UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MARIA FERNANDA BENITEZ ERIZ

**Atividade hidrolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de *Gloeophyllum*
trabeum associada a substratos celulósicos oxidados.**

Lorena- SP

2014

MARIA FERNANDA BENITEZ ERIZ

**Atividade hidrolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de *Gloeophyllum*
trabeum associada a substratos celulósicos oxidados.**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências do Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferraz.

Versão original

Lorena – SP

Agosto, 2014

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.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Benitez Eriz, Maria Fernanda

Atividade hidrolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de *Gloeophyllum trabeum* associada a substratos celulósicos oxidados. / Maria Fernanda Benitez Eriz. – Versão original. - 2014.

70 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.

Orientadora: André Luís Ferraz

1. Celulases 2. Celulose 3. Oxidação 4. Fungos de decomposição. I. Título. II. Ferraz, André Luís, orient.

577.152.3 - CDU

**Dedico esta dissertação a meus pais,
Maria Eriz Lertzundi e Pablo Benitez Aguilar.
Obrigada pelo apoio e amor incondicional.**

AGRADECIMENTOS.

- À minha família e amigos em especial aos meus pais Pablo e Maria, pelo apoio incondicional, amor e paciência.
- À Escola de Engenharia de Lorena/USP e ao Departamento de Biotecnologia, por me permitir a realização desse trabalho.
- Ao meu orientador Prof. Dr. André Ferraz, por sua orientação sempre presente, dedicação e apoio durante esses anos.
- A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, pelos conhecimentos a mim transmitidos.
- Aos amigos do Laboratório de Ciência da Madeira, pelo companheirismo, apoio e bons momentos.
- A todos os funcionários, e amigos do Departamento de Biotecnologia, pela boa disposição, carinho e parceria.
- Á CAPES, pela concessão do auxílio financeiro e a USP pela oportunidade.

.

RESUMO

Benítez, F. **Atividade hidrolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de *Gloeophyllum trabeum* associada a substratos celulósicos oxidados**. 2014. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se as enzimas secretadas pelo fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* podem atuar como auxiliares às celulasas comerciais na hidrólise de substratos celulósicos oxidados. Para isto foi realizada a oxidação de celulose microcristalina Avicel mediante reação de Fenton (Fe^{+2} , H_2O_2) e tratamento com CuSO_4 . O substrato oxidado foi caracterizado e posteriormente foi determinado o efeito desta modificação sobre a eficiência hidrolítica de enzimas comerciais (Celluclast/Novozym) e sobre misturas destas enzimas comerciais suplementadas com extrato enzimático obtido de *G. trabeum*. As reações realizadas com Avicel indicaram que ambos tratamentos químicos foram efetivos para modificar grupos funcionais presentes na celulose. A caracterização físicoquímica dos substratos oxidados permitiu concluir que o tratamento Fenton gerou transformações mais intensas na celulose do que o tratamento com CuSO_4 . O análise dos hidrolisados ácidos das amostras oxidadas por Fenton mediante espectrometria de massas (GC-MS) confirmou que a oxidação ocorre principalmente no C1. As hidrólises enzimáticas utilizando preparações com diferentes cargas das enzimas comerciais apresentaram uma diminuição significativa da conversão de celulose quando as amostras são tratadas com o reagente Fenton. Por outro lado, a celulose oxidada gerada pelo tratamento com CuSO_4 ainda é eficientemente hidrolisada pelas enzimas. As duas amostras de celulose Avicel oxidadas também foi hidrolisada utilizando misturas de enzimas comerciais e extratos enzimáticos de *G. trabeum*. Em todas as condições ensaiadas a suplementação da mistura reacional com extratos enzimáticos do fungo de decomposição parda *G. trabeum* diminuíram a eficiência de hidrólise enzimática da celulose oxidada. O emprego do dobro de carga enzimática de enzimas comerciais permitiu recuperar os níveis de hidrólise observados na celulose *in natura*.

Palavras-chave: Celulasas, Celulose, Oxidação, Fungos de decomposição.

ABSTRACT

Benítez, F. **Hydrolytic activity of enzymatic extracts from *Gleophyllum trabeum* associated with oxidized cellulosic substrates.** 2014. 70 p. Dissertation (Master of Science)– Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

The goal of this work was to evaluate whether enzymes produced by the brown-rot fungus *Gleophyllum trabeum* would be able to act as auxiliary enzymes of commercial cellulases during the enzymatic hydrolysis of oxidized cellulose. To reach this goal an oxidation of microcrystalline-cellulose (Avicel) was performed by two different reaction systems: Fenton reaction (Fe^{2+} , H_2O_2) or CuSO_4 treatments. The oxidized substrates were characterized and the effect of cellulose modification on the hydrolytic efficiency of commercial enzymes, supplemented or not with the enzymes recovered from a *G. trabeum* culture, was determined. The Avicel treatment by the oxidative systems resulted in cellulose structural changes as evidenced by infrared spectroscopy, viscosity measurements and chemical characterization by HPLC and GC/MS chromatography of the monomers recovered after acid hydrolysis. The physicochemical characterization of the oxidized celluloses allowed to conclude that the transformation of the cellulose was more intense when Fenton treatment was used as compared with the CuSO_4 treatment. The analysis of the acid hydrolysates by GC-MS indicated that the oxidation by Fenton reaction occurred mainly at the C1 of the cellulose chain, resulting in gluconic acid in the acid hydrolysates. A meaningful decrease of the cellulose conversion was observed when Fenton-treated samples were submitted to enzymatic hydrolysis using different amounts of commercial enzymes. On the other hand, the CuSO_4 -oxidized cellulose was still efficiently hydrolyzed by high enzyme dosages. The oxidized Avicel substrates were also hydrolyzed using a mixture of the commercial enzymes with enzymes recovered from *G. trabeum* cultures. At all tested conditions, the supplementation of the reaction mixture with enzymatic extracts from *G. trabeum* decreased the enzymatic hydrolysis efficiency. Nevertheless, the normal levels of enzymatic hydrolysis were recovered when the commercial enzymes dosage two-fold increased.

Keywords: Cellulases, Oxidized Cellulose, Oxidation, Brown-rot fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura das cadeias de celulose. Ligações de hidrogênio intermoleculares (linhas tracejadas) e intramoleculares (linhas pontilhadas).	19
Figura 2- Mecanismo de ação de celulasas. β G: β -glucosidase; CBH: Celobiohidrolase; EG: Endoglucanase	23
Figura 3 - Celobiohidrolase de <i>T. reesei</i> da família 7 (Cel7A) agindo em celulose. Cel7A é composta por um CBM de 36 aminoácidos, um domínio de união com O-glicano (azul escuro), e um domínio catalítico com “N-linked glicano” (rosa) e um túnel de 50 Å para o processamento das cadeias de celulose (verde). A celobiose é apresentada em amarelo.	24
Figura 4- Reações da celobiose desidrogenase. “Fe” representa o ferro heme, “A” representa um acceptor de elétrons.	26
Figura 5- Mecanismo proposto para a geração de espécies reativas de oxigênio no fungo de decomposição parda <i>Gloeophyllum trabeum</i> . (mostrado para 2,5-dimetoxihidroquinone).....	32
Figura 6- Uma das possíveis vias para a oxidação de celulose por radicais hidroxila. Esta via cliva a ligação glicosídica da celulose e gera um resíduo de ácido gluconico (na forma de lactona).	33
Fonte: (HAMMEL et al 2002).	33
Figura 7- Alterações químicas ocorridas na lignina após do ataque de radicais hidroxila ($\bullet$ OH) produzidos por reação de Fenton durante a decomposição de madeira por fungos de decomposição parda e potenciais reações de re-polimerização. A oxidação da cadeia lateral mostra a clivagem da ligação C α -C β com formação de benzaldeído e derivados do ácido benzoico (adaptado de Arantes 2012).	35
Figura 8- Espectros de infra vermelho de celulose Avicel oxidada pela reação de Fenton e por CuSO ₄ e o respectivo controle não tratado. (preto) Avicel Controle; (vermelho) Avicel oxidada por reação de Fenton; (verde) Avicel oxidada por reação com CuSO ₄	46
Figura 9- Concentração de Cu (I) (mM) quantificado como Cu(I)BCA2.....	48

Figura 10- Cromatogramas dos hidrolisados ácidos das amostras de Avicel oxidadas e do controle obtidos por sistema de cromatografia que emprega a coluna BIORAD HPX-87H.....	50
Figura 11- Cromatograma GS-MS do hidrolisado ácido (após reação de sililação) da amostra de Avicel oxidada pela reação Fenton.	52
Figura 12- Conversão de celulose durante a hidrólise de celulose microcristalina Avicel oxidada pelo sistema Fenton, CuSO ₄ e de um controle não oxidado com Avicel in natura.	56
Figura 13- Conversão de celulose durante a hidrólise de Avicel oxidada pelo sistema Fenton e por CuSO ₄ . Nas legendas, 50%GT corresponde a 50% da carga de endoglucanase da preparação comercial substituída por 50% de endoglucanase proveniente do extrato de <i>G. trabeum</i> . 25%GT corresponde a carga original de endoglucanases diminuída à metade, sendo que metade desta carga foi substituída por endoglucanase de <i>G. trabeum</i>	59
Figura 14- Conversão de celulose Avicel oxidada pela reação de Fenton. 100% EG corresponde a 10 FPU/g de endoglucanase (Sigma C2730) e de 15 UI de β -glicosidase (Sigma C6105), 200% EG corresponde a 20 FPU/g de endoglucanase (Sigma C2730) e de 30 UI de β -glicosidase (Sigma C6105), 100% GT corresponde a carga enzimática de 200% sendo que metade da atividade de endoglucanases era proveniente do extrato de <i>G. trabeum</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição da biomassa lignocelulósica de acordo com o tipo de planta. (Adaptado de McKendry, 2002).....	18
Tabela 2: Composição das amostras de Avicel oxidadas e do controle não tratado segundo os teores de glucana e xilana detectados como açúcares monoméricos após hidrólise ácida.	48
Tabela 3- Viscosidade intrínseca das amostras de Avicel oxidada e dos respectivos controles.	52
Tabela 4- Atividade de endoglucanase presente no extrato enzimático bruto produzido por <i>G. trabeum</i> obtido após 21 dias de incubação em meio contendo CMC 2% como fonte de carbono e nas frações purificadas por precipitação das proteínas seguida de ultrafiltração.	54
Tabela 5- Atividade de enzimas hidrolíticas presentes em preparações comerciais de enzimas hidrolíticas e no extrato enzimático bruto produzido por <i>G. trabeum</i> obtido após 21 dias de incubação em meio contendo CMC 2% como fonte de carbono submetido a etapas sequenciais de purificação e concentração (precipitação das proteínas, ultrafiltração e liofilização).	55

ABREVIATURAS

DP - número de resíduos de anidroglicose por molécula de celulose.

GH- Glicosil hidrolase.

EG- Endoglucanase.

CBH- Celobiohidrolase.

CBM- peptídeo de união a carboidrato.

BG- β - glicosilase.

CDH- Celobiose desidrogenase.

PASC - Celulose inchada com ácido fosfórico.

2,5-DMBQ - 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona.

FPA - Atividade de papel de filtro.

ρ NPG - para-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo.

ρ NPX - para-nitrofenil- β -D-xilanopiranosídeo.

ρ NP - para-nitrofenol.

CMC – Carboximetilcelulose.

DNS - ácido dinitrossalicílico.

UI - μ mol de produto liberado por minuto nas condições de ensaio.

FPU – Unidades de Papel de filtro.

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Transformações de lignocelulósicos em etanol.	17
2.2. Biomassa lignocelulósica.....	18
2.3. Degradação enzimática de polissacarídeos contidos em materiais lignocelulósico.....	21
2.4. Pré-tratamentos.	26
2.5. Biodegradação da madeira por fungos.....	30
2.5.1. Mecanismos de degradação de madeira por fungos de decomposição parda.	31
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. Oxidação de celulose Avicel e sua caracterização.....	37
4.2. Produção das enzimas por <i>Gloeophyllum trabeum</i>	39
4.2.1. Cultivo do fungo e preparo do inóculo.	39
4.2.2. Cultivo de <i>G. trabeum</i> para produção de hidrolases.	39
4.2.3. Determinação das atividades enzimáticas.....	40
4.3. Hidrólise enzimática.	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1. Preparação e caracterização de celulose oxidada.....	46
5.2. Produção e caracterização do extrato enzimático de <i>G. trabeum</i>	53
5.3. Hidrólise enzimática da celulose Avicel e amostras oxidadas.....	55
5.3.1 Hidrolise enzimática da Celulose Avicel utilizando enzimas comerciais.....	55
5.3.2. Hidrolise enzimática da Celulose Avicel utilizando preparações de enzimas comerciais suplementadas com extrato enzimático de <i>G. trabeum</i>	57
6. CONCLUSÃO	62
REFERENCIAS.	64

1. INTRODUÇÃO.

A atual demanda por gasolina para uso automotriz e a crescente insegurança relacionada ao fornecimento de petróleo por um número restrito de países tem intensificado a busca por substitutos para os combustíveis derivados de petróleo. O etanol de primeira geração é um composto alternativo ou suplementar à gasolina e é produzido mediante processos biológicos a partir da fermentação de sacarose ou glicose proveniente da cana de açúcar e do amido de milho, respectivamente. Por outro lado, os materiais lignocelulósicos são particularmente atraentes para a produção de etanol de segunda geração devido a grande disponibilidade de resíduos agrícolas e florestais, bem como a característica destas matérias primas que são renováveis, já que derivam da fotossíntese. Um impedimento tecnológico para a utilização mais generalizada deste importante recurso é a ausência de tecnologias provadas em grande escala e de baixo custo para superar a recalcitrância da biomassa celulósica (LYND et al 2002; MARTINEZ-ANAYA et al 2008).

Entre os inúmeros processos já postulados para diminuir a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, encontram-se alguns processos oxidativos que, em geral, visam remover lignina do material lignocelulósico. No entanto, é comum que como decorrência da aplicação destes processos, ocorra também a oxidação parcial dos polissacarídeos (KIRK et al 1991). Há dados da literatura indicando que alguns substratos lignocelulósicos oxidados apresentam baixa eficiência de conversão em açúcares monoméricos quando submetidos à hidrólise mediada por enzimas comerciais (RÄTTÖ; RITSCHKOFF; VIIKARI, 1997). A quase totalidade das enzimas comerciais atuais é oriunda de fungos filamentosos, especialmente da classe Ascomycetes (VAN DYK; PLETSCHE, 2012). Por outro lado, há fungos da classe Basidiomycetes que pertencem ao grupo dos fungos de decomposição parda que degradam os polissacarídeos de materiais lignocelulósicos empregando vias degradativas que incluem processos oxidativos, como a reação de Fenton. Neste caso, os polissacarídeos são oxidados parcialmente, porém há vias metabólicas nestes fungos que permitem a conversão destes polissacarídeos a monômeros passíveis de metabolismo intracelular (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008). As enzimas hidrolíticas produzidas por este grupo de fungos são, portanto, potencialmente interessantes para aplicação na hidrólise de biomassa pré-tratada por processos oxidativos.

Dentro do contexto apresentado anteriormente, o presente trabalho avaliou como a oxidação de celulose cristalina afeta a eficiência de sua hidrólise por enzimas hidrolíticas comerciais e também explorou o potencial de enzimas hidrolíticas produzidas por fungos de decomposição parda para contornar eventuais limitações da hidrólise de celulose oxidada pelas enzimas comercialmente produzidas a partir de cultivos de ascomicetos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Transformações de lignocelulósicos em etanol.

O processo de transformação de materiais lignocelulósicos em etanol consiste basicamente em 5 etapas (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAALJ, 2005).

1. *Obtenção do substrato*: biomassa lignocelulósica proveniente de árvores, gramíneas ou resíduos agrícolas.
2. *Pré-tratamento*: esta etapa concentra uma mistura de processos, sendo os mais empregados aqueles de tipo quimiotermomecânico, os quais têm por objetivo desestruturar, romper e desfibrar a estrutura organizacional das células dos materiais lignocelulósicos. Normalmente este processo é feito junto com o tratamento químico, que vai realizar a deslignificação e/ou remoção de hemicelulose, assim a acessibilidade das enzimas hidrolíticas ao substrato melhora, aumentando a eficiência da sacarificação posterior.
3. *Hidrólise enzimática*: esta etapa é feita por um grupo de enzimas celulolíticas chamadas celulasas, as quais podem atuar diretamente sobre a ligação β -1,4-glicosídica da celulose, gerando oligômeros, os quais posteriormente são hidrolisados à dímeros e finalmente monômeros que podem ser fermentescíveis.
4. *Fermentação*: envolve a metabolização de monômeros de açúcar até etanol. Atualmente os microrganismos fermentadores mais eficientes são as leveduras.
5. *Destilação*: Consiste na purificação do produto de fermentação para a obtenção de etanol.

2.2. Biomassa lignocelulósica.

A biomassa lignocelulósica está composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Dependendo da espécie vegetal, das condições de plantio e crescimento da planta e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie, estes componentes podem variar como se apresenta de forma geral na Tabela 1 (McKENDRY, 2002).

Tabela 1- Composição da biomassa lignocelulósica de acordo com o tipo de planta. (Adaptado de McKendry, 2002).

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Coníferas	35-40	20-25	27-30
Folhosas	45-50	25-30	20-25
Gramíneas	35-45	10-40	5-25

A celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal, o que a converte no polissacarídeo mais abundante sobre a superfície terrestre. A unidade estrutural básica deste homopolímero é a celobiose, que esta formada por duas unidades de D-anhidroglucopirranose unidas por ligações glicosídicas do tipo β - (1 $\rightarrow$ 4). Este polímero é caracterizado por ter extremidades assimétricas, onde o carbono um (anomérico livre) tem a capacidade de reduzir oxidantes, pelo qual pode ser chamado de terminal redutor, enquanto que o carbono quatro da outra extremidade não é redutor (Figura 1).

A estabilização das cadeias de celulose, pela formação de estruturas supramoleculares origina-se pela presença dos grupos hidroxila que tem a capacidade de interagir uns com os outros. Estes grupos são responsáveis pela estrutura supramolecular, bem como pelas características físico-químicas da celulose, dependendo da sua localização nas unidades de glicose, eles têm a capacidade de formar dois tipos de ligação hidrogênio: ligação de hidrogênio intramolecular (entre grupos hidroxila de moléculas de glicose adjacentes na mesma molécula de celulose) e ligação de hidrogênio intermolecular (entre grupos hidroxila de moléculas de celulose adjacentes). A estrutura linear conferida pelas ligações de hidrogênio intra e intermolecular, leva a agregações da cadeia de celulose em fibras elementares contendo regiões mais ordenadas (cristalinas) e menos ordenadas

(amorfos). Este elevado grau de ordenamento e estabilidade da estrutura fibrilar faz com que a celulose seja insolúvel na maioria dos solventes (incluindo a água) e altamente recalcitrante à ação das enzimas hidrolíticas microbianas. As microfibrilas formadas por cadeias de celulose estão envolvidas por hemicelulose e lignina formando uma matriz que fornece rigidez e resistência à parede celular dos vegetais lignificados (FENGEL; WEGENER, 1989; HIMMEL et al 2007). Tipicamente, as cadeias de celulose na parede celular primária das células vegetais têm graus de polimerização (DP - número de resíduos de anidroglicose por molécula de celulose) na faixa de 5.000 a 7.500, podendo atingir DP de 15.000 na celulose de algodão (OGEDA; PETRI, 2010).

Figura 1- Estrutura das cadeias de celulose. Ligações de hidrogênio intermoleculares (linhas tracejadas) e intramoleculares (linhas pontilhadas).

Fonte: Adaptado de FESTUCCI- BUSELLI; OTONI; JODHI, 2007.

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Diferencia-se da celulose por apresentar uma estrutura heterogênea, ramificações e natureza amorfa, características que facilitam sua hidrólise em comparação com a celulose. A estrutura das hemiceluloses inclui pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, galactose e manose) e compostos fenólicos como o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico. As hemiceluloses são polidispersas (o que significa que o componente isolado apresenta moléculas com grau de polimerização variável) e altamente ramificadas, com substituintes de diferentes tipos,

incluindo a acetilação de grupos hidroxila. Nas madeiras de folhosas, a hemicelulose existe majoritariamente na forma de xilanas (cadeias de resíduos β -D- xilopiranosose com ligações tipo 1,4), enquanto que nas madeiras de coníferas, a hemicelulose contém principalmente glucomanan. Já nas gramíneas, como a cana de açúcar, a hemicelulose predominante é formada por xilanas com ramificações que incluem os ácidos hidroxicinâmicos. As cadeias de hemiceluloses em gramíneas podem encontrar-se entrecruzadas mediante ligações éster formadas entre duas cadeias diferentes e o ácido diferúlico. Além disso, elas podem se associar à microfibrilas de celulose, proteínas de parede celular primária, e lignina através das arabinoses nas ramificações, formando ligações éster com ácidos ferúlicos ou cumáricos conferindo resistência e estabilidade na estrutura (HATFIELD; VERMERRIS, 2001; SAHA et al 2003).

A lignina é uma macromolécula fenólica característica nos tecidos de plantas superiores, tais como gimnospermas e angiospermas, normalmente localizada nos tecidos vasculares (por exemplo, xilema). A síntese da lignina ocorre pela polimerização radicalar de álcoois fenil propenos como o *p*-cumarílico, o coniferílico, e o sinapílico. A proporção destes monômeros varia entre as espécies. Dependendo do número de metoxilas no anel aromático, diz-se que a unidade básica é *p*-hidróxi-fenil (não metoxilada, derivada do álcool *p*-cumarílico), guaiacil (com uma metoxila, derivada do álcool coniferílico) ou siringil (com duas metoxilas, derivada do álcool sinapílico). Enquanto as ligninas de madeiras de coníferas são compostas quase exclusivamente por unidades guaiacil, sendo denominadas de ligninas tipo G, as ligninas de madeiras de folhosas são mais ricas em unidades siringil, sendo denominadas de ligninas tipo GS. (FENGEL; WEGENER, 1989; HENRIKSSON, 2009). Nas gramíneas, a lignina pode estar ligada à hemicelulose através de uma ligação éster dos ácidos ferúlico ou cumárico com as arabinoses das ramificações na hemicelulose e um éter com a lignina.

Os componentes citados anteriormente estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente, formando a parede celular dos vegetais lenhosos. Portanto, para o aproveitamento biotecnológico dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica via formação de seus monômeros, é necessário depolimerizar os polissacarídeos até açúcares fermentescíveis através da quebra da ligação glicosídica. Este procedimento pode ser realizado pela ação de um conjunto de enzimas conhecidas como celulasas e hemicelulasas, que degradam a celulose e a hemicelulose, respectivamente.

2.3.Degradação enzimática de polissacarídeos contidos em materiais lignocelulósico.

As enzimas envolvidas na desestruturação da parede celular não são totalmente conhecidas, mas sabe-se que é necessária a participação de quatro grupos de enzimas: enzimas que degradam lignina, celulasas, hemicelulasas e enzimas acessórias, que no caso da hidrólise de hemicelulose incluem enzimas que atuam nos grupos pendentes da cadeia principal, tais como as esterases, arabinofuranosidasas e metil-glucuronidasas. Esses grupos de enzimas são necessários devido a heterogeneidade e recalcitrância do material lignocelulósico que requer a ação sinérgica dessas enzimas para a conversão eficiente de açúcares poliméricos até monossacarídeos biologicamente fermentescíveis (HIMMEL et al 2007).

As celulasas são um conjunto de glicosil hidrolases (GH) que podem ser classificadas com base na sua sequência de aminoácidos. Esta classificação por famílias permite identificar as características estruturais das enzimas, inferir seu mecanismo de ação e determinar as relações evolutivas entre elas (MARTINEZ-ANAYA et al 2008). Atualmente, mais de 2500 glicosil hidrolases foram identificados e classificados em 115 famílias, que incluem enzimas provenientes de plantas, bactérias e fungos, com diferentes atividades e especificidades de substrato.

As celulasas podem ser classificadas em três grupos dependendo do local onde clivam a cadeia de celulose: as endoglucanases - EG (1,4- β -D- glicana-4-glicanohidrolase; EC 3.2.1.4) que clivam aleatoriamente a cadeia de celulose; as celobiohidrolases - CBH (1,4- β -D-glicana-celobiohidrolase; EC 3.2.1.91) que são exo-celulasas e liberam celobiose a partir das extremidades (CBH I atua no terminal redutor e CBH II atua no terminal não redutor) e; as 1,4- β -glicosidasas (EC 3.2.1.21) que liberam glicose a partir de celobiose e de pequenos oligossacarídeos. As endoglucanases e CBHs são inibidas pela celobiose, produto da ação da CBH (Figura 2) (LYND et al 2002).

O entendimento sobre a ação das celulasas de fungos foi largamente baseado em estudos moleculares e bioquímicos do fungo *Trichoderma reesei* – o primeiro fungo a ser utilizado na produção industrial de celulase, permanecendo ainda como a fonte mais

utilizada. Tem sido reportado que este fungo possui dois genes que codificam CBHs, *cbh1-2*, e oito genes que codificam EGs, *egl1-8*, os que codificam para as proteínas CBH I-II e EG I-VI respectivamente. A razão pela qual o fungo produz diferentes tipos de EGs para degradar biomassa celulósica ainda não é clara. EG I (Cel7B), EG II (Cel5A) e EG III (Cel12A) estão bem caracterizadas e as estruturas tridimensionais de EG I e EG III já foram determinadas. No entanto, a comparação entre estas EGs, em especial com respeito a sua especificidade pelo substrato, tem sido pouco investigada, apesar de ser a chave para compreender o papel destas enzimas (NAKASAWA et al 2008).

As celulasas geralmente apresentam uma ou mais estruturas com a função de ligação ao carboidrato denominadas “*carbohydrate-binding module*” (CBM). Esta estrutura está ligada com a região da proteína que contém o sítio ativo por um peptídeo cuja sequência de aminoácidos está composta principalmente por Serina e Treonina e é uma porção da proteína altamente glicosilada. A função descrita para os CBMs é basicamente aproximar o substrato ao sítio ativo, mas os CBMs também poderiam contribuir na separação das cadeias de celulose em regiões cristalinas. A afinidade dos CBMs pela celulose é atribuída ao fato de que parte de sua superfície “planar” é composta principalmente por aminoácidos aromáticos que conferem hidrofobicidade ao módulo. Os sítios ativos das endoglucases estão expostos para fora da enzima, enquanto os sítios ativos das celobio-hidrolases estão dentro de um túnel (MARTINEZ-ANAYA et al 2008). Por exemplo, no caso da CBHI do *T. reesei*, um túnel de 50 Å e 10 sítios ligantes de celulose garantem a permanência da celulose dentro do túnel, enquanto ocorre a hidrólise (OGEDA; PETRI, 2010).

Estudos na família de CBH Cel7A de *T. reesei* tem demonstrado que estas enzimas possuem um sítio catalítico com pontos de união para glicosídeos. Estes sítios permitem que as enzimas continuem em contato com o oligossacarídeo (glucana), inclusive depois da hidrólise da celobiose, o que resulta numa alta processividade (KIPPER; VALJAMAE; JOHANSSON, 2005). A enzima se liga na superfície hidrofóbica (menos hidrofílica) da celulose e difunde através dela até encontrar um terminal livre (não esterificado) e a partir daí conduz a cadeia de celulose até dentro do túnel proteico, onde, após a formação do complexo ativo, ocorre a hidrólise da ligação glicosídica para produzir celobiose, a qual é liberada (Figura 3) (BECKHAM et al 2011).

Gilligan e Reese (1954) descreveram pela primeira vez o sinergismo entre as enzimas celulolíticas na hidrólise de celulose; assim a hidrólise de substratos insolúveis por uma combinação de EGs e CBHs é maior que a soma das atividades hidrolíticas individuais, sinergismo Endo-Exo. Outros numerosos tipos de sinergismo têm sido reportados, dentro dos quais se incluem; sinergismo exoglucanase com exoglucanase, endoglucanase com β - glicosidase, domínios catalíticos com CBM, sinergismo entre domínios catalíticos e sinergismo entre endoglucanases (reportado somente para celulases fúngicas de *Gloeophyllum sepiarium* e *Gloeophyllum trabeum*). O tipo de sinergismo depende tanto da fonte de enzima como da natureza do substrato (YANG et al 2011).

Figura 2- Mecanismo de ação de celulases. β G: β -glucosidase; CBH: Celobiohidrolase; EG: Endoglucanase

Fonte: Viksør-Nielsen (2010)

Figura 3 - Celobiohidrolase de *T. reesei* da família 7 (Cel7A) agindo em celulose. Cel7A é composta por um CBM de 36 aminoácidos, um domínio de união com O-glicano (azul escuro), e um domínio catalítico com “N-linked glicano” (rosa) e um túnel de 50 Å para o processamento das cadeias de celulose (verde). A celobiose é apresentada em amarelo.

Fonte: Beckham et al (2011).

Ainda dentro do complexo celulolítico podem existir outras enzimas como a celobiose-desidrogenase (CDH), que é responsável por oxidar vários açúcares como celobiose, celodextrinas solúveis, manodextrinas, lactose e inclusive celulose, até suas correspondentes lactonas. Comoceptor de elétrons para fechar o seu ciclo catalítico, esta enzima pode utilizar quinonas, citocromos, radicais orgânicos, O_2 molecular, íons Fe^{3+} e Cu^{2+} . Ao reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , a celobiose-desidrogenase pode gerar radicais hidroxilas via reação de Fenton, os quais podem atuar na despolimerização dos polissacarídeos e na modificação estrutural da lignina. O H_2O_2 envolvido na reação pode ser gerado por várias vias que incluem a redução de O_2 pela própria celobiose-desidrogenase ou por outras enzimas oxidativas (AGUIAR; FERRAZ, 2011). CDH é uma oxidoreductase típica com meias reações de oxidação e redução que ocorrem de forma independente. A meia reação de oxidação representa uma oxidação na posição C1 do sacarídeo; o hemiacetal nesta posição é convertido numa lactona que se hidrolisa espontaneamente até ácido carboxílico. Os dois elétrons captados pela enzima são depois transferidos para umceptor de dois elétrons ou para dois aceptores de um elétron. Todos os resultados indicam que a oxidação de um doador de elétrons é conduzida pelo grupo FAD, que é convertido em $FADH_2$. A

redução do citocromo *c* e outros aceptores de elétrons pela CDH é realizada pelo domínio heme. No entanto, a redução direta de aceptores de elétrons pelo domínio FAD da proteína também é possível, apesar de que às vezes é mais lento (Figura 4) (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008).

Outro grupo de proteínas amplamente expresso no reino fungi relacionado com a biodegradação de material lignocelulósico é a família de proteínas composta pelas glicosídeo hidrolases 61 (GH61). Tem sido demonstrado que a adição de proteínas GH61 específicas aumenta a eficiência de celulasas de *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) na hidrólise de substratos de origem lignocelulósica. Estas proteínas foram originalmente classificadas como glicosídeo hidrolases, com base na detecção de baixos níveis de atividade endoglucanase. No entanto, as investigações subsequentes revelaram que estas proteínas não tem a capacidade de hidrolisar substratos tais como celulose microcristalina, celulose intumescida com ácido fosfórico (PASC do inglês “*phosphoric acid-swollen cellulose*”), ou substratos hemicelulósicos, como xilana. As estruturas cristalinas de proteínas GH61 evidenciam que não há a presença de um sítio ativo de glicosídeo hidrolase tradicional, mas estas proteínas apresentam homologia estrutural com proteínas bacterianas cuja função é clivar quitina nos terminais redutores de polímeros quitina oxidados, numa reação que depende tanto da presença de oxigênio como da presença de um agente redutor (LANGSTON et AL 2011). Recentemente foi experimentalmente demonstrado que a função destas proteínas em fungos filamentosos envolve a oxidação da celulose. Portanto, atualmente se denominam monooxigenases de polissacarídeos dependentes de cobre (POMs). Estas proteínas têm sido encontradas tanto em Ascomicetos como Basidiomicetos o que sugere que este modelo oxidativo de degradação de celulose pode ser comum para todo o reino Fungi. Quando estas proteínas são adicionadas à misturas de celulasas, observa-se um incremento na sacarificação de celulose, o que sugere que elas podiam ser usadas para melhorar a eficiência da produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos (PHILLIPS et al 2011).

Apesar de os complexos enzimáticos para degradar polissacarídeos apresentarem boa eficiência, o acesso das enzimas até os polissacarídeos na parede celular está fisicamente limitado pela presença de lignina. Tem sido demonstrado que a parede celular apresenta uma baixa porosidade o que impede a infiltração de moléculas de elevada massa molar, como as proteínas (HIMMEL et al 2007). Portanto, os processos de conversão da

biomassa por enzimas requerem de uma etapa de pré-tratamento que visa essencialmente aumentar o acesso da enzima ao substrato.

Figura 4- Reações da celobiose desidrogenase. “Fe” representa o ferro heme, “A” representa um aceptor de elétrons.

Fonte: Adaptado de Baldrian; Valášková (2008).

2.4. Pré-tratamentos.

Os pré-tratamentos devem atender a vários requisitos de processo que muitas vezes incompatíveis, tais como: melhorar a acessibilidade das enzimas ao substrato; evitar a degradação e perda de carboidratos; evitar a formação de subprodutos inibitórios das etapas posteriores (hidrólise e fermentação) e ser economicamente viável (SUN; CHENG, 2002).

Numerosos métodos de pré-tratamentos estão atualmente disponíveis e podem ser classificados em diferentes categorias: físicos (moenda); fisicoquímicos (“steam explosion”); químicos (ácidos diluídos, álcalis); dependentes de solventes orgânicos

(Organosolv) e bioquímicos (fungos). Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens e atualmente não há tecnologias provadas industrialmente que apliquem pré-tratamento de biomassa para sacarificação subsequente. A tendência atual para aplicação industrial tem sido a de empregar processos com baixo consumo de reagentes químicos, principalmente visando o menor custo de pré-tratamento e o menor impacto ambiental possível do processo (CHIARAMONTI et al 2012).

No caso particular do presente trabalho, avaliaremos como um processo oxidativo, que provoca principalmente a degradação da hemicelulose devido a sua maior reatividade, mas também pode despolimerizar a celulose e modificar a lignina, afetando a ação de enzimas hidrolíticas. A reação de Fenton que é um exemplo clássico de processo oxidativo envolve a redução de H_2O_2 até o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) pela oxidação de Fe^{+2} (Eq. 1-4)

A formação de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é a etapa chave da reação de Fenton, pois se trata de radical com elevada capacidade oxidativa. O Fe^{3+} pode ser reduzido de novo para Fe^{2+} (Eq. 2). Devido a elevada capacidade oxidativa, o radical hidroxila pode reagir com quase todos os compostos químicos conhecidos (MICHALSKA et al 2012).

A eficácia desta reação não aumenta necessariamente com a quantidade de sal de ferro ou peróxido de hidrogênio usado no processo. A presença destes reagentes em excesso leva a reações secundárias (3) e (4), que culminam na eliminação de radicais hidroxila (LUCAS; PERES, 2009).

Resultados contraditórios têm sido apresentados com base no efeito do tratamento Fenton sobre amostras de celulose e a subsequente hidrólise enzimática (Ratto et al 1997). Com a finalidade de avaliar esta quisição, Ratto et al 1997 pretrataram dois substratos: pó

de madeira de abeto e celulose microcristalina (Avicel) empregando processos oxidativos. Os autores utilizaram o reagente de Fenton (H_2O_2 , Fe^{2+}) em três combinações diferentes; 0.2% H_2O_2 /0.1 mM FeSO_4 , 1% H_2O_2 /0.5 mM FeSO_4 e 3% H_2O_2 /1.5 mM FeSO_4 . O pH das soluções foi ajustado para 4.0 e o tempo de reação foi de 24h a 30°C com agitação. Uma vez filtradas e secadas, as amostras prétratadas e os controles foram submetidas à hidrólise enzimática utilizando três combinações diferentes de sistemas enzimáticos i) um extrato enzimático obtido do fungo de decomposição parda *Poria placenta*, ii) endoglucanase purificada de *Trichoderma reesei*, EGI, iii) um preparado de celulases comerciais, Econase CE. Os resultados indicaram que o tratamento oxidativo produziu a despolimerização dos polissacarídeos nos dois substratos e a perda de massa dependeu da concentração dos reagentes utilizados. Foi observado que o tratamento oxidativo aumentou a eficiência da hidrólise enzimática de pó de abeto com todas as combinações de enzimas ensaiadas, efeito principalmente devido a hidrólise dos produtos primários (oligômeros formados a partir de celulose, xilano e glucomanano) os quais foram hidrolisados até monômeros, esta remoção de celulose amorfa e hemicelulose facilitou o acesso das enzimas hidrolíticas até a celulose cristalina, em comparação com o controle (pó de spruce sem tratar).

Em contraste, o pré-tratamento baseado na reação de Fenton melhorou a hidrólise de Avicel somente quando a hidrólise foi realizada com endoglucanases purificadas de *T. reesei* e com o extrato celulolítico obtido de *P. placenta*. A hidrólise da Avicel oxidada pelo preparado de enzimas comerciais Econase CE foi menor do que aquela obtida com a Avicel in natura (não oxidada).

Cannella, et al (2012) avaliaram o efeito de um preparado de enzimas comerciais (Cellic, CTec2) com atividade oxidante sobre substratos lignocelulosicos, palha de trigo e papel filtro. Observando que a presença de estas enzimas incrementa globalmente o rendimento de hidrólise enzimática, nas condições ensaiadas um 4,1% das ligações glicosídicas foram oxidativamente clivadas por estas enzimas, favorecendo o acesso das enzimas hidrolíticas, enquanto que a enzima β -glicosidase contida na mistura enzimática tem capacidade de hidrolisar ácido celobiônico, mas a uma taxa muito mais lenta em comparação com a celobiose, mas o ácido glucônico produzido atua como um forte inibidor da atividade β -glicosidase. Os resultados indicam que uma quantidade significativa de glucose foi oxidada até ácido glucônico não fermentável e o seu efeito como inibidor das β -glucosidasas. Dependendo da temperatura, pode-se produzir , 4-6 g / L

de ácido gluconico (concentração mais elevada a temperatura mais baixa), e este valor era suficiente para resultar em 50% de inibição da actividade β -glicosidase nas preparações de enzima.

Xu, Ding e Tejirian (2009) avaliaram a oxidação seletiva das extremidades redutoras de Avicel e *Phosphoric acid-swollen cellulose* (PASC) utilizando CuSO_4 . Foi feita a oxidação de celulose Avicel de forma a se obter 40 ou 80% das extremidades redutoras oxidadas, bem como a oxidação de 80% das extremidades redutoras de PASC. Os autores realizaram então a hidrólise enzimática dos materiais oxidados e dos respectivos materiais de controle (não oxidados). A hidrólise foi realizada com diferentes celobiohidrolases pertencentes às famílias de glicosilases 6 e 7, além de um extrato enzimático de *Hypocrea jecorina* com atividade celobiohidrolases, endoglucanases e β -glicosidases. Os resultados demonstraram que a atividade da celobiohidrolase I (CBH-I), que hidrolisa a celulose iniciando nos terminais redutores, foi diminuída e mais afetada do que a atividade da celobiohidrolase II (CHB-II), que atua sobre terminais não redutores. Cabe enfatizar dos resultados deste trabalho que a hidrolise enzimática dos dois substratos oxidados (Avicel e PASC) diminuiu significativamente quando a enzima empregada foi a celobiohidrolase I (CBH-I), tanto em termos da velocidade inicial quanto em termos da extensão total da hidrólise. É conhecido que a CBH-I apresenta atividade processiva, mesmo quando o terminal da cadeia de celulose está reduzido (transformado em glucitol aberto). Acredita-se que CBH-II também tem atividade processiva, mas a sua fidelidade de processabilidade e especificidade são significativamente mais baixas do que os da CBH-I. Os substratos PASC e Avicel oxidados também foram hidrolisados por uma mistura de celulasas de *Hypocrea jecorina*, com atividade celobiohidrolase, endoglucanase e β -glicosidase. Durante a fase inicial de hidrólise, não foi observada diferença na conversão dos substratos oxidados comparados com os substratos não oxidados, mas, após um tempo de reação prolongado, os níveis de hidrólise das celulosas oxidadas foram significativamente menores do que os observados com as celulosas não-oxidadas.

Com relação à ação das endoglucanases sobre materiais oxidados, Nidtzky e Claeysens (1994) e Divine et al. (1998) demonstraram que a atividade de endocelulasas não foi afetada de forma significativa, quando o substrato foi previamente oxidado nos terminais redutores. Por outro lado, os autores também observaram que a ação de exocelulasas foi diminuída com o emprego de substratos oxidados.

Os estudos descritos anteriormente sugerem que um bom modelo de estudos para novas enzimas celulolíticas, com eventual ação eficiente em celulose oxidada, é composto pelos fungos de decomposição parda, pois estes organismos já atuam nos ambientes naturais por vias que envolvem a geração de radicais hidroxila que modificam os polissacarídeos da parede celular vegetal (BACKA et al 1997). O tópico a seguir descreve alguns antecedentes sobre o modo de ação destes fungos.

2.5. Biodegradação da madeira por fungos.

Os micro-organismos mais eficientes na biodegradação da madeira são os fungos decompositores da madeira. Dependendo do padrão de degradação, estes fungos são classificados em três grupos que são descritos a seguir. Fungos de decomposição branda (*soft rot-fungi*): degradam principalmente a holocelulose e em forma mais lenta e limitada a lignina. Estes fungos caracterizam-se por causar danos na superfície da madeira, sem que esta perca resistência estrutural (GOODEL, 2003). Fungos de decomposição branca (*white rot-fungi*): são capazes de modificar eficientemente todos os componentes estruturais da madeira, produzindo dano estrutural. Os mecanismos de degradação empregados por estes fungos envolvem hidrolases para a degradação de holocelulose e oxidases para a degradação de lignina (TEN HAVE; TEUNISSEN, 2001). Fungos de decomposição parda (*brown rot-fungi*): são caracterizados por despolimerizar a holocelulose sem a degradação considerável de lignina, o que produz dano estrutural na madeira. Os mecanismos que estes fungos utilizam para degradar a madeira incluem sistemas não enzimáticos. No caso da ação de sistemas não enzimáticos há a predominância de compostos de baixa massa molar, que tem a capacidade de se difundir através da parede celular e promover a geração de espécies radicalares como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) mediante reações de Fenton. Os fungos de decomposição parda apresentam também um complexo de celulasas com a capacidade de degradar a holocelulose, mas com uma diversidade de enzimas menor do que aquela observada em fungos de decomposição branca (GOODELL, 2003; WYMELENBERG et al 2010).

2.5.1. Mecanismos de degradação de madeira por fungos de decomposição parda.

Os fungos de decomposição parda colonizam a madeira a partir de seu micélio. Se as condições ambientais são adequadas (principalmente umidade e temperatura) proliferam degradando os carboidratos e nutrientes disponíveis na madeira para posteriormente ficar no lúmen das células, onde começa a biodegradação dos componentes macromoleculares. Na degradação da madeira, a capa da parede celular que encontra-se em contato com a hifa do fungo, a capa S₃, fica relativamente intacta até estados avançados de degradação. A degradação começa pelas capas mais profundas da parede celular, principalmente pela capa S₂. A degradação não ocorre perto das hifas do fungo, o que indica que os reagentes de degradação produzidos pelos fungos são capazes de difundir através da parede celular da madeira. No entanto, as enzimas extracelulares dos fungos são demasiado grandes para penetrar a parede celular da madeira quando esta não está modificada, motivo pelo qual são incapazes de atingir a celulose (GREEN; HIGHLEY, 1997; XU; GOODELL, 2001). Portanto, a biodegradação por fungos de decomposição parda deve envolver um processo não enzimático, pelo menos nas fases iniciais de degradação.

Este processo não enzimático está baseado na produção de compostos de baixa massa molar, que tem a capacidade de difundir através da parede celular da madeira para promover a geração de espécies ativadas, como radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) mediante reação de Fenton (Eq1) (GREEN; HIGHLEY, 1997)

Dois sistemas que promovem a reação de Fenton têm sido descritos. O primeiro baseia-se na produção de dihidroxibenzenos (DHB) e o segundo é baseado na produção de glicopeptídeos. Além destes mecanismos que tomam como base a ação de compostos de baixa massa molar, há também um mecanismo enzimático que considera a participação da enzima celobiose desidrogenase que já foi descrita no fungo de decomposição parda *Coniophera puteana* (CONTRERAS et al 2007).

Dentro do grupo de fungos de decomposição parda, o modo de ação de *Gloeophyllum trabeum* é um dos mais conhecidos. Este fungo dispõe de um sistema de hidroquinonas orientado para a produção extracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), além produzir uma série de hidrolases como β -glicosidases, xilanases e duas

endoglucanases, uma das quais atua de forma processiva na degradação de celulose cristalina (COHEN; SUZUKI; HAMMEL, 2005).

Os dihidroxibenzenos (DHBs) 2,5- dimetoxihidroquinona e 4,5 dimetoxycatecol já foram identificados como os compostos indutores da reação de Fenton neste fungo. Estes metabólitos atuam reduzindo o Fe^{+3} e produzindo H_2O_2 de forma cíclica. A quinona resultante é reduzida a hidroquinona por uma enzima denominada quinona redutase (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008). O princípio deste mecanismo é a de que o fungo reduz uma quinona extracelular para sua hidroquinona, que depois reage com Fe^{+3} para dar Fe^{+2} e uma semiquinona radical. A semiquinona em seguida reduz o O_2 para dar o radical hidroperoxila ($\cdot\text{OOH}$) e a quinona original. O hidroperoxila é uma fonte de H_2O_2 , o que irá gerar um novo sistema de Fenton (Figura 5).

Figura 5- Mecanismo proposto para a geração de espécies reativas de oxigênio no fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum*. (mostrado para 2,5-dimetoxihidroquinone).

Fonte: Adaptado (BALDRIAN 2008).

O radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) gerado na reação de Fenton reage rapidamente com praticamente todas as moléculas orgânicas, seja mediante a abstração de um hidrogênio a

partir de estruturas alifáticas ou pela adição electrofílica ao anel aromático. O radical hidroxila pode abstrair um átomo de hidrogênio de subunidades de celulose, usualmente no carbono 1 (C1). Esta reação gera um radical centrado no carbono que reage rapidamente com oxigênio para formar radicais organoperoxila ($\text{ROO}\cdot$). Se o radical peroxila já tem um grupo hidroxila no mesmo carbono, ocorre a eliminação de hidroperoxila ($\cdot\text{OOH}$). Se não há um grupo α -hidroxila, a estrutura $\text{ROO}\cdot$ passa por uma variedade de oxido-reduções, algumas das quais resultam na clivagem da cadeia do polissacarídeo (Figura 6) (HAMMEL et al 2002).

Figura 6- Uma das possíveis vias para a oxidação de celulose por radicais hidroxila. Esta via cliva a ligação glicosídica da celulose e gera um resíduo de ácido gluconico (na forma de lactona).

Fonte: (HAMMEL et al 2002).

A elevada capacidade oxidativa do radical hidroxila (E° 2.8V, 25°C) permite, além de depolimerizar a celulose, diminuir rapidamente os teores de hemicelulose (CURLING; CLAUSEN; WINANDY, 2002) e gerar modificações na lignina, principalmente oxidação

das cadeias laterais, desmetilação, hidroxilação, oxidação do C α e ruptura da ligação β -O-4 (Figura 7). Este conjunto de reações pode levar a despolimerização parcial da lignina (FILLEEY et al 2002) deixando o substrato com uma importante perda de resistência e melhorando a acessibilidade das enzimas na etapa de sacarificação.

As mudanças detectadas na celulose degradada por fungos de decomposição parda (aumento da capacidade redutora e aumento da solubilidade em álcalis) têm sido observadas também na celulose submetida a tratamento com H₂O₂ e Fe⁺². Pequenas quantidades de grupos carboxila (menos de 0.5 por cadeia de celulose) foram detectadas em celulose de algodão depolimerizada pelo fungo de decomposição parda *P. placenta* ou por reagente de Fenton. Resíduos de ácidos glicérico, eritrônico, e glucônico foram reportados nos hidrolisados ácidos. (KIRK et al 1991).

Diferindo de *Coniophora puteana*, que produz celobiohidrolases, a maioria dos fungos de decomposição parda, inclusive *G. trabeum*, não possuem o sistema celulolítico completo necessário para degradar celulose cristalina (MANSFIELD; SADDLER; GUBITZ, 1998). Em algumas espécies, a ausência de celobiohidrolase é substituída pela produção de endoglucanases processivas, enzimas que clivam a celulose internamente, liberam oligossacarídeos antes de perder contato com o polissacarídeo e podem seguir o processo de despolimerização (COHEN; SUZUKI; HAMMEL, 2005). Portanto, estas enzimas podem ter atividade similares as de endoglucanase e celobiohidrolase simultaneamente.

Em *G. trabeum* já foram descritas β -glucosidases, xilanases e duas endoglucanases, uma das quais é considerada processiva (Cel5A). Esta enzima tem a capacidade de hidrolisar celulose cristalina Avicel, liberando celobiose como produto principal enquanto introduz apenas uma pequena percentagem de açúcares redutores no substrato insolúvel. Ela produziu até 4,5 equivalentes de glicose a partir de Avicel por minuto e miligrama de proteína. Nos fungos de decomposição parda, as endoglucanases processivas poderiam potencialmente substituir a ausência de celobiohidrolases. É provável que estas enzimas atuem de forma coordenada com o sistema de degradação oxidativo, depois que o tamanho dos poros na matriz lignocelulósica seja incrementado. A produção destas endoglucanases processivas em outro fungo de decomposição parda, *Fomitopsis palustres* também, já foi

descrita (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008; COHEN; SUZUKI; HAMMEL, 2005; YOON et al 2007).

Figura 7- Alterações químicas ocorridas na lignina após do ataque de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) produzidos por reação de Fenton durante a decomposição de madeira por fungos de decomposição parda e potenciais reações de re-polimerização. A oxidação da cadeia lateral mostra a clivagem da ligação $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ com formação de benzaldeído e derivados do ácido benzoico (adaptado de Arantes 2012).

Fonte: Adaptado de Arantes (2012).

Apesar da intensiva investigação feita nos últimos 30 anos, a conversão rápida, completa e eficiente dos substratos celulósicos mediante hidrólise enzimática continua sendo um desafio. Há cerca de 5-6 anos, várias análises econômicas do processo de produção de etanol a partir de lignocelulósicos indicavam que a etapa de conversão enzimática é uma das mais caras. Recentes esforços de alguns dos principais fabricantes mundiais de enzimas resultaram na redução de aproximadamente 20-30% no custo. No entanto, reconhece-se que a natureza do substrato e o método de pré-tratamento continuam influenciando a eficácia da combinação de enzimas empregadas (CHANDRA et al 2007).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é preparar um substrato celulósico oxidado e avaliar se as enzimas secretadas pelo fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* podem atuar como auxiliares às celulasas comerciais na hidrólise de substratos oxidados.

Para atingir este objetivo propõe-se a execução das seguintes etapas:

1. Oxidação de celulose Avicel por processo químico.
2. Caracterização do substrato oxidado.
3. Cultivo de *G. trabeum* para recuperação de um extrato enzimático rico em hidrolases.
4. Hidrolisar Avicel in natura e Avicel oxidada com misturas de enzimas comerciais suplementadas com o extrato enzimático obtido de *G. trabeum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1. Oxidação de celulose Avicel e sua caracterização.

Celulose Avicel (SIGMA -PH-101) (10 g) foi misturada com 500 mL de solução que continha concentrações finais de 5 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10% (v/v) de H_2O_2 em pH 2.8. A mistura foi agitada a 120 rpm por 24h incubada a 25°C. Este procedimento oxidativo foi denominado como tratamento Fenton dentro do capítulo de resultados e discussão. Completado o tempo de reação, o sólido foi filtrado utilizando sistema Millipore com membranas de 0.45 μm , lavado com 1L de água destilada e secado em dessecador até umidade de aproximadamente 6% (Modificado de Ratto, 1997).

Um segundo procedimento de oxidação seletiva dos terminais redutores de celulose microcristalina foi testado, empregando CuSO_4 como agente oxidante, conforme metodologia proposta por XU, DING e TEJIRIAN, 2009. Neste caso, celulose Avicel (5g) foi tratada com uma suspensão de CuSO_4 2.8mM, ácido bicinconínico (BCA) 46mM e Na_2CO_3 170 mM em volume final de 250 mL. A mistura foi agitada a 80 rpm por 15 dias a 30°C. Completado o tempo de reação, o sólido foi filtrado utilizando sistema Milipore com membranas de 0.45 μm , lavado com 500 mL de água destilada, resuspendido em tampão acetato 50 mM pH 5.1 e, após 15 min, filtrada novamente. O sólido obtido foi secado em dessecador até umidade de aproximadamente 6%. Durante os 15 dias de reação foi realizada a quantificação fotométrica de Cu(I) como Cu(I)BCA_2 a 562 nm (BRENNER et al 1995).

Os sólidos obtidos pelos dois procedimentos de oxidação foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho num equipamento PERKIN ELMER 2000 FT-IR. Os espectros foram comparados com um controle de celulose Avicel não tratada.

O conteúdo de carboidratos presentes na amostra controle e nas amostras oxidadas foram determinados a partir de uma hidrólise do material com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% (FERRAZ et al 2000). Assim, 400 mg de amostra foram tratados com 3mL de H_2SO_4 72% (p/p) num banho a 30°C por 1h. Em seguida, o conteúdo do tubo de ensaio foi

transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 250 mL com o auxílio de 79 mL de água, a mistura foi autoclavada a 121°C por uma hora, resfriada e filtrada a vácuo. O filtrado foi avolumado para 100 mL e analisado quanto aos teores de açúcares por cromatografia líquida (CLAE). A análise cromatográfica foi feita, utilizando uma coluna HPX-87H (Bio-Rad) a 45°C, H₂SO₄ 0,005 M como fase móvel e fluxo de 0.6 mL/min e um detector de índice de refração a 35°C. A caracterização permitiu quantificar os açúcares glicose e xilose, presentes no hidrolisado ácido.

A presença de açúcares oxidados nas amostras tratadas pela reação de Fenton foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS). Os hidrolisados ácidos das amostras oxidadas por reação de Fenton foram neutralizados e posteriormente liofilizados. 1,5 mg do sólido liofilizado foram diluídos em 750 µL de piridina e 750 µL de BSTFA para identificação dos compostos na forma de éteres derivados com a função trimetil-silil (-Si(CH₃)₃). De forma similar foram preparados e analisados os seguintes padrões de açúcares; glicose, ácido glucônico, ácido *glucurônico* e ácido celobiônico. As amostras sililadas foram analisadas em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (Finningan GCQ-Mat), DB-5 de 30 m x 0,53 mm. O fluxo de hélio utilizado foi de 33,0 cm/s e a temperatura do injetor foi mantida a 240°C. Para a separação dos compostos foi empregada uma rampa de aquecimento que partiu de 60°C mantidos por 1 min. Posteriormente a coluna foi aquecida a 20°C/min até atingir a temperatura de 280°C, que foi mantida por 10 min adicionais. A quantidade de amostra injetada foi de 1 µL empregando um fracionamento mecânico (split) na razão de 1:30.

As amostras de celulose foram ainda caracterizadas quanto à viscosidade de acordo com a norma TAPPI 230 om-04. Para isso, 0,05 g de celulose (em base seca) foram pesados com exatidão de $\pm 0,005$ g e então misturados com 5 mL de água sob agitação magnética por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 5 mL de solução de cobre (II) etilendiamina 1M e a mistura foi agitada por mais 15 minutos. Finalmente, a amostra foi transferida para um viscosímetro Cannon-Fenske série 100x que estava parcialmente submerso num banho de água a 25 $\pm$ 0,1°C. O tempo de escoamento da solução dentro do viscosímetro foi determinado em quintuplicata. A viscosidade das amostras foi determinada através do produto da constante do viscosímetro (mm²/s²), tempo de escoamento (s) e a densidade da solução de celulose em cobre-etilendiamina 1M a 25°C (1.052 g/cm³). Os resultados são apresentados como viscosidade intrínseca η (dL/g) foram

calculada pelo método descrito por Solomon and Gottesman, 1968.

4.2. Produção das enzimas por *Gloeophyllum trabeum*.

4.2.1. Cultivo do fungo e preparo do inóculo.

G. trabeum (coleção de cultura do Laboratório de Ciências da Madeira, Departamento de Biotecnologia, EEL/USP) foi cultivado em placas de Petri com meio contendo 2% de extrato de malte, 2% de ágar e 0,2% de extrato de levedura a 27°C durante 7 dias. Erlenmeyers de 2 L contendo 200 mL de meio de cultivo composto por 2,4% (p/v) de extrato de batata/dextrose e 0,7% (p/v) de extrato de levedura esterilizado a 121°C/15 min foram inoculados com 20 discos de micélio com 8 mm de diâmetro provenientes das placas de Petri recém-cultivadas com *G. trabeum*. Após 14 dias de incubação estática a 27 °C, o micélio crescido na forma de uma camada superficial do meio líquido foi filtrado, lavado com água estéril e posteriormente macerado em 300 mL de água destilada também esterilizada, usando um liquidificador de alumínio estéril. O micélio foi macerado 3 vezes em ciclos de 15 segundos de maceração e 60 segundos de repouso. Uma alíquota de 20 mL foi retirada da suspensão obtida e filtrada sobre papel de filtro previamente seco e pesado em pesa-filtro. O micélio retido mais o papel de filtro (contido em um pesa-filtro) foram então secos a 100°C até massa constante para a determinação da quantidade de micélio (base seca) contido na suspensão recém-preparada. Com base nessa determinação, foi definido o volume de suspensão (homogeneizada) necessário para inocular cada frasco de cultivo com uma carga de 235 mg de micélio por litro de meio.

*4.2.2. Cultivo de *G. trabeum* para produção de hidrolases.*

O meio de cultivo foi constituído, por litro de solução de: 1,0 g de NH_4NO_3 , 0,5 g de MgSO_4 , 0,2 g de Na_2HPO_4 , 0,8 g de KH_2PO_4 , 4,0 g de extrato de levedura e 20 g de

carboxy metil celulose de média viscosidade (SIGMA C4888) como fonte de carbono.

Frascos de Erlenmeyers de 1L contendo 200 mL do meio de cultivo foram inoculados sob condições assépticas com um volume da suspensão de inóculo correspondente a 235 mg de micélio (base seca)/L de meio. Os frascos foram incubados estaticamente a 27°C. Nove cultivos idênticos foram realizados simultaneamente. Após um período de 21 dias de incubação, cada Erlenmeyer foi filtrado utilizando filtro Gooch número 4. Os extratos enzimáticos brutos foram combinados (1800 mL) e divididos em duas frações de 900 mL. Uma amostra de 14 mL foi separada para a determinação da atividade endoglucanase originalmente presente nos cultivos.

Uma das frações de 900 mL de extrato bruto foi submetida à adição de sulfato de amônio para atingir 80% da saturação em sulfato de amônio a fim de precipitar as enzimas presentes. O pellet precipitado foi resuspenso em água destilada e submetido à ultrafiltração contra uma membrana de 10 kDa. O extrato concentrado foi caracterizado com base nas atividades de hidrolases presentes.

A outra fração de 900 mL de extrato enzimático foi igualmente precipitada sulfato de amônio e submetida à ultrafiltração. O concentrado obtido foi congelado em ultrafreezer e então liofilizado até a formação de um pó. O pó foi novamente resuspenso em água para caracterização das atividades de hidrolases presentes.

4.2.3. *Determinação das atividades enzimáticas.*

Os extratos enzimáticos de *G. trabeum* (líquido concentrado e amostra liofilizada) foram caracterizados quanto as atividades de endoglucanase, β -glicosidase, celobiohidrolase e xilanase.

4.2.3.1. Determinação da atividade endoglucanase.

O método para a determinação da atividade de endoglucanase foi descrito por Ghose et al 1987 e consiste na hidrólise de carboximetil celulose (CMC), resultando na formação de extremidades redutoras, detectadas pelo método do ácido dinitrossalicílico – DNS (MILLER, 1959).

Uma alíquota de 0,5 mL de CMC 2% (diluída em tampão citrato 0,05M, pH 4,8) foi incubada a 50°C por 30 minutos com 0,5 mL de extrato enzimático diluído com tampão citrato em vários níveis de diluição. As diluições do extrato foram realizadas a fim de determinar àquela que produz 0,5 mg de açúcar redutor no meio reacional. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro consistiu da substituição do substrato por solução tampão. Os controles para cada amostra foram preparados adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático. O cálculo de concentração a partir da absorbância foi feito de acordo com uma curva de calibração padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como μmol de açúcar redutor liberado por minuto nas condições de ensaio.

A curva padrão de glicose foi construída utilizando as seguintes concentrações de glicose; 2,0, 1,33, 1,0, 0,5 mg de glicose/mL de tampão acetato. Às soluções padrão foram adicionados 3,0 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) e a mistura foi fervida por 5 minutos. Uma vez resfriada, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. O branco correspondeu à substituição da glicose por solução tampão.

4.2.3.2. Determinação da atividade Exoglucanase (Celobiohidrolase).

O método utilizado para a determinação da atividade de exo-1,4- β -glucanase foi descrito por Wood e Bhat (1988). A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo

método do DNS (MILLER, 1959). Uma alíquota de 0,9 mL de suspensão de Avicel 1% (p/v) foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e posteriormente incubada por os seguintes tempos de reação 30, 45, 60 e 120 minutos a uma temperatura de 50°C. Para interromper as reações foram adicionados 1,5 mL de DNS. Os tubos de ensaio foram posteriormente fervidos em banho-maria durante 5 minutos. Após esta etapa, a mistura foi centrifugada a 3400 x g por 15 minutos para retirada dos sólidos insolúveis. A leitura da absorbância do sobrenadante foi feita a 540 nm. O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro correspondeu à substituição do substrato e do extrato enzimático por tampão. Os controles foram preparados adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. A determinação da concentração de açúcar a partir da absorbância foi feita de acordo com a curva padrão de glicose conforme descrição do item 4.2.3.1. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor liberado por minuto nas condições de ensaio.

4.2.3.3. Determinação da atividade de β -glicosidase.

Para a determinação da atividade β -glicosidase foi utilizada a metodologia descrita por Tan et al.(1987), que envolve a liberação de p-nitrofenol durante a hidrólise do reagente comercial p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG).

Uma alíquota de 0,8 mL de pNPG 0,1% (p/v) foi adicionada a 0,2 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50 °C pelos seguintes tempos de reação: 2, 5, 10, 20 e 30 minutos. Completado o tempo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de bicarbonato de sódio 10% e a absorbância foi medida a 410 nm. O branco utilizado consistiu na substituição do substrato e o extrato enzimático por tampão. O controle foi preparado adicionando o bicarbonato antes do extrato enzimático. O cálculo de concentração foi feito de acordo com uma curva padrão de p-nitrofenol. Uma unidade de β -glicosidase (UI) foi definida como 1 μ mol de p-nitrofenol formado por minuto nas condições de ensaio. A construção da curva padrão de p-nitrofenol (pNP) foi realizada misturando em tubos de ensaio, 0,2 mL de soluções de pNP com diferentes concentrações e 0,8 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH

5,0. Foram adicionados 2,0 mL de bicarbonato de sódio 10% (m/v). As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 410 nm. O branco foi feito substituindo a solução de pNP por solução tampão. Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de pNP para a obtenção da curva padrão.

4.2.3.4. Determinação da atividade xilanase.

As atividades de xilanase foram determinadas segundo Bailey et al. (1992). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Um volume de 0,9 mL de uma solução de xilana de birchwood 1% (p/v) (SIGMA) foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e a mistura foi incubada a 50 °C pelos tempos de reação de 2, 5, 10, 20 e 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 minutos. Após o resfriamento foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito substituindo o substrato e o extrato enzimático por tampão. O controle foi preparado adicionando-se o DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de xilose através da curva de calibração de xilose.

A curva de xilose foi obtida de forma semelhante à curva de glicose, substituindo as soluções de glicose por soluções de xilose. Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de xilose e dessa forma obteve-se a curva de calibração. A absorbância foi convertida em concentração de acordo com a curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor liberado por minuto nas condições de ensaio.

4.3. Hidrólise enzimática.

As amostras oxidadas e controles de Avicel foram hidrolisadas com enzimas em experimentos realizados em pequena escala (20 mg de substrato). Optou-se por experimentos de hidrólise em pequena escala pois os níveis de produção de celulases

observados nos cultivos de fungos de decomposição parda geralmente eram baixos e a disponibilidade de enzimas era pequena. As reações foram conduzidas com consistência de 2% (p/v) de substrato. A carga enzimática de celulases totais foi definida originalmente como 10 FPU/g de substrato, provenientes da enzima comercial Celluclast (Sigma C2730) e 15 UI de β -glicosidase/g de substrato, provenientes da enzima comercial Novozym (Sigma C6105). As preparações comerciais das enzimas foram diluídas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 contendo azida sódica a 0,01% (p/v) para um volume final de 1 mL. Cerca de 20 mg de substrato (massa seca) foram pesados em microtubos de 2 mL. Ao sólido foi adicionado 1 mL da mistura de enzimas e a reação foi conduzida sob agitação de 120 rpm a 45°C. Nos tempos de reação de 4, 8, 24, 48 e 72 horas de reação foi feita a amostragem a partir de uma alíquota de 20 μ L retirada de cada tubo de experimentação. Para isso, os tubos foram resfriados em banho de gelo e em seguida centrifugados a 3400 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 20 μ L do líquido foram coletados, diluídos com água destilada na proporção de 1:20 para os tempos de reação de 4 e 8 horas e 1:40 para os tempos de 24; 48 e 72 horas. As soluções obtidas foram analisadas por CLAE para quantificação do teor de açúcares monoméricos liberados. Após cada período de amostragem, o conteúdo restante do microtubo foi colocado novamente sob agitação de 120 rpm a 45°C.

Para as análises por CLAE foi utilizada uma coluna BIORAD AMINEX HPX87H com H₂SO₄ 5 mM como fase móvel em fluxo de 0,6 mL por minuto e um detector de índice de refração a uma temperatura controlada de 35°C. A conversão enzimática da celulose foi estimada utilizando-se as concentrações de glicose devidamente expressas como massa de glicose no tubo de reação, multiplicada pelo o fator de hidrólise (0,9) e dividida pela massa inicial de celulose presente na reação. Cinco repetições foram realizadas para cada experimento.

Os experimentos de hidrólise descritos anteriormente também foram realizados com cargas menores de enzima na reação. Para isso, foram empregadas cargas reduzidas em 50% (5 FPU e 7,5 UI de β -glicosidase/g de substrato) e em 75% (2,5 FPU e 3,75 UI de β -glicosidase/g de substrato).

O estudo do efeito da mistura de enzimas comerciais com enzimas presentes no extrato concentrado de *G. trabeum* foi conduzido tomando como base a atividade

enzimática de endoglucanase nos meios reacionais avaliados. Assim, as misturas reacionais estudadas continham; 50% da atividade endoglucanase de *T. reesei* (enzima comercial) e 50% da carga de endoglucanase de *G. trabeum*, condição denominada 50% GT, ou 25% da atividade endoglucanase de *T. reesei* (enzima comercial) e 25% da carga de endoglucanase de *G. trabeum*, condição denominada 25% GT. Para determinar se a suplementação com extrato do fungo *G. trabeum* conseguiria atingir a mesma eficiência de hidrólise observada quando se emprega uma mistura de celulasas comerciais, a carga de endoglucanase no ensaio foi ainda aumentada em um 100%, condição denominada 100% GT.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1. Preparação e caracterização de celulose oxidada.

O nível de oxidação de Celulose Avicel tratada por reagente de Fenton e solução de CuSO_4 foi verificado pelo aparecimento de grupos funcionais carbonila (possivelmente carboxila) determinados por espectroscopia de infravermelho. A banda de absorção observada em 1735 cm^{-1} é associada com grupos carbonilas de oxicheluloses de materiais degradados (GARSIDE; WYETH, 2006) (Figura 8).

Figura 8- Espectros de infra vermelho de celulose Avicel oxidada pela reação de Fenton e por CuSO_4 e o respectivo controle não tratado. (preto) Avicel Controle; (vermelho) Avicel oxidada por reação de Fenton; (verde) Avicel oxidada por reação com CuSO_4 .

Com estes resultados, pode-se verificar que ambos tratamentos oxidativos modificaram grupos funcionais presentes na celulose. A maior intensidade da banda associada a grupos carbonila no tratamento Fenton indica que a capacidade oxidativa deste tratamento é maior, em comparação com o tratamento com CuSO_4 .

A reação de oxidação da celulose por Cu (II) pode ser monitorada a partir da determinação da formação de Cu (I) no meio reacional (método do ácido bicincônico - BCA). Desta forma, alíquotas do meio reacional que continha Avicel e CuSO_4 foram analisadas ao longo da reação estudada por mistura com BCA. A cor característica da solução de Cu^{+2} (verde) com BCA mudou progressivamente para a cor roxa do complexo Cu(I)BCA_2 , indicando que o Cu (II) foi reduzido até Cu(I) e que os terminais redutores da cadeia de celulose foram oxidados até ácidos aldônicos ou lactonas correspondentes (ambas estruturas estão em equilíbrio). A redução de Cu (II) foi verificada mediante a determinação espectrofotométrica da formação do complexo Cu(I)BCA_2 a 562 nm, durante os 15 dias de reação (Figura 9).

Pode-se observar que a concentração máxima de Cu (I) foi de 2.79 ± 0.03 mM, permitindo deduzir que todo o Cu (II) adicionado ao meio reacional (2.8 mM) foi reduzido. A princípio, a redução do Cu (II) deveria ocorrer a partir da oxidação dos terminais redutores disponíveis da celulose. No entanto, os dados obtidos por espectroscopia de infravermelho indicam que a formação de grupos carboxílicos na celulose não foi expressiva. Este resultado pode ser explicado pela baixa concentração de Cu (II) inicialmente presente, ou mesmo pelo lento deslocamento do equilíbrio natural Cu(II)/Cu(I) em água, uma vez que a formação do complexo BCA-Cu(I) pode ter fomentado o deslocamento deste equilíbrio no sentido do acúmulo de Cu(I).

Figura 9- Concentração de Cu (I) (mM) quantificado como Cu(I)BCA2

A caracterização da Avicel controle e das amostras oxidadas também foi feita quanto ao teor de açúcares detectados após hidrólise ácida (Tabela 2).

Tabela 2: Composição das amostras de Avicel oxidadas e do controle não tratado segundo os teores de glucana e xilana detectados como açúcares monoméricos após hidrólise ácida.

	Avicel	Avicel /Fenton	Avicel /CuSO ₄
Glucana (%)	93 ± 3	86.6 ± 0.4	94.5 ± 0.4
Xilana (%)	3.9 ± 0.1	2.31 ± 0.01	2.34 ± 0.01
Glucana + Xilana (%)	96.9	88.91	96.84

Pela comparação entre os dois tratamentos oxidativos com o controle, observa-se que o tratamento Fenton diminui significativamente a porcentagem de glucana em

comparação com o controle, enquanto que o tratamento com CuSO_4 não apresentou diferenças significativas. Este resultado tem relação com o observado na análise das amostras por espectroscopia de infravermelho, podendo-se concluir que o tratamento Fenton gerou maiores transformações na celulose do que o tratamento com CuSO_4 .

A perda de massa inicial da Avicel submetida ao tratamento oxidativo também foi avaliada. No tratamento Fenton a perda foi de $11 \pm 3\%$, enquanto que no tratamento com CuSO_4 a perda de massa foi de aproximadamente 15%. Estes valores são estimativas baseadas nas medidas de massa inicial e final da celulose obtida de forma preparativa, onde várias etapas de lavagem e transferência de material sólido poderia ter causado erros experimentais expressivos. Para efeito de comparação, pode-se mencionar que dados reportados por Ratto et al 1997, mostraram uma perda de massa de 9.2% para celulose tratada numa reação de Fenton onde a concentração de peróxido de hidrogênio era de 1%. As perdas de massa em questão estão relacionadas à solubilização parcial de oligômeros da celulose, ou mesmo a mineralização completa do sólido até CO_2 e água.

A análise dos cromatogramas dos hidrolisados ácidos das amostras, indica que com o tratamento Fenton foram produzidos alguns compostos cuja estrutura não é conhecida, (Figura 10). Estes compostos poderiam corresponder a produtos de degradação de celulose, tais como ácidos carboxílicos derivados do processo oxidativo (KIRK, 1991). Para confirmar esta hipótese, três açúcares oxidados foram analisados no mesmo sistema cromatográfico: ácido D- glucurônico, ácido D- glucônico e ácido lactobiônico (estruturas indicadas na Figura 10). Os tempos de retenção destes compostos foram 8,0, 8,9 e 7,5 min, respectivamente. Pode-se notar que tanto o ácido D- glucônico como o ácido lactobiônico apresentam tempos de retenção próximos aos observados para os açúcares correspondentes não oxidados (glicose 8,9 min; celobiose 7,5 min, respectivamente) o que impede a identificação destes compostos neste sistema cromatográfico. No caso do ácido glucurônico, o tempo de retenção de 8,0 min permite sua identificação no sistema cromatográfico empregado, o que permite sugerir que este ácido não estava presente nas amostras oxidadas, indicando que não deve haver oxidação do C-6 na celulose Avicel. No caso do tratamento com CuSO_4 não foram identificados compostos diferentes daqueles já detectados na amostras de Avicel controle (Figura 10).

Figura 10- Cromatogramas dos hidrolisados ácidos das amostras de Avicel oxidadas e do controle obtidos por sistema de cromatografia que emprega a coluna BIORAD HPX-87H.

Para determinar a possível presença de açúcares oxidados nas amostras tratadas pela reação de Fenton, os hidrolisados foram ainda caracterizados por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS). Os hidrolisados ácidos foram previamente neutralizados, liofilizados e os sólidos resultantes tratados com BSTFA para

identificação dos compostos na forma de éteres derivados com a função trimetil-silil ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) (Figura 11).

O sistema cromatográfico em questão foi inicialmente avaliado com os padrões de glicose, ácido glucônico, ácido glucurônico e ácido celobiônico. O cromatograma decorrente da amostra de Avicel oxidada mostra um pico em 18.93 minutos que corresponde à glicose, o que é esperado como o produto de hidrólise ácida, conforme já detectado por CLAE. O pico em 19.25 minutos corresponde ao ácido glucônico confirmando que o tratamento Fenton oxidou os terminais da celulose Avicel principalmente no C1. Por outro lado, o ácido glucurônico (carbono oxidado no C6) não foi detectado na amostra, uma vez que o padrão gerou um pico em 21.57 minutos (não observado no cromatograma indicado na Figura 11). Da mesma forma, o ácido lactobiônico não estava presente na amostra, uma vez que o padrão apresentou pico em 33,9 min, o que não foi detectado no cromatograma correspondente da amostra de Avicel oxidada. Os demais picos observados no cromatograma da Figura 11 não foram identificados por comparação dos padrões analisados. Em alguns casos, os espectros de massa eram similares aos dos padrões de glicose ou do ácido glucônico, sugerindo que diversos isômeros são formados na etapa de sililação.

O efeito dos tratamentos oxidativos no grau de polimerização da celulose foi avaliado mediante a determinação da viscosidade intrínseca η (dL/g) das amostras, conforme mostrado na Tabela 3.

Pode-se observar uma diminuição significativa da viscosidade nas amostras submetidas a tratamento Fenton. Esta redução da viscosidade se explica por uma extensiva fragmentação randômica produzida pelos radicais hidroxila no interior da cadeia de celulose (HASTRUP et al 2011). A diminuição significativa da viscosidade nas amostras tratadas unicamente com peróxido de hidrogênio sugere que a concentração deste foi suficientemente elevada para oxidar celulose independente da presença de ferro. Não foi observada uma diminuição significativa da viscosidade nos tratamentos com ferro (sem H_2O_2) e CuSO_4 .

Figura 11- Cromatograma GS-MS do hidrolisado ácido (após reação de sililação) da amostra de Avicel oxidada pela reação Fenton.

Tabela 3- Viscosidade intrínseca das amostras de Avicel oxidada e dos respectivos controles.

Viscosidade Intrínseca η dL/g	
Avicel	1.3 ± 0.2
Avicel / Fenton	0.6 ± 0.1
Avicel/ Fe ⁺²	1.3 ± 0.2
Avicel / H ₂ O ₂	0.6 ± 0.1
Avicel / CuSO ₄	1.3 ± 0.2

5.2. Produção e caracterização do extrato enzimático de *G. trabeum*

Os cultivos de *G. trabeum* sobre CMC como fonte de carbono foram filtrados após 21 dias de incubação. O extrato bruto obtido foi caracterizado com base na atividade de endoglucanase (Tabela 4). O extrato bruto foi concentrado e parcialmente purificado empregando uma precipitação inicial com sulfato de amônio a 80% da saturação. A precipitação e posterior centrifugação gerou um pellet de proteínas que foi posteriormente ressuspensão em água destilada e ensaiado para a atividade de endoglucanase. Para verificar a efetividade deste método na remoção de CMC, foi determinado o teor de açúcares totais no pellet ressuspensão utilizando o método do Fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A solução de proteínas, após reação com o reagente fenol-ácido sulfúrico, se mostrou levemente amarelada e não avermelhada, indicando a completa remoção de CMC no pellet.

O método de precipitação com sulfato de amônio foi ainda empregado como etapa de concentração e purificação do extrato enzimático (Tabela 4). Para isso, o extrato precipitado e ressuspensão em volume reduzido de água foi ainda concentrado por ultrafiltração utilizando membranas com corte de 10 kDa. A solução final de enzima obtida apresentou uma atividade de endoglucanase de 12,4 UI/mL com uma recuperação final de 50% da atividade enzimática inicialmente presente no extrato bruto. A perda de parte da atividade endoglucanase observada durante as etapas de purificação e concentração pode ser atribuída à precipitação incompleta de enzimas ou mesmo a inativação durante a precipitação devido à utilização de sulfato de amônio.

Os 900 mL restantes de extrato obtido após filtração dos cultivos de *G. trabeum* foram purificados e concentrados seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, porém o ultrafiltrado foi liofilizado para uso posterior. Completada a etapa de ultrafiltração, o extrato precipitado foi congelado em ultrafreezer e posteriormente liofilizado até a forma de pó, com o objetivo de conservar o extrato enzimático para a realização das hidrolises enzimáticas posteriores. Os extratos concentrados tanto líquido como liofilizado, foram caracterizados com base em suas atividades enzimáticas. Os resultados são apresentados na Tabela 5. Na mesma tabela estão também incluído as atividades detectadas nos preparados comerciais de celulasas empregados na presente dissertação.

Tabela 4- Atividade de endoglucanase presente no extrato enzimático bruto produzido por *G. trabeum* obtido após 21 dias de incubação em meio contendo CMC 2% como fonte de carbono e nas frações purificadas por precipitação das proteínas seguida de ultrafiltração.

Etapas	Volume (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Enzimática (UI/mL)	Atividade total (UI)	Rendimento (%)	Atividade Específica
Extrato Bruto	900,00	*nd	*nd	0,43 ± 0,01	387,00	100	*nd
Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄	43,57	*nd	*nd	6 ± 1	274,49	71	*nd
Ultrafiltração	15,5	0,89	13,80	12,4 ± 0,6	192,36	50	13,9

(*) não determinado

Os extratos enzimáticos concentrados de *G. trabeum* apresentaram atividade CMCase, β -glicosidase, xilanase e β -xilanase, porem não foi possível detectar atividade FPase total, o que pode ser atribuído a ausência ou baixo nível de atividade de celobiohidrolase no extrato. A ausência deste grupo de enzimas limita a capacidade do extrato em converter a celulose do papel de filtro em açúcares redutores totais (oligossacarídeos, celobiose e glicose). Desta forma, não se obteve o mínimo de conversão de 4% do papel de filtro em açúcares redutores no tempo de 60 min de reação (Ghose, 1987), mesmo empregando o extrato concentrado. Observa-se também uma diminuição de todas as atividades enzimáticas ensaiadas no extrato enzimático liofilizado em comparação com o extrato bruto concentrado (Tabela 5). Isso poderia ser causado por desnaturação de proteínas durante a etapa de congelamento prévio ao processo de liofilização (BHATNAGAR et al 2007). No presente trabalho isso não foi avaliado já que não faz parte do objetivo inicialmente proposto.

Tabela 5- Atividade de enzimas hidrolíticas presentes em preparações comerciais de enzimas hidrolíticas e no extrato enzimático bruto produzido por *G. trabeum* obtido após 21 dias de incubação em meio contendo CMC 2% como fonte de carbono submetido a etapas sequenciais de purificação e concentração (precipitação das proteínas, ultrafiltração e liofilização).

Atividade enzimática (UI/mL)							
	FPase	CMCase	β -glicosidase	CBH	Xilanases	β -xilosidases	Proteína (mg/mL)
Extrato concet.	**nd	12,4 $\pm$ 0,6	1,41 $\pm$ 0,04	*nd	85,5 $\pm$ 0,4	0,25 $\pm$ 0,01	0,89
Extrato concent. e liofilizado	**nd	7,68 $\pm$ 0,07	1,33 $\pm$ 0,04	*nd		0,10 $\pm$ 01	0,21
Sigma C2730	45 $\pm$ 2	549 $\pm$ 54	77 $\pm$ 2	101 $\pm$ 11	485 $\pm$ 10	29,0 $\pm$ 0,4	107 $\pm$ 5
Sigma C6105	*nd	nd	752 $\pm$ 2	*nd	2517 $\pm$ 25	8,38 $\pm$ 0,07	62 $\pm$ 3

*nd não detectado no extrato diluído 100X

**nd não detectável nos extratos concentrados de *G.trabeum* testado.

5.3. Hidrólise enzimática da celulose Avicel e amostras oxidadas.

5.3.1 Hidrolise enzimática da Celulose Avicel utilizando enzimas comerciais.

A hidrolise enzimática de celulose Avicel nativa e oxidada foi estudada utilizando diferentes cargas de celulasas comerciais. As cargas enzimáticas utilizadas foram: 10 FPU/g de substrato, ou 120 UI de endoglucanase/g de substrato oriundas da preparação (Sigma C2730) e 15 UI de β -glicosidase/g de substrato oriundas da preparação Sigma C6105. Esta carga enzimática foi denominada como 100% ao longo da discussão. Uma carga enzimática reduzida à metade de 100% também foi ensaiada e corresponde aos valores indicados como 50% na discussão (Figura 12).

Figura 12- Conversão de celulose durante a hidrólise de celulose microcristalina Avicel oxidada pelo sistema Fenton, CuSO_4 e de um um controle não oxidado com Avicel in natura.

Observa-se nos dados da Figura 12 que houve uma diminuição significativa da eficiência de hidrólise quando as amostras de Avicel foram tratadas com o reagente de Fenton e hidrolisadas com as duas cargas enzimáticas ensaiadas. O tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou resultados similares aos observados na celulose tratada com a reação de Fenton completa (Fe^{2+} e H_2O_2) (dados não apresentados).

O tratamento com CuSO_4 gerou uma celulose oxidada que ainda foi eficientemente hidrolisada quando se empregou 100% de carga de enzimas comerciais. No entanto, o efeito da oxidação por CuSO_4 sobre a hidrólise enzimática foi mais evidente quando a carga de enzimas comerciais foi reduzida para 50% do valor original.

No caso do tratamento com CuSO_4 , os dados de espectroscopia infravermelho, CLAE e a ocorrência de redução de Cu^{2+} durante a reação indicam que deve ter havido oxidação dos terminais redutores da cadeia de celulose. No entanto, a manutenção da viscosidade na Avicel tratada com CuSO_4 sugere que somente alguns terminais C1 livres no polissacarídeo foram oxidados. Desta forma, a intensidade do tratamento parece não ter sido suficiente para gerar um substrato menos susceptível à hidrólise quando a carga de

enzimas era elevada. Ao diminuir a carga de enzimas à metade, o efeito da oxidação destes poucos terminais C1 passou a ser significativo.

Não só a oxidação dos terminais redutores poderia influenciar a diminuição da eficiência hidrolítica nestes substratos modificados. De uma forma geral, os íons metálicos podem se unir às enzimas gerando mudanças na conformação, ou ainda podem se ligar ao substrato (no caso a celulose), bloqueando ou afetando a acessibilidade da enzima. Por exemplo, Tejirian e Xu (2010) sugeriram que a inibição da conversão enzimática de celulose na presença de Fe(II) e Cu(II) é de natureza redox. Para provar a hipótese de que o ferro inibe a hidrólise enzimática mediante um mecanismo redox, eles realizaram uma série de hidrólises enzimáticas utilizando 25 g/L de Avicel por uma mistura de celulasas na presença ou ausência de 1 mM de FeSO₄ em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 a 50°C. O experimento de hidrólise foi desenvolvido na presença ou ausência de oxigênio. Depois de um dia de reação, o FeSO₄ causou uma diminuição de aproximadamente 30% na eficiência de hidrólise enzimática “aeróbia” (hidrólise tradicional), mas a hidrólise feita em condições “anaeróbias” não foi afetada, indicando que o oxigênio está envolvido na inibição enzimática por Fe(II). Na presença de oxigênio, o Fe(II) em solução aquosa é oxidado rapidamente a Fe(III), portanto é importante considerar que nesta inibição por ferro participam íons de Fe(III) ou mesmo os radicais de O₂ formados durante a redução de O₂ a radical hidroperoxila. O Fe(III) é conhecido por sua capacidade de oxidar terminais redutores (hemiacetales) dos carboidratos (E° -0.4 V) sendo reduzido a Fe(II). O Fe(II) formado pode ser reoxidado a Fe(III) por oxigênio gerando um novo ciclo. Assim a inibição exerceria seu efeito principalmente sobre a celulose mais do que na celulase.

5.3.2. Hidrólise enzimática da Celulose Avicel utilizando preparações de enzimas comerciais suplementadas com extrato enzimático de G. trabeum.

A eficiência de conversão de celulose Avicel oxidada foi avaliada em ensaios nos quais parte da atividade endoglucanase da preparação comercial Sigma C2730, foi substituída por endoglucanases presentes no extrato enzimático concentrado de *G. trabeum* (Figura 13). As misturas de enzimas foram realizadas com base nas atividades enzimáticas apresentadas na Tabela 5.

Avaliando inicialmente o efeito da substituição de parte da carga de endoglucanase do meio reacional proveniente de celulase comercial SIGMA C2730 por endoglucanases provenientes do extrato de *G. trabeum*, podemos destacar que:

1. Na hidrólise de Avicel *in natura* (controle) após 72 horas de reação, as *eficiências de hidrólise* que eram de 64% e 55% com 100% e 50% da atividade de endoglucanase original (Figura 12), diminuí para 47% quando a carga inicial de endoglucanases de 120 UI/g de substrato (100%) foi estabelecida com 60UI/g proveniente de enzima comercial e 50% proveniente do extrato de *G. trabeum*. A expectativa neste experimento é que a *eficiência de hidrólise* fosse, no mínimo, igual aos dados obtidos com 50% da carga de EG comercial, ou seja, 55%. Idealmente, o extrato enzimático de *G. trabeum* poderia atuar de forma complementar às enzimas do preparado comercial e proporcionar os 64% de *eficiência de hidrólise* obtidos com 100% de carga de EG proveniente de enzimas comerciais. No entanto, os dados obtidos apontam para uma deficiência do extrato de *G. trabeum* em atuar em conjunto com as enzimas comerciais, causando, inclusive, certo grau de combinação prejudicial à hidrólise da celulose Avicel *in natura*. A ausência de atividade celobiohidrolase no extrato de *G. trabeum* justifica não se atingir 64% de conversão da Avicel *in natura*, pois a diminuição da atividade de celobiohidrolases no meio reacional diminui a hidrólise dos oligossacarídeos gerados pelas endoglucanases, minimizando a formação de celbiose e, por consequência, de glicose. No entanto, a ausência de celobiohidrolases no extrato de *G. trabeum* não explica o fato de a mistura de enzimas ter proporcionado uma eficiência de hidrólise ainda menor do que aquela obtida no ensaio com 50% da atividade original de EG. Quando a carga de enzimas foi fixada no valor mais baixo avaliado, 60 UI de endoglucanases/g de substrato (50%), o efeito da substituição das EG do preparado comercial por EGs de *G. trabeum* foi ainda maior, pois a hidrólise final de Avicel passou de 55% no caso do uso das enzimas comerciais (Figura 12) para 38% no caso onde metade da atividade de EG era proveniente do extrato de *G. trabeum* (25% GT - Figura 13).

2. No caso da Avicel oxidada pela reação de Fenton, foi observado o mesmo fenômeno já detectado para a Avicel *in natura*, pois os níveis de conversão de celulose da Avicel oxidada por reação de Fenton que eram de 45% e 37% nas reações catalisadas por 100% e 50% de EG provenientes do preparado comercial, respectivamente (Figura 12), diminuíram

para 35% e 29% quando metade da carga de EG era proveniente do extrato de *G. trabeum* (Figura 13).

3. No caso da Avicel oxidada por CuSO_4 , novamente o efeito prejudicial da adição de extrato enzimático de *G. trabeum* ao meio reacional foi observada, pois os níveis iniciais de conversão proporcionados pelo preparado de celulases comerciais que eram de 61% e 49% nas reações catalisadas por 100% e 50% de EG provenientes do preparado comercial, respectivamente (Figura 12), diminuíram para 39-40% quando metade da carga de EG era proveniente do extrato de *G. trabeum* (Figura 13).

Figura 13- Conversão de celulose durante a hidrólise de Avicel oxidada pelo sistema Fenton e por CuSO_4 . Nas legendas, 50%GT corresponde a 50% da carga de endoglucanase da preparação comercial substituída por 50% de endoglucanase proveniente do extrato de *G. trabeum*. 25%GT corresponde a carga original de endoglucanases diminuída à metade, sendo que metade desta carga foi substituída por endoglucanase de *G. trabeum*.

A oxidação dos terminais redutores da celulose, produzida pelo tratamento oxidativo, não deve impactar diretamente na ação das endoglucanases, e razão pela qual as celulases comerciais conseguem hidrolisar parte da celulose modificada, mas na medida em que a hidrólise progrediu, o acúmulo de terminais oxidados deve ter aumentado a recalcitrância da celulose. Este efeito aparentemente foi mais significativo ainda nas amostras de celulose cristalina Avicel tratadas por Fenton onde foram gerados mais oligômeros com terminais oxidados.

Em todas as condições ensaiadas não foi possível observar que a suplementação da mistura reacional com extratos enzimáticos do fungo de decomposição parda *G. trabeum* melhorasse a hidrólise enzimática da celulose oxidada.

Para determinar se a suplementação com extrato do fungo *G. trabeum* conseguiria atingir a mesma eficiência de hidrólise observada quando se emprega uma mistura de celulasas comerciais, a carga de endoglucanase no ensaio foi ainda aumentada em um 100%. Ou seja, se realizou um ensaio onde a carga final de endoglucanases era de 240 UI/g de substrato, sendo que metade desta carga era proveniente do preparado comercial SIGMA C2730 e a outra metade era proveniente do extrato de *G. trabeum* (Figura 14). Pode-se observar que no caso da Avicel oxidada pela reação de Fenton o aumento de 100% na carga de endoglucanases, com metade da atividade sendo proveniente do extrato de *G. trabeum* (100% GT + 100% EG), não proporcionou melhora na eficiência de hidrólise. A eficiência de conversão de Avicel oxidada só foi aumentada (atingindo os valores da Avicel *in natura*) quando a carga enzimática foi dobrada a partir do uso exclusivo do preparado comercial (200% EG - Figura 14), confirmando que a suplementação da atividade endoglucanase utilizando extrato do fungo *G. trabeum* não apresentou vantagens na hidrólise de celulose nas condições ensaiadas. O resultado da recuperação da eficiência de hidrólise empregando o dobro da carga de enzimas comerciais sugere ainda que os terminais oxidados da celulose são convertidos pelas enzimas comerciais, porém com menor eficiência, sendo que o emprego de uma maior carga enzimática permite recuperar os níveis de hidrólise observados na celulose *in natura*.

Figura 14- Conversão de celulose Avicel oxidada pela reação de Fenton. 100% EG corresponde a 10 FPU/g de endoglucanase (Sigma C2730) e de 15 UI de β -glicosidase (Sigma C6105), 200% EG corresponde a 20 FPU/g de endoglucanase (Sigma C2730) e de 30 UI de β -glicosidase (Sigma C6105), 100% GT corresponde a carga enzimática de 200% sendo que metade da atividade de endoglucanases era proveniente do extrato de *G. trabeum*.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou se o extrato enzimático produzido pelo fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* pode atuar de forma auxiliar às celulasas comerciais na hidrólise de um substrato celulósico que foi previamente oxidado utilizando dois tratamentos oxidativos diferentes: reação de Fenton e tratamento com CuSO_4

Mediante a caracterização fisicoquímica dos substratos oxidados foi possível verificar que ambos tratamentos foram eficientes em modificar grupos funcionais presentes na celulose microcristalina Avicel. No entanto, o tratamento por reação de Fenton apresentou uma maior capacidade oxidativa em comparação com o tratamento com CuSO_4 .

O análise dos hidrolisados ácidos das amostras oxidadas empregando CLAE permitiu a detecção de compostos oxidados nos hidrolisados ácidos das amostras oxidadas mediante tratamento Fenton, que posteriormente foram identificados por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas. Esta análise possibilitou determinar que quando as amostras são oxidadas mediante a reação de Fenton, a oxidação é produzida principalmente no C1 da estrutura da celulose. No caso do tratamento com CuSO_4 , não foram identificados compostos diferentes daqueles já detectados na amostras de Avicel controle

O efeito da oxidação foi avaliado na sacarificação enzimática utilizando diferentes cargas de enzimas comerciais e misturas destas enzimas comerciais suplementadas com extrato enzimático obtido de cultivos de *G. trabeum*. Foi possível observar que houve uma diminuição significativa da eficiência de hidrólise quando as amostras de Avicel foram tratadas com o reagente de Fenton e hidrolisadas com as duas cargas enzimáticas ensaiadas. No entanto, o tratamento com CuSO_4 gerou uma celulose oxidada que ainda foi eficientemente hidrolisada quando se empregou 100% de carga de enzimas comerciais. O efeito negativo da oxidação por CuSO_4 sobre a hidrólise enzimática foi mais evidente quando a carga de enzimas comerciais foi reduzida para 50% do valor original.

As celulasas comerciais conseguem hidrolisar parte da celulose modificada, porém com menor eficiência, devido, provavelmente, à ocorrência de terminais redutores

modificados, o que aumentaria a recalcitrância da celulose à hidrólise enzimática. Este efeito aparentemente foi mais significativo nas amostras de celulose cristalina Avicel tratadas por Fenton onde foram gerados mais oligômeros com terminais oxidados. No entanto, o emprego de uma maior carga enzimática permitiu recuperar os níveis de hidrólise observados na celulose *in natura*.

Em todas as condições ensaiadas não foi possível observar que a suplementação da mistura reacional com extratos enzimáticos do fungo de decomposição parda *G. trabeum* melhorasse a hidrólise enzimática da celulose oxidada

REFERENCIAS.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v.34, p.1729-1738. 2011.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p. 4, 2010.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, n.3, p.257-270. 1992.

BACKA, S.; GIERER, J.; REITBERGER, T.; NILSSON, T. Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. **Holzforschung** v.47, p.181–7, 1993.

BHATNAGAR, B.S., BOGNER, R.H., PIKAL, M.J. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.12, p.505–23, 2007.

BALDRIAN, P.; VALÁŠKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. v32, n.3, p. 501-521, 2008.

BECKHAM, G.T.; Y.J.; BOMBLE, E.A.; BAYER, M.E.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M.F.; Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. **Current Opinion in Biotechnology**. v.22, p.231-238, 2011.

BRENNER, A.J.; HARRIS, E.D. A quantitative test for copper using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.20, n.226, p.80-4, 1995.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v.32, n.2, p. 2191-2195, 2009.

CHANDRA, R.P.; BURA, R.; MABEE, W.E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v.108, p.67-93, 2007.

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v.46, p.25-35, 2012.

COHEN, R.; SUZUKI, M.R.; HAMMEL, K.E.; Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, p.2412-2417, 2005.

CONTRERAS, D.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J.; SCHWEDERSKI, B.; KAIM, W. Enhanced hydroxyl radical production by dihydroxybenzene-driven Fenton reactions: implications for wood biodegradation. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.12, p.1055-1061, 2007.

CURLING, S.F.; CLAUSEN, C.A.; WINANDY, J.E. Relationships between mechanical properties, weight loss, and chemical composition of wood during incipient brown-rot decay. **Forest Products Journal**, v.52, p.34-39, 2002.

CANNELLA D, HSIEH C, FELBY C, JØRGENSEN H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnol Biofuels**, 5:26. 2012.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**. v5, n.6, p. 578-595, 2009.

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

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter. 1989.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v.74, p.201-212, 2000.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W.C.; JOSHI, C.P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p.1-13, 2007.

FILLEY, T.R.; CODY, G.D.; GOODELL, B.; JELLISON, J. NOSER, C.; OSTROFSKY, A. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. **Organic Geochemistry**. v.33, p.111-124, 2002.

GARSDALE, P.; WYETH, P. Identification of cellulosic fibres by FTIR spectroscopy: thread and single fibre analysis by attenuated total reflectance. **Studies in Conservation**. v.48, p. 269-275, 2006.

GILLIGAN, W. Y REESE, E. T. Evidence for multiple components in microbial cellulases. **Canadian Journal of Microbiology**, v.1, p.190-107, 1954.

GREEN, F.; HIGHLEY, T.L. Mechanism of brown-rot decay: paradigm or paradox. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.39, p.113-124, 1997.

GOODELL, B. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. In wood deterioration and preservation. Washington. American chemical society, 2003 v.545 p97-118, 2003.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass & Bioenergy**, v.28, n.4, p. 384-410, 2005.

HAMMEL, K.E; KAPICH, A.N.; JENSEN, K.A.; RYAN, Z.C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**. v.30, p.445-453, 2002.

HASTRUP, A.C.S., HOWELL, C.; JENSEN, B.; GREEN, F. Non-enzymatic depolymerization of cotton cellulose by fungal mimicking metabolites. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.65, p.553-559, 2011.

HATFIELD, R.; VERMERRIS, W. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. **Plant Physiology**v.126, p.1351-7, 2001.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **Journal Biotechnology**, v.78, n.2, Mar 10, p.93-113, 2000.

HIMMEL, M.E.; DING, S.Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v315, n 5813, p. 804-807. 2007.

KIPPER, K.; VALJAMAE, P.; JOHANSSON, G. Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as ‘burst’ kinetics on fluorescent polymeric model substrates. **Biochemical Journal**. v.385, p.527-35. 2005.

KIRK, T. K.; IBACH, R.; MOZUCH MICHAEL, D.; CONNER ANTHONY, H.; HIGHLEY, L. Characteristics of Cotton Cellulose Depolymerized by a brown-rot fungus, by acid, or by chemical oxidants. **International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood**, v45, n.4, p. 239-244, 1991.

LANGSTON, J.A.; SHAGHASI, T.; ABBATE, E.; XU, F.; VLASENKO, E.; SWEENEY, M.D.. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the Enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside Hydrolase 61. **Applied and Environmental Microbiology**,. v77, n. 19, p.7007-7015, 2011.

LUCAS, M.S.; PERES, J. A. Removal of COD from olive mill wastewater by Fenton's reagent: kinetic study. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p.1253–1259, 2009.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p.506-577, 2002.

MANSFIELD, S.D.; SADDLER, J.N.; GUBITZ, G.M. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.23, p.133-140, 1998.

MARTÍNEZ-ANAYA, C.; BALCÁZAR-LÓPEZ, E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; FOLCH-MALLOL, J.L. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. **Revista Latinoamericana de Microbiología**. v.50, n.3-4, Sep, p. 119-130, 2008.

McKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v83,n.1, p. 37-46, 2002.

MENDES M; SIQUEIRA G; CARVALHO W; FERRAZ A. MILAGRES ADRIANE F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v.27, p. 395-401, 2011.

MICHALSKA, K.; MIAZEK, K.; KRZYTEK, L.; LEDAKOWICZ, S. Influence of pretreatment with Fenton's reagent on biogas production and methane yield from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.11, p. 72–78, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v.31, n.3, p.426-428. 1959.

NAKAZAWA, H.; OKADA, K.; KOBAYASHI, R.; KUBOTA, T.; ONODERA, T.; OCHIAI, N.; OMATA, N.; OGASAWARA, W.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and

III, expressed in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.81, n.4, p.681-689, 2008.

NIDETZKY, B.; STEINER, W.; HAYN, M.; CLAEYSSSENS, M. Cellulose Hydrolysis by the Cellulases from *Trichoderma-reesei* - A New Model for Synergistic Interaction. **Biochemical Journal**. v.298, p.705–710, 1994.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.E. Biomass Enzymatic Hydrolysis. **Química Nova**. v.33, n.7, p.1549-1558, 2010.

PHILLIPS, C.M.; BEESON, W.T.; CATE, J.H.; MARLETTA, M.A. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chemical Biology** v.6, p.1399-1406, 2011.

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

RÄTTÖ, M.; RITSCHKOFF, A. C.; VIKARI, L. The effect of oxidative pretreatment on cellulose degradation by *Poria placenta* and *Trichoderma reesei* cellulases. **Applied microbiology and biotechnology**, v.48, n.1, p.53-57, 1997.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.

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

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian journal of microbiology**, v.33, n.8, p.689-692. 1987.

TANAKA, M.; TANIGUCHI, M.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *eupenicillium-javanicum*: studies on the re-utilization of cellulosic resources. **Journal of Fermentation Technology**, v.59, n.3, p.177-183. 1981.

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of Cellulase-Catalyzed Lignocellulosic Hydrolysis by Iron and Oxidative Metal Ions and Complexes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.7, n.23, p. 7673–7682, 2010.

TEN HAVE, R; TEUNISSEN, P. J. M. Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. **Chemical Reviews**, v.101, p.3397-3413, 2001.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v.30, n.6, p.1458-1480, 2012.

WYMELENBERG, A.V.; GASKELL, J.; MOZUCH, M.; SABAT, G.; RALPH, J.; SKYBA, O.; MANSFIELD, S.D.; BLANCHETTE, R.A; MARTINEZ, D. GRIGORIEV, I.; KERSTEN, P.J.; CULLEN, D. Comparative Transcriptome and Secretome Analysis of Wood Decay Fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.3599-3610, 2010.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v.160, p.87-112. 1988.

XU, F.; DING. H.; TEJIRIAN., A. Detrimental effect of cellulose oxidation on cellulose hydrolysis by cellulase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.203-209, 2009.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.; WYMAN, C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v.2, n.4, p. 421–450, 2011.

YOON, J.J; CHA, C.J.; KIM, Y.S.; SON, D.W.; KIM, Y.K. The brown rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endoglucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.17, p. 800–805, 2007.