**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

FERNANDO RODRIGUES DA CONCEIÇÃO

**Investigação da interação enzimática e das suas mudanças estruturais durante a
hidrólise da biomassa lignocelulósica através de metodologias óticas**

**São Carlos
2012**

FERNANDO RODRIGUES DA CONCEIÇÃO

Investigação da interação enzimática e das suas mudanças estruturais durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica através de metodologias óticas

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

**São Carlos
2012**

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 preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

C744i Conceição, Fernando Rodrigues da
Investigação da interação enzimática e das suas
mudanças estruturais durante a hidrólise da biomassa
lignocelulósica através de metodologias óticas / Fernando
Rodrigues da Conceição; orientador Francisco Eduardo
Gontijo Guimarães. -- São Carlos, 2012.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais e Área
de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e
Aplicação de Materiais) -- Escola de Engenharia de São
Carlos, Instituto de Física de São Carlos e Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.

1. Biomassa. 2. Celulose. 3. CBHI. 4. Adsorção. 5.
Mudanças estruturais. 6. Hidrólise. I. Título.

Dedico esse trabalho especialmente a minha família, primeiramente ao meu avô Adélio da Conceição (em memória), te amo muito; a minha querida avó Amélia, a minha querida madrinha e mãe Marlene e ao meu amado pai Alcione. Em especial a minha querida e amada namorada Aline.

AGRADECIMENTOS

*Ao meu querido e eterno avô Adélio da Conceição (em memória) e minha querida avó Amélia por sempre acreditar em mim, amo muito vocês!

*A minha querida madrinha, mãe e amiga Marlene Pereira da Conceição por estar sempre comigo durante toda a minha vida, nos momentos difíceis e bons, te amo muito dinda!

*Ao meu pai Alcione da Conceição. Pai o senhor é tudo para mim!

*A minha amada namorada, mulher da minha vida, Aline Marques Leite por ter me acompanhado durante toda a minha formação, desde a graduação e por ter me aguentado por todo esse tempo em que estamos juntos, te amo muito vida!

*Ao Professor Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e pessoal!

*Ao meu tio Adilson Pereira da Conceição!

*Aos amigos Luzia Targino Valente e Joaquim Bernadino Valente!

*Ao grande amigo Gabriel Perlin Sari pelas nossas ótimas horas de conversa!

*Aos amigos que me receberam aqui em São Carlos, Christiane Tragante, Daniel Estevão Ramos de Miranda, Rafael Lamera Cabral, Gustavo Pila D'alóia, José Pedro Ribeiro!

*Aos amigos de república, Fábio Toshiro T. Hanashiro, Filipe Gonçalves da Silva vulgo “Boto”, Leandro kenji Takao, Reginaldo Sadao Matsumoto!

*Em especial a minha querida amiga e irmã Carla Ferezin “carlita” por ter compartilhado momentos agradáveis durante o tempo do desenvolvimento do mestrado. Pelas receitas que executamos e por todas as gordices. Pelos momentos de bate papo na sorveteria bêjo e por tantos outros que necessitariam mais que uma dissertação para descrever, te amo querida! “Entra na fila”

*A grande amiga Idelma Terra pelos diálogos e conselhos em momentos difíceis e pela a sua recepção aqui o IFSC e entre outros tantos momentos bons que compartilhamos!

*Aos amigos Gustavo Targino Valente e Josiane Torres pelas horas prazerosas que tivemos juntado durante todo esse tempo e de muitas horas que virão. Em especial as memoráveis horas de almoço que realizamos aos domingos onde o Gustavo “cidi” aprontava.

*Ao grande amigo Willian Marcondes pelas boas horas que estive em sua companhia.

*Aos amigos (as) de grupo, Angelo Danilo Faceto, Nirton Cristi (Axé), Mike Mello do Vale, Vinícius, Rafael, Izabela Gutierrez, Alessandra Figueiredo, Fernando Tissutae, e Vitor Carlos Coletta, os quais contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento do trabalho!

*Em especial ao grande amigo Mike Mello do Vale!

*Aos amigos do futebol pelos momentos de diversão que passamos juntos nas nossas grandiosas partidas de futebol no CEFER.

*A grande amiga Franciele Colussi pela parceria, discussões e dicas que foram de suma importância para o desenvolvimento do trabalho Sem você esse trabalho ficaria mais difícil, obrigado Fran!

*Ao Grupo de Biotecnologia Molecular, que sob a coordenação do Professor Igor Polikarpov forneceu material para o desenvolvimento dessa dissertação!

*Ao Grupo de Polímero Bernad Cross, em especial ao Bruno Bassi e a Débora Baloch pela ajuda no laboratório!

*À Escola de Engenharia de São Carlos e ao Instituto de Física de São Carlos pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento do projeto.

*Enfim, a todos que de uma forma ou outra estiveram envolvidos na realização deste trabalho e na participação desta etapa da minha vida, os meus sinceros agradecimentos.

*Muito obrigada a todos!

*“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente, o que fazemos
para mudar o que somos.”*

Eduardo Galeano

RESUMO

Conceição, F. R. da **Investigação da interação enzimática e das suas mudanças estruturais durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica através de metodologias óticas** 93p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

A investigação do processo de interação da enzima responsável pela hidrólise da biomassa lignocelulósica e das suas alterações estruturais são de suma importância no que diz respeito à otimização da produção do etanol de segunda geração proveniente da biomassa lignocelulósica. Neste contexto, metodologias óticas foram desenvolvidas e empregadas no presente trabalho na caracterização da interação enzimática com substrato celulósico. Basicamente, foram utilizadas espectroscopia de absorção Uv/vis, fluorescência e dicroísmo circular (CD). Fibras de eucalipto e celulose microcristalina (Avicel) foram usadas como substrato. Com o auxílio da fluorescência intrínseca da enzima Celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum* (*ThCBHI*), foi possível desenvolver o método de arraste enzimático que nos permitiu determinar a dependência da interação enzima-substrato com o pH e a temperatura e estimar o número de enzimas adsorvidas na biomassa lignocelulósica. O efeito destes parâmetros sobre as estruturas secundárias da enzima *ThCBHI* e de sua influência na interação enzimática também foi estudado. Medidas da seção choque efetiva de absorção demonstraram que a estrutura da *ThCBHI* sofreu grande influência do pH e da temperatura, o que foi confirmado de forma complementar pela técnica de CD. Estimativas da fração de cobertura das enzimas na superfície do substrato indicam uma forte dependência da interação enzima-substrato com o pH e temperatura. Observou-se que essa interação é basicamente determinada pelas cargas efetivas acima e abaixo do ponto isoelétrico associado ao módulo de ligação à celulose, CBM. Além disso, o método colorimétrico Somogyi-Nelson (SN) permitiu quantificar com precisão pequenas quantidades de produto da hidrólise da biomassa pela enzima *ThCBHI*. Os resultados de atividade mostraram forte correlação entre o perfil de interação e as mudanças estruturais sofridas pela enzima *ThCBHI*. Com essa metodologia foi possível estimar a máxima atividade da *ThCBHI* durante 24 horas de reação. Os valores do produto nos permitiu computar atividades específicas de 0,1 U/mg e 0,2 U/mg para 25°C e 50°C, respectivamente.

Palavras-chave: Biomassa. Celulose. CBHI. Adsorção. Mudanças estruturais. Hidrólise

ABSTRACT

Conceição, F. R. da **Investigation of the enzymatic interaction and its structural changes during lignocellulosic biomass hydrolysis by using optics methodologies.** 93p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

The investigation of the interaction process of enzymes during hydrolysis of lignocellulosic biomass and the effect of structural changes are issues of fundamental importance in respect to optimization of ethanol second generation production. In this context, optical methodologies were developed and employed in the present work in the characterization of enzymatic interactions with cellulosic substrates. Basically, we used for this purpose absorption and fluorescence spectroscopy and circular dichroism (CD). Eucalyptus fibers and microcrystalline cellulose (Avicel) were used as substrate. The interaction between enzyme and substrate was determined by the use of enzymatic drag methodology by measuring directly the intrinsic fluorescence of the *Trichoderma harzianum* Celobiohydrolases I (*ThCBHI*) enzymes as a function of the temperature and pH of the reaction medium. The effect of these parameters on the enzyme secondary structure was also subject of the present study. Furthermore, both effective cross-section and molar extinction coefficient of the *ThCBHI* were determined and correlated to structural changes due to temperature and pH, as confirmed by CD measurements. Estimation of the enzyme covering ration for eucalyptus fiber showed a strong dependence on both temperature and pH due to changes of the effective charges above and below the enzyme isoelectric point and to thermal effects on the enzymatic structure and on the enzyme-substrate interaction associated to the Carbohydrate Binding Modules (CBM). In addition, we use the Somogyi-Nelson methodology to measure very small amount of hydrolyses product. As a result, a strong correlation between interaction profile and *ThCBH* structural changes was demonstrated. Specific activities of 0,1 U/mg e 0,2 U/mg for 25°C e 50°C, respectively, were found for the eucalyptus fiber.

Keywords: Biomass. Cellulose. CBHI. Adsorption. Structural change. Hydrolysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da estrutura da biomassa de origem vegetal. Esses compostos são ricos de polissacarídeos que podem ser aplicados na produção do bioetanol celulósico.	13
Figura 2: Estrutura tridimensional da lignina (ALVES, 2011).....	14
Figura 3: Compostos químicos da hemicelulose	15
Figura 4: Estrutura geral da molécula de hemicelulose (ALVES, 2011).....	15
Figura 5: Estrutura molecular da celulose	16
Figura 6: Estruturas das celulasas que participam da degradação da celulose obtidas a partir do banco de dados PDB. (a) endoglucanase (ID 1KS5), (b) CBHI (ID 2Y9N), (c) CBHII (3CBH) e (d) β -glucosidase (ID 3AHY).....	17
Figura 7: Ilustração da ação da enzima endoglucanase sobre a celulose. Essa enzima atua preferencialmente nas regiões amorfas da biomassa.	18
Figura 8: Ação das enzimas exoglucaneases CBHI e CBHII sobre a celulose. A enzima CBHI atua preferencialmente na extremidade redutora e CBHII age na região não redutora da cadeia da celulose cristalina.	18
Figura 9: Estrutura da enzima CBHI. Figura adaptada a partir da referência (BECKHAM, 2010).	19
Figura 10: Ilustração da dinâmica da enzima CBHI durante o processo de desconstrução da celulose presente na biomassa lignocelulósica. Figura foi adaptada da referência (BECKHAM, 2010). (a) as enzimas CBHI encontram-se inicialmente livres na solução e após a sua (b) adsorção sobre a superfície da celulose regulada pelo CBM inicia-se o processo de reconhecimento de uma extremidade redutora da celulose (c). Feito o reconhecimento, um filamento de celulose é encaminhado ao domínio catalítico (d) e (e) onde o processo de hidrólise é iniciado (f). Assim que a celulose é hidrolisada no domínio catalítico e a celobiose é inibida e liberada para a solução (g).....	19
Figura 11: Ilustração da ação das enzimas β -glucosidase durante o processo de hidrólise da celobiose.	20
Figura 12: Processo de absorção de um fóton. Quando um fóton de energia $h\nu$ incide sobre um material contendo uma espécie absorvedora, este pode ser absorvido se a diferença de energia do estado excitado (E_1) e fundamental (E_0) é exatamente igual à energia do fóton incidente.	21
Figura 13: Processo de absorção da radiação. Um feixe paralelo de radiação antes e depois de atravessar um meio que tem espessura dl e uma concentração C de uma espécie molecular absorvente.....	21
Figura 14: Corte de secção transversal de uma amostra contendo uma espécie absorvedora	22

Figura 15: Estrutura dos resíduos aromáticos responsáveis pela absorção na região Uv/vis. (a) Phe, (b) Trp e (c) Tyr.	24
Figura 16: (a) Espectro de absorção individual dos aminoácidos: Phe, Tyr e Trp. (b) Comparação do espectro de absorção de uma solução contendo uma mistura de Phe, Tyr e Trp com o espectro de absorção de um polipeptídeo (pepsina). Os espectros apresentados nessa figura foram obtidos a partir da seguinte referência (YANARI, 1960).....	25
Figura 17: Diagrama de Jablonski. Ilustra os vários processos de transição eletrônica desde a absorção até a emissão	26
Figura 18: Espectro de emissão dos resíduos Phe, Tyr e Trp (LAKOWICZ, 2006).	27
Figura 19: Interferência de dois raios de polarização circular quando há dicroísmo circular. Polarização elíptica.....	28
Figura 20: Radiação de polarização elíptica emergindo do meio apresentando dicroísmo circular em que $\epsilon_d > \epsilon_e$	29
Figura 21: Esquema básico de um dicrometro circular. Figura adaptada a partir de (DELEPIERRE, 1994)	30
Figura 22: Esqueleto de uma ligação amina de um polipeptídeo mostrando os momentos de transição e os seus respectivos ângulos de rotação.	30
Figura 23: Espectro de CD de vários tipos de estruturas secundárias. A figura foi retirada e modificada a partir da seguinte referência (KELLY, 2005)	31
Figura 24: Fluxograma do experimento de arraste enzimático	36
Figura 25: Fluxograma do experimento de interação entre <i>ThCBHI</i> com o material celulósico.....	37
Figura 26: Comportamento dos reativos SN na presença de glicose. O aumento da coloração desse reativo ocorre em função da concentração de glicose (da esquerda para a direita).....	37
Figura 27: Comportamento espectral do método SN para a escolha da região de maior sensibilidade. Nota-se que a região em 690 nm apresentou uma maior sensibilidade na detecção de cellobiose e por isso foi utilizada para a quantificação do produto da hidrólise das FE pela <i>ThCBHI</i>	38
Figura 28: Curva padrão de glicose obtida pelo método SN: Esta curva foi utilizada para a quantificação do produto da hidrólise das FE.	39
Figura 29: Fluxograma do método colorimétrico Somogyi-Nelson (SN) utilizado na quantificação da celobiose proveniente da hidrólise das FE pelas enzimas <i>ThCBHI</i>	40
Figura 30: Espectros de absorção Uv da enzima <i>ThCBHI</i> para valores de pH (a) 3,5; (b) 5 e (c) 6,3 medidos à temperatura de 25°C. Os espectros de menor concentração (linhas pretas) podem ser resolvidos em duas bandas com forma de linha gaussiana (linhas hachuradas em verde) posicionadas em 262 nm e 280 nm.	42
Figura 31: (a) Espectro de absorção das enzimas <i>ThCBHI</i> em pH 3,5 juntamente com os espectros de absorção dos resíduos responsável pela absorção. A concentração de enzimas foi	

$2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$. Os espectros dos resíduos Phe, Trp e Tyr foram obtidos a partir de (YANARI, 1960) e foram utilizados aqui somente para comparações. (b) Localização dos resíduos Phe, Tyr e Trp no domínio catalítico das enzimas *TrCBHI*. 43

Figura 32: Absorção em 280 nm em função da concentração molar de enzima *ThCBHI* para diferentes valores de pH à 25°C. 44

Figura 33: Espectro de excitação PLE (esquerda) entre 245-300 nm ($\lambda_{em}=342\text{nm}$) e fluorescência PL (Direita) entre 280-455 nm ($\lambda_{PLE}=279 \text{ nm}$) de enzima *ThCBHI* em pH: (a) 3,5; (b) 5 e (c) 6,3 nas temperatura de 25°C..... 47

Figura 34: Espectros de CD da enzima *ThCBHI* em função do pH para as temperaturas de (a) 25°C e de (b) 50°C. As posições das transições ópticas referentes às estruturas α -hélice em 222 nm e folha- β em 215 nm estão mostradas pelas barras verticais. 49

Figura 35: Espectros de PLE e PL da enzima *ThCBHI* em função da concentração de substrato FE. Os comprimentos de onda de máxima da PLE e da PL estão centrados em 279 e 342 nm, respectivamente. **Em 25°C:** (a.1) pH 3,5; (a.2) pH 5,0; (a.3) pH 6,3. **Em 50°C:** (b.1) pH 3,5; (b.2) pH 5,0; (b.3) pH 6,3. 51

Figura 36 - Máximos da intensidade da PL em função da concentração de (a) FE e (b) Avicel pela intensidade da PL para a solução de referência sem substratos (pontos) medidos nas temperaturas de 25°C e 50°C para cada valor de pH. As curvas contínuas são ajustes exponenciais utilizados para guiar os olhos. Comportamento experimental do arraste enzimático sobre as FE nas temperaturas de 25°C e 50°C..... 52

Figura 37: A imagem de microscopia confocal de fluorescência de campo amplo (a) mostra a distribuição das FE. Em (b) mostra um corte confocal de fluorescência a qual é atribuída a lignina presente na parede das FE e em (c) a imagem montada a partir da metodologia Z-Stack (ALVES, 2011). A partir dessas imagens foi possível assumir que as FE assumem uma simetria cilíndrica. 54

Figura 38: Área efetiva da enzima *ThCBHI*. Considerando o comprimento de 10 nm de uma única enzima e o tamanho de 5 nm do seu domínio catalítico pode-se estimar a área total de enzimas contidas na solução com um número 5×10^{14} enzimas. O valor do comprimento da enzima *ThCBHI* foi determinado pelo Grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos – USP. 54

Figura 39: Concentração de FE (C_A) para o máximo arraste em (a) e fração da cobertura (Cob) das FE (b) em função do pH nas temperaturas de 25°C e 50°C. Em ambas as temperaturas, a fração de cobertura Cob das FE apresenta uma dependência inversa de C_A , ou seja, enquanto que os valores de C_A cresce quando o pH é deslocado para regiões alcalinas os valores de Cob decai de acordo com a lei exponencial. 56

Figura 40: Espectros de absorbância no Uv da solução enzimática sobrenadante após a centrifugação dos substratos de (a) F.E e (b) Avicel. Os espectros foram obtidos para pH=3,5, porém para os demais valores de pH, o efeito produzido pela lignina e celulose foram o mesmo. 59

Figura 41: Intensidade da (a) PL em medida em 342 nm e da (b) absorbância medida em 279

nm em função da concentração das enzimas <i>ThCBHI</i>	62
Figura 42: Dependência da taxa de arraste k com o pH para as diferentes temperaturas e substratos de FE e Avicel.....	64
Figura 43: Fração de enzimas de <i>ThCBHI</i> adsorvidas nos substratos FE e Avicel em função do pH nas temperaturas de 25 °C e 50 °C.	65
Figura 44: (a) Ilustração do processo de interação enzima-substrato em função do pH. (b) Cobertura das enzimas sobre substrato para valores de pH 3,5, 5 e 6,3.	67
Figura 45: Razão I/I_o em função do pH para a FE (a) e o Avicel (b), respectivamente, para as temperaturas de 25 °C (quadrados) e 50 °C (círculos). As curvas contínuas são ajustes sigmoidal dos pontos experimentais. As curvas pontilhadas correspondem às derivadas das curvas segmoidais e seus máximos indicam os pontos de inflexão das mesmas.	70
Figura 46: Experimento de arraste da <i>ThCBHI</i> (pontos abertos) e do seu CCD (pontos fechados) para pH=3,5 (círculos) e pH=6,3 (quadrados),utilizando a FE como substrato.	71
Figura 47: Razão N_{es}/N_{eo} entre o número de enzimas N_{es} sobre o substrato FE e o número de enzimas total ou de partida $N_{eo}=5 \times 10^{14}$ em função do pH para as de 25 °C (quadrado) e 50 °C (círculo).	72
Figura 48: Ilustração que descreve o produto da hidrólise versus tempo de reação.	74
Figura 49: Concentração de Celobiose versus tempo de hidrólise realizada nas temperaturas de (a) 25°C e (b) 50°C para valores de pH compreendidos na faixa de 3-8.	49
Figura 50: Dependência dos parâmetros k_2 e $[ES]_o$ utilizados no ajuste das Figuras 49 para as temperaturas (a) 25°C e (b) 50°C, respectivamente, em função do pH.	50
Figura 51: Concentração de celobiose liberada durante a hidrólise da celulose pela <i>ThCBHI</i> em função do pH para cada tempo de medição para as temperaturas de 25°C e 50°C.	51
Figura 52: Máxima da concentração de produto em função do tempo de reação para a temperatura de 50 °C.	78
Figura 53: Comparação das estruturas α -hélice e folha β referente a máxima atividade nas temperaturas de 25°C e 50°C.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de lignina, hemicelulose e celulose na biomassa lignocelulósica.	16
Tabela 2: Valores do coeficiente de extinção molar e seção choque de absorção efetiva da <i>Th</i> CBHI para diferentes valores de pH juntamente com os seus respectivos valores teóricos (Expasy, 2011)..	45
Tabela 3: Valores de concentração de FE para o arraste de 95% juntamente com fração da cobertura das FE.	52
Tabela 4: Valores de concentração de Avicel para o arraste de 95%.	58
Tabela 5: valores de α (pH), ε (pH) e de k obtidos para os diferentes pHs e temperaturas para os substratos FE e Avicel.	63

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Propriedades de materiais lignocelulósicos e celulasas	13
2.1 Lignina.....	13
2.2 Hemicelulose.....	15
2.3 Celulose.....	16
2.2 Celulasas.....	17
3 Espectroscopia Óptica.....	20
3.1 Espectroscopia de Absorção	20
3.2 Espectroscopia de Absorção Uv/vis: Aplicação em sistemas polipeptídicos	24
3.3 Espectroscopia de Fluorescência	25
3.4 Espectroscopia de Fluorescência: Aplicação em sistemas polipeptídicos	27
3.5 Dicroísmo Circular – Breve Explicação	28
3.6 Dicroísmos circular – Cromóforo amida em polipeptídio	30
4 Materiais e Métodos.....	33
4.1 Materiais	33
4.1.1 Material lignocelulósico.....	33
4.1.2 Enzima Celobiohidrolase I de <i>Trichoderma harzianum</i> (ThCBHI)	33
4.1.3 Reativos Somogyi-Nelson (SN)	33
4.2 Métodos	34
4.2.1 Determinação do espectro de Absorção, Excitação e Fluorescência da Enzima ThCBHI	34
4.2.2 Determinação de Mudanças Conformacionais da Enzima ThCBHI – Dicroísmo Circular	34
4.2.3 Adsorção das Enzima ThCBHI sobre os substratos celulósicos	35
4.2.4 Interação enzima-substrato celulósico.....	36
4.2.5 Método de Somogyi – Nelson (SN).....	37
4.2.6 Curva Padrão de Glicose	38
4.2.7 Ensaio de Atividade Enzimática ThCBHI usando o Método Somogyi-Nelson.....	39
5 Resultados e Discussão.....	41
5.1 Propriedades ópticas da Enzima ThCBHI	41
5.2 Coeficiente de extinção molar da Enzima ThCBHI	44
5.3 Excitação e Fluorescência da Enzima ThCBHI	46
5.4 Mudanças Conformacionais da Enzima ThCBHI – Dicroísmo Circular.....	48
5.5 Adsorção da Enzima ThCBHI sobre os substratos celulósicos.	50
5.5.1 Adsorção enzimática pelo Método de Arraste	50
5.5.2 Determinação do Número de Enzima sobre substratos celulósicos	58
5.5.3 Interação enzima-substrato celulósico	68
5.6 O processo de hidrólise e sua correlação com a interação enzimática	72
5.6.1 Produto da hidrólise das FE versus tempo de reação.....	73
5.6.2 Influência do pH e temperatura na hidrólise das FE	76
6 Conclusões	83
7 Referências Bibliográficas	87

1 Introdução

A busca por novas matrizes energéticas vem sendo umas das principais preocupações da humanidade nas últimas décadas. De acordo com uma projeção realizada pela Agência Internacional de Energia (IEA), a demanda de energia global deve aumentar um terço (aproximadamente 33%) entre 2010 e 2030, o que corresponde a um aumento de 1,7% ao ano ((IEA) ; FERREIRA, 2010). A matriz energética mundial atual recebe contribuições de 90% de fontes de combustível fóssil, onde o petróleo contribui com 36%, 23% de carvão e 21% de gás natural (FERREIRA, 2010; ALVES, 2011). Como sabemos, a taxa de consumo dessas fontes de energia é bem mais elevada do que a sua taxa de recomposição, tornando-as, portanto fontes de energias não renováveis.

Nesse contexto, a necessidade de fontes de energias renováveis vem tornando-se crescente no cenário mundial. Dentre as várias fontes de energia renováveis existentes, tais como eólica, energia das ondas, geotérmica, etc. a biomassa de origem lignocelulósica tem recebido uma atenção especial, pois ela é a fonte mais abundante de compostos orgânicos existente na biosfera (CANILHA, 2010), além de promover o sequestro de carbono na atmosfera. Esses materiais apresentam grande potencialidade de serem convertidos em biocombustíveis pela alta concentração de celulose e substituir fontes de energia não renováveis, como o petróleo.

Devido o alto potencial de produção de biocombustível a partir da biomassa lignocelulósica, o acesso e o desempacotamento das cadeias de celuloses presentes nestes materiais, seguido pela sua quebra em açúcares menores (hidrólise), tem se tornado alvo de muitas pesquisas que visa a sua aplicação industrial (CTBE ; NREL).

Além disso, para que o processo de hidrólise das cadeias de celulose presente na biomassa lignocelulósica seja efetivo, a hidrólise enzimática a partir de complexos de enzimas celulasas tem sido utilizada de forma promissora. As enzimas que compõe esse complexo atuam sinergicamente desde o desempacotamento das cadeias de celulose até a sua digestão completa em glicose. Dentro da classe das celulasas, a enzimas Celobiohidrolase I (CBHI), o maior componente produzido pelo fungo filamentoso *Trichoderma* sp, são a principal chave para a hidrólise da celulose cristalina em dímeros de açúcares fermentáveis após a biomassa lignocelulósica ter passado pelo processo de deslignificação (REZENDE, 2011; COLUSSI, 2012).

Uma grande variedade de estudos têm sido realizados em torno da otimização dos

processos de hidrólise enzimática da celulose pela enzima CBHI visando uma aplicabilidade em escala industrial na produção de etanol (Beckham, 2011). Em relação a essa otimização, parâmetros como pH e temperatura são de suma importância. Efeitos de protonação e desprotonação tanto das enzimas quanto do substrato afetam a interação enzima-substrato e influencia significativamente o processo de hidrólise através da mudança do pH (REINIKAINEN, 1995; SOARES, 2004; COLUSSI, 2012). Já a temperatura influencia na estabilidade térmica enzimática (ANDREAUS, 1999) e a cinética da hidrólise (SEGUEL, 1993).

Entender a dinâmica que as enzimas CBHI desempenham durante a hidrólise da celulose em diferentes condições de pH e temperatura é de suma importância no que diz respeito a otimização do processo de hidrólise da celulose. Para isso torna-se necessário combinar métodos já existentes ou desenvolver novas metodologias que permitem investigar tal dinâmica a nível molecular. Métodos computacionais de simulação e de dinâmica molecular vêm sendo combinados para entender e aperfeiçoar o processo de hidrólise da celulose pelas enzimas CBHI. Eles fornecem as condições prévias de estrutura, as energias envolvidas e as interações entre as enzimas com as cadeias de celulose a nível molecular (NIMLOS, 2007; BU, 2009; BECKHAM, 2010). Porém, efeitos de pH e temperatura são muitas vezes parametrizados, de modo que informações referentes às melhores condições para a máxima atividade catalítica da CBHI e suas correlações com a interação sobre os substrato lignocelulósico são ainda escassas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver metodologias óticas objetivando a otimização do processo de hidrólise da celulose presente na biomassa lignocelulósica. Será demonstrado que o uso de técnicas espectroscópicas de (a) absorção Uv/vis, (b) fluorescência e (c) dicroísmo circular (CD) permitem investigar com precisão propriedades importantes, tais como a interação entre a enzima *ThCBHI* com substratos celulósicos e os efeitos da mudança estrutural no processo de hidrólise destes substratos.

No que diz respeito à estrutura dessa dissertação, primeiramente será apresentando uma breve revisão bibliográfica dos conceitos básicos que envolvem a biomassa lignocelulósica, com ênfase na composição química e estrutural, passando pela apresentação do complexo enzimático responsável pela hidrólise completa da celulose presente nos materiais lignocelulósico e por fim descrever os conceitos básicos referentes às técnicas espectroscópicas utilizadas no desenvolvimento do trabalho. Em seguida, vamos mostrar as relações dos materiais utilizados para desenvolver essa dissertação e a metodologia desenvolvida para caracterizá-los. Na seção 5, serão apresentados e discutidos os resultados

referentes à metodologia aplicada na caracterização do sistema em estudo. E por fim as conclusões do presente trabalho seguido das referências utilizadas como suporte será apresentado nos capítulos subsequentes.

2 Propriedades de materiais lignocelulósicos e celulasas

Biomassa de origem lignocelulósica, tais como resíduos agroindustriais, resíduos florestais, polpa de madeira são materiais formados por células macroscópicas que são constituídas basicamente pela lamela média, parede celular e membrana plasmática (ALVES, 2011). Em suma, a maioria dos componentes moleculares que compõem a biomassa lignocelulósica se encontra na parede celular da célula vegetal (Figura 1). Tais componentes são: lignina, hemicelulose e celulose, que juntos perfazem cerca de 90% da massa seca total da biomassa (BOM, 2008).

Figura 1: Esquema da estrutura da biomassa de origem vegetal. Esses compostos são ricos de polissacarídeos que podem ser aplicados na produção do bioetanol celulósico.

Estes materiais lignocelulósico são os compostos mais abundantes da biosfera, representando 50% da biomassa terrestre (BOM, 2008) e, devido a grande composição de celulose, estes apresentam grande potencial para serem bioconvertidos em açúcares menores e consequentemente aplicados na produção de bioetanol após a sua fermentação (PALONEN 2004; CARLO 2005; SANTO, 2009).

2.1 Lignina

Na natureza, a lignina é encontrada como parte integrante da parede celular da biomassa e está incorporada na forma de uma matriz polimérica com a hemicelulose e com a

celulose (PALONEN, 2004). A lignina é um complexo macromolecular que apresenta uma estrutura tridimensional, amorfa e altamente ramificada e compõem em média de 20-30% de toda a biomassa lignocelulósica (HIMMEL, 2007; CHUNDAWAT, 2011). A Figura 2 apresenta a estrutura da lignina.

Figura 2: Estrutura tridimensional da lignina (ALVES, 2011).

Como pode ser observado, esse composto macromolecular apresenta um grande número de grupos aromático e alifáticos, ligados por meio de diferentes tipos de ligações tais como: éter (hidroxilas primárias e secundárias, carbonilas, carboxilas, ésteres e ligações etilênica) ou carbono-carbono (VANHOLME, 2010). Devido a essas características estruturais, do ponto de vista físico, a lignina é rígida e serve para adicionar resistência à parede celular.

Uma propriedade interessante da lignina é a fluorescência, que é atribuída a sua estrutura conjugada formada pelos anéis aromáticos. Por isso, a absorção da luz de excitação pela lignina ocorre no ultravioleta. Já a emissão da lignina é formada por uma banda larga que cobre o espectro ultravioleta próximo ao visível (COLETTA, 2012). As propriedades de absorção e emissão da lignina na biomassa refletem a sua estrutura complexa, interagente e amorfa.

2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é classificada como polissacarídeo heterogêneo que se liga entre si e com as microfibras de celulose através de ligações cruzadas via ponte de hidrogênio, formando uma rede complexa (FASANELLA, 2008). Nas plantas, estas moléculas estão localizadas na parede celular, representando cerca de 20-40% da massa seca total da biomassa (CARLO, 2005; HIMMEL, 2007).

A hemicelulose é um biopolímero amorfo e de baixo peso molecular, quimicamente composto por vários resíduos de açúcares, tais como: D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, entre outros, e por seus ácidos urônicos (FASANELLA, 2008; FILHO, 2008). A Figura 3 apresenta a estrutura desses açúcares.

Figura 3: Compostos químicos da hemicelulose

A sua cadeia principal pode ser constituída de uma só unidade desses açúcares (homopolímeros) ou de duas ou mais unidade (heteropolímero) ligadas entre si por ligações do tipo glicosídicas β -1,4. As ramificações da hemicelulose são formadas a partir da cadeia principal e estabilizadas por pontes de hidrogênio com cadeias adjacentes. A Figura 4 apresenta a estrutura geral da hemicelulose.

Figura 4: Estrutura geral da molécula de hemicelulose (ALVES, 2011).

2.3 Celulose

A maior parte dos açúcares fermentáveis presentes na biomassa lignocelulósica está na forma de celulose. Essa molécula apresenta-se em maior quantidade na biomassa do que a lignina e a hemicelulose, compondo cerca de 40-60% do peso da biomassa seca (CARLO, 2005).

Como está ilustrado na Figura 5, a celulose é um polímero linear, que contém até 15.000 unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4. Estas cadeias individuais estabelecem ligações de hidrogênio intermoleculares, as quais são responsáveis pela manutenção das redes cristalinas, são rígidas e em forma de fita (BON, 2008; FILHO 2008).

Figura 5: Estrutura molecular da celulose.

A fração dos principais componentes da biomassa lignocelulósica (lignina, hemicelulose e celulose) varia em relação cada espécie de vegetal, idade entre outros fatores. Assim, a Tabela 1 mostra a porcentagem destes componentes para vários vegetais (SUN 2002; CARLO, 2005).

Tabela 1: Porcentagem de lignina, hemicelulose e celulose na biomassa lignocelulósica.

Biomassa	lignina (%)	hemicelulose (%)	celulose (%)
<i>Robinia pseudoacacia</i>	26,70	17,66	41,61
<i>Casca de nozes</i>	30-40	25-30	25-30
<i>Espiga de milho</i>	15	35	45
<i>Papel</i>	0-15	0	85-99
<i>Semente de algodão</i>	0	80-85	15-20
<i>Caules Folhosos</i>	40-55	24-40	18-25
<i>Gramíneas</i>	25-40	35-50	25-40
<i>Muda de Grama</i>	12,0	31,4	45
<i>Pinus</i>	27,67	21,90	44,55
<i>Eucalipto</i>	27,67	13,07	49,50

2.2 Celulases

Para a produção do etanol a partir da biomassa lignocelulósica é necessário que a celulose seja hidrolisada em açúcares menores. Enzimas celulases são utilizadas para que esse processo seja efetivo desde o desempacotamento até a hidrólise completa da celulose presente na biomassa. As celulases estão subdivididas em três classes e suas estruturas podem ser vistas na Figura 6, a saber: endo-1,4- β -D-glucanases ou Endoglucanase (a); as exo-1,4- β -D-glucanases ou Celobiohidrolase (CBHI, (b)) e II (CBHII, (c)); e as 1,4- β -D-glucosidase.

Figura 6: Estruturas das celulases que participam da degradação da celulose obtidas a partir do banco de dados PDB. (a) endoglucanase (ID 1KS5), (b) CBHI (ID 2Y9N), (c) CBHII (3CBH) e (d) β -glucosidase (ID 3AHY).

As enzimas endoglucanase hidrolisam randomicamente regiões internas na molécula de celulose e apresenta afinidade por regiões amorfas (Figura 7). O produto final dessa enzima são celo-oligossacarídeos com diversos graus de polimerização e as extremidades livres das moléculas de celulose ficam acessíveis ao ataque posterior das enzimas CBHI e CBHII.

Figura 7: Ilustração da ação da enzima endoglucanase sobre a celulose. Essa enzima atua preferencialmente nas regiões amorfas da biomassa.

As enzimas exoglucanase (CBHs) atuam nas extremidades da celulose, liberando a celobiose como produto da hidrólise. Esta molécula é composta de duas glicoses unidas entre si por uma ligação β -1,4 glicosídica. Essas enzimas são divididas em duas subclasses: as que hidrolisam terminais redutores (do tipo I ou CBHI) e as que hidrolisam terminais não redutores da cadeia de celulose (tipo II ou CBHII). A Figura 8 apresenta a ação da exoglucanase (CBHI e CBHII) sobre a celulose (FERREIRA, 2010; OGEDA, 2010).

Figura 8: Ação das enzimas exoglucanases CBHI e CBHII sobre a celulose. A enzima CBHI atua preferencialmente na extremidade redutora e CBHII age na região não redutora da cadeia da celulose cristalina.

A enzima CBHI pode ser obtida preferencialmente a partir do fungo filamentoso *Trichoderma* sp e é a chave principal para a hidrólise da celulose cristalina açúcares fermentáveis (DIVNE, 1994; DIVNE 1998). Essa enzima foi utilizada para o desenvolvimento do presente trabalho e, portanto, vamos dar ênfase às suas propriedades principais a seguir.

A estrutura da enzima CBHI é mostrada na Figura 9 e é composta basicamente composta de um módulo de ligação a celulose (CBM) e de um domínio catalítico de aproximadamente 50 Å, ambos ligados entre si por uma sequência polipeptídica glicosilada (ZHONG, 2007).

Figura 9: Estrutura da enzima CBHI. Figura adaptada a partir da referência (BECKHAM, 2010).

O processo de hidrólise realizado pela enzima CBHI é ilustrado na Figura 10 desde o momento que ela se encontra livre na solução (a) até o momento da expulsão do produto da hidrólise da cadeia de celulose (g). A enzima CBHI é adsorvida (b) a partir da interação do CBM com a superfície do substrato (ZHONG, 2007; BECKHAM, 2010). Após realizar a ligação com a superfície da celulose, a enzima faz o reconhecimento da extremidade redutora da cadeia celulósica através do seu domínio catalítico (c) e se liga a uma única cadeia de celulose (d) para hidrolisar a ligação β -1,4 glicosídica para a produção de celobiose (e-f), culminando na liberação da mesma (g). Esse processo é repetido sucessivamente até que a enzima termine de hidrolisar por completo o filamento de celulose e fique livre para encontrar outra cadeia (migração) (CHUNDAWAT, 2011).

Figura 10: Ilustração da dinâmica da enzima CBHI durante o processo de desconstrução da celulose presente na biomassa lignocelulósica. Figura foi adaptada da referência (BECKHAM, 2010). (a) as enzimas CBHI encontram-se inicialmente livres na solução e após a sua (b) adsorção sobre a superfície da celulose regulada pelo CBM inicia-se o processo de reconhecimento de uma extremidade redutora da celulose (c). Feito o reconhecimento, um filamento de celulose é encaminhado ao domínio catalítico (d) e (e) onde o processo de hidrólise é iniciado (f). Assim que a celulose é hidrolisada no domínio catalítico e a celobiose é inibida e liberada para a solução (g).

Por fim, a hidrólise da celulose é finalizada pela enzima β -glucosidase. Após a liberação do produto da hidrólise da celulose pela enzima CBHI, as enzimas β -glucosidase hidrolisam a ligação β -1,4 glicosídica da celobiose, liberando unidades monoméricas de D-glicose (OGEDA, 2010). A Figura 11 ilustra o processo da hidrólise da ligação β -1,4 glicosídica da celobiose.

Figura 11: Ilustração da ação das enzimas β -glucosidase durante o processo de hidrólise da celobiose.

3. Espectroscopia Óptica

Vamos apresentar nessa seção uma revisão dos conceitos fundamentais que envolvem as técnicas espectroscópicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. Vamos abordar em primeira mão os aspectos gerais dos processos ópticos na matéria e, em seguida, aplicar estas considerações na caracterização de sistemas proteicos, em especial do sistema enzimático.

3.1 Espectroscopia de Absorção

Basicamente, a espectroscopia de absorção é feita pela passagem da luz de comprimento de onda na faixa do ultravioleta próximo, visível e infravermelho através de um meio contendo uma espécie absorvedora (átomos, moléculas, íons). A fração dessa luz que será absorvida depende da probabilidade de interação entre a radiação e a molécula absorvedora, o que promove um elétron de um estado ocupado de menor energia (estado fundamental) para outro estado desocupado de maior energia (estado excitado) e a energia do fóton absorvida é igual a diferença de energia entre estes dois estados, conforme é apresentado na Figura 12.

Figura 12: Processo de absorção de um fóton. Quando um fóton de energia $h\nu$ incide sobre um material contendo uma espécie absorvedora, este pode ser absorvido se a diferença de energia do estado excitado (E_1) e fundamental (E_0) é exatamente igual à energia do fóton incidente.

Em consequência da absorção da radiação pelas moléculas absorventes, a intensidade do feixe I_0 é atenuada para I (Figura 13). Em uma solução contendo a espécie absorvedora, a fração de radiação absorvida ao propagar um caminho óptico de comprimento dl nessa solução é proporcional à concentração C da molécula em mol.L^{-1} , ao seu coeficiente de extinção molar ε definido em $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ e a dl dado em cm, e pode ser expressa da seguinte forma:

$$dI/I_0 = -C\varepsilon dl \quad (1)$$

A expressão (1) é conhecida como Lei de Beer-Lambert. O sinal menos indica que a intensidade é menor após a luz percorrer dl . ε independe da concentração para um conjunto de molécula não interagente, porém possui uma dependência do comprimento de onda ou da frequência em que a molécula absorve.

Figura 13: Processo de absorção da radiação. Um feixe paralelo de radiação antes e depois de atravessar um meio que tem espessura dl e uma concentração C de uma espécie molecular absorvente.

Integrando a equação (1) em um comprimento óptico l ou para toda amostra de mesma espessura, obtemos que:

$$\ln(I_0/I) = C\varepsilon l \quad (2)$$

Podemos converter a equação (2) em log de base 10 utilizando a seguinte propriedade:

$$\log_b(x) = \frac{\log_a(x)}{\log_a(b)} \quad (3)$$

A quantidade adimensional $A(\lambda) \equiv \log(I_0/I)$ é chamada de absorbância do material absorvedor e só depende da razão I_0/I entre a intensidade da luz ao sair do material I e a intensidade da luz incidente I_0 . Estas intensidades são tomadas em relação a uma linha de base definida para que $I_0/I = 1$, ou seja, $A(\lambda) \equiv \log(I_0/I) = 0$, para todo o comprimento de onda da luz de excitação. O ajuste da linha de base deve ser realizada antes da medida de absorbância seguindo as especificações de cada espectrômetro. Assim temos que:

$$A(\lambda) \equiv \log(I_0/I) = C\varepsilon(\lambda)l \quad (4)$$

O produto $C\varepsilon$ é definido como a absorção do material em solução e é uma característica intrínseca do mesmo. Em um filme, a absorção é dada em termos do produto $N\sigma$ entre o número de moléculas por unidade de volume e a seção de choque de absorção de cada molécula. Uma propriedade importante é que σ e ε estão relacionados por características geométricas da espécie molecular absorvente como pode ser visto a seguir. Para isso, vamos considerar um corte transversal com área A (cm²) e espessura dl (cm), de acordo com a Figura 14.

Figura 14: Corte de seção transversal de uma amostra contendo uma espécie absorvedora

O número de moléculas por cm³ é $CN_0/1000$ e o número de moléculas na seção transversal é $CAN_0 dl/1000$. Considerando a área da molécula, a fração máxima da área de seção choque ocupada pelas moléculas na seção transversal é dada em termos do raio r da molécula absorvedora pela relação (5):

$$f_{m\acute{a}x} = \pi r^2 CN_0 / 1000 \quad (5)$$

A fração da luz absorvida, quando esta incide sobre uma seção transversal, é dada em termos da probabilidade de absorção P e da espessura da seção dl , através da seguinte relação:

$$-dI/I_0 = f_{m\acute{a}x} P dl = (CN_0 / 1000) \pi r^2 P dl \quad (6)$$

Durante o processo de absorção, cada molécula contribui para que o processo de absorção ocorra de acordo com a relação (7), onde σ é **seção choque de absorção** da molécula dado em cm^2 (CANTOR, 1998).

$$\sigma = \pi r^2 P \quad (7)$$

Igualando a expressão (1) com a (6) e utilizando a relação (7), podemos estabelecer uma relação entre o coeficiente de extinção molar e a seção choque de absorção através da seguinte relação:

$$\varepsilon = \sigma N_0 / 2303 \quad (8)$$

A equação acima fornece informações fundamentais a respeito das mudanças dimensionais da molécula responsável pela absorção, visto que, o parâmetro ε é intrínseco da molécula. Nota-se que ε é diretamente proporcional à seção choque de absorção, onde qualquer mudança em ε reflete mudanças significativas na seção de choque molecular quando P permanece constante.

Uma propriedade importante da Lei de Beer-Lambert é que esta pode ser aplicada em um sistema contendo várias espécies absorvedoras, onde a absorbância total é simplesmente a soma das absorbâncias individuais de cada espécie, conforme dado pela equação (9) (GALO, 2009),

$$A_\lambda = \sum_i C_i \varepsilon_\lambda l \quad (9)$$

Como sabemos, cada molécula apresenta uma seção choque de absorção que é descrita pelas equações (7) e (8). Assim, para um sistema composta por várias moléculas absorvedoras, por exemplo, uma enzima, a seção choque de absorção pode ser considerada como uma seção *choque de absorção efetiva* σ_e , onde todos os resíduos responsáveis pela absorção são levados em consideração. Dessa forma podemos escrever a equação (8) da seguinte forma.

$$\varepsilon(s) = \sigma_e N_0 / 2303 \quad (10)$$

Onde $\varepsilon(s)$ corresponde ao coeficiente de extinção de todas as moléculas absorvedoras do sistema e σ_e a *seção choque de absorção efetiva do sistema*.

3.2 Espectroscopia de Absorção Uv/vis: Aplicação em sistemas polipeptídicos

A espectroscopia de absorção Uv/vis torna-se uma poderosa técnica quando aplicada na investigação propriedades óticas de polipeptídios. Em geral, o espectro de absorção Uv/vis de sistemas proteicos está compreendido na faixa espectral de 250-320 nm e está associado a transições ópticas inteiramente atribuídas aos resíduos que apresentam o grupo R aromático, ou seja, Fenilalanina (Phe), Triptofano (Trp) e Tirosina (Tyr). As estruturas moleculares desses resíduos aromáticos estão apresentadas na Figura 15.

Figura 15: Estrutura dos resíduos aromáticos responsáveis pela absorção na região Uv/vis. (a) Phe, (b) Trp e (c) Tyr.

Os resíduos Phe, Trp e Tyr apresentam absorções características em regiões espectrais distintas dentro da faixa do Uv/vis, como é mostrado na Figura 16 (a). O resíduo Phe apresenta uma forte absorção em torno de 255 nm, enquanto que o Trp e a Tyr apresentam fortes absorções compreendidas na faixa entre 275-278 nm. A superposição de cada contribuição espectral de cada resíduo produz o espectro característico de absorção de

sistemas proteicos, ou seja, ele representa a absorção de uma mistura dos resíduos aromáticos (YANARI, 1960; PAGE, 1995).

Figura 16: (a) Espectro de absorção individual dos aminoácidos: Phe, Tyr e Trp. (b) Comparação do espectro de absorção de uma solução contendo uma mistura de Phe, Tyr e Trp com o espectro de absorção de um polipeptídeo (pepsina). Os espectros apresentados nessa figura foram obtidos a partir da seguinte referência (YANARI, 1960).

Assim, torna-se possível identificar mudanças estruturais de sistemas polipeptídicos (enzimáticos e proteicos) via espectroscopia de absorção através do parâmetro σ_e , visto que esse sistema é composto em sua maior parte de várias moléculas absorvedoras.

3.3 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência está relacionada na análise da emissão da radiação proveniente após o movimento dos elétrons a partir de um estado excitado (após o processo de absorção) para o estado fundamental. Os processos que ocorrem entre a absorção e emissão da radiação são usualmente ilustrados em um diagrama denominado de Jablonski (GONSALVES, 2005). Esse diagrama mostra vários processos moleculares que ocorre no estado excitado após o processo de absorção. Um diagrama típico de Jablonski está apresentado na Figura 17.

Figura 17: Diagrama de Jablonski. Ilustra os vários processos de transição eletrônica desde a absorção até a emissão

Nesse diagrama estão representados todos os processos de transição eletrônica que ocorrem em uma molécula, desde o processo de absorção, fluorescência e fosforescência. S₀, S₁ e S₂ correspondem respectivamente aos estados fundamental e excitado, onde cada um destes estados apresentam um número de níveis de energia vibracional, denominado por 0, 1, 2, etc. O processo de transição eletrônica, tanto na absorção quanto na emissão, está representada por uma seta vertical.

Seguido a absorção da luz em uma dada frequência, a molécula é usualmente excitada para os níveis vibracionais dos estados S₁ ou S₂. Após ocorrer essas transições, moléculas sofrem uma rápida relaxação para os estados vibracionais do nível eletrônico S₁. Esse processo de relaxamento é chamado de Conversão Interna (CI) e ocorre em um tempo de aproximadamente 10⁻¹²s ou menos. Quando a molécula atinge o estado eletrônico excitado S₁, após transitar pelos níveis vibracionais de S₁, esta pode retornar para o estado fundamental emitindo dessa forma a radiação restante do processo de absorção. Além disso, o tempo de permanência da molécula no estado S₁ está na ordem de 10⁻⁹s (HAMMES, 2005).

A molécula no estado excitado S₁ também pode sofrer uma conversão de spin para o estado T. A emissão a partir deste estado T é denominada de fosforescência e geralmente é deslocado para regiões de menores energias relativas a fluorescência. Essa conversão entre S₁ e T é chamada de conversão inter sistema. A transição de T para o nível S₀ é proibida pela multiplicidade de spin e dessa forma em geral a intensidade de emissão é fraca e o tempo que de permanência em T é na ordem de milissegundos (HAMMES, 2005).

Nos estudos que envolvem sistemas proteicos a espectroscopia de fluorescência exerce um papel fundamental, pois com ela é possível obter várias informação desde suas

modificações estruturais até em sua dinâmica de interação com outras moléculas. Veremos na próxima seção como é que se dá o processo de fluorescência em biomoléculas, tais como proteínas.

3.4 Espectroscopia de Fluorescência: *Aplicação em sistemas polipeptídicos*

A aplicação da espectroscopia de fluorescência na determinação de propriedades de sistemas proteicos se dá pelo fato da existência de fluorescência intrínseca nesse sistema.

Assim como no processo de absorção, proteínas contêm três resíduos aromáticos que contribuem para a sua fluorescência na região UV, a saber: Phe, Tyr e Trp (HAMMES, 2005; LAKOWICZ, 2006). Os espectros de emissão desses resíduos estão mostrados na Figura 18.

Figura 18: Espectro de emissão dos resíduos Phe, Tyr e Trp (LAKOWICZ, 2006).

Como pode ser observado, o resíduo Phe apresenta uma máxima emissão próximo a 280 nm. Por sua vez, a emissão da Tyr ocorre em 303 nm enquanto que a emissão do Trp ocorre próximo de 350 nm. Além disso, devido as suas características estruturais, Tyr e Trp apresenta alta sensibilidade ao ambiente e solvente em que são expostos. Como pode ser observado na Figura 15 (c), o resíduo Tyr apresenta um grupo hidroxílico em seu anel

aromático o qual confere uma característica polar para esse resíduo. Por outro lado Trp é um resíduo apolar, porém pode sofrer influência do ambiente que o cerca devido a presença do grupo imino no seu anel indol. Essas características faz com que os espectros de emissão desses resíduos tornam-se fortemente dependente da polaridade do solvente ou do ambiente em que se encontram. O espectro típico de emissão de uma proteína é largo e tem seu máximo, em pH=6,3, em torno de 340 nm. Estas propriedades são características de um sistema para o qual existe acentuados processos de transferência de energia entre seus constituintes contendo ambientes químicos distintos.

3.5 Dicroísmo Circular – Breve Explicação

Dicroísmo circular (CD) ocorre quando a radiação polarizada circularmente, para direita e esquerda, atravessa um meio opticamente ativo, contendo moléculas com estrutura em forma de hélice ou chirais, onde cada componente estará sujeita a diferentes absorções, ou seja, a absorção molar é diferente para cada um dos componentes da luz de polarização circular. CD é um fenômeno de absorvidade, representada como a diferença na absorção da luz polarizada circularmente da esquerda (A_e) e da luz polarizada circularmente à direita (A_d).

Esse fenômeno altera o balanço entre as intensidades fazendo com que o raio emergente adquira uma polarização elíptica como mostrado na Figura 19.

Figura 19: Interferência de dois raios de polarização circular quando há dicroísmo circular. Polarização elíptica.

Na Figura 20 está ilustrada uma representação gráfica do efeito produzido por uma substância opticamente ativa, com diferente absorção molar para cada um dos componentes de polarização circular.

Figura 20: Radiação de polarização elíptica emergindo do meio apresentando dicroísmo circular em que $\epsilon_d > \epsilon_e$.

O CD pode ser medido através da diferença de absorção molar $\Delta\epsilon = \epsilon_e - \epsilon_d$ ou em função da elipticidade. A elipticidade θ é uma grandeza que está relacionada com $\Delta\epsilon$ e é definido como o ângulo cuja tangente é igual a relação entre o eixo menor OB e o eixo maior, AO .

$$\operatorname{tg} \theta = \frac{\overline{OB}}{\overline{OA}} \quad (11)$$

A relação entre a elipticidade molar e o CD, $\Delta\epsilon$ é dada pela seguinte expressão:

$$[\theta] = 3298(\epsilon_e - \epsilon_e) = 3298\Delta\epsilon \quad (12)$$

dados em $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$.

Para obter uma curva de CD é necessário usar um dicrometro circular, instrumento cujo princípio básico de funcionamento está representado na Figura 21. Neste caso a amostra é submetida alternadamente a feixes de luz circularmente polarizada para a esquerda e direita e em seguida o sistema de detecção permite registrar o comportamento do espectro em termos da diferença entre absorvidade molar em função do comprimento de onda.

Figura 21: Esquema básico de um dicrometro circular. Figura adaptada a partir de (DELEPIERRE, 1994)

3.6 Dicroísmo circular – Cromóforo amida em polipeptídio

Um dos principais e mais abundantes cromóforos presentes em sistemas polipeptídicos são as ligações peptídicas, as quais são responsáveis pela absorção da radiação na região abaixo de 240 nm (BASCH, 1967). A Figura 22 mostra esse cromóforo com a direção e magnitude dos momentos de transição do amido grupo, as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.

Figura 22: Esqueleto de uma ligação amina de um polipeptídio mostrando os momentos de transição e os seus respectivos ângulos de rotação.

Como pode ser observado na figura acima, existe uma rotação restrita em torno da ligação peptídica devida o caráter de dupla ligação que resulta na coplanaridade dos átomos CONH. Além disso, as transições eletrônicas relacionadas a este cromóforo são de suma importância para sinal de CD, pois dependendo da estrutura secundária de que é formada a enzima, a transição eletrônica ocorre em um comprimento de onda específico dentro da região espectral de 185-250nm.

Assim, a estrutura randômica apresenta duas transições na região Uv/vis distante. A primeira apresenta um sinal negativo, atribuída a uma transição $n \rightarrow \pi^*$ em 195 nm. A segunda é positiva, correspondendo a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em um comprimento de onda de 212 nm.

A estrutura folha- β apresenta uma transição negativa $n \rightarrow \pi^*$ próxima de 215 nm enquanto que a região positiva está relacionada a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ centrada entre 195 e 197 nm. Por fim, o espectro de CD da estrutura α -hélice é composta pelo desdobramento da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em duas bandas: a primeira com alta energia de transição em 192 nm e uma outra com uma baixa energia de transição em 209 nm, apresentando respectivamente sinais positivos e negativo. A transição $n \rightarrow \pi^*$ apresenta um sinal negativo em 222 nm. A Figura 23 apresenta os espectros típicos de CD para cada estrutura secundária (DELEPIERRE 1994; HAVEL 1996; GONSALVES, 2005; KELLY, 2005).

Figura 23: Espectro de CD de vários tipos de estruturas secundárias. A figura foi retirada e modificada a partir da seguinte referência (KELLY, 2005)

Todas essas transições possuem sua origem na ligação amido peptídica e seu sinal é dependente da estrutura secundária e não dos resíduos que compõem a cadeia lateral.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Material lignocelulósico

A biomassa lignocelulósica utilizada neste trabalho foram fibras de eucalipto (FE). Essas fibras foram fornecidas pela empresa Aracruz Celulose após passar por processo de deslignificação. Para o processo de deslignificação, foi primeiramente utilizado uma solução de NaOH e, em seguida, uma solução ácido e/ou enzimática com as enzimas xilanase (ALVES, 2011). A fração de lignina resultante do processo de tratamento foi de 2%, sendo este valor determinado por ALVEZ (ALVES, 2011).

Como substrato de controle, foi utilizada a celulose microcristalina Avicel® PH 101, fornecido pelo Grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos/USP.

4.1.2 Enzima Celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum* (*ThCBHI*)

As enzimas *ThCBHI* foram purificadas e fornecidas pelo Grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos/USP, conforme descrito em COLUSSI (COLUSSI, 2011). A massa molecular da enzima *ThCBHI* foi determinada por COLUSSI (COLUSSI, 2011) e seu valor é de 66 kDa.

4.1.3 Reativos Somogyi-Nelson (SN)

Os reativos de Somogyi-Nelson foram fornecidos pelo Laboratório de Ensino do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo-IQSC/USP. Porém para maiores informações de como prepará-lo, o leitor pode procurar na seguinte referência (Nelson, 1944).

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação do espectro de Absorção, Excitação e Fluorescência da Enzima *ThCBHI*

Primeiramente foram adicionados 10 ml de água MilliQ-Q (pH 7,0) e um tubo falcon de 12ml. Em seguida, alíquotas de enzima *ThCBHI* foram adicionadas neste mesmo tubo falcon com as seguintes concentrações: 2×10^{-8} ; $3,9 \times 10^{-8}$; $5,9 \times 10^{-8}$ e $7,9 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹.

Os valores de pH, 3,5; 5 e 6,3 foram ajustados com HCl 0,1M. Para cada valor de pH, as variações das concentrações foram feitas em tubos falcons separados. Logo, um volume de 2 ml de solução, foi retirada e colocada em uma cubeta de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm.

Por fim os espectros de absorção das enzimas, em seu respectivo valor de pH, foram medidos utilizando um Espectrômetro Hitachi U-2900 (UV/Vis) operando em um range espectral de 190-1100 nm enquanto que os espectros de excitação (PLE) e fluorescência (PL) foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro RF-5301 PC. Todos os espectros foram mensurados a 25°C e os dados posteriormente tratados no programa Origin 8.

4.2.2 Determinação de Mudanças Conformacionais da Enzima *ThCBHI* – Dicroísmo Circular

Através da técnica de dicroísmo circular (CD), foi possível analisar a integridade das estruturas secundárias da enzima *ThCBHI* e monitorar as possíveis mudanças conformacionais induzidas pela influência do pH em diferentes temperaturas.

Para a realização do experimento de CD foram utilizadas soluções tampões Ácido Cítrico/Fosfato de Sódico para o tamponamento entre 3-8 e solução de Carbonato de Sódio/Bicarbonato de Sódio para valores de pH 9 e 10, ambas soluções a 20 mM contendo 0,26 g.L⁻¹ ($3,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$) de enzimas *ThCBHI*.

As medidas de CD foram obtidas através de um espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com uma unidade de controle de temperatura Peltier. Todos os espectros foram obtidos em um range espectral de 205-250 nm, com uma média de 8 acumulações, velocidade de escaneamento de 100 nm min⁻¹ e com a fenda de 1 nm de abertura. Todos os espectros

foram obtidos a 25 °C e 50 °C. Para eliminação dos efeitos de background, foram subtraídas de todas as análises as contribuições das soluções tampões.

Os dados foram tratados no programa Origin e em seguida no programa CDpro para a determinação da quantidade de estruturas α -hélice e folha- β presentes nas enzimas.

4.2.3 Adsorção da Enzima *ThCBHI* sobre os substratos celulósicos

Este método foi desenvolvido no presente trabalho, objetivando estudar a interação entre a enzima *ThCBHI* e substrato. Este método consiste basicamente em determinar as condições de pH e temperatura e o número de enzimas adsorvidas sobre o substrato através da sua fluorescência intrínseca. Esse método é um complemento do método de arraste molecular apresentado por TSUTAE (TSUTAE, 2011) que utilizou espectroscopia de absorção para determinar diretamente o número de moléculas adsorvidas em uma superfície.

Nesse trabalho, os estudos de interação foram feitas para os valores de pH 3,5; 5 e 6,3 nas temperaturas de 25 °C e 50 °C.

Inicialmente foram preparados em tubos falcons, soluções contendo 10 mL de água Milli-Q juntamente com enzima *ThCBHI* a uma concentração de 5,2 mg.L⁻¹ ($7,9 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹). Para os ajustes dos valores de pH, utilizou-se alíquotas de HCl a 0,1M. Como referência, 2 mL de solução foram adicionados em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico e em seguida os espectros de PLE e PL foram obtidos em um espectrofluorímetro RF-5301 PC.

Após obter a referência, os 2 mL de solução foram devolvidos ao tubo falcon no qual 5 mg de FE foram adicionadas. Para cada quantidade de substrato adicionados, a solução foi centrifugada sob uma rotação de 3600 rpm por 3 min e em seguida 2 mL de sobrenadante foram retirados para medidas de PLE e PL. Todos os espectros foram obtidos em uma faixa espectral de 245-300 nm para a PLE e 287-450 nm para a PL. Esse procedimento foi repetido para cada adição de substrato até que a PLE e a PL fossem reduzidos ao seu mínimo. Para o substrato de controle Avicel, o mesmo procedimento foi adotado.

Para investigar a influência do CBM no processo de interação da enzima com o material celulósico, o método de arraste enzimático foi aplicado para a enzima com o CBM clivado, ou seja, para enzima contendo apenas o centro catalítico (CCD). As concentrações de substrato, enzima, centrifugação, medidas de PLE e PL foram as mesmas utilizadas para o arraste da enzima completa. Os valores de pHs utilizados para a obtenção do arraste do CCD

foi de 3,5 e 6,3, os quais foram ajustados com HCl 0,1M.

A Figura 24 apresenta o fluxograma do método de arraste enzimático.

Figura 24: Fluxograma do experimento de arraste enzimático

4.2.4 Interação enzima-substrato celulósico

Este método foi desenvolvido com o objetivo de investigar a interação da enzima *ThCBHI* sobre o substrato celulósico para uma maior faixa de pH nas temperaturas de 25 °C e 50°C.

Para a realização desse experimento foi necessário obter primeiramente a concentração de substrato para o máximo arraste enzimático referente à FE através do experimento descrito na seção anterior e esse valor foi de 2 g.L⁻¹.

Nesse experimento foram utilizadas duas soluções, aqui chamadas de **A** e **B**. A solução **A** consistiu de 10 mL de água Milli-Q juntamente com 5,2 mg.L⁻¹ (7,9x10⁻⁸ mol.L⁻¹) de enzimas *ThCBHI*. Por outro lado, a solução **B** consistiu das mesmas composições apresentada em **A**, porém com uma concentração de 2 g.L⁻¹ de substrato.

A faixa de pH das soluções utilizadas foi de 3 a 10 em ambas as temperaturas. Os valores de pH da solução para a faixa de 6-3 foram ajustados com HCl 0,1M enquanto que para a faixa de pH 7-10 os valores foram ajustados com NaOH 0,1M. A centrifugação e medidas de PLE e PL das soluções foram realizadas nas mesmas condições descrita na seção 4.2.3. A Figura 25 mostra o fluxograma do experimento.

Figura 25: Fluxograma do experimento de interação entre *ThCBHI* com o material celulósico.

Os dados referentes as intensidade da solução **A** (I_o) e a intensidade da solução **B** (I), foram tratadas posteriormente no programa Origin 8.

4.2.5 Método de Somogyi – Nelson (SN)

Para determinar a quantidade de celobiose produzidas através da hidrólise da celulose presente nas FE pela enzima *ThCBHI* o método SN foi utilizado. Esse método baseia-se na determinação espectrofotométrica a 535 nm do composto azul formado devido à reação da celobiose - advinda da clivagem da cadeia de celulose das FE – com os reativos de SN. Esse método consiste em uma reação de oxirredução na qual o cátion Cu^{++} é reduzido a Cu^+ e a celobiose é oxidada. O cátion Cu^+ livre em solução liga-se ao arsenomolibdato presente no reativo de Nelson, o qual origina um complexo estável de coloração azul que, por fim, é quantificado por espectrofotometria. Conforme mostrado na Figura 26, a intensidade da coloração é proporcional à quantidade de açúcares redutores presentes na amostra (NELSON, 1944).

Figura 26: Comportamento dos reativos SN na presença de glicose. O aumento da coloração desse reativo ocorre em função da concentração de glicose (da esquerda para a direita).

Conforme apresentado na Figura 27, escolhemos a absorção em 690 nm, pois nesse comprimento de onda a concentração de celobiose apresentou de forma mais pronunciada.

Figura 27: Comportamento espectral do método SN para a escolha da região de maior sensibilidade. Nota-se que a região em 690 nm apresentou uma maior sensibilidade na detecção de celobiose e por isso foi utilizada para a quantificação do produto da hidrólise das FE pela *ThCBHI*.

A escolha desse método para a quantificação do produto da hidrólise é devido a sua alta sensibilidade as regiões de baixa concentração de glicose (celobiose) quando comparados à outros corantes como DNS.

4.2.6 Curva Padrão de Glicose

Para a elaboração da curva padrão de glicose, foram utilizadas soluções com as seguintes concentrações finais de glicose: 3,7, 7,4, 11, 22, 30, 37, 74 e 148 $\mu\text{Mol.L}^{-1}$. Em seguida 100 μl de cada solução foram transferidos para tubos eppendorfs nos quais 100 μl de reativo Somogyi foram adicionados e em seguidas levados para serem fervidas durante 10 min para que ocorresse a reação de oxirredução entre Cu^{++} e a glicose. Após a fervura das soluções, 100 μl de Nelson juntamente com 700 μl de água foram adicionados, completando dessa forma 1 mL de solução.

Alíquotas de cada solução foram removidas e colocadas em uma placa de Elisa de 96 poços e em seguida levados ao um espectrômetro Thermo-Multiskan Spectrum para a obtenção dos espectros de absorção. Os valores da absorbância em 690 nm foram plotadas em função da concentração de glicose, conforme mostrado na Figura 28.

Figura 28: Curva padrão de glicose obtida pelo método SN: Esta curva foi utilizada para a quantificação do produto da hidrólise das FE.

4.2.7 Ensaio de Atividade Enzimática *ThCBHI* usando o Método Somogyi-Nelson

O ensaio da atividade enzimática consistiu em determinar a quantidade de produto liberado durante o processo de hidrólise das F.E pelas enzimas *ThCBHI*. Assim, o ensaio foi realizado em duplicata na faixa de pH 3-8 nas temperaturas de 25 °C e 50 °C para os seguintes tempos de reação: 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. Para a variação do pH utilizou-se a solução tampão de Ácido Cítrico/Fosfato de Sódico 50 mM. O controle da temperatura se deu com o auxílio de um banho Maria Nova Ética 500-30D.

Além disso, em cada valor de pH e temperatura, amostra de 50 mg de fibras foram colocadas juntamente com 5 mL de solução tampão em seu respectivo pH, totalizando uma concentração de 10 g.L⁻¹ de substrato. Para formar a reação, uma concentração final de 26 mg.L⁻¹ de enzimas *ThCBHI* foram adicionadas na solução. Em seguida os falcons contendo o material da reação foram postos a agitar de forma que a enzima sempre se encontrava em contato com o substrato em todo o tempo de reação.

Como controle de substrato, foram preparadas soluções contendo uma concentração de 10 g.L⁻¹ de FE para toda a faixa de pH utilizada na atividade, porém sem enzimas. A solução para o controle de enzima foi preparada com as mesmas concentrações utilizadas para o ensaio de atividade, porém apenas para pH 5 e 50°C.

Para cada tempo de reação, 100 μl de cada solução foram retiradas e transferidos para

tubos eppendorfs e em seguida adicionados 100µl de reativo Somogy. Logo, os eppendorfs contendo o material da reação juntamente com o reativo Somogyi foram fervidos com o intuito de desnaturar as enzimas e ativar o processo de oxirredução entre o Cu^{++} e a celobiose advinda do processo de hidrólise das FE. Após a fervura, adicionou-se mais 100µl de reativo de Nelson juntamente com 700µl de água Milli-Q, completando 1 ml. Aliquotas de cada solução foram retiradas e colocadas em uma placa de Elisa contendo 96 poços e em seguida levados ao um espectrômetro Thermo-Multiskan Spectrum para a obtenção dos espectros de absorção.

Após a obtenção dos espectros e com o auxílio da curva padrão de glicose pode-se realizar a quantificação do produto da hidrólise das FE para cada tempo de reação, nas temperaturas de 25 °C e 50 °C na faixa de pH 3-8.

A Figura 29 ilustra o procedimento realizado no ensaio da atividade da enzima *ThCBHI* sobre a celulose presente nas F.E. S.R, E.R e E+S correspondem respectivamente a: referência do substrato, referência da enzima e enzima + substrato.

Figura 29: Fluxograma do método colorimétrico Somogyi-Nelson (SN) utilizado na quantificação da celobiose proveniente da hidrólise das FE pelas enzimas *ThCBHI*.

5 Resultados e Discussão

Neste capítulo vamos apresentar os resultados referentes às técnicas utilizadas na caracterização do sistema *ThCBHI*-substrato celulósico, tais como: espectroscopia de absorção Uv/vis na região espectral de 250-350nm, espectroscopia de fluorescência e CD. Vamos mostrar que a técnica de absorção Uv/vis foi de suma importância na determinação de informações preliminares referente a influência do meio sobre as alterações conformacionais das enzimas através dos parâmetros: coeficiente de extinção molar e seção choque de absorção efetiva. Como complemento, vamos mostrar que a técnica de CD se mostrou importante na determinação das frações referente às estruturas secundárias presentes nas enzimas e suas variações sofridas devido o pH e temperatura. Além disso, vamos mostrar que através da espectroscopia de fluorescência foi possível acompanhar a dinâmica de adsorção das enzimas sobre as FE e Avicel, via fluorescência intrínseca, em várias condições de pH nas temperatura de 25°C e 50°C. Vamos apresentar como se deu o desenvolvimento método de arraste enzimático que foi proposto para determinar o número de enzimas adsorvidas sobre os substratos via PL.

Por fim, uma correlação entre adsorção e alterações estruturais com a hidrólise da celulose presente nas FE pela *ThCBHI*, será apresentado.

5.1 Propriedades ópticas da Enzima *ThCBHI*

A caracterização óptica das estruturas secundaria de enzimas é normalmente realizada pela técnica de CD. Nesta seção vamos mostrar que foi possível realizar a caracterização das enzimas *ThCBHI* a nível estrutural através da técnica de espectroscopia de absorção Uv/vis. Enzimas possuem resíduos aromáticos, tais como Phe, Tyr e Trp, com absorção óptica predominantemente na região do ultravioleta (UV). Portanto, os espectros de absorbância nessa região espectral podem fornecer informações fundamentais a respeito de parâmetros, tais como, coeficiente de extinção molar e seção choque de absorção efetiva, que forneceram informações preliminares referentes às estruturas da enzima e da influência do meio onde a mesma se insere. Estes parâmetros encontram-se tabelados na literatura para a *ThCBHI* (EXPASY, 2011), porém eles serão determinados no presente trabalho e serão utilizados nas seções que se seguem. Isto é de importância fundamental, pois para a realização de medidas e

previsões qualitativas sobre o comportamento enzimático sobre substratos celulósicos, é importante determinar com exatidão, por exemplo, as concentrações, o grau de purificação e a atividade dessas enzimas.

A dependência da intensidade espectral da absorbância A da enzima *ThCBHI* com a concentração C (número de moléculas por volume N) do centro absorvedor em solução aquosa fornece o seu coeficiente de extinção molar ε (seção de choque σ) em acordo com a lei de Beer-Lambert, ou seja, $A_\lambda = \varepsilon lc = \sigma l N$ (equação 4), onde l é o caminho óptico percorrido pela luz de comprimento de onda λ . Esta dependência linear com a concentração é sempre esperada se efeitos de agregação ou espalhamento molecular estão ausentes.

A Figura 30 mostra o comportamento dos espectros de absorbância na região do Uv entre 240-300 nm da enzima *ThCBHI* em função de sua concentração para valores de pH fixados em (a) 3,5; (b) 5 e (c) 6,3; todos medidos à temperatura de 25°C. Esta faixa de concentrações muito pequenas corresponde àquelas utilizadas nos estudos de interação enzimática tratados no presente trabalho. Os espectros de menor concentração (linhas pretas) podem ser resolvidos em duas bandas com forma de linha gaussiana (linhas hachuradas em verde) posicionadas em 262 nm e 280 nm. Pode-se observar que a absorbância aumenta com a concentração. Porém, este é mais expressivo para a região espectral correspondente à banda posicionada 280 nm do que para a banda em 262 nm, indicando que moléculas com coeficientes de extinção ε (σ) distintos estão contribuindo para o espectro total da *ThCBHI* (veja abaixo) nessa faixa de comprimento de onda.

Figura 30: Espectros de absorção Uv da enzima *ThCBHI* para valores de pH (a) 3,5; (b) 5 e (c) 6,3 medidos à temperatura de 25°C. Os espectros de menor concentração (linhas pretas) podem ser resolvidos em duas bandas com forma de linha gaussiana (linhas hachuradas em verde) posicionadas em 262 nm e 280 nm.

O espectro de absorção da enzima *ThCBHI* é a convolução das absorções de 16 moléculas de Phe, de 24 Tyr e de 10 Trp na região espectral compreendida entre 250-310 nm (EXPASY, 2011), cujo comprimento de onda de máxima absorção (λ_{Absm}) encontrado está em torno de 276 nm. A Figura 31 (a) compara os espectros de absorbância da enzima *ThCBHI* com aqueles de cada resíduo aromático (YANARI, 1960). Pode-se observar que as moléculas Tyr e Trp contribuem com maior peso para λ_{Absm} na faixa espectral compreendida em 265-290 nm, enquanto que o resíduo de Phe contribui de forma significativa em torno de 240-265 nm (HOLIDAY, 1936; GOLDFARB, 1951; SAIDEL, 1952; ROSENHECK, 1961; LEVINE, 1982; PAGE, 1995; HAVEL, 1996).

A Figura 31 (b) mostra a localização dos resíduos de Phe, Try e Trp no domínio catalítico da enzima Celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei* (*TrCBHI*). A justificativa da utilização da estrutura do domínio catalítico da enzima *TrCBHI* para representar a estrutura da enzima *ThCBHI* é devido a homologia entre elas ser de 83% (NCBI, 2012) e da sua não disponibilidade em bancos de dados. A contribuição do CBM para com o espectro de absorção das enzimas se dá por meio de três resíduos de Tyr, um de Trp e um de Phe neste anexo enzimático (COLUSSI, 2011).

Figura 31: (a) Espectro de absorção das enzimas *ThCBHI* em pH 3,5 juntamente com os espectros de absorção dos resíduos responsável pela absorção. A concentração de enzimas foi 2×10^{-8} mol.L⁻¹. Os espectros dos resíduos Phe, Trp e Tyr foram obtidos a partir de (YANARI, 1960) e foram utilizados aqui somente para comparações. (b) Localização dos resíduos Phe, Tyr e Trp no domínio catalítico das enzimas *TrCBHI*

5.2 Coeficiente de extinção molar da Enzima *ThCBHI*

O conhecimento coeficiente de extinção molar ϵ dos resíduos de Phe, Try e Tyr fornece informações sobre as mudanças estruturais das enzimas e será usado na determinação da área absorção efetiva da enzima *ThCBHI*. A priori, o coeficiente de extinção molar da enzima está vinculado diretamente com a seção choque de absorção efetiva, dado por σ_e , onde qualquer variação deste parâmetro reflete em primeira mão possíveis mudanças estruturais relacionadas ao sistema macromolecular em estudo.

Neste contexto, vamos apresentar nesta seção os valores do coeficiente de extinção molar e da seção choque de absorção efetiva (σ_e) da enzima *ThCBHI*, todos obtidos a partir das medidas espectrais apresentadas na seção anterior.

Os valores de absorbância para os resíduos Try e Trp em 280 nm em função da concentração de enzima *ThCBHI* para três valores de pH ácido são mostrados na Figura 32. O comportamento linear esperado para os três valores de pH é ajustado por retas (linhas) com coeficiente angular proporcional ao valor do coeficiente de extinção molar para um caminho ótico de 1 cm. Pode-se observar que as retas ajustadas passam pela origem em forma consistente com o fato de que espalhamento ou formação de agregados não estão presentes. A variação do coeficiente angular das retas ajustadas indicam que os coeficientes de extinção molar são afetados pelo pH.

Figura 32: Absorção em 280 nm em função da concentração molar de enzima *ThCBHI* para diferentes valores de pH à 25°C.

Os valores do coeficiente de extinção molar calculado ($\epsilon_{\text{calculado}}$) e os respectivos valores de σ_e estão apresentados na Tabela 2 juntamente com seus respectivos valores teóricos (EXPASY, 2011), ambos para uma intensidade de absorção em 280 nm. A escolha desse comprimento de onda para determinação do coeficiente extinção molar se dá pelo fato da disponibilidade de comparação com outros trabalhos reportados na literatura, visto que grande parte destes determinaram o valor do coeficiente de extinção molar em 280 nm (EDELHOCH, 1967; GILL, 1989; MACH, 1992; GALO, 2009). Pode-se ver que o coeficientes de extinção molar (ou seção de choque) das enzimas *ThCBHI* é máximo para pH=5 e cai 30% desse valor para pH=3 e 10% em relação ao pH=6,3, indicando uma significativa mudança da estrutura molecular da enzima neste pH. Os valores calculados pelos dados acima dos coeficientes de extinção para pH=5 é pelo menos uma ordem de magnitude maior que os valores de ϵ para cada resíduo de Phe, Tyr e Trp que são de $110,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $1300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente (LEVINE, 1982; GILL, 1989; PAGE, 1995). Conforme foi discutido acima, o coeficiente de extinção em 280 nm se deve principalmente às contribuições da Tyr e Trp. Como a densidade destas moléculas por enzima é alta, a probabilidade de um fóton ser absorvido na seção de choque da enzima é praticamente 1 (100%). Assim, o coeficiente de extinção molar medido será um parâmetro (ϵ) efetivo que corresponde à soma de todas as contribuições individuais no comprimento de onda avaliado (Levine, 1982). Portanto, pode-se prever um valor de ϵ para a enzima *ThCBHI* de $8,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para pH=6,5, considerando a soma das absorções de 24 Tyr e 10 Trp. Este valor estimado corresponde aos valores medidos de $8,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e teórico de $9,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dentro de um desvio de 5% em relação ao valor teórico. Como a medida de absorbância é absoluta (eixo das ordenadas na Figura 32), este desvio indica que a concentração da enzima *ThCBHI* (eixo das abscissas) foi avaliada corretamente e que a mesma encontra-se em um grau de pureza muito satisfatórios.

Tabela 2: Valores do coeficiente de extinção molar e seção choque de absorção efetiva da *ThCBHI* para diferentes valores de pH juntamente com os seus respectivos valores teóricos (EXPASY, 2011).

<i>pH</i>	$\epsilon_{\text{calculado}}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 10^4$	$\sigma_e(\text{cm}^2) \times 10^{16}$	$\epsilon_{\text{teórico}}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 10^4$	$\sigma_{\text{teórico}}(\text{cm}^2) \times 10^{16}$
3,5	$8,3 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$		
5	$12,2 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,1$	9.2	3.5
6,3	$11,0 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,2$		

Como é representado na Tabela 2, as variações encontradas nos valores $\varepsilon_{\text{calculado}}$ e σ_e forneceram informações importantes referentes às possíveis alterações estruturais da enzima *ThCBHI* devido os efeitos provenientes do pH. Essas informações estruturais estão intrinsicamente relacionadas com o quanto os resíduos responsáveis pela absorção estão exposto ao meio. Portanto, de acordo com o valor de σ_e , em pH 3,5 as enzimas *ThCBHI* mostraram-se estruturalmente mais compactada, condição na qual aos resíduos Try e Trp encontraram-se mais internalizados. Por outro lado em pH 5 e 6,3, estes mesmos resíduos encontraram-se mais exposto para absorção refletindo uma estrutura mais aberta das enzimas nestas condições de pH.

Nesta seção, descrevemos apenas os efeitos prévios referente à influência do pH sobre a estrutura das enzimas *ThCBHI*. Na seção 5.4, vamos apresentar os resultados relacionados ao CD, técnica a qual nos permitiu fazer uma análise mais precisas das mudanças estruturais da estrutura secundária da enzima *ThCBHI* devido ao pH e temperatura.

5.3 Excitação e Fluorescência da Enzima ThCBHI

Os resíduos Phe, Try e Trp possuem anéis aromáticos que conferem, além da alta seção de choque de absorção, propriedades de emissão de luz quando fotoexcitados por luz ultravioleta. As propriedades do estado excitado enzimático e de sua emissão de luz serão apresentadas nessa seção e serão utilizadas indiretamente neste trabalho como sonda na investigação da interação enzimática com o substrato lignocelulósico.

A Figura 33 apresenta os espectros típicos de excitação óptica (PLE) e de fluorescência (PL) na região do Uv próximo da enzima *ThCBHI* em função de sua concentração para temperatura de 25°C, medidos nas mesmas condições de pH: 3,5; 5 e 6,3 utilizadas na seção anterior. Os espectros de PL foram excitados no máximo da PLE em $\lambda_{\text{exc}}=279$ nm e se localizam na faixa espectral de 280-420 nm. Já a PLE foi detectada no comprimento de onda máximo de emissão $\lambda_{\text{em}}=342$ nm e o comprimento de onda de excitação foi variado de 245 a 300 nm.

Conforme é esperado, observa-se que a intensidade da PLE e da PL aumenta com a concentração de enzimas na solução seguindo o comportamento da absorção para todos os pHs utilizados. Além disso, a PLE possui praticamente a mesma forma de linha espectral da absorbância (Figura 30). Porém, a emissão encontra-se deslocada significativamente da região

de absorção (deslocamento de Stokes), o que indica que processos ópticos de relaxação energética e migração de energia estão ocorrendo na enzima. Isto também é esperado para um sistema fechado com alta densidade de resíduos aromáticos onde processos de decaimento não radiativos podem ocorrer. O λ_{em} observado em 342 nm recebe forte contribuição dos níveis eletrônicos dos resíduos Trp e Tyr uma vez que a migração e relaxação levam ao decaimento em estados de menor energia. Isto também é esperado para um sistema fechado com alta densidade de resíduos aromáticos. Assumindo o raio de 2,5 nm para a CBHI, pode-se estimar uma densidade de resíduos aromáticos da ordem de $0,76 \text{ moléculas/nm}^3$, o que nos permite avaliar um raio de transferência de energia tipo Foerster da ordem de 0,7 nm, que está dentro das distâncias típicas de 5-10 Angstroms para a interação dipolo-dipolo entre par doador-aceitador em sistemas moleculares. Além disso, é possível observar um ombro no espectro de excitação em torno de 254 nm o qual é atribuído ao resíduo Phe, reportado na literatura (LAKOWICZ, 2006).

Figura 33: Espectro de excitação PLE (esquerda) entre 245-300 nm ($\lambda_{em}=342\text{nm}$) e fluorescência PL (Direita) entre 280-455 nm ($\lambda_{PLE}=279 \text{ nm}$) de enzima *ThCBHI* em pH: (a) 3,5; (b) 5 e (c) 6,3 nas temperatura de 25°C.

Por fim, os espectros de PLE e PL não sofreram alterações significativas nas condições de pH utilizadas, tais com deslocamento espectral para regiões de abaixas energias (COLUSSI, 2012). Isto é uma indicação de que os resíduos Phe, Try e Trp, e a enzima *ThCBHI* não sofreram alterações significativas, como protonação e desprotonação, nestas condições de pH e temperatura.

5.4 Mudanças Conformacionais da Enzima ThCBHI – Dicroísmo Circular

Estruturas secundárias α -hélice e folha- β das enzimas *ThCBHI* podem fornecer mais informações referentes a influência do pH e temperatura nas propriedades estruturais, estabilidade e atividade. Através da relação entre as intensidades de luz circularmente polarizadas para a direita e para a esquerda em medidas de dicroísmo circular (CD), podemos estabelecer as frações das estruturas α -hélice e folha- β que compõe a enzima e quanto elas variam quando as condições de pH e temperatura são alteradas.

A Figura 34 mostra respectivamente os espectros de CD da enzima *ThCBHI* nas temperaturas de (a) 25°C e (b) 50°C para os valores de pH compreendidos na faixa de pH 3-10. Os espectros de CD foram obtidos na região Uv na faixa espectral de 202-250 nm do espectro eletromagnético. As posições das transições ópticas referentes às estruturas α -hélice e folha- β estão mostradas pelas barras verticais.

Os espectros apresentaram somente a região negativa para ambas as temperaturas e para todos os valores de pH utilizados. Através do programa CDpro foi possível determinar as frações das estruturas secundárias presentes nas enzimas *ThCBHI*, correspondentes a 2,2% para a estrutura α -hélice e 39,3% para folha- β e que estão, portanto, em concordância trabalhos anteriores (DIVNE, 1994; BOXU, 1997; PINGALI, 2011; COLUSSI, 2012). Nesse contexto, para analisar a influência do pH sobre as estruturas secundária das enzimas *ThCBHI* nas temperaturas de 25 °C e 50 °C, monitoramos variações espectrais associadas às estruturas α -hélice e folha β (TINOCO, 1960; TINOCO, 1960; BASCH, 1967; HAVEL, 1996; BESLEY, 1999; KELLY, 2005) com relação ao espectro da estrutura enzimática responsável pela máxima hidrólise, ou seja, nas condições de pH=5 e de temperatura a 50 °C (ANDREAU, 1999; BOER, 2003; COLUSSI, 2012). Nesse caso, verificou-se que a elipicidade referente a estrutura α -hélice ficou em torno de -10,3 mdeg enquanto que a estrutura folha β a elipicidade foi de -18,7 mdeg.

Figura 34: Espectros de CD da enzima *ThCBHI* em função do pH para as temperaturas de (a) 25°C e de (b) 50°C. As posições das transições ópticas referentes às estruturas α -hélice em 222 nm e folha- β em 215 nm estão mostradas pelas barras verticais.

Nota-se que o pH influenciou significativamente a estrutura α -hélice presente nas enzimas *ThCBHI* para valores de pH maiores que 8 à temperatura ambiente (25°C). Os valores de elipcidade nos espectros de CD permaneceram em torno de valores típicos de -12 mdeg (COLUSSI, 2011) para $\text{pH} < 8$ e variaram até -8 para $\text{pH} > 8$. Em relação à estrutura folha β , o valor da elipcidade variou 12% em torno de -19,2 mdeg para $\text{pH} < 8$. No entanto, como veremos na seção 5.6, estas variações estruturais não afetaram significativamente a hidrólise das FE pelas enzimas *ThCBHI*. Por outro lado, os valores da elipcidade para a estrutura folha β também apresentaram variações significativas para os valores de $\text{pH} > 8$. Para a temperatura de 50°C, as estruturas enzimáticas foram preservadas somente para valores de pH entre 3 e 5.

Podemos concluir que a estabilidade das estruturas secundárias da enzima *ThCBHI* não foram afetadas para valores de pH menores que 8 a 25 °C, enquanto que para valores de $\text{pH} > 8$ a sua estrutura foi totalmente perdida. Por outro lado, na temperatura de 50°C, a estrutura secundária foi completamente conservada somente para valores de pH 3 e 5, apresentando variações para os demais valores de pH. As variações estruturais apresentadas pelas enzimas *ThCBHI* em relação a estrutura de referência em diferentes condições de pH nas temperaturas de 25°C e 50°C, podem ser atribuídas à ionização de resíduos específicos pertencentes as mesmas, causando, portanto, instabilidade estrutural devido os efeitos de

repulsão eletrostática. Como veremos na próxima seção, tais modificações estruturais influenciaram no processo de adsorção das enzimas *ThCBHI* sobre o Avicel e as FE e, consequentemente, na sua atividade catalítica sobre o último substrato.

5.5 Adsorção da Enzima ThCBHI sobre os substratos celulósicos.

O processo de adsorção das enzimas *ThCBHI* sobre a biomassa lignocelulósica é de suma importância, pois esta é a primeira etapa para que a hidrólise da celulose presentes nestes materiais ocorra. Devido a sua enorme sensibilidade ao pH e temperatura, a enzima *ThCBHI* pode ter a sua adsorção regulada pelo pH e temperatura, visto que esses parâmetros influenciam na protonação tanto da enzima quanto do substrato e na sua estabilidade térmica. Nesta seção vamos apresentar resultados referentes ao Método de Arraste Enzimático desenvolvido no presente trabalho para se determinar as interações e as condições de adsorção de enzima *ThCBHI* sobre as FE e do Avicel.

5.5.1 Adsorção enzimática pelo Método de Arraste

Conforme foi descrito na seção 4.2.3, o método de arraste enzimático permite obter informação quantitativa da adsorção enzimática sobre substratos celulósicos através de medidas simples de fluorescência ou absorbância das enzimas na solução sobrenadante, após a centrifugação do material celulósico. A Figura 35 mostra os espectros de PLE e PL das enzimas *ThCBHI* em pH 3,5; 5, e 6,5 nas temperaturas de 25 °C e 50 °C em função da adição de alíquotas de FE em uma solução. Nesse experimento, a solução inicial foi tomada como referência (espectros de linhas pretas) e a concentração de enzima *ThCBHI* foi fixada no valor $7.9 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ($\sim 5 \times 10^{14}$ moléculas) para todos os valores de pH e temperaturas utilizados. Os comprimentos de onda de excitação da PL e de detecção da PLE foram tomados nos máximos da PLE e da PL em torno de 279 e 342 nm respectivamente. Nota-se que as intensidades espectrais da solução sobrenadante caem monotonicamente após a adição gradativa de FE e a sua centrifugação. Portanto, a intensidade da PL ou da PLE após cada adição de FE é proporcional à concentração de enzimas que não interagiram com o material celulósico.

Figura 35: Espectros de PLE e PL da enzima *ThCBHI* em função da concentração de substrato FE. Os comprimentos de onda de máxima da PLE e da PL estão centrados em 279 e 342 nm, respectivamente. **Em 25°C:** (a.1) pH 3,5; (a.2) pH 5,0; (a.3) pH 6,3. **Em 50°C:** (b.1) pH 3,5; (b.2) pH 5,0; (b.3) pH 6,3.

Para melhor visualizar a variação da intensidade da PL em função da concentração de FE, a Figura 36 apresenta o valor da intensidade do máximo da PL normalizada pela intensidade da PL para a solução de referência sem a fibra (pontos), obtida através da Figura 35. As curvas contínuas são ajustes exponenciais utilizados para guiar os olhos.

Figura 36: Máximos da intensidade da PL em função da concentração de (a) FE e (b) Avicel pela intensidade da PL para a solução de referência sem substratos (pontos) medidos nas temperaturas de 25°C e 50°C para cada valor de pH. As curvas contínuas são ajustes exponenciais utilizados para guiar os olhos. Comportamento experimental do arraste enzimático sobre as FE nas temperaturas de 25°C e 50°C.

A partir da Figura 36 (a) pode-se observar que o maior arraste enzimático ocorre para valor de pH= 3,5, para o qual a intensidade da PL decai abruptamente para valores próximos de zero para uma concentração de FE 2,7 g.L⁻¹. É interessante notar que isso ocorre igualmente para 25 °C e 50 °C e corresponde a uma redução de aproximadamente 95% do número inicial de enzima existente inicialmente na solução de referência. Nesse caso, pode-se dizer que a interação enzimática com a fibra celulósica é máxima. Essa interação cai substancialmente para valores de pH iguais a 5 e 6,3. Nesses casos, as concentrações de fibra para as quais a intensidades da PL do sobrenadante caíam 95% aumentam e podem ser obtidas através de extrapolação de uma exponencial do gráfico apresentado em 36 (a) na escala $\log(I/I_0)$ pela concentração. A concentração de fibras que corresponde uma queda da intensidade de 95% em relação à intensidade de referência é denominada de concentração de arraste total ou C_A . Os valores de C_A estão mostrados na Tabela 3 para as duas temperaturas e pH usados.

Podemos estimar a fração de cobertura da fibra pelas enzimas a partir dos valores da concentração de arraste C_A . A cobertura da fibra Cob é dada pela razão $Cob=A_{et}/A_{ft}$, onde A_{et} e A_{ft} correspondem respectivamente a área total de enzima e fibra. A área total de enzimas vale $A_{et} = N_e \times A_e$, onde N_e é o número de enzimas na solução inicial sem fibra e A_e é a área estimada da enzima. Já a área total de fibras vale $A_{ft} = N_f \times A_f$, onde N_f é o número de fibras na solução e A_f é a área estimada de uma única fibra de eucalipto. Mas, N_f pode ser estimado pela razão entre o volume de fibras V_{ft} na concentração C_A e o volume de uma única fibra V_f , ou seja, $N_f = V_{ft}/V_f$. Assim, $A_{ft} = V_{ft} \times R_{AV}$, onde $R_{AV} = A_f/V_f$ é a razão área/volume da fibra. O volume total de fibras V_{ft} pode ser calculado pela razão entre a massa de fibra m_{ft} necessária para reduzir I/I_0 de 95% e a densidade do material celulósico ρ_f . Portanto, a fração de cobertura da fibra pela enzima pode ser avaliada pela expressão:

$$Cob = \frac{N_e A_e \rho_f}{m_{ft} R_{AV}} \quad (13)$$

A fração de cobertura Cob pode ser calculada em termos das concentrações de enzimas C_e e da concentração C_A de fibra na solução para se obter 95% de arraste. Assim, o número de enzimas N_e pode ser estimado pelo produto entre a concentração da enzima em [g/l], C_e , o número de Avogadro, N_A , o volume da solução V_{sol} , ou seja, $N_e = (C_e \times N_A \times V_{sol})/M_{me}$, onde M_{me} é o peso molecular da enzima *ThCBHI*. Considerando

que $m_{fi} = C_A \times V_{sol}$, o valor da fração de cobertura da fibra pela enzima pode ser reescrita da forma:

$$Cob = \frac{A_e N_A \rho_f C_e}{M_{me} R_{AV} C_A} \quad (14)$$

A cobertura pode ser incompleta ($Cob < 1$), completa ($Cob = 1$) ou apresentar superposição das enzimas em camadas ou em forma de aglomerados tridimensionais sobre a fibra ($Cob > 1$). Como a concentração da enzima $C_e = 7.9 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ é fixa no experimento de arraste, a cobertura só depende do inverso da concentração de arraste C_A da fibra de eucalipto. Portanto, quanto maior C_A no experimento de arraste, menor será a interação, ou seja, dependendo das condições de pH e temperatura é preciso aumentar a concentração de fibra na solução contendo as enzimas para se obter 95% de arraste da mesma. Conforme pode ser visto na Figura 37, as fibras de eucalipto possuem simetria cilíndrica, com diâmetros médios da superfície externa $r_e = 5 \mu m$ e da superfície interna $r_i = 3 \mu m$. Com essa geometria, a razão área/volume de uma fibra isolada é $R_{AV} = 2/(r_e - r_i)$ e vale $1 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$. Esse valor é 75 vezes menor que a razão área/volume de uma esfera de 20 nm diâmetro. É importante salientar que R_{AV} independe do comprimento da fibra. A densidade de fibra de celulose pode ser estimada considerando que as fibras de eucalipto são exatamente as mesmas que produzem o papel e, portanto, de densidade $0,75 \text{ g/cm}^3$. Esse número é bastante razoável, pois o papel flutua na água quando a mesma não penetra por entre as fibras.

Figura 37: A imagem de microscopia confocal de fluorescência de campo amplo (a) mostra a distribuição da FE. Em (b) pode ser visto um corte confocal de fluorescência a qual é atribuída a lignina presente na parede da FE e em (c) a imagem montada a partir da metodologia Z-Stack (ALVES, 2011). A partir dessas imagens foi possível assumir que a FE assumem uma simetria cilíndrica.

Já a estimativa da área efetiva ocupada pela enzima *ThCBHI* pode ser feita como o produto entre a dimensão do domínio catalítico de 5 nm e as dimensões ortogonal que contempla o CBM de 10 nm, ou seja, $A_e = 5 \times 10^{-13} \text{ cm}^2$, conforme ilustrado na Figura 38.

Figura 38: Área efetiva da enzima *ThCBHI*. Considerando o comprimento de 10 nm de uma única enzima e o tamanho de 5 nm do seu domínio catalítico pode-se estimar a área total de enzimas contidas na solução com um número 5×10^{14} enzimas. O valor do comprimento da enzima *ThCBHI* foi determinado pelo Grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos – USP.

Como o número total de enzimas arrastadas é de 5×10^{14} , então a área total de enzimas colocadas lado-a-lado é de $A_{et} = 250 \text{ cm}^2$, o que é aproximadamente igual à $A_{ft} = (m_{ft} \times R_{AV}) / \rho_f$ (área total de fibras) que tem o valor de 267 cm^2 para a fibra em pH=3,

significando que a enzima recobre quase que totalmente a sua área, ou seja, um recobrimento estimado de aproximadamente ~94%. Esta estimativa do recobrimento é surpreendente e coincide com o esperado se a interação é somente superficial.

A Tabela 3 contém os valores da concentração de arraste máximo C_A da enzima *ThCBHI* pela fibra de eucalipto obtidos da Figura 36 (a) pela extrapolação exponencial para uma queda de I/I_o igual a 95% para os diferentes valores de pH e temperatura. Além disso, a tabela mostra os valores correspondentes da fração de cobertura *Cob* obtidos a partir da estimativa realizada acima através da equação (14).

Tabela 3: Valores de concentração de FE para o arraste de 95% juntamente com fração da cobertura das FE.

pH	$C_A(\text{g.L}^{-1})$	$C_A(\text{g.L}^{-1})$	% de Cob	% de Cob
	25°C	50°C	25°C	50°C
3,5	2,4	2,5	98,7	95,1
5,0	17,5	31	13,4	7,6
6,3	57,1	143,5	4,1	1,6

Para uma melhor compreensão de C_A e *Cob*, os seus respectivos valores estão apresentados na Figura 39 (a) e (b) em função do pH e temperatura. Pode-se observar que C_A é pequeno para pH=3 e aumenta através de uma lei exponencial crescente da forma $\exp(pH/pH_o)$, onde pH_o é uma constante adimensional. Isso quer dizer que a interação enzimática com a fibra celulósica decresce consideravelmente quando o pH é deslocado para a faixa de pH correspondente à máxima atividade da enzima *ThCBHI* (COLUSSI, et al., 2012). Pode-se ver também que a interação enzimática muda consideravelmente com a temperatura.

Este resultado tirado do experimento de arraste enzimático é equivalente ao comportamento inverso da fração de cobertura com o pH mostrada na Figura 39 (b). A cobertura é máxima (~95%) para pH=3,5, indicando uma forte interação da enzima com a fibra enquanto que a cobertura (interação) cai exponencialmente para maiores valores de pH.

Figura 39: Concentração de FE (C_A) para o máximo arraste em (a) e fração da cobertura (Cob) das FE (b) em função do pH nas temperaturas de 25°C e 50°C. Em ambas as temperaturas, a fração de cobertura Cob das FE apresenta uma dependência inversa de C_A , ou seja, enquanto que os valores de C_A cresce quando o pH é deslocado para regiões alcalinas os valores de Cob decai de acordo com a lei exponencial.

Como pode ser visto na Figura 39 (b), as variações da cobertura em função do pH em ambas as temperaturas é atribuída as fortes interações eletrostática entre as enzimas e FE. Como é conhecido, o domínio catalítico e o CBM possuem potenciais isoeletrônicos (pI) de 4,3 e 6,4 (PINGALI., 2011), respectivamente, enquanto que a porção celulósica da FE apresenta um pI de 3,2 (MOSUR, 2008). Assim, para a condição de máxima cobertura em ambas as temperaturas o domínio catalítico e o CBM das enzimas *ThCBHI* estão carregados positivamente enquanto que a celulose está carregada negativamente e, por esse motivo a maior parte da FE estão cobertas pelas enzimas *ThCBHI* devido às fortes interações eletrostática estabelecida entre o sistema enzima-FE. Além disso, a cobertura da FE sofre uma redução significativa em pH=5 para as duas temperaturas em relação a cobertura na condição de pH=3,5. Essa redução da interação nesta condição de pH já era de se esperar, visto que o domínio catalítico apresenta carga negativa e o CBM uma distribuição de carga positiva, ficando somente o CBM da enzima responsável pela interação atrativa com a FE. Por fim, a cobertura total das FE é reduzida para valores abaixo de 5% em pH= 6,3 em ambas as temperaturas e tende a valor zero para regiões de pH alcalinos. Essa baixa interação enzimática com a FE é atribuída as fortes repulsões eletrostática estabelecidas entre o domínio

catalítico pertencentes a enzima com as FE. Além disso, em pH=6,3 o CBM da enzima encontra-se neutro de carga devido o valor do pI desse anexo enzimático ser igual a 6,4, com isso a magnitude de interação entre a enzima e substrato é baixa, justificando portanto a redução da cobertura em pH=6,3.

Com objetivo de estabelecer uma comparação do perfil do arraste enzimático realizado para a FE, o mesmo procedimento descrito na seção 4.2.3 foi realizado para o Avicel. Essa comparação é importante no âmbito de diagnosticar se outros compostos moleculares restante do processo de deslignificação da FE não estão influenciando no comportamento de interação das enzimas com esses substratos. A escolha do Avicel como referência para o presente estudo da interação enzimática é devido seu alto grau de pureza (>70%) o que indica que este material é composto basicamente de celulose microcristalina. No entanto, a mesma abordagem realizada para a FE não será realizada para o Avicel, pois este material não apresenta uma forma geométrica regular o que impossibilita a utilização de uma simetria conhecida para determinar o parâmetro *Cob*. Portanto, os aspectos que envolvem a interação entre as enzimas *ThCBHI* com o Avicel serão apresentados de forma qualitativa em termos de C_A do Avicel para que o arraste seja 95% efetivo.

Os espectros de PLE e PL da solução contendo enzimas em função da adição de alíquotas de Avicel foram obtidos nas mesmas condições de temperatura, pH e mesma concentração de enzimas daqueles obtidos para as FE. No entanto, estes espectros foram negligenciados por apresentarem o mesmo comportamento espectral daqueles mostrado na Figura 35 referente a FE, para a qual o comprimento de onda de máxima PLE e PL estão respectivamente em 279 nm e 342 nm. Para uma melhor abordagem do efeito de arraste enzimático sobre o Avicel, a Figura 36 (b) apresenta a intensidade da PL normalizada pela intensidade da PL da solução de referência em função da concentração de Avicel. As curvas contínuas são ajustes exponenciais utilizados apenas como guia para os olhos.

Como pode ser visto na Figura 36 (b) o arraste da enzima *ThCBHI* sobre o Avicel exhibe o mesmo comportamento do arraste obtido para as FE, decaindo exponencialmente com o aumento da concentração de Avicel. A priori é possível notar que o decaimento I/I_0 para esse substrato é menos efetivo em relação ao decaimento encontrado para as FE apresentando um arraste de 88% em pH=3,5 em ambas as temperaturas. Esse valor corresponde um desvio de 6% em relação ao arraste obtido para as FE. A concentração de máximo arraste C_A para o avicel (95% da redução da intensidade) foi determinado a partir da extrapolação do gráfico apresentado na Figura 36 (b) na forma de $\log(I/I_0)$. Os valores de C_A estão apresentados na

Tabela 4.

Tabela 4: Valores de concentração de Avicel para o arraste de 95%

pH	$C_A(\text{g.L}^{-1})$ 25°C	$C_A(\text{g.L}^{-1})$ 50°C
3,5	6,24	6,41
5	44,6	77,6
6,3	56,5	128,8

Os valores de C_A para Avicel aumentam quando o pH é deslocado de 3,5 para 6,3 em ambas as temperaturas e exibem o mesmo comportamento de C_A encontrados para as FE. Porém os valores de C_A para que a razão I/I_o caia 95% são superiores dos valores encontrados para a FE e implica que, de acordo com a equação (14), a cobertura do Avicel é menor em relação a FE. Isso significa que a área total A_{ft} do Avicel é menor do que a área total estimada para a FE.

Essas variações de interação enzimática em relação a FE e o Avicel, dado em termos do parâmetro Cob , pode ser justificado pela presença de outros pontos de interação que está presente na FE, tais como lignina, hemicelulose e outros resíduos proveniente do processo de deslignificação e que se encontram ausentes no Avicel. Esses pontos adicionais de interação dependem do pH e portanto podem ditar a eficiência de interação entre a enzima com a FE via processos de protonação e desprotonação de grupos funcionais específicos que estão presentes na FE, porém, ausentes no Avicel.

5.5.2 Determinação do Número de Enzima sobre substratos celulósicos

Na seção anterior, fizemos a estimativa da fração de cobertura da enzima sobre fibras de eucalipto a partir da concentração de máximo arraste C_A definida a partir da Figura 37 (a) e de considerações geométricas das fibras a partir da razão R_{AV} . Porém, é interessante utilizar os mesmos dados das medidas ópticas para obter valores quantitativos como, por exemplo, a taxa de arraste enzimático por materiais celulósicos em função do pH e temperatura. Nesta seção, vamos determinar, além dessa taxa, o número de enzimas adsorvidas sobre os substratos de FE e de Avicel utilizando as medidas de PL e de absorbância obtidas no método de arraste enzimático proposto neste trabalho. A determinação do número de enzimas adsorvidas sobre o substrato é de suma importância no que diz respeito à produção de etanol proveniente da

biomassa lignocelulósica uma vez que o processo de adsorção das enzimas sobre o substrato e a magnitude da interação são propriedades determinantes para que o processo de hidrólise da celulose presentes na biomassa seja realizado (MA, 2008).

Em trabalhos recentes como de TSUTAE (TSUTAE, 2011) realizados em nossos laboratórios, metodologias ópticas foram desenvolvidas para se determinar o número de moléculas adsorvidas em uma determinada superfície de uma nanopartícula via espectroscopia de absorção Uv/vis, possibilitando a determinação direta das propriedades da interação entre as moléculas e a superfície estudada.

No entanto, resíduos oriundos do material celulósico (lignina e partículas, por exemplo) podem produzir absorções e espalhamentos adicionais que limitaram o uso a espectroscopia de absorção Uv/Vis na região espectral em que as enzimas *ThCBHI* absorvem (MILOSLAV, 2008; ALVES, 2011). As Figuras 40 (a) e (b) apresentam como estes efeitos interferiram na obtenção de dados confiáveis e reproduzíveis por meio do arraste enzimático das enzimas *ThCBHI* sobre a FE e Avicel, respectivamente, por meio de medidas de absorção na região espectral Uv. Pode-se observar um deslocamento da linha de base dos espectros devido ao espalhamento e aparecimento de novas bandas na solução sobrenadante após cada processo de centrifugação.

Figura 40: Espectros de absorbância no Uv da solução enzimática sobrenadante após a centrifugação dos substratos de (a) F.E e (b) Avicel. Os espectros foram obtidos para pH=3,5, porém para os demais valores de pH, o efeito produzido pela lignina e celulose foram o mesmo.

Por outro lado, estes resíduos provindos do material celulósico não afetaram o arraste enzimático via PL, conforme foi visto na seção 4.5.1. Neste contexto vamos aqui apresentar o desenvolvimento de um procedimento que nos permitiu determinar o número de enzimas *ThCBHI* adsorvidas sobre a FE e Avicel através do ajuste dos gráficos apresentados nas Figuras 36 (a) e (b).

Portanto, o método de arraste enzimático fornece recursos para a análise da interação entre as enzimas e seus substratos através da análise da intensidade da PL do sobrenadante após consecutivas adições de substratos na solução. É de se esperar que a taxa de variação da concentração enzimática no sobrenadante após cada adição de uma pequena fração do material celulósico dC_s seja diretamente proporcional à concentração da enzima C_e da seguinte forma:

$$\frac{dC_e}{dC_s} = -kC_e \quad (15)$$

onde k é a constante de proporcionalidade que tem unidade do inverso da concentração de substrato C_s , ou $l.g^{-1}$. Essa relação já foi utilizada por GAMBARATO e colaboradores (GAMBARATO, 2012) para determinar a concentração de lignina presente em materiais lignocelulósicos após esse ter passado por um tratamento de deslignificação.

Utilizando a lei de Beer-Lambert, escrevemos a concentração de enzimas do sobrenadante da seguinte maneira:

$$C_e = \frac{A}{\varepsilon l} \quad (16)$$

Substituindo (16) em (15) e isolando os parâmetros que envolvem a absorção dos que depende da concentração de substratos temos que:

$$\frac{dA}{A} = -kdC_s \quad (17)$$

Integrando os dois lados da relação (17), temos que

$$\ln\left(\frac{A_0}{A}\right) = k(C_s - C_{so}) \quad (18)$$

Em que A_o e C_{so} são constantes de integração. Do experimento, temos que $A=A_o$ para a condição inicial em que a concentração inicial de fibra C_{so} é igual a zero na solução enzimática. Assim, a equação (18) pode ser escrita da forma exponencial:

$$A = A_o e^{kC_s} \quad (19)$$

Fazendo algumas considerações na equação (19), este é o comportamento exponencial mensurado na medida da absorbância com a concentração do substrato no experimento de arraste sem interferência de outros efeitos introduzidos por resíduos da fibra, como foi discutido acima. Desta forma, a constante k é denominada de taxa de arraste. Porém, a intensidade da PL é sempre proporcional à absorção efetiva da luz de excitação, ou seja, ela é pouco sensível a efeitos de espalhamento ou resíduos quando os mesmos emitem em uma região espectral distinta da enzima. Nesse caso, é mais conveniente usar a PL no experimento de arraste.

Vamos considerar aqui que os efeitos de resíduos proveniente do processo de deslignificação pouco interfere nesse experimento para o intervalo de concentrações limitado pela concentração máxima de substrato, C_{sm} , que produz uma queda na absorbância na solução sobrenadante de A_o para o valor A_m de acordo com (19)

$$\frac{A_m}{A_o} = e^{-kC_{sm}} \quad (20)$$

Com isso, através da relação (20), encontramos uma expressão para a constante de proporcionalidade em termos de parâmetros que podem ser obtidos experimentalmente. Assim, a expressão da taxa de arraste k da enzima na solução para o substrato pode ser escrita da em termos do valor da absorbância A_o para concentração de enzima inicial sem substrato e do valor A_m referente à concentração do substrato C_{sm} nessa solução:

$$k = \left(\frac{1}{C_{sm}} \right) \ln \left(\frac{A_o}{A_m} \right) \quad (21)$$

A priori, as relações encontradas até aqui não resolveram o problema da determinação do número de enzimas sobre o substrato via o arraste enzimático realizado no presente

trabalho. Para contornar esse problema, consideramos os resultados apresentados nas Figuras 41 (a) e (b), os quais foram obtidos através do experimento descrito na seção 4.2.1. Os gráficos apresentam respectivamente a intensidade máxima da PL das enzimas *ThCBHI* em 342 nm e a máxima intensidade da absorbância em 279 nm para os valores de pH 3,5, 5 e 6,3 nas temperaturas de 25°C. Nesse caso, o comprimento de onda do máximo da intensidade de absorbância foi àquele responsável pela máxima intensidade da PL. Pode-se ver que a variação da PL segue fielmente o comportamento da absorbância.

Figura 41: Intensidade da (a) PL em medida em 342 nm e da (b) absorbância medida em 279 nm em função da concentração das enzimas *ThCBHI*.

Conhecendo-se a priori as dependências lineares mostradas na Figura 41 (a), pode-se escrever os seus respectivos coeficientes angulares para cada condição de pH para a PL:

$$a(pH) = \frac{\Delta I}{\Delta C_e} = \frac{I - I_0}{C_e - C_{eo}} = \frac{I}{C_e} \quad (22)$$

O mesmo foi feito para as retas referentes à absorbância apresentada na Figura 41 (b)

$$b(pH) = \frac{\Delta A}{\Delta C_e} = \frac{A - A_o}{C_e - C_{eo}} = \frac{A}{C_e} \quad (23)$$

Dos dados acima, $A_o=0$ para concentração de enzimas $C_{eo}=0$. Além disso, o valor do coeficiente angular b_{pH} é proporcional ao valor do coeficiente de extinção molar das enzimas, ou seja, é igual a $l\varepsilon(pH)$.

Levando em consideração uma mesma concentração de enzimas, dividimos a equação (22) pela relação (23) e encontramos a correspondência entre a intensidade da PL e a intensidade da absorbância para o sobrenadante:

$$I = \left(\frac{a(pH)}{l\varepsilon(pH)} \right) A \quad (24)$$

A Tabela 5 resume os valores de $a(pH)$, $\varepsilon(pH)$ e de k obtidos para os diferentes pHs e temperaturas para os substratos FE e Avicel.

Tabela 5: valores de $a(pH)$, $\varepsilon(pH)$ e de k obtidos para os diferentes pHs e temperaturas para os substratos FE e Avicel.

pH	$a_{342nm} \times 10^8$ (mol.L ⁻¹) ⁻¹		$\varepsilon_{342nm} \times 10^4$ (M ⁻¹ . cm ⁻¹)		FE		Avicel	
	25°C	50°C	25°C	50°C	$k_{25^\circ C}(\text{g.L}^{-1})^{-1}$	$k_{50^\circ C}(\text{g.L}^{-1})^{-1}$	$k_{25^\circ C}(\text{g.L}^{-1})^{-1}$	$k_{50^\circ C}(\text{g.L}^{-1})^{-1}$
3,5	3,1	3	8,2	8,5	$1,33 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,1$	$0,53 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,02$
5	3,93	3,9	12,7	12,5	$0,20 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
6,3	3,83	3,8	11,6	11,8	$0,22 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$

A Figura 42 mostra a dependência da taxa de arraste k com o pH para as diferentes temperaturas e substratos FE e Avicel. Os valores de k são menores para o Avicel em comparação com a FE.

Figura 42: Dependência da taxa de arraste k com o pH para as diferentes temperaturas e substratos de FE e Avicel.

Podemos, então, associar uma medida direta da intensidade da PL da solução sobrenadante com a sua absorbância, ou vice-versa através da equação (24). Com isso, temos condições de avaliar diretamente o número de enzimas que interagem com o material celulósico através da concentração de enzimas inicial C_{eo} (em mol.L⁻¹) e da concentração de enzimas na solução sobrenadante C_{esn} (em mol.L⁻¹) através de medidas puramente ópticas. Assim, o número de enzimas sobre o substrato celulósico N_{es} é igual ao número de enzimas total $N_{eo} = N_A V_{sol} C_{eo}$ menos o número de enzimas na solução sobrenadante de volume V_{sol} após a adição de substrato, ou seja, $N_{esn} = N_A V_{sol} C_{esn}$, da forma

$$N_{es} = N_{eo} - N_{esn} = N_A V_{sol} (C_{eo} - C_{esn}) \quad (25)$$

onde N_A é o número de Avogrado. Em termos da medida de absorbância e de uma concentração de substrato C_{sm} (equações (16) e (20)), esta equação pode ser reescrita na forma

$$N_{es} = \frac{N_A V_{sol} A_o}{\varepsilon(pH)l} (1 - e^{-kC_{sm}}) = N_{eo} (1 - e^{-kC_{sm}}) \quad (26)$$

Já em termos das medidas de PL, a equação (24) nos permite calcular

$$N_{es} = \frac{N_A V_{sol} I_o}{a(pH)} (1 - e^{-kC_{sm}}) = N_{eo} (1 - e^{-kC_{sm}}) \quad (27)$$

As equações (26) e (27) são muito importantes, pois nos permite calcular indiretamente a concentração de enzimas adsorvidas sobre o substrato lignocelulósico através das medidas de A_o e I_o a partir solução inicial de enzimas e da constante de decaimento k através do ajuste dos gráficos do arrastes enzimático e que está mostrado na Tabela 5. O valor de N_{eo} nas equações (26) e (27) calculados a partir dos valores de A_o e I_o coincide com o valor de 5×10^{14} enzimas estabelecido previamente.

A Figura 43 contém em escala semi-log a fração de enzimas de *ThCBHI* adsorvidas nos substratos FE e Avicel em função do pH nas temperaturas de 25 °C e 50 °C. O número de enzimas adsorvidas tem a mesma dependência que a fração de cobertura estimada anteriormente para a FE mostrada na Figura 39 (b). É interessante notar que a fração de enzimas sobre o substrato é alta para pH=3,5 para os dois casos.

Figura 43: Fração de enzimas de *ThCBHI* adsorvidas nos substratos FE e Avicel em função do pH nas temperaturas de 25 °C e 50 °C.

Foi possível notar que o máximo de enzimas adsorvidas em ambos os substratos ocorre em pH=3,5. Este número reduz substancialmente com o aumento do pH na solução enzimática. Este comportamento reflete basicamente a interação da enzima com o substrato. Pela estimativa da razão de cobertura realizada acima, a enzima recobre quase que a totalidade da área da fibra de eucalipto (Cob~1), indicando que a interação nessa região de pH

é forte e que praticamente todo ponto sobre a fibra é sítio de interação. O caráter da interação muda substancialmente com o aumento do pH entre 3,5 e 6,5 e apenas sítios específicos são ocupados pelas enzimas, o que reduz fortemente a fração de cobertura sobre a fibra.

Essas variações na adsorção ocorrem provavelmente devido o efeito de protonação dos radicais expostos sobre o substrato e da enzima *ThCBHI* com a variação do pH. Grupos hidrofílicos, tais como hidroxílicos, estão presentes nas moléculas constituintes da FE (lignina, hemicelulose e celulose) e tem o número de ligações de hidrogênio alterado de acordo com o valor pH, influenciando portanto na distribuição de carga das F.E. Em particular, considerando o tratamento de deslignificação da FE (ALVES., 2011), a porção da celulose exposta encontra-se negativamente carregada para valores de pH acima do valor de seu ponto isoelétrico (pI) de 3,2. Grupos hidroxílicos compondo outras moléculas podem estar desprotonadas acima desse valor. O mesmo pode-se dizer para o Avicel que, por ser puramente celulósico, também sofre a desprotonação dos grupos hidroxílicos presentes na celulose.

Por outro lado, as enzimas *ThCBHI* são compostas basicamente pelo domínio catalítico e o CBM, que são conectados pela sequência polipeptídica glicosilada ou 'linker'. Os valores do ponto isoelétrico, pI, do domínio catalítico e do CBM são 4.3 e 6.4, respectivamente (PINGALI., 2011). Assim, o domínio catalítico encontra-se negativamente carregado para valores de pH acima de 4.3 e positivamente carregado para valores de pH abaixo deste enquanto que o CBM está positivamente carregado para valores de pH menores do que 6.4 e negativamente carregado para valores de pH acima de 6.4, conforme ilustrado na Figura 44 (a). Portanto, de acordo com o esquema da Figura 44 (b), o máximo número de enzimas *ThCBHI* adsorvidas sobre a celulose presentes nas FE e Avicel em função do pH pode ser justificado pelas fortes interações eletrostáticas estabelecidas entre enzimas-substratos.

Figura 44: (a) Ilustração do processo de interação enzima-substrato em função do pH. (b) Cobertura das enzimas sobre substrato para valores de pH 3,5, 5 e 6,3.

Em $\text{pH}=3,5$, tanto o domínio catalítico e quanto o CBM da *ThCBHI* se encontram positivamente carregados, interagindo fortemente com toda a superfície de ambos os substratos nas temperaturas de 25°C e 50°C . Para $\text{pH}=5$, o domínio catalítico passa a ter uma distribuição de carga negativa enquanto que o CBM ainda mantém a sua carga efetiva positiva, o que é responsável pela adsorção das enzimas nessa condição de pH. Porém, devido a repulsão entre domínio catalítico e substrato, a magnitude da interação é menor quando comparada à carga total em $\text{pH}=3,5$. Assim, número de enzimas adsorvidas sobre a celulose em $\text{pH}=5$ é menor devido a baixa interação eletrostática entre enzima e celulose. Por fim em $\text{pH}=6,3$, o CBM das enzimas está neutro e por esse motivo a intensidade da adsorção entre enzima e celulose é menor do que aquelas encontradas em $\text{pH} 3,5$ e 5 .

Nota-se que, para os valores de pH 5 e 6,3, o número de enzimas adsorvidas para um mesmo substrato cai quando a temperatura foi aumentada de 25°C para 50°C. Este efeito pode estar relacionado com a energia térmica adicional que dificulta o estabelecimento de ligação entre *ThCBHI* e os substratos (FE e Avicel.). No entanto, em pH 3,5, a energia eletrostática é forte o suficiente para compensar o aumento da energia térmica a 50°C e a eventual remoção da enzima do substrato. Esse mesmo efeito foi observado em (GÉRALDINE., 1999; KO., et al. 2011).

Finalmente, pode-se observar na Figura 43 que a adsorção enzimática é maior para o substrato de FE e do que para o Avicel para ambas as temperaturas. A diferença na eficiência de adsorção entre substratos se dá pela existência de outros radicais que não estão associados diretamente à celulose, tais como aqueles associados à lignina e à hemicelulose na FE. Por exemplo, a protonação de grupos hidrofílicos, como por exemplo, os grupos hidroxílicos (OH) presentes em seus anéis fenólicos da lignina e, portanto, altera o número de sítios de interação entre FE e enzima (ZHANG, 2011). Por outro lado, o Avicel apresenta como ponto de protonação somente, os grupos OH presentes na celulose, sendo assim menos eficiente a adsorção entre as enzimas e este substrato em relação a FE.

5.5.3 Interação enzima-substrato celulósico

Nas seções anteriores apresentamos os resultados do arraste enzimático a partir de metodologias ópticas e demonstramos que informações precisas podem ser obtidas sobre a fração de cobertura da enzima sobre substratos celulósicos e sobre o caráter da interação enzima-substrato. Este estudo se prendeu à regiões de pH (entre 3,5 e 6,5) e temperaturas de 25 °C e 50 °C que resultam na maior atividade enzimática (COLUSSI., 2012). Nessa seção, a faixa de pH será ampliada de 3 a 10 na tentativa de se obter informação sobre o efeito da estrutura enzimática na interação total.

Das relações (16) e (24), é fácil mostrar que a razão I/I_o entre a intensidade da PL I da enzima na solução sobrenadante após adição e a centrifugação do material celulósico e a intensidade I_o da solução enzimática de partida é exatamente igual à razão das correspondentes concentrações de enzimas nas duas soluções C_e/C_{eo} , sendo C_{eo} a concentração de partida da enzima. Consequentemente, I/I_o é igual a razão envolvendo o número de enzimas N_e/N_{eo} nessas soluções. Do mesmo modo, $(1 - I/I_o)$ é igual à razão N_{es}/N_{eo}

entre o número de enzimas sobre o substrato N_{es} e o número de enzimas total ou de partida N_{eo} . Assim, a dependência da razão I/I_o com o pH é uma assinatura fiel da interação média enzima-substrato e pode fornecer informações preciosas para o entendimento de processos como a hidrólise enzimática.

As Figuras 45 (a) e (b) apresentam a razão I/I_o em função do pH para a FE e o Avicel, respectivamente, para as temperaturas de 25 °C (quadrados) e 50 °C (círculos). Nesse experimento, a concentração de enzima foi fixada em $7,9 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, enquanto a concentração de fibra e de Avicel foi de 2 g.L^{-1} . Essa concentração foi suficiente para garantir um arraste de 95% das enzimas da solução sobrenadante pela FE em pH=3,5. Maiores detalhes deste experimento encontram-se descritos na seção 4.2.4. As curvas contínuas são ajustes que descrevem um comportamento sigmoidal para os pontos experimentais e representam um retrato fiel da interação enzimática sobre o substrato celulósico. No limite de pH baixo, I/I_o é pequeno o que corresponde a uma interação máxima enzima-substrato (arraste máximo). Já I/I_o possui comportamento assintótico próximo de 1 no limite de pH alto, indicando que a interação é mínima (arraste mínimo). As curvas pontilhadas correspondem às derivadas das curvas segmoidais e seus máximos indicam os pontos de inflexão das mesmas. Estes pontos de inflexão estão posicionados na região de pHs entre 5 e 6. É interessante notar que nesse intervalo encontra-se o valor de pH=5,4 que corresponde ao valor médio dos potenciais isoelétricos do domínio catalítico (pI=4,3) e do CBM (pI=6,4). Isto significa que a interação enzima-substrato é determinada basicamente pelas mudanças das cargas efetivas na enzima ao ultrapassar os pontos isoelétricos associados ao domínio catalítico e ao CBM, uma vez que o pI do substrato ocorre para pH=3,2. Além disso, a interação independe do substrato usado, seja ele a FE ou o Avicel, o que corrobora para a hipótese de que a saída da enzima da superfície do substrato só depende de seu estado de protonação. O deslocamento dos pontos de inflexão indica que os valores dos pontos isoelétricos estão sendo alterados com a temperatura. Isto é consistente com o deslocamento do pI para baixos valores de pH com o aumento da temperatura, pois a saída do próton dos radicais moleculares é induzida termicamente. Considerações mais detalhadas envolvendo aspectos energéticos das ligações com o substrato serão tratadas em trabalhos futuros.

Figura 45: Razão I/I_0 em função do pH para a FE (a) e o Avicel (b), respectivamente, para as temperaturas de 25 °C (quadrados) e 50 °C (círculos). As curvas contínuas são ajustes sigmoidal dos pontos experimentais. As curvas pontilhadas correspondem às derivadas das curvas segmoidais e seus máximos indicam os pontos de inflexão das mesmas.

Da mesma forma, a interação muda substancialmente com a temperatura. Como vimos nos resultados prévios mostrados acima, as enzimas estão menos adsorvidas ao substrato na faixa de pH entre 3 e 6 para 50 °C do que para 25 °C. Podemos dizer que os efeitos provenientes da interação eletrostática entre enzima e substrato mostrou-se predominante na faixa pH de 3-6. Nessa região, os espectros de CD mostram que as estruturas α -hélice e folha β foram preservadas. Para valores de $\text{pH} > 6$, a adsorção das enzimas inverte para a FE, mostrando que a interação enzimática é mais fraca a temperaturas de 25 °C. Mostramos que as enzimas sofrem profundas variações das estruturas α -hélice e folha- β para $\text{pH} > 8$ e na temperatura de 50 °C, o que possivelmente pode estar afetando a interação entre enzima-substrato. Porém, nessa faixa de pH a interação eletrostática é suficientemente fraca para se observar qualquer alteração estrutural na adsorção enzimática.

Na Figura 36, não foi possível distinguir as contribuições do domínio catalítico e do CBM na interação enzimática com o substrato. É interessante comparar o arraste da enzima *ThCBHI* com o arraste do seu centro catalítico CCD obtido a partir de processo de clivagem do CBM. A Figura 46 mostra o resultado do experimento de arraste da *ThCBHI* (pontos abertos) e do seu CCD (pontos fechados) para $\text{pH}=3,5$ (círculos) e $\text{pH}=6,3$ (quadrados), utilizando a FE como substrato. Pode-se ver que o arraste é muito menor para o CCD do que para a *ThCBHI* completa para as duas condições de pH. Isto significa que a forte interação observada em $\text{pH}=3,5$ recebe contribuições significativas do CBM. Além disso, pode-se

concluir que o desligamento do CBM da FE para $\text{pH} > 6$ (Figura 45) se deve à desprotonação do CBM acima do valor da sua $\text{pI} = 6,4$.

Figura 46: Experimento de arraste da *ThCBH1* (pontos abertos) e do seu CCD (pontos fechados) para $\text{pH} = 3,5$ (círculos) e $\text{pH} = 6,3$ (quadrados), utilizando a FE como substrato.

A Figura 47 apresenta a razão N_{es}/N_{eo} entre o número de enzimas N_{es} sobre o substrato FE e o número de enzimas total ou de partida $N_{eo} = 5 \times 10^{14}$ em função do pH para as temperaturas de 25 °C (quadrados) e 50 °C (círculos). Pode-se ver nessa figura que o número de enzimas sobre o substrato cai exponencialmente para valores de pH maiores que 5. Abaixo desse valor, o número de enzimas N_{es} satura para as duas temperaturas, indicando uma máxima interação eletrostática e máxima cobertura da superfície do substrato pela enzima. A dependência exponencial N_{es} com o pH do tipo $\exp(-\text{pH}/\text{pH}_0)$ fornece valores de pH_0 igual a 2 para $T = 50$ °C e em torno de 1 para $T = 25$ °C. Esta grande diferença na adsorção enzimática para valores de pH altos pode estar associado as mudanças de estrutura observadas nas medidas de CD, principalmente para a temperatura de 50 °C.

Figura 47: Razão N_{es}/N_{eo} entre o número de enzimas N_{es} sobre o substrato FE e o número de enzimas total ou de partida $N_{eo}=5 \times 10^{14}$ em função do pH para as de 25 °C (quadrado) e 50 °C (círculo).

Vimos acima que a adsorção enzimática sobre o substrato celulósico não é alta na região de pH de máxima atividade enzimática. Como foi diagnosticado em trabalhos como os de MA (MA, 2008) o aumento da adsorção das enzimas sobre o substrato não significa a máxima atividade catalítica. Isto pode estar associado à intensidade da interação envolvendo enzima-substrato e a aspectos de mobilidade enzimática na superfície do substrato durante o reconhecimento de uma extremidade redutora da cadeia de celulose, ou ao número de sítios disponíveis para a ação enzimática (veja discussão abaixo). Assim, na próxima seção vamos mostrar a influência da adsorção e das mudanças estruturais das enzimas *ThCBHI* sobre a hidrólise da celulose presente na FE.

5.6 O processo de hidrólise e sua correlação com a interação enzimática

Nas seções anteriores ficou demonstrado que a interação enzimática com substratos depende do pH, principalmente pela modificações do estado de carga molecular do CBM abaixo ou acima do valor de seu ponto isoelétrico. Nessa seção, estamos interessados em correlacionar estes aspectos da interação com o substrato obtidos através do método de arraste com a atividade e estrutura enzimática em função do pH e temperatura. Em todos os sistema

em que ocorre hidrólise enzimática, as enzimas que estão envolvidas nesse processo possuem valores de pH e temperatura ótimos para que a máxima hidrólise aconteça (SEGEL, 1993), o que define a atividade catalítica máxima. Nesse caso, a atividade catalítica máxima é determinada por aspectos energéticos (térmicos e eletrostáticos) e estruturais, que, consequentemente, influenciam a hidrólise do substrato. A temperatura pode contribuir para a instabilidade estrutural da enzima e pode afetar a cinética da reação, visto que a temperatura influencia no nível de agitação molecular que pode interferir no processo de colisão enzima-substrato. Por fim, a maior parte da estrutura enzimática é estabilizada por ligações secundárias que podem ser afetadas pela agitação térmica molecular. Outro fator que pode influenciar na hidrólise enzimática é a sua adsorção sobre o substrato. Vamos mostrar que os parâmetros como adsorção e mudanças estruturais afetaram significativamente o processo da hidrólise da celulose presentes na FE pelas enzimas *ThCBHI*. Como já foi reportado em outros trabalhos (PEITERSEN, 1977; KYRIACOU, 1988; REINIKAINEN, 1995; VÄLJAMÄE 1998; MA, 2008), o aumento da adsorção enzimática sobre o substrato não significa a sua máxima atividade catalítica.

5.6.1 Produto da hidrólise das FE versus tempo de reação

Primeiramente, vamos considerar que a hidrólise enzimática da celulose se processa através da seguinte reação escrita, no equilíbrio, em termos da concentração de reagentes e produtos em mol.L⁻¹:

onde o termo $[E]$ se refere a concentração de enzimas antes e após hidrólise; $[S]$ ao substrato; $[ES]$ ao complexo ativo formado entre enzima e substrato; e $[P]$ ao produto da hidrólise. As taxas envolvidas na associação e dissociação do complexo ativo no equilíbrio são k_1 e k_{-1} e na dissociação do complexo ativo enzima-substrato e enzima-produto é k_2 . A formação do complexo ativo depende unicamente das interações enzima-substrato ES e da concentração de sítios ativos disponíveis. Já a formação de produto P depende do caráter dessa interação (forte ou fraca) e da estrutura e especificidades enzimáticas.

A velocidade de dissociação do complexo ativo ES em enzima-produto é proporcional

à concentração $[ES]$ durante a hidrólise e pode ser escrita através da seguinte equação:

$$\frac{d[ES]}{dt} = -k_2[ES] \quad (28)$$

A solução desta equação é uma dependência exponencial que relaciona a concentração do complexo ativo $[ES]_t$ em um tempo t com a sua concentração inicial $[ES]_0$ escrita da seguinte forma:

$$[ES]_t = [ES]_0 e^{-k_2 t} \quad (29)$$

onde k_2 é a constante de dissociação do complexo ativo enzima-substrato.

Assim, a concentração de produto em um tempo t , $[P]_t$, pode ser escrita em termos das concentrações do complexo formado nesse instante de tempo, $[ES]_t$, e no tempo inicial, $[ES]_0$, da reação pode através da relação:

$$[P]_t = [ES]_0 (1 - e^{-k_2 t}). \quad (30)$$

No instante inicial da reação temos uma dada concentração de $[ES]_0$, porém com o passar do tempo, o valor dessa concentração é reduzida devido a transformação do substrato em produto (COPELAND, 2000), conforme é ilustrado na Figura 48.

Figura 48 - Ilustração que descreve o produto da hidrólise versus tempo de reação.

Utilizamos o *Método Óptico de Somogyi – Nelson (SN)* (seção 4.2.5) para determinar os efeitos do pH e da temperatura na formação do produto da hidrólise da celulose (concentração de celobiose) presente nas FE pelas enzimas *ThCBHI*. A dependência da concentração de celobiose liberada durante a hidrólise é apresentada na Figura 49 (a) e (b) para o intervalo de tempo de reação de 24 horas para diferentes valores de pH compreendidos

na faixa de 3-8 e para as temperaturas de 25°C e 50°C, respectivamente. As amostras de controle para a fibra sem a enzima (não mostradas na figura) não apresentaram crescimento nas curvas de concentração de celobiose no intervalo de tempo estudado. É importante salientar que, por se tratar de um experimento de longo tempo (24 horas) todas as amostras foram preparadas simultaneamente em solução tampão conforme procedimento descrito na seção (seção 4.2.5). As curvas contínuas são os ajustes realizados a partir da equação exponencial (30) para ambas as condições de temperatura. Conforme o esperado, a concentração de produto apresenta um crescimento significativo para tempos curtos de reação e tende, por fim, a uma saturação para longos tempos de reação.

Figura 49: Concentração de Celobiose versus tempo de hidrólise realizada nas temperaturas de (a) 25°C e (b) 50°C para valores de pH compreendidos na faixa de 3-8.

Os parâmetros k_2 (em escala log) e $[\text{ES}]_0$ utilizados no ajuste das Figuras 49 (a) e (b) estão mostrados nas Figuras 50 (a) e (b), respectivamente, para as temperaturas de 25°C e 50°C em função do pH. Primeiramente, pode-se ver que a taxa de formação do produto k_2 é maior para a temperatura de 50 °C em todo o intervalo de pH. Este resultado tem relação direta com aumento de atividade da hidrólise enzimática a altas temperaturas já publicados (Colussi, 2012). As curvas contínuas são guias para os olhos e mostram que k_2 varia de uma ordem de magnitude na faixa de pH estudada, porém este comportamento ainda é tema de estudo. Já a concentração inicial do complexo ativo $[\text{ES}]_0$ possui comportamentos bastante

distintos para as temperaturas de 25 °C e 50 °C, como é mostrado pelos ajustes gaussianos (linhas contínuas). $[ES]_0$ tem um máximo no valor de pH=5,5 e varia basicamente na faixa de pH entre 4 e 6 para a temperatura de 50 °C. Já para a temperatura de 25 °C, a dependência de $[ES]_0$ se alarga e se desloca para a região de maior pH entre 5 e 8. Estes comportamentos distintos de $[ES]_0$ com o pH e temperatura será discutido a seguir.

Figura 50:- Dependência dos parâmetros k_2 e $[ES]_0$ utilizados no ajuste das Figuras 49 para as temperaturas (a) 25°C e (b) 50°C, respectivamente, em função do pH.

5.6.2 Influência do pH e temperatura na hidrólise das FE

A dependência do produto da reação por tempo durante a hidrólise enzimática apresentados nas Figuras 49 (a) e 49 (b) dão informação da cinética de reação. Porém, é possível rerepresentá-la em termos da concentração de celobiose liberada durante a hidrólise da celulose pela *ThCBHI* em função do pH para cada tempo de medição, como pode ser visto na Figura 51 para as temperaturas de 25°C e 50°C. Os pontos experimentais para cada tempo podem ser ajustados por curvas gaussianas (linhas contínuas), o que confere dependências distintas com o pH para as temperaturas de 25°C e 50°C. Este comportamento é semelhante àquele da concentração inicial do complexo ativo $[ES]_0$ apresentado na Figura 50 (b). Assim,

podemos concluir que o aumento significativo da concentração do produto, apresentado nas Figuras 49 (a) e 49 (b), estão correlacionados com uma alta concentração de complexo ativo $[ES]_0$ formados nos instantes iniciais da reação. Este resultado tem uma relação direta com as interações e ligações químicas do complexo CBHI-FE.

Figura 51: Concentração de celobiose liberada durante a hidrólise da celulose pela *ThCBHI* em função do pH para cada tempo de medição para as temperaturas de 25°C e 50°C.

Observamos que à 25°C, o produto da hidrólise é máximo para valor de pH=7 para um tempo de reação de 24h. Nesta condição, a concentração de celobiose liberada foi de 18,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. De forma surpreendente, a enzima *ThCBHI* apresentou atividade catalítica em uma faixa larga de pH entre 5 e 9, com menos de 25% de variação em relação a condição ideal de pH, ou seja, pH 7.

O máximo de atividade se desloca para valores de pH menores quanto a temperatura é aumentada para 50 °C. Observamos nesta condição de temperatura, que a hidrólise da FE está compreendida em uma janela estreita de pH entre 5 e 6. Com o auxílio do ajuste gaussiano se pode fazer uma estimativa de que a máxima quantidade de produto liberado pela hidrólise da celulose contida na FE é 31,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e ocorre para o valor de pH= 5,4 no tempo de reação de 24h. Este valor estimado está de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura (Boer, 2003; Colussi, 2012).

É interessante notar que a razão das áreas $A_{25^\circ\text{C}}/A_{50^\circ\text{C}}$ debaixo das curvas gaussianas na Figura 51 para as temperaturas de 25°C e 50°C é exatamente igual à razão do número total de celobiose na solução de reação $N_{25^\circ\text{C}}/N_{50^\circ\text{C}}$ para as duas temperaturas e vale 3,7. Assim,

podemos estimar que o número total de celobioses a 25°C é quase quatro vezes maior do que aquele encontrado a 50 °C, indicado que a hidrólise é mais eficiente a baixas temperaturas. Porém, o número total de celobioses na solução de reação é $6,6 \times 10^{19}$ no final de 24 horas, ou seja, $5,5 \times 10^4$ vezes maior que o número total de enzimas nessa solução. Se todas as enzimas em consideração são ativas, isso significa que cada enzima realiza em média $5,5 \times 10^4$ hidrólises em 24 horas de reação, ou seja, 38 reações por minuto. Além disso, levando em consideração que uma unidade (U) de atividade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato ou a formação de 1 μmol de produto por minuto (KIELING, 2002), calculamos a atividade específica das *ThCBHI* para a máxima quantidade de produto liberado em 24 horas de reações para as duas temperaturas. Obtivemos um valor de 0,1U/mg em pH=7 à 25°C e ~0,2 U/mg em pH=5 à 50°C, portanto um valor razoável considerando as FE como substrato, pois a atividade dessa enzimas em Avicel (substrato ideal) é de ordem de 1,25 U/mg a pH=5 e temperatura de 50°C (Colussi, 2011).

Apesar do uso de tampão durante a hidrólise, é interessante notar também que o máximo de concentração de produto se desloca para valores de pH pequenos com o tempo de reação para a temperatura de 50 °C, conforme pode ser visto na Figura 52. Isso pode estar associado ao fato da curva de atividade ter uma faixa de pH muito estreita nessas condições, o que a torna extremamente sensível a variações durante o intervalo de 24 horas de reação. No entanto, o efeito que se tornou mais pronunciado está relacionado com o deslocamento de pH de quase 1,5 da máxima atividade para todos os tempos de reação para as duas temperaturas (Figura 51).

Figura 52: Máxima da concentração de produto em função do tempo de reação para a temperatura de 50 °C.

Estes resultados referentes ao produto da hidrólise em função do pH mostrados na Figura 51 têm grande importância tecnológica no que diz respeito ao controle dos parâmetros que determinam a eficiência da hidrólise enzimática. A atividade enzimática diferenciada encontrada nessa larga faixa de pH pode ser explicada por aspectos energéticos da interação enzimática e por efeitos produzidos pelo pH na estrutura secundária da enzima.

O efeito da estrutura secundária está resumido na Figura 53 através dos espectros de CD. Estes espectros estão relacionados às faixas de pH em que é considerado que a estrutura secundária da enzima *ThCBHI* é preservada em ambas condições de temperatura. É possível verificar que as estruturas α -hélice e folha β das enzimas *ThCBHI* apresenta alto grau de homologia, isto é, não mostraram variações estruturais significativas. Em outras palavras, a estrutura obtida à 50°C e pH 5 é semelhante àquelas encontradas à 25°C para a larga faixa de pH entre 5 e 8. Estas duas regiões de pH em que a estrutura enzimática é preservada correspondem àquelas associadas a máxima atividade e, portanto refletem aos valores próximos encontrados da atividade específica nas duas temperaturas.

Figura 53: Comparação das estruturas α -hélice e folha β referente a máxima atividade nas temperaturas de 25°C e 50°C.

Acreditamos, porém, que o caráter da interação enzimática tem uma influência tão importante quanto a estrutural. A interação enzimática é muito forte para $\text{pH} < 4$ e a cobertura do substrato é máxima. Isso reduz a mobilidade enzimática e a probabilidade de encontrar o sítio ativo para a realização da hidrólise (KIYOHICO, 2009). De acordo com (VÄLJAMÄE, 1998;), as enzimas que se encontram adsorvidas sobre o substrato podem se mover sobre o

mesmo e encontrar aleatoriamente um sítio ativo produtivo mais facilmente do que outras moléculas que se encontram livres. Como a estrutura enzimática é preservada para valores de $\text{pH} > 5$ para a temperatura de 25°C , a queda na concentração de celobiose abaixo de $\text{pH} 7$ (ver Figura 53) para essa temperatura se deve à contribuição dos efeitos de interação e cobertura descritos acima. O mesmo se pode falar para a forte redução da concentração de celobiose para valores de $\text{pH} < 5$ para a temperatura de 50°C . Como discutido em (VÄLJAMÄE, 1998; MA, 2008; KUMAR, 2008), fortes interações entre enzimas e substrato faz com que ocorra um aumento do número de enzimas adsorvidas sobre o substrato, aumentando, portanto, a área superficial ocupada pelas enzimas, impossibilitando o acesso de sítios de reação por outras enzimas que se encontram livres. Assim, as enzimas *ThCBHI* ativas podem ser impedidas estericamente de identificar os sítios ativos para a formação do complexo ativo $[ES]$ pelas enzimas ocupando sítios não adequados para a hidrólise.

Já a redução dessa concentração para valores de $\text{pH} > 5$ em altas temperaturas (50°C) é atribuída a efeitos estruturais e à forte redução da interação enzimática acima do ponto isoelétrico do CBM ($\text{pI}=6,4$) e consequente queda na cobertura da fibra (ver Figura 43). Do mesmo modo, a redução da concentração de produto para valores de $\text{pH} > 7$ para a temperatura de 25°C se deve a efeitos estruturais e a redução da cobertura devido a baixa interação enzima-substrato nessa faixa.

Da discussão acima, pode-se concluir que a interação enzima-substrato tem um papel de fundamental importância na eficiência da hidrólise enzimática. Isto pode ser visto no deslocamento em pH da máxima atividade quando consideramos as duas as temperaturas de 25°C e 50°C . Este deslocamento se deve ao fato de que a hidrólise enzimática ocorre apenas em um limiar de interação muito estreito e específico que determinam a ligação adequada a sítios específicos do substrato de celulose e que permitam a alta mobilidade enzimática ao longo do substrato. Valores de interação acima ou abaixo desse limiar reduzem a mobilidade da enzima ou reduzem a sua adsorção (promove a sua desorção), respectivamente. Deste modo, a interação enzimática é forte o suficiente a baixos valores de pH à temperatura ambiente, o que faz a curva de concentração por pH se deslocar para valores de pH mais altos de modo a encontrar o limiar de interação adequado que garanta a adsorção e a mobilidade enzimática. O mesmo se pode falar para o deslocamento do máximo de concentração para valores de pH mais baixos ($\text{pH}=5$) à temperaturas de 50°C . Nesse caso a temperatura reduz a adsorção enzimática (ver Figura 45), de modo que os valores ideais de interação (adsorção) para a máxima atividade sejam restaurados aumentando-se a interação que ocorre para valores de pH menores. Estes aspectos de interação explicam o deslocamento observado do máximo

de concentração de produto com a temperatura.

Os resultados acima mostram que a faixa estreita de interação que promove a máxima atividade enzimática pode ser alargada ao reduzir a temperatura da reação. Nesse caso, a curva de produto versus pH é significativamente alargada. Isso deve promover estabilidades no processo de controle da atividade com a variação do pH durante o processo de hidrólise enzimática. O conhecimento e o controle desses parâmetros são de fundamental importância quando se almeja o uso da hidrólise enzimática na produção açúcares menores a partir da celulose e o seu uso como fonte de energias renovais.

6 Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e aplicar estas novas metodologias ópticas à cadeia de bioconversão da biomassa da cana de açúcar em bioetanol. Mais especificamente, foram estudados aspectos da interação enzima-substratos em função do pH e da temperatura, bem como o efeito da estrutura enzimática na eficiência da hidrólise biocatalítica do material celulósico por meio de espectroscopia de fluorescência e de absorção. Aqui, a caracterização óptica das modificações da interação foi determinante para o entendimento da ação enzimática e pode ser usada como ‘feedback’ para o controle de processos na cadeia de bioconversão da biomassa em etanol.

Através das metodologias de caracterização ópticas desenvolvidas neste trabalho, foi possível diagnosticar a influência do pH sobre as propriedades estruturais e de interação da enzima *ThCBHI* com substrato lignocelulósico nas temperaturas de 25 °C e 50 °C, que por fim nos possibilitou correlacionar com a sua atividade catalítica sobre a celulose presente nas fibras de eucalipto.

Os resultados referente à espectroscopia de absorção Uv/vis nos permitiu mostrar que os espectros de absorbância da enzima *ThCBHI*, na faixa espectral de 250-310 nm, é equivalente a convolução dos três resíduos aromáticos Phe, Tyr e Trp, onde cada um desses resíduos contribuíram na absorção em diferentes regiões do espectro dentro da faixa que foi mensurado. Além disso, foi possível estimar o valor do coeficiente de extinção molar levando em consideração a contribuição individual de cada resíduo responsável pela absorção em 280 nm e o valor encontrado foi de $8,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ que está completamente de acordo com os valores dos coeficientes obtidos neste trabalho e do valor teórico reportado para esta enzima. Variações no coeficiente de extinção refletiram de forma proporcional aos valores da seção choque de absorção efetiva da enzima e nos permitiu a concluir que a estrutura enzimática foi afetada pela alteração do pH e temperatura, o que foi confirmado pelas medidas de dicroísmo circular, CD.

Através da técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foi possível determinar as frações de estrutura secundária que compõem as enzimas *ThCBHI*. Determinamos que as estruturas folha β mostrou-se mais abundante do que a estrutura α -hélice. Além disso, essas técnica nos permitiu diagnosticar que as estruturas α -hélice e folha β sofreram influência significativa do pH nas temperaturas de 25 °C e 50 °C. Vimos que à 25 °C as estruturas secundárias das enzimas foram conservadas em uma larga faixa de 3-8,

desnaturando apenas para valores de $\text{pH} > 8$. Por outro lado a 50°C a estrutura secundária foi conservada apenas para uma estreita faixa de pH .

Neste trabalho, desenvolvemos o método de arraste enzimático através da fluorescência intrínseca da enzima, o que nos possibilitou a determinar parâmetros fundamentais, tais como cobertura (Cob) e o número de enzimas (N_{es}) envolvidos na interação entre *ThCBHI* com substrato lignocelulósico.

Através desse método determinamos que o pH e a temperatura influenciaram significativamente a dinâmica de interação da enzima *ThCBHI* com as FE e Avicel. Determinamos que, a máxima cobertura desses substratos pela enzima se deu em $\text{pH}=3,5$ nas duas temperaturas, onde $\sim 95\%$ do total de enzimas presentes na solução foram adsorvidas sobre o substrato. Porém, quando o valor do pH foi deslocado para a região de máxima atividade, o valor da cobertura sofreu um decaimento exponencial refletindo, portanto a redução da interação enzima-substrato.

Além da estimativa realizada para a cobertura das FE, o método de arraste enzimático nos possibilitou a determinar o número exato de enzima adsorvidas sobre o substrato através da correlação entre a PL e absorbância em termos da propriedade molecular (ϵ). Os valores do número de enzimas adsorvidas sobre o substrato apresentou a mesma dependência que a fração da cobertura estimada para as FE onde a fração de enzimas adsorvidas em $\text{pH}=3,5$ foi alta para os dois casos, porém apresentando um decréscimo substancial com o aumento nos valores do pH . Esses resultados nos permite concluir que, as condições de máxima fração de enzima adsorvidas implicam que a área total de EF e Avicel encontra-se totalmente ocupada pela enzima.

Em relação à interação enzima-substrato celulósico foi possível determinar as condições de pH para as máximas e mínimas interação nas temperaturas de 25°C e 50°C . Determinamos que a máxima interação entre enzima-substrato ocorreu para a região de pH ácido enquanto que as baixas interações ocorreram para região de pH básico. Essas alterações no perfil da interação entre as enzimas e o substrato foram atribuídas ao processo de protonação e desprotonação de regiões específicas da enzima que é regulada pelo valor do pI do sistema. Além disso, as alterações estruturais da enzima foram responsáveis pela redução da interação enzimática com o substrato.

O método espectrométrico Somogyi-Nelson foi eficaz na quantificação da celobiose após a hidrólise da celulose presente nas FE. Com esse método foi possível estimar que a máxima atividade das enzimas durante 24 horas de reação se deu a 50°C e em $\text{pH}=5,4$ com $31,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de celobiose. Porém a 25°C , encontramos que a máxima atividade foi em $\text{pH}= 7$

com $18,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de celobiose. Os valores do produto nos permitiu computar os valores de atividade específica da enzima que é de $0,1 \text{ U/mg}$ e $\sim 0,2 \text{ U/mg}$ respectivamente para 25°C e 50°C , sendo valores razoáveis quando comparados com a atividade específicas destas enzimas sobre o Avicel

Encontramos que a atividade da enzima é deslocada a partir de uma estreita faixa de pH à 50°C para uma larga faixa de pH à 25°C . Além disso, encontramos que a larga faixa de pH apresenta um montante de produto ~ 4 vezes maior do que as condições de 50°C .

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho é de suma importância no que diz respeito ao processo de otimização da sacarificação da celulose presente em materiais lignocelulósicos pela enzima *ThCBHI*, pois com a metodologia de caracterização ótica desenvolvida nesse trabalho nos permite aferir que a hidrólise da biomassa por essa enzima pode ser realizada efetivamente em temperatura ambiente, necessitando de menos energia térmica para produzir açúcares fermentáveis que posteriormente serão aplicados na produção de etanol de segunda geração

7 Referências Bibliográficas

ALVEZ, R. E. (2011). **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. 115p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos e Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ANDREAUS, J et al. (1999). **Effects of temperautre on the cellulose binding ability of cellulase enzymes**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 7: 233-239.

BASCH, H. (1967). **Electronic States of the Amide Group**. The Journal of Chemical Physics 47(4): 1201.

BECKHAM, G.T et al. 2010. 2010. **Identification of Amino Acids Responsible for Processivity in a Family 1 Carbohydrate-Binding Module from a Fungal Cellulase**. Phys. Chem 144: 1447-1453.

BECKHAM, G.T et al. 2010. **Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of Cellulose**. Current Opinion in Biotechnology 22: 1–8.

BESLEY, N. A. et al. (1999). **Theoretical Studies toward Quantitative Protein Circular Dichroism Calculations**. J Am Chem Soc 121: 9636-9644.

BOER, H. et al. (2003). **The relationship between thermal stability and pH optimum studied with wild-type and mutant *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A**. European Journal of Biochemistry 270(5): 841-848.

BON, E.P.S, et al. (2008). **Enzimas na Produção de Etanol. Produções, Aplicações e Mercado**.

BOXU, Y. et al. (1997). **Circular dichroism studies on conformation of cellobiohydrolase and endoglucanase from *Trichoderma pseudokoningii* S-38: Effects of pH and ligand binding**. Journal of Protein Chemistry 16(2): 107-111.

BU, L et al, 2009. **The Energy Landscape for the Interaction of the Family 1 Carbohydrate-Binding Module and the Cellulose Surface is Altered by Hydrolyzed Glycosidic Bonds**. J. Phys. Chem B 113: 10994-11002.

CANILHA, L et al. (2010). **Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal.** Revista Analytica 44: 48-53.

CANTOR, C. R. et al. 1998. **BIOPHYSICAL CHEMISTRY. Part II Techniques for the study of biological structure and function.**

CARLO, N. H, et al. (2005). **Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term.** Biomass and Bioenergy 28: 384–410.

CHUNDAWAT, S. P. et al. (2011). **Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals.** Annu Rev Chem Biomol Eng 2: 121-145.

COLETTA, V.C. et al. (2012). **Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by fluorescence lifetime imaging microscopy.**

COLUSSI, F. (2011). **Purification, and Biochemical and Biophysical Characterization of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844.** Journal of Microbiology and Biotechnology. 21(8): 808-817.

COLUSSI, F. et al. (2012). **Effect of pH and temperature on the global compactness, structure, and activity of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma harzianum*.** Eur Biophys J. 41(1): 89-98.

COPELAND, R. A. (2000). **Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis.** New Yourk.

CTBE. Centro de Ciências e Tecnologia do Bioetanol. <<http://www.bioetanol.org.br/index.php>>. Acesso em: 31 de maio de 2012.

DELEPIERRE, J. J. et al (1994). **Biologie structurale: Principes et méthodes biophysiques.** Paris.

DIVNE, C. et al (1994). **The Three-Dimensional Crystal Structure of the Catalytic Core of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* CBHI.** Science 265: 524-527.

DIVNE, C. et al. (1998). **High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 angstrom long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*.** Journal of Molecular Biology 275: 309-325.

EDELHOCH, H. (1967). **Spectroscopic Determination of Tryptophan**. *Biochemistry* 6(7): 7.

EXPASY. Protparam. <<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>> . Acesso: 23 de novembro de 2011.

FASANELLA, C. C. (2008). **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 79p Dissertação (Mestrado), - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo

FERREIRA, V. (2010). **Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces Cerevisiae* recombinante e avaliação de seu no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. 155p. Tese (Doutorado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FILHO, J. M. M. A. (2008). **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 79p Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

GALO, A. L, et al. (2009). **Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostra com densidade óptica muito baixa**. *Química Nova* 2: 488-492.

GAMBARATO, B. C. (2010). **Estabelecimento e validação de modelos de oxidação de ligninas**. 100p. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo.

GÉRALDINE, M. L. (1999). **Widely different off rates of two closely related cellulose-binding domains from *Trichoderma reesei***. *Eur Biophys J* 262: 637-643.

GILL, S. C. et al (1989). **Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data**. *Analytical Biochemistry* 182: 319-326.

GOLDFARB, et al. (1952). **The Absorption Spectra Of Amino Acids In The Region Two Hundred To Two Hundred And Thirty Millimicrons**. *Journal of biological Biochemistry*(285): 285-291.

GONSALVES, A. M. R et al. 2005. **Espectroscopias Vibracional e Electrónica**. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra.

HAMMES, G. G. (2005). **Spectroscopy for the biological sciences Department of Biochemistry**, Duke University, New Jersey.

HAVEL, H. A. (1996). **Spectroscopic Methods for Determining Protein Structure in Solution**. Indianápolis

HIMMEL, M. E. et al. (2007). **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production**. Science 315(5813): 804-807.

HOLIDAY, E. R. (1936). **Absorbtion Spectra of Tyrisune, Tryptophan and their mixture**.

IEA. <<http://www.iea.org>>. Acesso em: 31 de maio de 2012.

KELLY, S. et al. (2005). **How to study proteins by circular dichroism**. Biochim Biophys Acta 1751(2): 119-139.

KIELING, D. D. (2002). **Enzimas: Aspectos Gerais**. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

KIYOHICO, I. et al. (2009). **High Speed Atomic Force Microscopy Visualizes Processive Movement of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I on Crystalline Cellulose**. The Journal of Biological Chemistry. 284(52): 36186–36190.

KO, C., et al. (2011). **Effects of fiber physical and chemical characteristics on the interaction between endoglucanase and eucalypt fibers**. Cellulose 18(4): 1043-1054.

KUMAR, R., et al. (2008). **Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives**. J Ind Microbio Biotechnol. 35:377-391.

KYRIACOU, A et al. (1988). **Effec of physical parameters on the adsorption characteristics of fractionated *Trichoderma reesei* cellulase components**. Enzyme and Microbial Technology 10: 675-681.

LAKOWICZ, J. R. (2006). **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer. New Yourk 531-538.

LEVINE, R. L, et al.(1982). **Quantitation of Aromatic Residues in Proteins Model Compounds for Second-Derivative Spectroscopy**. Biochemistry 21: 2600-2606.

MA, A. et al. (2008). **The enzymatic hydrolysis rate of cellulose decreases with irreversible adsorption of cellobiohydrolase I**. Enzyme and Microbial Technology 42(7): 543-547.

MACH, H. et al. (1992). **Statistical Determination of the Average Values of the Extinction Coefficients of Tryptophan and tyrosine in native proteins**. Analytical Biochemistry 200: 70-80.

MILOSLAV, S. M. (2008). **Characterization of Oxidized Cellulose with Ultraviolet Visible Spectroscopy**. Journal of Applied Polymer Science 107: 2045–2052.

MOSUR, P. M. et. al. 2008. **Electrosurface Properties of Microcrystalline Cellulose Dispersions in Aqueous Solutions of Aluminum Chloride, Nitrate, and Sulfate**. Colloid Journal 70(4): 462–465

NCBI. Blast. <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso: 15 de março de 2012.

NELSON, N. (1944). A Photometric adaptation of the somogyi method for the determination of gluucose. Journal Biological Chemistry: 375-380.

Nicolai Peitersen, J. M., Mary Mandels (1977). **Adsorption of Trichoderma cellulase on cellulose**. Biotechnology and Bioengineering 19: 1091-1094.

NIMLOS, M. R. et al. (2007). **Molecular modeling suggests induced fit of Family I carbohydrate-binding modules with a broken-chain cellulose surface**. Protein Eng Des Sel 20(4): 179-187.

NREL. National Renewable Energy Laboratory. < <http://www.nrel.gov>>. Acesso em 30 de maio de 2012.

OGEDA, T. L. et al. 2010. **Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Química Nova 33(7): 1549-

1558.

PAGE, et al. (1995). **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein**. Protein Science(4): 2411-2423.

PALONEN, H. (2004). **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. Doutor, University of Technology.

PDB. Protein Data Bank.<www.pdb.org>. Acesso em: 29 de maio de 2012.

PINGALI, S. V et. al. (2011). **Small Angle Neutron Scattering Reveals pH-dependent Conformational Changes in *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I**. Journal of biological Biochemistry 286: 32801-32809.

REINIKAINEN, O. T. et al. (1995). **Effects of pH and High Ionic Strength on the Adsorption and Activity of Native and Mutated Cellobiohydrolase I From *Trichoderma reesei***. Proteins: Structure, Funtion and Genetics 22: 392-403.

REZENDE, C. A et al. (2011). **Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility**. Biotechnology for Biofuels 4: 18.

ROSENHECK, K. et al. (1961). **The Far Ultraviolet Absorption Spectra of polypeptide and and protein solution and their dependence on conformation**. Biochemistry 47: 1775.

SAIDEL L. J, et al. (1951). **The Ultraviolet Absorbtion Spectra of Proteins**. Journal of biological Biochemistry: 397-404.

SANTO, J. R. A et al. (2009). **Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais 11(1): 27-33.

SEGEL, I. H. (1993). **Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**.

SOARES, T. A et al, 2004. **Aplicação da equação de Poisson-Boltzmann ao cálculo de propriedades dependentes do pH em proteínas**. Química Nova 27(4): 640-647.

SUN, Y et al. (2002). **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review** *Bioresource Technology* 83: 1–11.

TINOCO, I. (1960). **Optical and Other Electronic Properties of Polymers**. *The Journal of Chemical Physics* 33(5): 1332.

TINOCO, I. et al (1960). **Optical Rotation of Oriented Helices. II. Calculation of the Rotatory Dispersion of the Alpha Helix**. *The Journal of Chemical Physics* 32(2): 461.

TSUTAE, F. M. (2011). **Processos ópticos e interação entre nanopartículas e sistemas moleculares**. 81p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

VÄLJAMÄE, P et al. 1998. **The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface – erosion model**. *Eur. J. Biochem* 253: 469-475.

VANHOLME, R. et al. 2010. **Lignin Biosynthesis and Structure**. *Plant Physiology* 153: 895–905.

WU, B et al. (2008). **Structural changes of cellobiohydrolase I (1,4--Dglucan-cellobiohydrolase I, CBHI) and PNPC (p-nitrophenyl--D-cellobioside) during the binding process**. *Science in China Series C: Life Sciences* 51(5): 459-469.

YANARI, S. et al. (1960). **Interpretation of the Ultraviolet Spectral Changes of Proteins**. *Journal of Biological Chemistry* 235: 2818-2826.

ZHANG, Y. et al. (2011). **Effect of PEG4000 on cellulase catalysis in the lignocellulose saccharification processes**. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86(1): 115-120.

ZHONG, L. et al. (2007). **Interactions of the complete cellobiohydrolase I from *Trichodera reesei* with microcrystalline cellulose I β** . *Cellulose* 15(2): 261-273.