. L., FIDALE, L. C., EL SEOUD, O. A., PETRI, D. F. S., *"Enzymatic activity of free and immobilized cellulase in the hydrolysis of celluloses from different sources"*. In: 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites, **VII ISNaPol**, em Gramado (R.S., Brasil), Setembro de 2010. Apresentação do trabalho
- OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S., *"Efeito de Diferentes Pré-tratamentos de Celulose sobre a Atividade Enzimática da Celulase Livre e Imobilizada"*. In: XVIII Encontro de Química da Região Sul, **XVIII SBQSul**, em Curitiba (P.R., Brasil), Novembro de 2010.

Artigos Completos Publicados em Periódicos

1. OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S.; *Hidrólise Enzimática de Biomassa*, **Química Nova**, 2010, 33, No. 7, 1549-1558.
2. BERTAZZO, S., ZAMBUZZI, W. F., CAMPOS, D. D. P., OGEDA, T. L., FERREIRA, C. V., BERTRAN, C. A., *Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2010, 78, 177–184. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.02.027.