

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de

Processos Químicos e Bioquímicos

Yuri Carvalho

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLUCOSIDASE EM DIFERENTES SUPORTES
E VIABILIDADE DE REAÇÕES COMBINADAS COM
CATALISADORES METÁLICOS**

Orientadores:

Prof. Eduardo Falabella Sousa-Aguiar, *DSc* e Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*

Rio de Janeiro

Fevereiro, 2018

Yuri Carvalho

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLUCOSIDASE EM DIFERENTES SUPORTES E
VIABILIDADE DE REAÇÕES COMBINADAS COM CATALISADORES
METÁLICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores:

Eduardo Falabella Sousa-Aguiar, *DSc*

Nei Pereira Junior, *PhD*

Rio de Janeiro

Fevereiro, 2018

CC331i Carvalho, Yuri
 Imobilização de Beta-Glucosidase em Diferentes
Suportes e Viabilidade de Reações Combinadas com
Catalisadores Metálicos / Yuri Carvalho. -- Rio de
Janeiro, 2018.
 120 f.

 Orientador: Eduardo Falabella Sousa-Aguiar.
 Coorientador: Nei Pereira Jr..
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Processos Químicos e
Bioquímicos, 2018.

 1. Imobilização. 2. Hidrolases. 3. Hidrólise. 4.
Beta-glucosidase. 5. Reações Combinadas. I.
Falabella Sousa-Aguiar, Eduardo, orient. II.
Pereira Jr., Nei, coorient. III. Título.

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLUCOSIDASE EM DIFERENTES SUORTES E
VIABILIDADE DE REAÇÕES COMBINADAS COM CATALISADORES
METÁLICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado por



Prof. Eduardo Falabella Sousa-Aguiar, *DSc* (Orientador)



Prof. Nei Pereira Junior, *PhD* (Orientador)



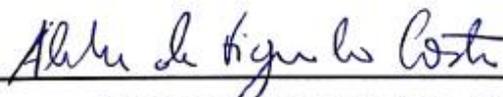
Prof.^a Suely Pereira Freitas, *DSc*



Prof.^a Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, *DSc*



Viridiana Santana Ferreira Leitão, *DSc*



Alexandre de Figueiredo Costa, *DSc*

Aos meus pais, Jorge e Andrea, pelo amor e dedicação à minha educação, dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, pelo amor incondicional e valores transmitidos durante minha vida. Ao meu pai, Jorge, pelos seus ensinamentos e apoio em todos os momentos da minha trajetória. À minha mãe, Andrea, por todo o carinho e conselhos valiosos. Ao meu irmão e melhor amigo, Yan, por todo o companheirismo, cumplicidade e amizade, sempre que precisei.

À minha companheira, Ana Beatriz Pradel, pelo amor, incentivo, apoio e por me mostrar sempre o lado mais bonito da vida.

Aos irmãos que a vida me deu, Pedro Romano e João Monnerat, por todo o suporte durante a realização desse trabalho e pelos bons momentos entre amigos.

Aos meus orientadores, Prof. Eduardo Falabella Sousa-Aguiar, pela amizade e apoio imensuráveis, tanto em minha vida profissional como pessoal, e Prof. Nei Pereira Junior, pela amizade e pelos grandes conselhos e ensinamentos transmitidos.

A todos os meus professores, que tive o prazer de conhecer durante minha trajetória, em especial aos meus queridos professores da Escola de Química da UFRJ.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Finalmente, gostaria de agradecer a Deus por ter colocado em meu caminho todas essas pessoas incríveis, cujas companhias fizeram de mim quem eu sou hoje.

“Try not to become a man of success, but rather a man of value.”

Albert Einstein

RESUMO

CARVALHO, Yuri. **IMOBILIZAÇÃO DE β -GLUCOSIDASE EM DIFERENTES SUPORTES E VIABILIDADE DE REAÇÕES COMBINADAS COM CATALISADORES METÁLICOS**. Tese de Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Orientadores: Eduardo Falabella Sousa Aguiar, *DSc* e Nei Pereira Jr., *PhD*

No presente trabalho, a hidrólise de celobiose, molécula modelo, foi avaliada utilizando β -glucosidase imobilizada em diferentes materiais. A enzima imobilizada em nanosilicalita apresentou a maior atividade recuperada, 63%, quando comparada a outros materiais, como sílicas mesoporosas, apesar de apresentar menor rendimento de imobilização. O resultado indica que enzimas imobilizadas apenas na área externa do suporte se mantêm mais ativas. Além disso, a enzima imobilizada em nanosilicalita apresentou boa reciclabilidade, com 81% de atividade residual após 6 ciclos de reação. O valor de K_M calculado para a enzima imobilizada foi cerca de 3 vezes maior que o valor para a enzima livre, mostrando menor afinidade pelo substrato por parte da enzima imobilizada. O teste de estabilidade térmica mostrou que a enzima imobilizada é mais resistente à desnaturação a 65 °C que a enzima livre. Em um segundo momento, foi estudada a viabilidade de se produzir, em uma reação *one-pot*, derivados de interesse, como ácido glucônico, a partir de celobiose. Entretanto, apenas 19% de rendimento em ácido glucônico foi obtido após 16 horas. Foi confirmado posteriormente que o ácido glucônico é inibidor da β -glucosidase. Além disso, foi também avaliado o sinergismo entre catalisadores metálicos e enzimas para promover reações *one-pot*. Foi mostrado que catalisadores de ouro não influenciam no rendimento da oxidação de glicose pela enzima glicose oxidase. Por fim, foi avaliada a reação *one-pot* para se produzir sorbitol a partir de celobiose, empregando β -glucosidase e catalisador de rutênio suportado em carvão. Porém, apenas 1,7% de rendimento em sorbitol foi obtido em 3 horas. O presente trabalho aponta os principais gargalos de reações combinadas pouco exploradas na literatura.

Palavras-chave: imobilização; enzimas; β -Glucosidase; zeólitas; hidrólise; reações combinadas; Glicose oxidase; oxidação; ácido glucônico; hidrogenação; sorbitol.

ABSTRACT

CARVALHO, Yuri. **β -GLUCOSIDASE IMMOBILIZATION ON DIFFERENT SUPPORTS AND VIABILITY OF METAL CATALYST COMBINED REACTIONS.**

PhD Thesis. School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Supervisor: Eduardo Falabella Sousa Aguiar, *DSc* and Nei Pereira Jr., *PhD*

In the present work, cellobiose hydrolysis was evaluated by applying β -glucosidase immobilized on different materials. The highest recovered activity, 63%, was obtained by immobilizing the enzyme on nanosilicalites, even though its low immobilization yield comparing to other materials. This result is an indicative that enzymes immobilized only on the external surface stay more active. Moreover, the nanosilicalite immobilized enzyme showed good recyclability, with 81% of residual activity after 6 cycles. The K_M value for the immobilized enzyme was 3 times-fold greater than for the free enzyme, indicating a decrease in substrate affinity. The thermal stability test showed that the immobilized enzyme is more resistant to denaturation at 65 °C than the free enzyme. Furthermore, the viability of producing chemicals of interest, such as gluconic acid, directly from cellobiose, was verified. However, only 19% yield of gluconic acid was obtained in 16 hours. It was confirmed further that gluconic acid is an inhibitor of β -glucosidase. In addition, the synergism between metal catalysts and enzymes for one-pot reactions was evaluated. It was proved that gold catalysts do not improve yields on glucose oxidation by glucose oxidase. Finally, the one-pot reaction for producing sorbitol from glucose utilizing β -glucosidase and ruthenium on carbon was evaluated. However, only 1.7% yield of sorbitol was obtained after 3 hours. The present work points out the main issues of one-pot reactions that are underexplored in literature.

Keywords: immobilization; enzymes; β -Glucosidase; zeolites; hydrolysis; one-pot reactions; Glucose oxidase; oxidation; gluconic acid; hydrogenation; sorbitol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos ⁴	20
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura molecular da celulose ⁷	22
Figura 3 - Esquema ilustrando as ligações de hidrogênio inter e intra moleculares nas moléculas de celulose ⁹	22
Figura 4 - Arranjo estrutural da fibra de celulose ¹⁰	23
Figura 5 - Arranjo estrutural das moléculas em zonas cristalinas e amorfas ¹²	23
Figura 6 - Exemplo esquemático da estrutura da hemicelulose ⁷	24
Figura 7 - Exemplo esquemático da estrutura da lignina ⁷	25
Figura 8 – Esquema das rotas tecnológicas em uma biorrefinaria ¹⁷	26
Figura 9 - Esquema de biorrefinaria ¹⁹	27
Figura 10 – Esquema simplificado de uma celobiohidrolase ³⁴	33
Figura 11 - Ação sinérgica das celulasas na clivagem da celulose ³⁴	34
Figura 12 - Classificação das técnicas de imobilização de enzimas ^{39, 66}	36
Figura 13 - Oxidação de glicose a ácido glucônico ⁸⁴	46
Figura 14 - Ácido glucônico.....	48
Figura 15 - Via bioquímica do gluconato ⁹²	49
Figura 16 – Hidrogenação de glicose a sorbitol ¹⁰¹	52
Figura 17 - Esquema reacional para oxidação de glicose.....	64
Figura 18 - Procedimento de imobilização por ligação covalente utilizando APTES e glutaraldeído como ligantes.....	68
Figura 19 - Possíveis mecanismos de ligação do glutaraldeído.....	69
Figura 20 - Diferentes graus de funcionalização em função da concentração de glutaraldeído.....	70
Figura 23 - Difratogramas da a) nanosilicalita, b) NanoY, c) NaY, d) SBA-15 e e) MSNS.....	71
Figura 22 - Micrografias TEM da nanosilicalita com destaque para a estrutura microporosa.....	72
Figura 23 - Micrografia TEM da MSNS.....	73
Figura 24 - Micrografia TEM da SBA-15.....	74
Figura 25 - Gráfico da distribuição de tamanhos das partículas de NanoY, gerado através da análise DLS.....	74
Figura 26 - Esquema de otimização das variáveis de imobilização.....	75
Figura 29 - Diagrama de Pareto para atividade enzimática na hidrólise de celobiose.....	77
Figura 30 - Superfície de resposta obtida a partir do planejamento DCCR.....	78

Figura 29 - Coloração da nanosilicalita funcionalizada em função da concentração de glutaraldeído.....	79
Figura 32 - Atividade β -glucosidásica em função da concentração de glutaraldeído.....	81
Figura 31 - Atividade enzimática específica em função da concentração de proteína.....	82
Figura 32 - Classificação dos suportes avaliados segundo suas propriedades.....	83
Figura 33 - Desempenho dos suportes na imobilização, expresso em termos da atividade recuperada. Hidrólise de celobiose a 50 °C, pH 5. Solução de enzima livre 1,6 mg.mL ⁻¹	84
Figura 34 - Método de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos de BG, BG/MSNS e BG/NANOSIL.....	86
Figura 35 - Atividade relativa de BG, BG/NANOSIL e BG/MSNS em diferentes valores de pH, a uma temperatura de 50 °C.....	87
Figura 36 - Atividade relativa de BG, BG/NANOSIL e BG/MSNS em diferentes temperaturas, em pH 5.....	88
Figura 37 - Teste de estabilidade térmica a 80 °C.....	89
Figura 38 - Teste de estabilidade térmica a 65 °C.....	90
Figura 39 - Ensaio de reciclo da BG/NANOSIL. Condições: 50 °C, pH 5, 18 horas.....	91
Figura 40 - Teste de reciclo da BG/MSNS. Condições: 50 °C, pH 5, 18 horas.....	91
Figura 41 - Oxidação de glicose com glicose oxidase na ausência de catalisador (GOX), na presença de ouro suportado em alumina (GOX + Au/Al ₂ O ₃) e na presença de ouro suportado em SBA-15. Condições experimentais: 30 °C, pH 7 controlado pela adição de NaOH, carga enzimática 31,2 U/mL, borbulhamento de O ₂ a 60 mL/min.....	93
Figura 42 - Reação <i>one-pot</i> de hidrólise e oxidação. Condições: 40 °C, pH 5, borbulhamento de O ₂ a 60 mL/min e carga enzimática de 60 e 1600 U.g ⁻¹ de celobiose para β -glucosidase e glicose oxidase, respectivamente.....	94
Figura 43 - Efeitos da adição de sorbitol e celobitol na hidrólise de celobiose.....	96
Figura 46 - Sobreposição dos cromatogramas de hidrólise de celobiose na presença de celobitol, em 15, 30, 120 e 180 minutos de reação.....	97
Figura 45 - Hidrólise de celobiose em reator Parr a 50 °C, pH 5, sem hidrogênio e com 40 bar de pressão de hidrogênio.....	98
Figura 46 - Reação <i>one-pot</i> de hidrólise e hidrogenação. Condições: 50 °C, pH 5, 40 bar de hidrogênio, β -glucosidase 80mg.g ⁻¹ de celobiose.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de resíduos lignocelulósicos ⁶	21
Tabela 2 - Composição em glicídios de materiais lignocelulósicos segundo Lee (1998) (apud BORGES, 2011) ⁵	21
Tabela 3 - Resumo dos tipos de pré-tratamento ³¹	31
Tabela 4 – Principais vantagens e desvantagens das técnicas de imobilização mais comuns ⁷⁰	39
Tabela 5 – Resumo dos principais trabalhos sobre imobilização da β -glucosidase. .	43
Tabela 6 - Planejamento experimental.	76
Tabela 7 - Tabela ANOVA para o modelo obtido a partir do planejamento DCCR. ..	78
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos e de imobilização.	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[E]: Concentração de enzimas;
[GA]: Concentração de Glutaraldeído;
AI: Atividade da enzima imobilizada;
AL: Atividade da enzima livre;
ANOVA: Análise de Variância;
APTES: 3-aminopropiltriétoxisilano;
AR: Atividade recuperada;
Au: Ouro;
Au/Al₂O₃: Ouro suportado em alumina;
Au/SBA-15: Ouro suportado em sílica;
BCA: Ácido Bicinconínico;
BG: β-Glucosidase;
BG/MSNS: β-Glucosidase imobilizada em nano partículas de sílica;
BG/NANOSIL: β-Glucosidase imobilizada em nanosilicalita;
BSA: Albumina do soro bovino;
CBD: *Cellulose-binding domain* (Domínio de ligação com a celulose);
CBH: Celobiohidrolases;
CD: *Catalytic domain* (Domínio catalítico);
CMC: Carboximetilcelulose;
CRGO: *Chemically reduced graphene oxide* (Óxido de grafeno quimicamente reduzido);
CTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio;
DAD: *Diode Array Detector*;
DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional;
DLS: *Dynamic light scattering* (Espalhamento de luz dinâmico);
DOE: *Department of Energy* (Departamento de Energia dos EUA);
DRX: Difração de raios X;
EC: *Enzyme Commission*;
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;
EG: Endoglucanases;
EI: Eficiência de imobilização;
FDA: *Food and Drug Administration*;
GOX: Glicose oxidase;
GRAS: *Generally recognized as safe* (Geralmente reconhecido como seguro);
HPLC: High Performance Liquid Chromatography;
IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*;
JCPDS: *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*;
K_M: Constante de Michaelis Menten;
MCM-41: *Mobil Composition of Matter* No. 41 (Sílica mesoporosa);
MSNS: *Mesoporous Silica Nanoparticles* (Nano partículas de sílica mesoporosa);
NTA: Ácido nitrilotriacético;
P: Concentração de proteínas no sobrenadante;
P₀: Concentração inicial de proteínas na solução enzimática;
PEI: Polietilenoimina;
p-NPG: 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo;
PTFE: Politetrafluoretileno (“Teflon”);
RI: Rendimento de imobilização;

RID: *Refractive Index Detector*;
SBA-15: *Santa Barbara Amorphous* (Sílica mesoporosa);
t: tempo;
TEM: *Transmission Electron Microscopy*;
TEOS: Tetraetil Ortosilicato;
TFE: Tetrafluoroeteno;
TMAOH: Hidróxido de Tetrametilamônio;
TPAOH: Hidróxido de Tetrapropilamônio;
V_{MAX}: Velocidade máxima.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
INTRODUÇÃO	17
1.1 Contextualização	17
CAPÍTULO 2	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Materiais Lignocelulósicos	20
2.2 Celulose	22
2.3 Hemicelulose	24
2.4 Lignina	25
2.5 Biorrefinaria.....	26
2.6 Processamento da biomassa	27
2.7 Tipos de Pré-Tratamento	28
2.8 Enzimas Celulolíticas e β -glucosidases	31
2.9 Imobilização de enzimas	35
2.10 Suportes para imobilização.....	39
2.11 Avaliação da imobilização.....	40
2.12 Imobilização de β -glucosidase	42
2.13 Glicose oxidase.....	45
2.14 Ácidos orgânicos.....	47
2.15 Ácido Glucônico	48
2.16 Sorbitol.....	52
2.17 Considerações gerais	52
CAPÍTULO 3	54
OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	54
3.1 Objetivo Geral	54
3.2 Objetivos específicos	54
3.3 Justificativa	55
CAPÍTULO 4	56
MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 Materiais	56
4.2 Síntese dos Suportes e Funcionalização com APTES	56
4.2.1 Síntese da nanosilicalita.....	56
4.2.2 Síntese da sílica mesoporosa	57

4.2.3	Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNS)	57
4.2.4	Síntese da nanozeólita Y	57
4.2.5	Caracterização dos suportes	58
4.2.6	Funcionalização com APTES.....	58
4.3	Varredura de condições de imobilização	59
4.3.1	Influência das variáveis na funcionalização com glutaraldeído.....	59
4.3.2	Concentração de proteína.....	60
4.3.3	Avaliação dos suportes.....	61
4.4	Caracterização da enzima imobilizada	61
4.4.1	Cálculo dos parâmetros cinéticos e de imobilização.....	62
4.5	Oxidação enzimática de glicose assistida por nanopartículas de ouro....	63
4.5.1	Síntese das nanopartículas de ouro suportadas em sílica mesoporosa (SBA-15)	63
4.5.2	Avaliação das nanopartículas de ouro suportadas	63
4.6	Hidrólise de celobiose e oxidação de glicose <i>one-pot</i> empregando enzimas.....	65
4.7	Viabilização de hidrólise enzimática <i>one-pot</i> com hidrogenação de glicose catalisada por Ru/C.....	65
CAPÍTULO 5		67
RESULTADOS E DISCUSSÃO		67
5.1	Hidrólise de Celobiose com β -Glucosidase Imobilizada	67
5.1.1	Considerações sobre a técnica de imobilização escolhida	67
5.1.2	Difração de raios X dos suportes	70
5.1.3	Micrografias dos suportes e determinação de tamanho de partícula...	72
5.1.4	Otimização das condições de imobilização.....	75
5.1.5	Determinação da concentração ótima de proteína	81
5.1.6	Avaliação dos suportes.....	82
5.1.7	Caracterização da enzima imobilizada	84
5.2	Avaliação das nanopartículas de ouro suportadas	92
5.3	Hidrólise de celobiose e oxidação de glicose <i>one-pot</i>	94
5.4	Viabilidade de hidrólise enzimática <i>one-pot</i> com hidrogenação de glicose	95
CAPÍTULO 6		100
CONCLUSÃO E SUGESTÕES.....		100
6.1	Conclusão.....	100
6.2	Sugestões.....	101

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Em um contexto econômico, o aumento dos preços dos produtos da petroquímica aliado à crise mundial de 2008 contribuíram para o desenvolvimento da indústria de biocombustíveis e produtos bioderivados. A proposta atual, que foi apresentada nos anos 80 após a crise do petróleo, é limitar a dependência da sociedade em relação aos produtos do petróleo e substituí-los por produtos derivados da biomassa. A grande vantagem dessa proposta é poder produzir polímeros, substâncias químicas e combustíveis a partir de fontes renováveis.

Nesse contexto, duas abordagens têm sido adotadas. A primeira visa a produzir biocombustíveis e bioprodutos, ditos de “primeira geração”, a partir de recursos da indústria agroalimentar. Na segunda abordagem, esses mesmos biocombustíveis e bioprodutos podem ser obtidos a partir de resíduos agrícolas. A vantagem seria que esses produtos, chamados “de segunda geração”, não competiriam com a indústria de alimentos e agregariam valor aos resíduos. Mais além, contribuiriam para a destinação dos resíduos agroindustriais.

Uma série de estudos tem sido realizada em torno do processo de sacarificação da celulose presente nesses resíduos agrícolas. A celulose é um polímero constituído de unidades de glicose e o objetivo da sacarificação, de maneira simples, é hidrolisar a celulose para se obter glicose. Feito isso, a glicose pode ser então utilizada como matéria-prima para conversão em produtos de interesse comercial. Existem basicamente duas estratégias para realizar a sacarificação da celulose: a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática. A primeira utiliza soluções ácidas que rompem as ligações internas da celulose, fazendo com que ela se despolimerize. A hidrólise enzimática, por sua vez, utiliza enzimas específicas para hidrolisar essas ligações e gerar glicose. Existe um grupo de enzimas responsáveis por romper as ligações da celulose, denominado celulasas, por intermédio de reações de hidrólise.

O ácido glucônico é um interessante *building block* na Indústria Química, possuindo importantes aplicações na Indústria de Alimentos e até mesmo na medicina. Uma das suas principais aplicações é no uso em produtos de limpeza, devido ao seu poder como agente quelante. Além disso, por ser biodegradável, sua aplicação nesse setor se torna ainda mais interessante. Outra importante aplicação do ácido glucônico é como aditivo em alimentos e como suplemento alimentar no tratamento de doenças. Como os sais de gluconato possuem uma excelente biocompatibilidade, são frequentemente usados para realçar sabores em alimentos e como veículo de medicamentos. O ácido glucônico é comumente encontrado na natureza, em pequenas quantidades, como produto da reação de oxidação da glicose. A enzima responsável por essa reação de oxidação é a Glicose Oxidase. Essa é uma reação conhecida há muitos anos e possui um problema particular: a coprodução de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio presente em excesso no meio reacional age como inibidor da glicose oxidase, diminuindo o rendimento da reação. Estudos recentes mostraram que a sinergia entre a glicose oxidase e catalisadores metálicos pode ser positiva e ajudar a contornar o problema de inibição enzimática causada pelo peróxido de hidrogênio ¹. Catalisadores com base em ouro suportados são capazes de degradar o peróxido de hidrogênio, aumentando a conversão da reação.

Como foi citado, existem muitas reações que são realizadas graças à utilização de enzimas. Porém, o alto custo de obtenção das mesmas pode ser um obstáculo para a viabilização dessas reações. Um processo envolvendo tais reações seria realmente eficiente se fosse possível a recuperação e reutilização dessas enzimas. Essa tarefa representa um grande desafio em termos de *downstream*. Isso porque, normalmente, separar enzimas das demais substâncias presentes no meio reacional pode ser muito difícil. Por isso, em diversos estudos, tem sido proposta a imobilização de enzimas como forma de contornar o problema associado à reutilização das enzimas. Enzimas imobilizadas em um suporte são facilmente separadas do meio, por centrifugação ou, até mesmo, filtração.

Dentro do contexto de aproveitamento de resíduos, é interessante converter a glicose, obtida pelas tecnologias de sacarificação, em, por exemplo, ácido glucônico, um produto de alto valor agregado, ou em outros produtos de interesse. Por isso, o presente trabalho propõe

converter celobiose, como molécula modelo, em glicose, por hidrólise com β -glucosidase imobilizada. Em seguida, foi avaliada a conversão direta (*one-pot*) a produtos de interesse, como ácido glucônico. Além disso, foi estudada a aplicação conjunta de enzimas e catalisadores metálicos suportados.

Nos capítulos seguintes serão apresentados, primeiramente, uma revisão sobre os principais conceitos e fundamentos aplicados ao trabalho, bem como uma revisão dos trabalhos anteriores com β -glucosidase imobilizada e glicose oxidase em reações combinadas; em seguida, será descrita a metodologia utilizada para a realização do trabalho. Na sequência, os resultados obtidos serão apresentados e discutidos, inicialmente no que diz respeito à imobilização de β -glucosidase em diferentes suportes, caracterização do sistema enzimático imobilizado e, posteriormente, à avaliação de reações combinadas utilizando β -glucosidase em sistemas multienzimáticos e também assistidos por catalisador metálico. Finalmente, são elencadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros e as referências utilizadas na construção desta tese de doutorado.

Publicações em periódico indexado e em Anais de Congresso com apresentação oral, extraídas do presente trabalho:

CARVALHO, Y.; ALMEIDA, J. M. A. R. ; ROMANO, P. N. ; FARRANCE, K. ; DEMMA CARÀ, P. ; PEREIRA, N. ; LOPEZ-SANCHEZ, J. A. ; SOUSA-AGUIAR, E. F. . Nanosilicalites as Support for β -Glucosidases Covalent Immobilization. Applied Biochemistry and Biotechnology (Online), v. 1, p. 1, 2017.

CARVALHO, Y.; ALMEIDA, J. M. A. R. ; ROMANO, P. N. ; PEREIRA JUNIOR, N. ; FARRANCE, K. ; CARA, P. D. ; SANCHEZ, J. A. L. ; SOUSA-AGUIAR, E. F. . Does size matter? Application of nanozeolites on enzyme immobilization for efficient conversion of biomass.. 2016. (Trabalho completo publicado nos Anais do *International Zeolytes Conference* – IZC com apresentação oral).

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

As matérias-primas lignocelulósicas são recursos abundantes e renováveis que tem sido o foco do desenvolvimento de novos processos sustentáveis para obtenção de combustíveis e produtos químicos nos últimos anos. Os materiais lignocelulósicos representam 50% da biomassa terrestre ². A estrutura lignocelulósica (Figura 1) é referente à parte do vegetal que forma a parede celular (meia lamela, paredes primária e secundária), composta por estruturas fibrosas, constituídas basicamente por polissacarídeos (celulose (40-60%) e hemicelulose (20-40%)) ³. Esses componentes estão associados a uma estrutura macromolecular contendo substâncias aromáticas, denominada lignina (15-25%). A celulose e hemicelulose são polissacarídeos compostos de açúcares fermentáveis. A celulose é um polímero composto exclusivamente de glicose. A hemicelulose tem composição variada, alternando entre sequências de açúcares de 6 átomos de carbono e sequências de açúcares de 5 átomos de carbono, como a xilose, além de ácidos orgânicos.

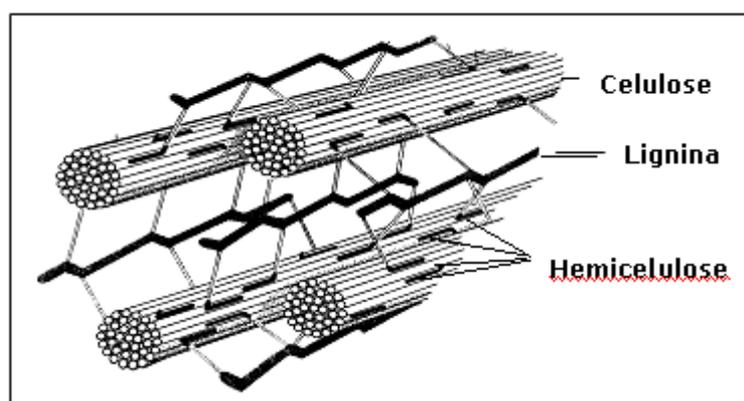


Figura 1 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos ⁴.

Os resíduos lignocelulósicos da agroindústria mais abundantes são: bagaço e palha de cana; sabugo e palha de milho; palhas de trigo e arroz, restos de madeira processada e

resíduos urbanos contendo papel. A composição desses resíduos pode ser observada na Tabela 1. No contexto brasileiro, estima-se que somente o setor sucro-alcooleiro gere cerca de 16 milhões de toneladas de bagaço de cana excedente e 76 milhões de toneladas de palha ⁵.

Tabela 1 - Composição de resíduos lignocelulósicos ⁶.

Fonte	Composição (%)				
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas
Bagaço de cana	33-36	28-30	18-20	4-6	2-4,8
Palha de arroz	32-37	19-24	9-13	4-5	12-18
Sabugo de milho	34-36	16-24	15-19	2-6	2-4
Palha de trigo	30-33	22-28	14-18	3-7	3-7
Palha de sorgo	34-36	25-26	25-26	-	-
Jornal impresso	40-55	25-40	18-30	-	-
Madeiras	~50	~20	15-20	Até 10	Até 5

A composição em glicídios dos polissacarídeos, por tipo de material lignocelulósico, bem como a composição em lignina, proteínas e cinzas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição em glicídios de materiais lignocelulósicos segundo Lee (1998) (apud BORGES, 2011) ⁵.

	Sabugo de milho	Palha de trigo	Palha de arroz	Bagaço de cana	Semente de algodão	Jornal impresso	Resíduos urbanos
Glicídios (%)							
Glicose	39,0	36,6	41,0	38,1	20,0	64,4	40,0
Manose	0,3	0,8	1,8	n.d.	4,1	16,6	8,0
Galactose	0,8	4,4	0,4	1,1	0,1	n.d.	n.d.
Xilose	14,8	19,2	14,8	23,3	4,6	4,6	14,0
Arabinose	4,2	4,4	4,5	4,5	4,3	0,5	4,0
Outros (%)							
Lignina	15,1	14,5	9,9	18,4	17,6	21,0	20,0
Cinzas	4,3	9,6	4,4	4,8	14,8	0,4	1,0
Proteínas	4,0	4,0	n.d.	4,0	4,0	n.d.	n.d.

2.2 CELULOSE

A celulose é o constituinte principal da parede celular das plantas e uma das estruturas que é constantemente regenerada durante a fotossíntese. É um polissacarídeo linear composto por moléculas de glicose. Uma cadeia de celulose é composta por milhares de unidades de glicose, ligadas entre si por uma ligação glicosídica β 1-4 entre carbonos. A celulose possui, portanto, um grau de polimerização relevante, que vai influenciar em suas propriedades físicas e mecânicas ⁴. A Figura 2 ilustra a estrutura molecular da celulose.

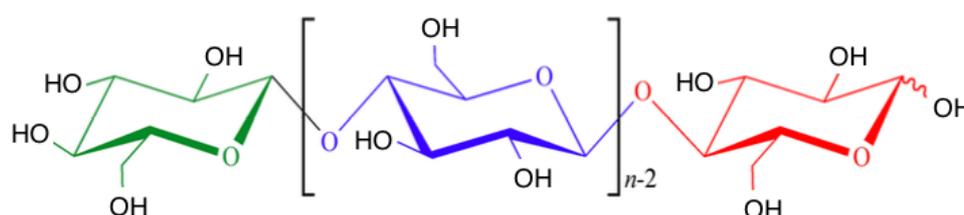


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura molecular da celulose ⁷.

Como os grupamentos hidroxila e as ligações glicosídicas estão em posição equatorial em relação ao plano médio dos ciclos, isso implica a linearidade da molécula de celulose. Essa linearidade leva a uma organização espacial das moléculas de celulose sob a forma de uma malha, onde as cadeias moleculares são ligadas entre si por ligações de hidrogênio estabelecidas entre os grupamentos hidroxila ⁸, como pode ser visto na Figura 3.

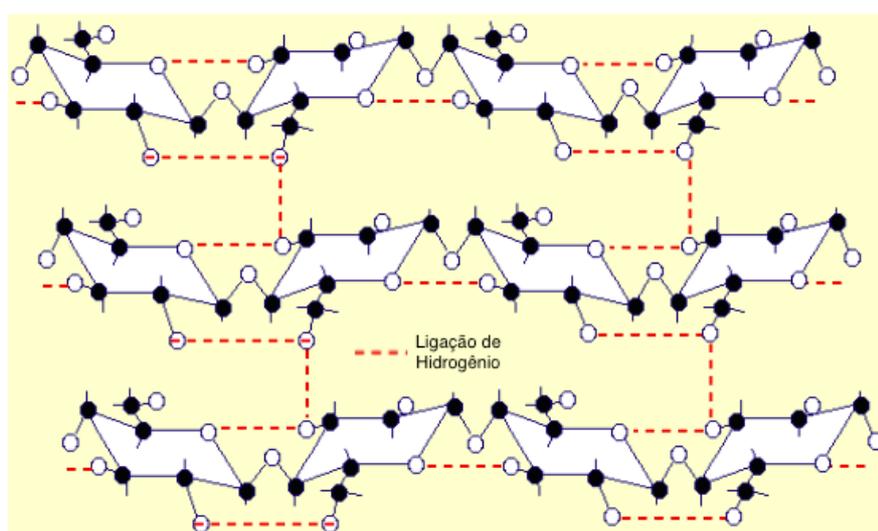


Figura 3 - Esquema ilustrando as ligações de hidrogênio inter e intra moleculares nas moléculas de celulose ⁹.

A celulose se organiza de maneira a formar fibrilas elementares que se agregam para formar microfibrilas. Essas microfibrilas, por sua vez, se associam para formar macrofibrilas e, em seguida, a fibra de celulose. A Figura 4 mostra o arranjo estrutural das fibras de celulose.

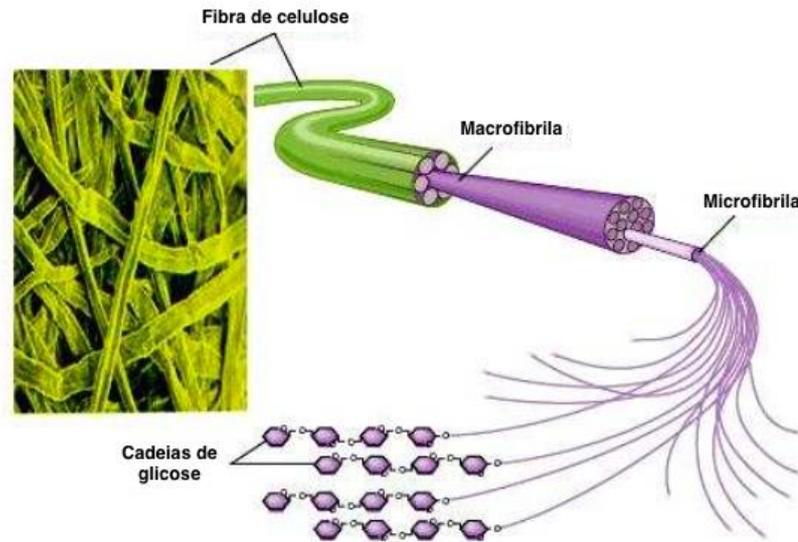


Figura 4 - Arranjo estrutural da fibra de celulose ¹⁰.

As microfibrilas de celulose formadas, são caracterizadas por propriedades cristalinas complexas. De fato, é possível distinguir zonas de arranjo altamente ordenados das moléculas de celulose (zonas cristalinas) e zonas onde é possível observar um agregado de moléculas dispostas de forma irregular (zonas amorfas) ¹¹. A Figura 5 mostra a disposição das zonas cristalinas e amorfas.

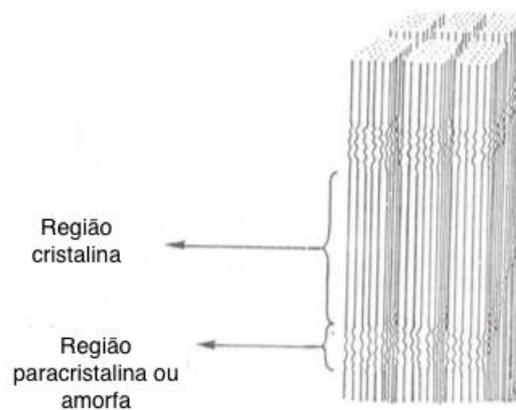


Figura 5 - Arranjo estrutural das moléculas em zonas cristalinas e amorfas ¹².

Essa alternância na ocorrência de zonas cristalinas e amorfas é altamente variável entre diferentes materiais lignocelulósicos e influencia diretamente o comportamento dos materiais em relação às propriedades físicas e mecânicas. Esse fenômeno exerce também grande influência sobre os parâmetros de hidrólise da celulose. A taxa de cristalinidade determina a acessibilidade à celulose pela água e reagentes de hidrólise que penetram a celulose, principalmente nas zonas amorfas ¹³. Muitas aplicações relativas à indústria de alimentos e farmacêutica utilizam a celulose classificada como microcristalina. A celulose microcristalina é uma celulose purificada e parcialmente despolimerizada. Ela é produzida por hidrólise controlada em solução de ácido diluído na temperatura de ebulição. Esse processo tem como objetivo hidrolisar preferencialmente as cadeias de celulose das zonas amorfas e conservar somente as zonas cristalinas. O produto final possui, portanto, um alto grau de cristalinidade ¹².

2.3 HEMICELULOSE

A hemicelulose é o polissacarídeo que envolve as fibras de celulose e contribui para dar suporte à parede celular vegetal. Ao contrário da celulose, cuja unidade monomérica é a glicose, a hemicelulose é uma macromolécula de composição variável constituído majoritariamente por seis monômeros principais: arabinose, glicose, xilose, manose, galactose e ramnose ⁶. A Figura 6 mostra um exemplo esquemático da estrutura da hemicelulose.

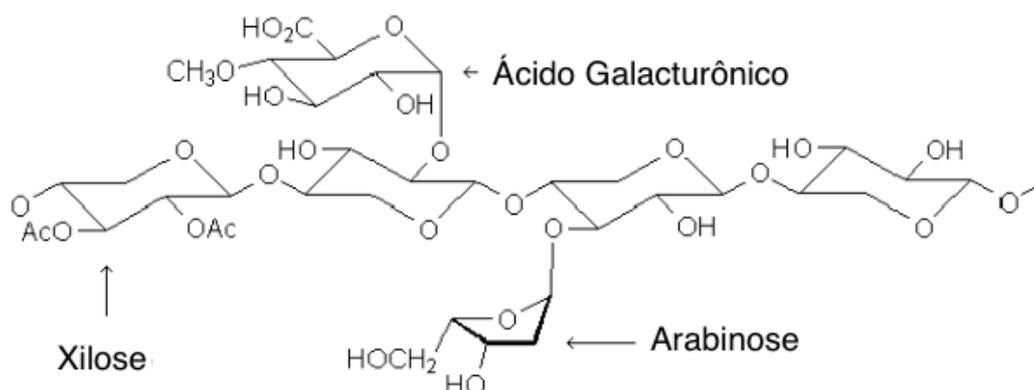


Figura 6 - Exemplo esquemático da estrutura da hemicelulose ⁷.

Sua natureza ramificada e a diversidade de monossacarídeos que compõe a hemicelulose impedem qualquer organização estrutural das cadeias e lhe conferem uma

estrutura amorfa. Essa propriedade implica uma maior acessibilidade dos agentes de hidrólise, como enzimas e ácidos, à estrutura da hemicelulose. Portanto, a hidrólise da hemicelulose é, por fim, mais fácil que a hidrólise da celulose ¹⁴.

2.4 LIGNINA

A lignina é o terceiro componente mais importante da parede celular vegetal e o segundo constituinte mais abundante da biomassa logo depois da holocelulose (celulose e hemicelulose). Na parede celular vegetal, a lignina age como um “cimento”, preenchendo os espaços entre e em volta da celulose e hemicelulose. A lignina enrijece fortemente a estrutura do material lignocelulósico, porém com o inconveniente de limitar a acessibilidade às frações celulósicas e hemicelulósicas da biomassa. Ao contrário da celulose e hemicelulose, a lignina não é um polímero polissacarídico. A lignina é um complexo tridimensional amorfo composto de estruturas fenólicas cujos precursores são álcoois aromáticos. Existem aproximadamente 10 tipos de ligações cruzadas em sua cadeia. A proporção de seus constituintes é altamente variável e depende do tipo de biomassa. Essa variação, ligada às modificações estruturais no momento da extração desse material, torna difícil a apresentação de uma estrutura para a lignina e faz desse material um componente ainda pouco conhecido e com propostas de valorização ainda limitadas ¹⁵. A Figura 7 mostra um esquema da estrutura da lignina.

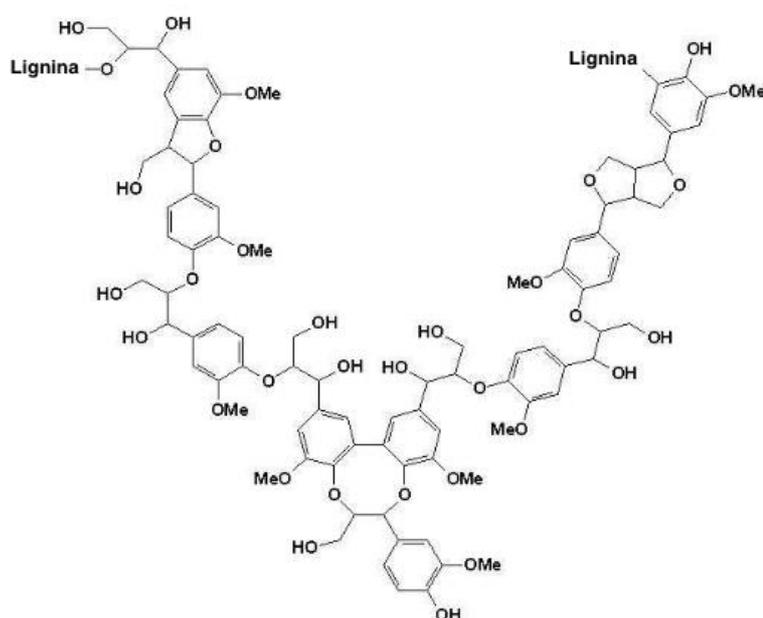


Figura 7 - Exemplo esquemático da estrutura da lignina ⁷.

2.5 BIORREFINARIA

O aproveitamento dos resíduos, como o bagaço de cana, representa um grande avanço para a Química Verde e tem potencial para gerar produtos dentro do conceito de biorrefinaria integrada. Biorrefinaria é um conceito que surgiu nos últimos anos para se referir à integração dos processos que usam matérias-primas renováveis, de forma a aproveitá-las ao máximo, gerando o mínimo de efluentes e de impacto ambiental. O conceito de biorrefinaria foi construído por grupos de pesquisa internacionais que buscavam o desenvolvimento de tecnologia para a produção de etanol de segunda geração, ou seja, aquele produzido a partir de resíduos de composição lignocelulósica. Uma biorrefinaria pode ser subdividida em duas plataformas, de acordo com a rota tecnológica, como mostrado no esquema de Schlittler e Pereira Jr. (2008), Figura 8. Os esforços nessa temática já apresentam expressivos resultados, traduzidos pela construção de dezenas de unidades demonstrativas, algumas já em operação, para a produção deste biocombustível, em particular nos Estados Unidos da América do Norte

16.

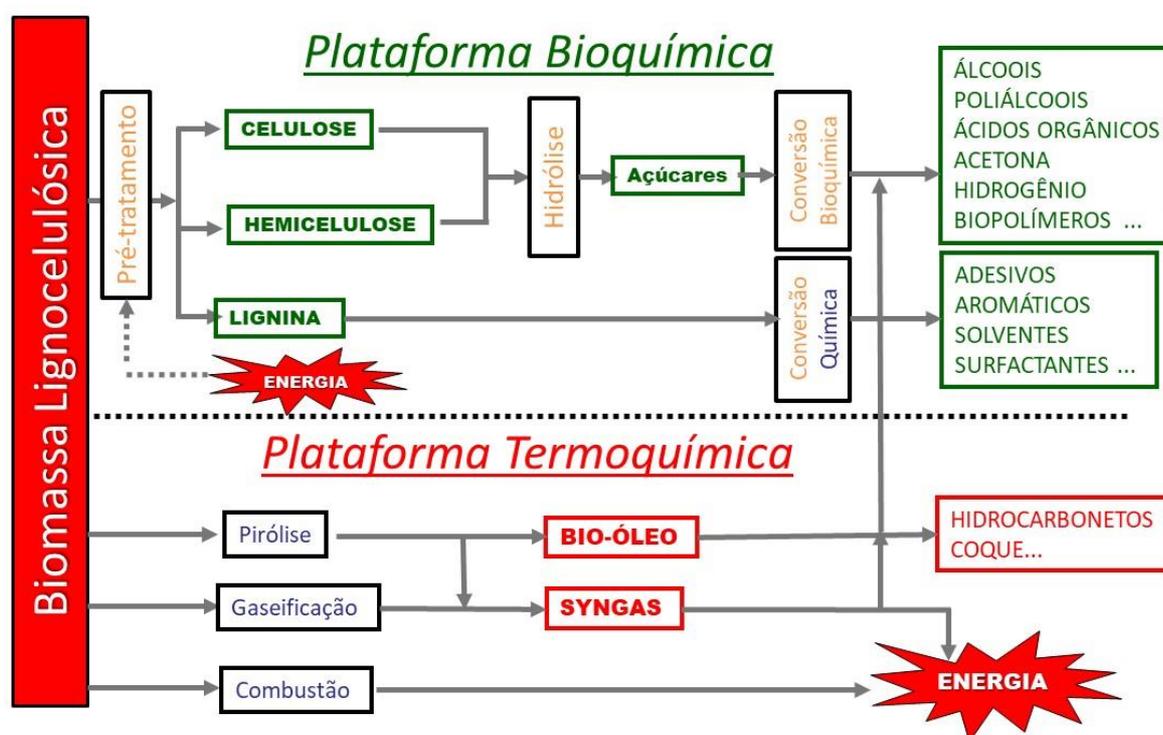


Figura 8 – Esquema das rotas tecnológicas em uma biorrefinaria ¹⁷.

Mais recentemente, foi cunhado o termo biorrefinaria integrada. Nesse caso, especial atenção é dada aos resíduos da biomassa que alimentam a Biorrefinaria. Na Biorrefinaria integrada, propõem-se rotas alternativas de transformação dos resíduos, almejando adicionar valor a esses, aumentando, dessa forma, a rentabilidade da refinaria ¹⁸. A Figura 9 mostra um esquema de biorrefinaria integrada proposto por Falabella et al. ¹⁹

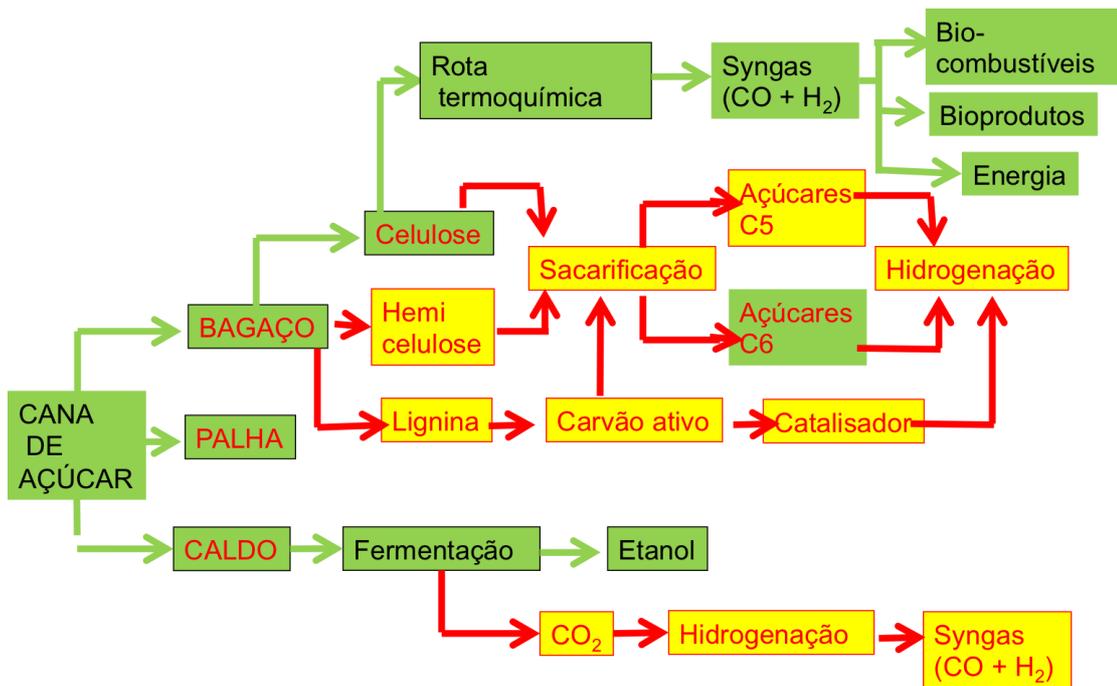


Figura 9 - Esquema de biorrefinaria ¹⁹.

2.6 PROCESSAMENTO DA BIOMASSA

Primeiramente, a biomassa lignocelulósica deve passar por um pré-tratamento para “abrir” a estrutura lignocelulósica. A lignina removida nessa etapa pode ser aproveitada, no contexto de uma biorrefinaria integrada, para produção de bio-óleo ou de carvões ativos, por exemplo. Por sua vez, a celulose e hemicelulose, que são as frações lignocelulósicas que contém, efetivamente, os açúcares fermentáveis em suas cadeias, necessitam passar por uma etapa de sacarificação para obtenção desses açúcares.

Em linhas gerais, existem dois tipos de sacarificação: hidrólise ácida e hidrólise enzimática. Cada um desses processos possui suas particularidades e desafios. A hidrólise ácida apresenta problemas de seletividade, recuperação do ácido e investimento em equipamentos resistentes para trabalhar nessas condições. Por sua vez, a hidrólise enzimática

apresenta maiores problemas em relação ao custo das enzimas utilizadas no processo e, por isso, é crucial que seja desenvolvida uma maneira eficiente de recuperação dessas enzimas. Porém, a hidrólise enzimática possui importantes vantagens, como a economia de energia, pois ocorre em condições reacionais brandas, evitando o uso de substâncias tóxicas e ácidos corrosivos.

2.7 TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO

Para o processamento e valorização de cada um dos três biopolímeros que foram descritos, é necessário que a estrutura do material lignocelulósico seja rompida para a separação de cada componente. A eficiência de um processo de pré-tratamento é caracterizada segundo diferentes critérios: redução do tamanho de partículas do substrato, formação limitada de inibidores de degradação, preservação da fração hemicelulósica, capacidade de recuperar moléculas de alto valor agregado, relação eficiência/custo, quantidade de energia consumida, gestão dos efluentes gerados, etc ²⁰.

Uma larga gama de tecnologias de pré-tratamento foi desenvolvida na última década para melhorar a acessibilidade à estrutura da biomassa da escala nanométrica à escala micrométrica. De uma maneira geral, essas tecnologias de pré-tratamento podem ser classificadas em 4 categorias: pré-tratamentos físicos, pré-tratamentos químicos, pré-tratamentos físico-químicos e pré-tratamentos biológicos ²¹.

Pré-tratamentos físicos e termo-físicos: Englobam geralmente os processos mecânicos utilizados para redução de tamanho. As mais comuns são as tecnologias de moagem, radiações ionizantes, ultrassom e extrusão ²¹.

Pré-tratamentos químicos e termoquímicos: Os pré-tratamentos químicos foram desenvolvidos inicialmente para atender à indústria do papel, com o objetivo de deslignificar o material lignocelulósico. Além disso, esse tipo de pré-tratamento permite a extração da fração hemicelulósica e impacta diretamente a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose. Os pré-tratamentos químicos englobam os pré-tratamentos ácidos e alcalinos. Os processos organosolv e solubilização em líquidos iônicos também são utilizados como tecnologias de pré-tratamento da biomassa ²¹. Os pré-tratamentos ácidos utilizam ácidos

diluídos ou concentrados (principalmente o sulfúrico) para romper a estrutura rígida da biomassa, hidrolisando a hemicelulose assim como, dependendo da concentração do ácido, as partes amorfas da celulose ²². Os pré-tratamentos alcalinos utilizam bases como a soda cáustica, cal e hidróxido de potássio. A utilização desses álcalis leva a uma alteração nas estruturas fenólicas da lignina, um inchamento e descristalinização parcial da celulose, além da solubilização parcial da hemicelulose ²³. Os processos organosolv revelam igualmente um potencial em termos de pré-tratamento de biomassa ²⁴. Esses processos utilizam diferentes solventes orgânicos e aquosos tais como o metanol, etanol, acetona e etileno glicol, os quais têm por objetivo solubilizar a lignina, permitindo aumentar a acessibilidade à celulose e hemicelulose e ainda recuperar lignina purificada como coproduto ²⁵. Dependendo do processo, os solventes podem ser ainda combinados com catalisadores ácidos (HCl, H₂SO₄, ácido oxálico ou salicílico) que permitem também a hidrólise da hemicelulose. O emprego de solventes é, ainda assim, o maior inconveniente desses processos. A reciclagem completa dos solventes deve ser realizada não só por razões econômicas, mas também porque traços desses solventes podem inibir as etapas posteriores de hidrólise enzimática e fermentação, por exemplo ⁶. A solubilização em líquidos iônicos como técnica de pré-tratamento é muito mais recente. Os líquidos iônicos, chamados também “solventes verdes”, são sais compostos de cátions e ânions de tamanhos relevantes, ligados a um fraco grau de simetria do cátion. Essa conformação confere temperaturas de fusão geralmente inferiores a 100°C. Estudos recentes comprovam a capacidade de dissolver celulose e palha de milho em BMIMCI (cloreto de 1-butil-3-metilimidazol) e idealizam a utilização de líquidos iônicos no pré-tratamento de biomassa ²⁶.

Pré-tratamentos físico-químicos e termo-mecano-químicos: Os pré-tratamentos físico-químicos combinam os efeitos dos pré-tratamentos físicos e químicos. Essa categoria engloba os processos que vêm sofrendo maiores desenvolvimentos e parecem ser os mais promissores. Essas tecnologias são: a explosão a vapor, explosão por amônia e micro-ondas combinadas com agentes químicos. A explosão a vapor é um processo físico-químico que permite romper a estrutura do complexo lignocelulósico pela ação combinada do calor do vapor e o cisalhamento aplicado ao material no retorno à pressão atmosférica. A explosão por amônia é um pré-tratamento onde os materiais lignocelulósicos são expostos à amônia líquida a alta temperatura e pressão. Esse processo induz uma descristalinização parcial da celulose, a despolimerização da hemicelulose e a clivagem das ligações éter das estruturas fenólicas da lignina. Essa fase de exposição à amônia é seguida de uma descompressão explosiva, assim

como na explosão a vapor, o que aumenta significativamente a superfície específica disponível aos ataques químicos ou enzimáticos. Os efeitos associados das duas fases de tratamento melhoram significativamente os rendimentos de hidrólise ²⁷. A substituição do aquecimento convencional por micro-ondas mostra uma melhora significativa no potencial dos agentes químicos que se traduz em uma melhora nos rendimentos de hidrólise. O aquecimento por micro-ondas é normalmente combinado com agentes básicos e ácidos ou mesmo agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio ²⁸.

Pré-tratamentos biológicos: Empregam microrganismos, principalmente fungos, que atacam a estrutura lignocelulósica. Os fungos utilizados possuem características de degradação muito distintas dependendo do tipo de cepa utilizada. Em geral, colônias de fungos de degradação marrom e degradação branca atacam majoritariamente a celulose. Porém, os fungos de degradação branca atacam ativamente a lignina, o que os torna interessantes para utilização no pré-tratamento de biomassa ⁶. A degradação da lignina com esse tipo de fungo acontece graças às enzimas lacases e peroxidases ²⁹. Muitos estudos procuram aumentar a atividade dessas enzimas para contornar uma grande desvantagem desse processo: o tempo de tratamento. Esse tipo de pré-tratamento pode demorar até 5 semanas, o que torna essa tecnologia pouco competitiva. Por isso, os pré-tratamentos com microrganismos ainda estão em fase de desenvolvimento, mas representam uma alternativa interessante do ponto de vista ambiental e em termos de segurança e economia energética ³⁰.

A Tabela 3 apresenta as principais vantagens e desvantagens dos processos de pré-tratamento mais comuns.

Tabela 3 - Resumo dos tipos de pré-tratamento ³¹.

PRÉ-TRATAMENTO	SOLUBILIZAÇÃO DA HEMICELULOSE	REMOÇÃO DA LIGNINA	ACESSIBILIDADE DA CELULOSE	GERAÇÃO DE INIBIDORES	POSSIBILIDADE DE UTILIZAR CELULOSE E HEMICELULOSE	AUMENTO NO CONTEÚDO DE CELULOSE NOS SÓLIDOS PRÉ-TRATADOS
Mecânico	sem efeito	sem efeito	+/-	sem efeito	sem efeito	sem efeito
Ácido Diluído	++ (hidrólise)	(lignina ácido solúvel)	+	+/-	++	+
Alcalino	+	++	++	+/-	- (celulose)	++
Oxidação úmida	+	++	++	-	+/-	+
Hidrotérmico	+	(lignina ácido solúvel)	+	-	+	+
Explosão com vapor	+ (hidrólise parcial)	(lignina ácido solúvel)	+	+/-	++	+
Explosão com vapor catalisada	++ (hidrólise)	(lignina ácido solúvel)	+	+/-	++	+
Expansão da fibra com amônia	+/-	Rompe ligações lignina-carboidrato	++	-	+	-

2.8 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E B-GLUCOSIDASES

Nos últimos anos, com a busca crescente por rotas mais limpas e verdes para síntese de produtos de interesse industrial, as tecnologias envolvendo enzimas se tornam uma alternativa promissora. Particularmente, nas últimas duas décadas, processos envolvendo biocatalisadores se mostraram importantes para atender a uma demanda por produtos mais sustentáveis, particularmente na síntese de produtos farmacêuticos, flavorizantes, aromatizantes, vitaminas e outros produtos de química fina ^{32, 33}.

Enzimas são comumente chamadas de biocatalisadores pela sua capacidade de promover transformações complexas na natureza. Com isso, muitos processos industriais se tornaram realidade através do isolamento de enzimas para exercer funções específicas na indústria. Estudos mostram que o uso da tecnologia enzimática ajuda a reduzir os custos operacionais na indústria em 10 – 50%, pela redução do consumo energético e de insumos ³⁴.

Com o crescimento da indústria do etanol de segunda geração, estima-se que o potencial de mercado para essas enzimas possa atingir 400 milhões de dólares por ano. Essa estimativa leva em consideração apenas a aplicação na hidrólise dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica, por isso, esse valor seria consideravelmente maior se levadas em conta outras aplicações ³⁵.

As celulasas, em particular, são enzimas conhecidas desde o início do século XX pela sua capacidade de hidrolisar o material celulósico. Atualmente, é conhecido que as celulasas são um consórcio de enzimas que apresenta especificidade pelas ligações glicosídicas β -1,4 e permitem a completa solubilização da celulose, gerando açúcares. Os principais grupos de enzimas envolvidos nesse processo são as endoglucanase e exoglucanase. Para a completa hidrólise da celulose, um outro grupo de enzimas se faz importante: as β -glucosidases, que não são verdadeiramente consideradas pertencentes ao grupo das celulasas, mas que são de fundamental importância na geração de glicose. Enquanto a endoglucanase e exoglucanase são responsáveis por fragmentar a matriz celulósica em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização, as β -glucosidases hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis a glicose ³⁶.

Recentes desenvolvimentos na tecnologia de produção de celulasas possibilitaram a diminuição do custo com enzimas por galão de etanol de 5,40 dólares para apenas 20 centavos de dólar. Porém, para que o processo seja realmente competitivo, esse valor precisaria cair para 7 centavos de dólar apenas ³⁷. Tornando o cenário mais complicado, uma maior redução dos custos com enzimas, por meio de engenharia genética e desenvolvimento de *downstream*, seria um caminho com desafios tecnológicos enormes ³⁷, devido ao investimento elevado e tempo de dedicação em pesquisa necessários. Em contraste, a possibilidade de reutilizar enzimas no processo é, visivelmente, mais atraente economicamente.

Uma alternativa que representa um fator crítico no uso de enzimas em processos industriais é a etapa de recuperação para reutilização dessas enzimas. Devido ao elevado custo de produção das enzimas empregadas nos processos como o de sacarificação, é interessante poder reciclar e utilizar novamente as mesmas, reduzindo gastos com aquisição de novas enzimas. De acordo com alguns estudos, as celulasas representam mais que 50% do custo total no processo de hidrólise enzimática ³⁸.

A partir do desenvolvimento de alternativas para contornar problemas como esse, é possível tornar processos industriais mais interessantes do ponto de vista econômico. Um processo verdadeiramente eficiente deveria contar com a recuperação das enzimas utilizadas na hidrólise e seu posterior reuso. Porém, o reciclo das enzimas é uma tarefa complexa pois, ao final da hidrólise, essas enzimas se distribuem entre duas fases: o substrato sólido e o sobrenadante líquido. Devido a esse fato, muitos estudos têm sido conduzidos visando à imobilização de enzimas. Dessa forma, a separação e reciclo tornam-se muito mais simples e a atividade útil das enzimas é aumentada. Além disso, enzimas imobilizadas são mais resistentes a alterações reacionais de pH e temperatura ³⁹.

A estrutura da maioria das celulasas apresenta dois domínios: o domínio catalítico (CD) responsável pela clivagem da celulose e o domínio responsável pela ligação com o substrato celulósico (CBD). Os dois domínios são ligados por uma região peptídica. A Figura 10 ilustra de forma simplificada a estrutura de uma celobiohidrolase, uma das enzimas celulolíticas.

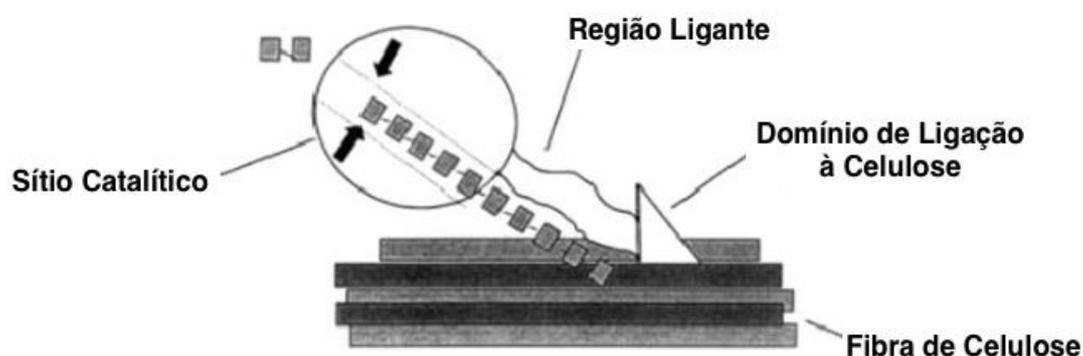


Figura 10 – Esquema simplificado de uma celobiohidrolase ³⁴.

Não se sabe ao certo o grau de importância do CBD e da região peptídica na conversão catalítica. Alguns sugerem que sua função é apenas de ligação com o substrato. Porém, estudos mostram que a atividade enzimática diminui bastante se a região peptídica for reduzida. Concluiu-se, portanto, que o CBD poderia ser responsável pela separação das cadeias e a região peptídica teria um papel importante na penetração no substrato ⁴⁰⁻⁴².

Em relação ao mecanismo sinérgico de ação das celulasas, esse sim é conhecido em maior profundidade. Enquanto as endoglucanases (EG) são responsáveis pela clivagem das

ligações internas β -1,4, as exoglucanases atuam na clivagem da região terminal da cadeia celulósica. As exoglucanases normalmente existem em dois tipos: celobiohidrolases I e II (CBH I e II). Elas atuam em conjunto, clivando os terminais redutores e não-redutores da cadeia celulósica a medida que a reação avança. O produto final da ação das endo e exoglucanases é a celobiose, duas unidades de glicose ligadas, e oligossacarídeos solúveis. A taxa de despolimerização enzimática pela ação das endo e exoglucanases representa o fator limitante na hidrólise enzimática ⁴³. Por sua vez, as β -glucosidases são responsáveis por converter celobiose em glicose, embora algumas β -glucosidases também sejam capazes de hidrolisar oligossacarídeos maiores ^{44,45}. O que ainda não se tornou um consenso é a ordem de ação das EG e CBH ³⁴. Tanto as EG e CBHs como as β -glucosidases sofrem inibição pelo seus produtos de hidrólise, celobiose e glicose, respectivamente ⁴⁶. A Figura 11 a seguir mostra o mecanismo de ação onde as EG rompem a cadeia celulósica e depois as CBH atuam nos terminais. A celobiose formada é hidrolisada em duas moléculas de glicose pela ação das β -glucosidases.

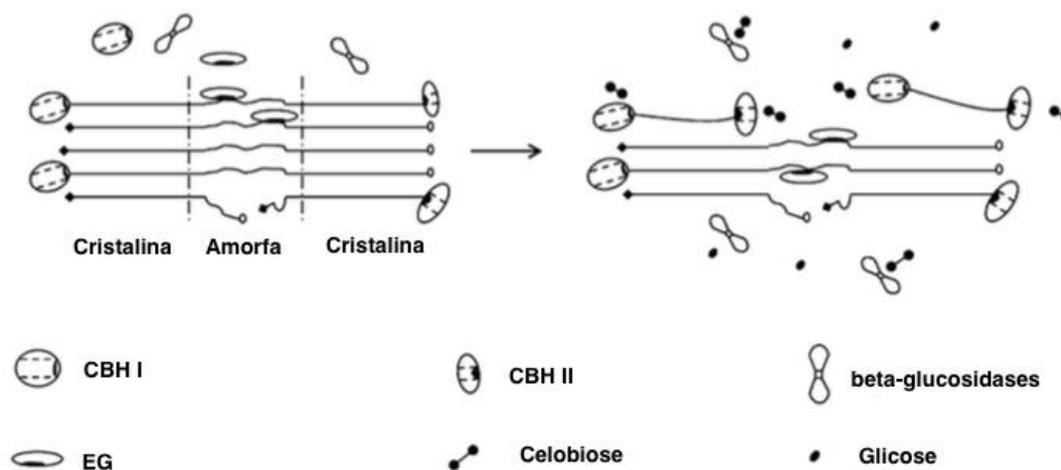


Figura 11 - Ação sinérgica das celulases na clivagem da celulose ³⁴.

O sinergismo entre as EG e CBH também depende do substrato utilizado. Se o substrato for solúvel, como é o caso da carboximetil celulose (CMC), o sinergismo é praticamente nulo ⁴⁷. Porém, quando o substrato é cristalino, como é o caso da Avicel[®] comercial, a importância das CBH é mais evidente, pois as ligações β -1,4 estão praticamente inacessíveis às EG ⁴⁸. De qualquer forma, os substratos cristalinos sempre possuem uma parte amorfa exposta e que permanece acessível às EG. Embora aparentemente o sinergismo entre essas enzimas tenha sido explicado em estudos anteriores, o tema ainda gera muita discussão

e não se sabe ao certo porque as CBH contribuem para a ação das EG em substratos como a celulose cristalina. Também ainda não foi descoberto porque apenas algumas CBH e EG apresentam sinergismo entre todas as existentes ⁴⁹. O grau de sinergismo entre as enzimas pode ser medido pela razão entre o efeito de todas as enzimas em conjunto e a soma dos efeitos das enzimas agindo individualmente. Estudos mostram conclusões interessantes em relação ao sinergismo das enzimas, como, por exemplo, a influência da β -glucosidase na ação da CBH. Experimentos mostram que o acúmulo de celobiose no meio, devido à ausência da β -glucosidase, apresentou um efeito inibitório na ação das CBHs ⁵⁰. Por isso, é interessante que um coquetel enzimático de celulases tenha alta atividade β -glucosidásica. As preparações enzimáticas disponíveis necessitam, muitas vezes, de suplementação com β -glucosidase extra para evitar a inibição por celobiose ⁵¹⁻⁵³. Além disso, já foi mostrado também como os efeitos individuais das EG e CBH são aumentados quando essas estão simultaneamente presentes na reação ³⁴.

A β -glucosidase (EC 3.2.1.21) é uma glicosil hidrolase de massa molar 136 kDa. Possui diversas aplicações em diferentes processos industriais, como na estabilização de sucos e bebidas, na melhoria das propriedades sensoriais dos alimentos, também é utilizada na síntese de alquil e arilglicosídeos a partir de polissacarídeos naturais através de hidrólise reversa ou trans-glicosilação, gerando produtos com aplicações na indústria farmacêutica, de cosméticos e de detergentes ⁵⁴.

2.9 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas imobilizadas são, de acordo com a IUPAC, enzimas solúveis ligadas a uma matriz insolúvel, orgânica ou inorgânica, ou encapsuladas em uma membrana com a intenção de aumentar sua estabilidade e permitir seu reciclo ou uso contínuo ⁵⁵. Além de permitir uma fácil separação do meio reacional, a imobilização protege as enzimas de eventual desnaturação causada por valores de pH extremos, altas temperaturas e solventes orgânicos ⁵⁵. Tais vantagens tornam interessante o uso de enzimas imobilizadas em escala industrial. Enzimas imobilizadas possuem, portanto, aplicações em diversos campos como na fabricação de biossensores ^{56, 57}, síntese de bioprodutos ^{58, 59}, produção de bioetanol e biodiesel ^{60, 61}, remoção de poluentes ^{62, 63} e células biocombustíveis ^{64, 65}. As técnicas de imobilização de

enzimas estão distribuídas, basicamente, em três grandes categorias: Ligação a um suporte, encapsulamento e ligação cruzada entre enzimas. A Figura 12 apresenta as principais técnicas de imobilização de enzimas.

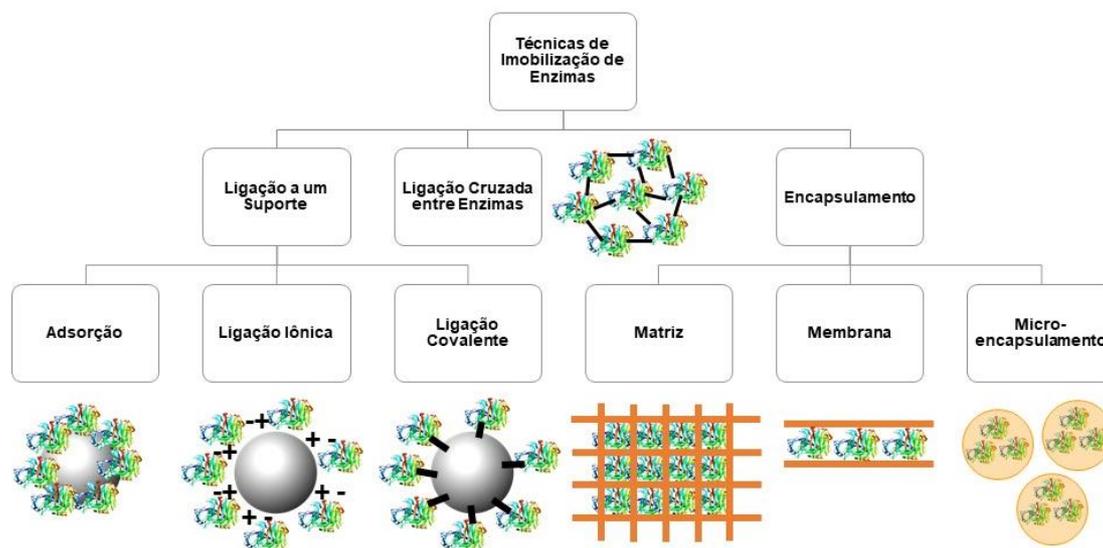


Figura 12 - Classificação das técnicas de imobilização de enzimas ^{39, 66}.

A ligação a um suporte pode ser de natureza física (interações hidrofóbicas e de van der Waals), iônica ou covalente. Entre os suportes comumente usados estão as resinas sintéticas, biopolímeros e sólidos inorgânicos. A adsorção física de enzimas ao suporte é uma das técnicas de imobilização mais comuns devido à sua praticidade e baixo custo ⁶⁷. Porém, a grande desvantagem dessa técnica é a fraca interação enzima-suporte, que facilita a dessorção das enzimas sob condições reacionais severas, como variações de temperatura, pH, força iônica ou, até mesmo, concentração de substrato. Por isso, a utilização de enzimas imobilizadas por adsorção é mais indicada em meios hidrofóbicos ⁶⁸. Por outro lado, a ligação a um suporte por interações iônicas é, naturalmente, mais forte. A seleção do suporte depende, basicamente, da sua estabilidade físico-química, capacidade de adsorção de enzima e custo ⁶⁹. Além do tipo de suporte, os principais parâmetros de imobilização que influenciam na quantidade e na atividade da enzima imobilizada são: Temperatura de imobilização, tempo de contato, pH, força iônica e concentração de enzima.

A imobilização por ligação covalente a um suporte consiste na ligação estabelecida entre os grupos funcionais presentes na proteína com atividade enzimática e os grupos funcionais na superfície do suporte. Os suportes normalmente não estão aptos a reagir

diretamente com as enzimas, sendo necessária funcionalização para conferir grupos eletrofilicos capazes de se ligar aos grupos funcionais da proteína. O tipo de funcionalização a ser realizada depende das características do suporte e, principalmente, dos grupos funcionais presentes em sua superfície. A grande vantagem dessa técnica é prevenir a dessorção da enzima através da forte ligação com o suporte. Por outro lado, se a enzima é eventualmente desativada durante a imobilização, o processo é irreversível e tanto a enzima como o suporte tornam-se inutilizáveis ⁶⁶. Por isso, a utilização de grupos ligantes de cadeia longa é preferida, uma vez que a ligação covalente pode promover grande rigidez à enzima, eventualmente desativando-a ⁷⁰. Além disso, é essencial que as ligações não ocorram entre o suporte e os grupos funcionais próximos ao sítio ativo da enzima, o que também acarretaria a sua desativação. O grupo funcional mais visado para funcionalização devido à sua abundância e reatividade em proteínas é o $-NH_2$, tanto N-terminal α -amino como a lisina ϵ -amino. Em particular, a lisina é preferida por não participar da atividade dos sítios ativos e estar disponível na superfície da proteína ⁷¹. A imobilização por ligação covalente é, naturalmente, mais custosa e mais complexa de ser executada que a adsorção, pois requer o uso de agentes ligantes e estudo mais aprofundado sobre as condições de imobilização a serem utilizadas. Consequentemente, a quantidade de materiais funcionalizados disponíveis comercialmente para imobilização covalente é relativamente pequena quando comparada com os materiais adsorventes para enzimas ⁷².

A imobilização por encapsulamento consiste na retenção da enzima em uma matriz polimérica. O aprisionamento da enzima no suporte impossibilita sua dessorção devido ao seu tamanho, porém permite a difusão de pequenas moléculas como reagentes e produtos. Normalmente, o suporte é produzido na presença da enzima em solução. Essa técnica é puramente física e não existe, portanto, ligação entre a enzima e o suporte. Logo, a vantagem da imobilização por encapsulamento é conter a enzima eficientemente presa ao suporte sem haver interações químicas e modificações na estrutura e sítio ativo, evitando a desnaturação. Por outro lado, a principal desvantagem é a limitação da taxa de difusão de reagentes e produtos através da matriz polimérica. Dependendo do material utilizado, pode-se dividir a técnica em encapsulamento em matriz polimérica, em membranas semipermeáveis e micro encapsulamento, ou seja, confinamento das enzimas em microcápsulas.

Enzimas podem ser, também, imobilizadas na ausência de um suporte, através de um método chamado *cross-linking* (ligação cruzada). Esse método consiste na ligação entre

enzimas, mediante o uso de agentes ligantes, formando aglomerados de enzimas. Normalmente os agentes de ligação utilizados são os mesmos que promovem a ligação entre enzima e suporte na imobilização por ligação covalente, como o glutaraldeído, por exemplo ⁶⁶. Devido à sua característica bifuncional, o glutaraldeído é capaz de formar bases de Schiff com os resíduos presentes na enzima contendo aminas, formando uma rede de ligações. Muitos fatores influenciam a atividade e estabilidade das enzimas imobilizadas por este método, como temperatura, pH, força iônica, tipo de ligante, quantidade de ligante e agente precipitante. Embora ocorra desativação das enzimas que permanecem no centro dos aglomerados, é possível obter alta atividade enzimática por peso de biocatalisador, já que não há presença de suporte. Além disso, a ausência de suporte representa também uma redução nos custos de preparação. Por outro lado, apesar de elevada estabilidade em altas temperaturas, os aglomerados enzimáticos possuem baixa resistência mecânica. Outra desvantagem é a difícil reprodutibilidade da técnica ⁷⁰.

A seleção da melhor técnica a ser utilizada depende, basicamente, da enzima a ser imobilizada e da aplicação final. Por isso, não existe uma técnica suficientemente abrangente e que seja considerada a melhor ⁶⁶. A Tabela 4 apresenta um resumo sobre as técnicas de imobilização mais comuns.

Tabela 4 – Principais vantagens e desvantagens das técnicas de imobilização mais comuns ⁷⁰.

Técnica de imobilização	Vantagens	Desvantagens
Encapsulamento	<ul style="list-style-type: none"> • Não há modificação química da enzima • Enzima é capaz de manter atividade nas condições de polimerização do suporte 	<ul style="list-style-type: none"> • Problemas de transferência de massa
Ligação cruzada entre enzimas	<ul style="list-style-type: none"> • Não há necessidade de um suporte • Estabilização das enzimas • Minimização da dessorção de enzimas 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de modificação química da enzima • Procedimento de execução complexa • Problemas de transferência de massa
Adsorção	<ul style="list-style-type: none"> • Não há modificação química da enzima • Fácil execução 	<ul style="list-style-type: none"> • Dessorção das enzimas • Baixa especificidade do método
Interação iônica	<ul style="list-style-type: none"> • Não há modificação química da enzima • Fácil execução 	<ul style="list-style-type: none"> • Dessorção das enzimas • Baixa especificidade do método • Possibilidade de modificações estruturais na enzima
Ligação covalente	<ul style="list-style-type: none"> • Forte ligação entre enzima e suporte • Minimização da dessorção de enzimas • Estabilização das enzimas 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de desativação • Necessidade de ativação do suporte • Processo irreversível, impossibilitando reuso do suporte

2.10 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Diferentes materiais podem ser utilizados como suporte para a imobilização de enzimas. Os suportes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos. Entre os suportes orgânicos estão os polímeros orgânicos sintéticos, como as resinas acrílicas comerciais Amberlit® XAD e Eupergit® C, por exemplo, e os polímeros naturais como a celulose, amido, quitina, ágar, etc. Os suportes inorgânicos incluem argilas, bentonita, areia e suportes sintéticos como sílicas mesoporosas e zeólitas. A seleção do material a ser utilizado como suporte depende, principalmente, da enzima, do método de imobilização e da aplicação final, por isso, não há um suporte perfeito que atenda a todas as necessidades. As principais características do material que devem ser levadas em consideração são a morfologia, composição, presença de íons metálicos, presença de grupos funcionais, resistência mecânica, natureza hidrofóbica e hidrofílica.

Entre os materiais inorgânicos, os mais utilizados em imobilização de enzimas são aqueles com base em sílica ou outros óxidos. A preferência por esses materiais se deve às suas propriedades como a alta resistência térmica e mecânica, propriedade antimicrobiana, rigidez e porosidade. Apesar da possibilidade de obtenção de materiais orgânicos com porosidade controlada, esses apresentam alta sensibilidade à pressão e variações de pH, o que pode acarretar variações de diâmetro e/ou volume de poros. De modo contrário, os materiais inorgânicos garantem uma morfologia constante e são comercialmente disponíveis em diversos tamanhos de partícula e diâmetros de poro. Deve-se levar em consideração o tamanho da enzima a ser imobilizada na seleção da porosidade do suporte. No caso de poros de diâmetro menor que a enzima a ser imobilizada, apenas a superfície externa do suporte torna-se disponível para imobilização. Por outro lado, poros maiores que a enzima, disponibilizam uma área específica maior para imobilização, porém podem acarretar problemas de transferência de massa e impedimento estérico. A difusão do substrato e dos produtos de reação nos poros é dificultada quando comparada com a superfície externa do suporte. Além disso, o entupimento dos poros causado pelo próprio processo de imobilização, muitas vezes devido ao ligante, ou até mesmo impurezas, pode ser uma grande desvantagem da porosidade do suporte ⁷³.

2.11 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO

A terminologia em imobilização de enzimas normalmente gera muita confusão. Existem três termos que são os mais utilizados para se referir ao desempenho do processo de imobilização: rendimento de imobilização, eficiência de imobilização e atividade recuperada.

O rendimento de imobilização se refere à fração de enzimas da solução inicial, ativas ou não, que se mantêm aderidas ao suporte. Em outras palavras, é a quantidade de proteína imobilizada em relação à quantidade de proteína total. Pode ser expresso pela seguinte equação:

$$RI = \frac{P_0 - P}{P_0} \times 100\%$$

Onde P_0 é a concentração inicial de proteínas na solução de enzimas livres utilizada na imobilização e P é a concentração de proteínas no sobrenadante recuperado após a imobilização.

Uma vez que é preciso avaliar a atividade final das enzimas imobilizadas no suporte, ou seja, investigar se houve desnaturação ou desativação durante a imobilização, utiliza-se o termo eficiência de imobilização. Este parâmetro, basicamente, se refere à porcentagem da atividade da enzima ligada ao suporte que é observada e pode ser calculada da seguinte forma:

$$EI = \frac{A_I}{A_L(RI)} \times 100\%$$

Onde A_I é a atividade observada das enzimas imobilizadas, A_L é a atividade da solução de enzimas livres e RI é o rendimento de imobilização. Em teoria pode-se ter um rendimento de imobilização de 100%, mas com uma eficiência de imobilização de 0%, se toda a proteína em solução for imobilizada, porém sem atividade devido à desativação ou inacessibilidade por consequência da imobilização.

O terceiro termo é a atividade recuperada, que expressa o desempenho geral do processo de imobilização. O termo indica quanto da atividade total disponível na solução de enzima livre foi, realmente, retida pelo suporte. Para obter a atividade recuperada, basta multiplicar a eficiência de imobilização pelo rendimento de imobilização:

$$AR = \frac{A_I}{A_L} \times 100\%$$

Muitas vezes os parâmetros de imobilização são, também, expressos na forma:

$$RI = \frac{A_L - A_R}{A_L} \times 100\%$$

$$EI = \frac{A_I}{A_L - A_R} \times 100\%$$

Onde A_R é a atividade residual no sobrenadante após a imobilização.

Muitos trabalhos optam por calcular RI e EI em termos da atividade imobilizada teórica ($A_L - A_R$), ao invés de recorrer aos métodos de quantificação de proteínas. Tais métodos são muito eficientes se corretamente executados, porém podem induzir ao erro no

caso da presença de impurezas ou utilização de padrões que diferem muito das proteínas a serem quantificadas.

A atividade enzimática é expressa em unidades U (μmol de produto formado por minuto). É importante salientar que a atividade enzimática deve ser quantificada por um único método, nas mesmas condições, e com o mesmo substrato, de preferência, o mesmo da aplicação final. Do contrário, os parâmetros de imobilização podem ser calculados de forma errada. Por exemplo, uma enzima imobilizada pode apresentar alta atividade nos testes de imobilização quando um substrato de molécula pequena é utilizado, mas apresentar baixa atividade quando na presença de um substrato de molécula grande, devido a problemas de transferência de massa, etc. ⁶⁶.

2.12 IMOBILIZAÇÃO DE β -GLUCOSIDASE

Poucos estudos foram voltados à imobilização de endoglucanase e exoglucanase, devido ao evidente problema de transferência de massa para converter o substrato, insolúvel, utilizando enzimas também insolubilizadas. Por outro lado, a β -glucosidase é responsável pela hidrólise de substratos solúveis, como a celobiose, que também possui um papel inibidor das demais celulasas. Portanto, a deficiência de atividade β -glucosídica nos coquetéis enzimáticos comerciais e a possibilidade de reciclar essas enzimas para reduzir custos, despertaram o interesse em imobilizar a β -glucosidase. Trabalhos da década de 70 já mostravam o desempenho da β -glucosidase imobilizada em celulose ativada, quitosana e reatores de fibra oca ⁷⁴. A partir disso, uma série de suportes foram testados, incluindo suportes sintéticos e inorgânicos. A Tabela 1 resume alguns dos trabalhos mais importantes sobre a imobilização de β -glucosidase.

Tabela 5 – Resumo dos principais trabalhos sobre imobilização da β -glucosidase.

Referência	Enzima	Suporte	Técnica	Vantagens	Desvantagens
Tu <i>et al.</i> (2006)	β -glucosidase de <i>Aspergillus niger</i>	Eupergit C	Ligação covalente	75% da atividade após 6 ciclos; Aumento da estabilidade a 65 °C	12 % da atividade recuperada; Problemas de transferência de massa
Gómez <i>et al.</i> (2009)	β -glucosidase de amêndoas	SBA-15	Adsorção	Elevada carga de proteína por grama de suporte, 430 mg.g ⁻¹	Problemas de transferência de massa; Dessorção das enzimas
Figueira <i>et al.</i> (2011)	β -glucosidase de <i>Aspergillus sp.</i>	Alginato, Amberlite, Sol-Gel, etc...	Adsorção	80% da atividade recuperada (sol-gel)	Problemas de transferência de massa
Verma <i>et al.</i> (2013)	β -glucosidase de <i>Aspergillus niger</i>	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	Ligação covalente	80% da atividade após 8 ciclos	Alteração do pH ótimo e constantes cinéticas
Borges <i>et al.</i> (2014)	β -glucosidase de <i>Trichoderma reesei</i>	Resina acrílica ativada com grupos carboxílicos e glioxil-agarose	Adsorção / Ligação covalente	Estabilidade a 65 °C 19 vezes maior (glioxil-agarose); Estável após 3 ciclos de hidrólise de bagaço (Resina)	Perda de estabilidade a 65 °C (Resina)
Tan <i>et al.</i> (2015)	β -glucosidase de <i>Aspergillus niger</i>	Kappa carragenana	Ligação covalente	Rendimento de imobilização 93 %	Alteração da temperatura ótima

Tu *et al.* avaliaram o potencial do suporte Eupergit C, um polímero sintético de metacrilamida, e mostraram que a β -glucosidase de *Aspergillus Niger* imobilizada teve uma melhora significativa em sua estabilidade térmica a 65 °C, quando comparada à enzima livre⁷⁵. Além disso, o material mostrou boa reciclabilidade, mantendo 75% da atividade durante 6 ciclos de reação. Contudo, foi constatada uma baixa atividade recuperada, 12 %, e um valor de K_M para a enzima imobilizada 10 vezes maior que para a enzima livre. Os autores atribuem a queda de atividade e afinidade por substrato à desativação causada pela ligação dos grupos

epóxi do Eupergit C aos resíduos próximos ao sítio ativo da enzima, além de problemas de transferência de massa causados pelo suporte.

A sílica mesoporosa SBA-15 foi utilizada como suporte para a β -glucosidase de amêndoas por Gómez *et al.* e testada na hidrólise de 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p-NPG) ⁷⁶. As enzimas foram imobilizadas por adsorção e uma carga elevada de proteína por grama de suporte foi obtida, 430 mg.g⁻¹. Porém, os autores atribuem a queda na atividade enzimática a possíveis mudanças conformacionais na estrutura da enzima causadas pela interação enzima-suporte, além de problemas difusionais. O pH ótimo da enzima imobilizada se manteve igual ao da enzima livre, pH=5,5. Os autores mostraram que esse fato foi, na verdade, devido à dessorção da enzima em valores de pH maiores que o pH de imobilização, pH=3,5.

Figueira *et al.* avaliaram diferentes suportes para imobilização da β -glucosidase de *Aspergillus sp.* através de adsorção e ligação covalente com glutaraldeído ⁵⁴. O melhor suporte foi o sol-gel, que apresentou 80% de atividade recuperada na hidrólise de p-NPG. Foram testados também alginato de cálcio, Eupergit, Amberlite, gelatina e Lentikats. Todos os demais suportes obtiveram atividade recuperada menor que 30 %. O aumento do valor de K_M para as enzimas imobilizadas foi atribuído a problemas difusionais.

No trabalho de Verma *et al.*, β -glucosidase de *Aspergillus Niger* foi imobilizada em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro por ligação covalente utilizando glutaraldeído ⁷⁷. As enzimas suportadas mostraram excelente reciclabilidade, apresentando atividade residual de 80% após 8 ciclos de hidrólise de p-NPG. Os autores indicaram a ocorrência de mudanças conformacionais na estrutura da enzima após imobilização, devido às alterações no pH ótimo e constantes cinéticas.

Borges *et al.* imobilizaram β -glucosidase de *Trichoderma reesei* por adsorção em resina acrílica ativada com grupos carboxílicos e por ligação covalente em glioxil-agarose ⁷⁸. A estabilidade térmica a 65 °C da enzima imobilizada em glioxil-agarose foi 19 vezes maior que para a enzima livre, segundo os autores. Por outro lado, a enzima imobilizada na resina acrílica desnaturou mais rapidamente a 65 °C que a enzima livre, mas apresentou boa reciclabilidade na suplementação de celulasas durante a hidrólise de bagaço de cana, permanecendo estável até o terceiro ciclo de reação.

Entre os suportes poliméricos naturais mais utilizados para encapsulamento de enzimas está a kappa carragenana, um polissacarídeo encontrado em macroalgas vermelhas. Apesar de seu baixo custo, a kappa carragenana é pouco eficiente para imobilizar enzimas se um agente de ligação cruzada não for utilizado. Tan *et al.* avaliaram o aprisionamento de β -glucosidase de *Aspergillus niger* em kappa carragenana funcionalizada com polietilenoimina (PEI) e glutaraldeído visando a aumentar a eficiência de imobilização⁵⁰. Uma otimização do processo de imobilização demonstrou que, ao aumentar a concentração de PEI de 0% até 2%, o rendimento da imobilização aumentou de 38,7% para 92,8%. Os autores explicam que, com o aumento do número de grupos amino no suporte, o número de grupos aldeídicos disponíveis para ligação também aumenta e, com isso, maior é a quantidade de enzimas que serão ligadas ao glutaraldeído na superfície do suporte. Foi também relatado que a enzima imobilizada apresentou atividade máxima em uma faixa mais ampla de pH se comparada com a enzima livre. No caso do perfil de temperatura ótima, a enzima imobilizada se mostrou mais ativa a 60 °C, enquanto para a enzima livre esse valor foi de 50 °C.

2.13 GLICOSE OXIDASE

A enzima glicose oxidase (EC 1.1.3.4.) é uma oxido-redutase de massa molar 160 kDa, capaz de catalisar a oxidação de glicose a glucono-lactona, que é rapidamente hidrolisada a ácido glucônico, utilizando oxigênio molecular como acceptor de elétrons e produzindo, simultaneamente, peróxido de hidrogênio como coproduto⁷⁹. A reação está esquematizada na Figura 13. É produzida a partir de linhagens de fungos filamentosos, principalmente *Aspergillus* e *Penicillium*^{80, 81}. Possui diversas aplicações na indústria, principalmente na remoção de glicose em alimentos para melhoria de sabor, coloração e tempo de prateleira. É também utilizada na remoção de oxigênio em bebidas embaladas e enlatadas para prevenir oxidação. Além disso, a glicose oxidase é muito conhecida por suas aplicações como biossensor para determinação analítica de glicose tanto em ambiente laboratorial como industrial. Essa enzima está presente em kits espectrofotométricos comerciais para quantificar glicose, no sangue e urina por exemplo, e em consórcio com a enzima catalase⁸². Esta última funciona como catalisador na decomposição do peróxido de hidrogênio formado na oxidação, uma vez que esse coproduto é inibidor da glicose oxidase, o que reduz drasticamente a conversão máxima em ácido glucônico⁸³.

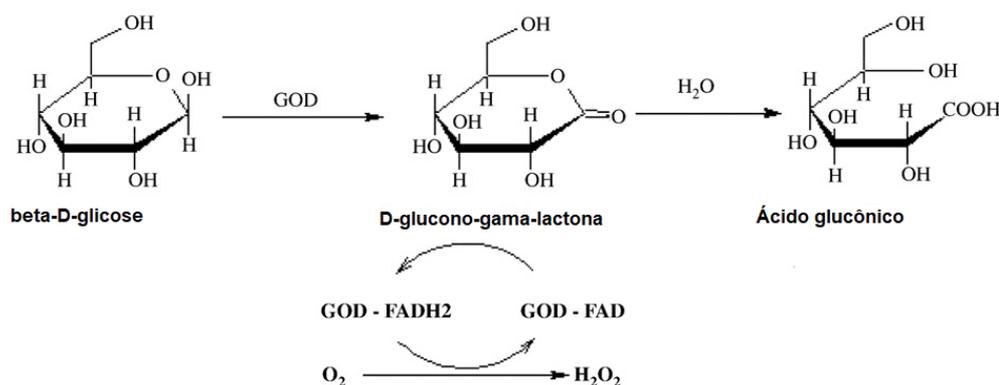


Figura 13 - Oxidação de glicose a ácido glucônico ⁸⁴.

O trabalho de Taketoshi *et al.* mostra como a inibição por peróxido de hidrogênio pode ser controlada e a conversão da reação aumentada através da utilização de catalisadores com base em ouro ¹. Foram utilizadas nanopartículas de ouro suportadas em diferentes materiais incluindo diversos óxidos metálicos e carvões. O aumento da conversão em 1 hora de reação, na presença dos catalisadores metálicos, foi correlacionado com a decomposição do peróxido de hidrogênio. Para isso, os catalisadores foram testados em solução 0,3 % de peróxido de hidrogênio e a vazão de oxigênio formado foi medida por um bolhômetro. Foi observado que, para a maior conversão obtida (98% ±2), utilizando ouro suportado em zircônia), maior foi a vazão de oxigênio no teste de decomposição de peróxido de hidrogênio (0,13 mL.min⁻¹). A conversão da oxidação de glicose na ausência de catalisador metálico foi 90% ±3.

Enzimas podem ser empregadas em um consórcio enzimático para realizar reações em cascata ou *one-pot*. Com o intuito de melhorar a reciclabilidade e estabilidade do biocatalisador, diferentes enzimas podem ser ligadas ao mesmo suporte para imitar sistemas multi-enzimáticos presentes nos sistemas celulares ⁸⁵. No trabalho de Zhao *et al.*, glicose oxidase e glucoamilase foram co-imobilizadas em óxido de grafeno quimicamente reduzido (CRGO) para produzir ácido glucônico a partir de amido em uma reação *one-pot* ⁸⁶. Os autores optaram por reduzir o suporte de óxido de grafeno utilizando ácido ascórbico para remoção dos grupos funcionais superficiais, de modo que a imobilização ocorresse apenas por adsorção, e não por ligações covalentes, uma vez que tais ligações modificariam a estrutura enzimática e a atividade seria prejudicada, como mostrado em trabalhos anteriores ⁸⁷⁻⁸⁹. Com esse sistema multi-enzimático foi obtido rendimento de 82% em ácido glucônico em apenas 2

horas. Além disso, o biocatalisador apresentou boa estabilidade, preservando em torno de 85% de sua atividade ao final de quatro ciclos de reciclo.

Outro trabalho mostrando um sistema multi-enzimático, não imobilizado, apresentado por Mafra *et al.*, utilizou as enzimas invertase, glicose oxidase e catalase em um reator aerado tipo *airlift* para produzir ácido glucônico a partir de sacarose em reação *one-pot*⁹⁰. A produção eficiente de ácido glucônico é altamente dependente da concentração de oxigênio no reator, por isso, a transferência de oxigênio para o meio reacional é crucial para atingir altos rendimentos. Os reatores *airlift* garantem altas taxas de solubilização do oxigênio com consumo de energia relativamente baixo. Os autores relataram uma concentração final de ácido glucônico de 28,6 g.L⁻¹ a 40 °C e pH 6, para uma concentração inicial de 50 g.L⁻¹ de sacarose.

2.14 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Ácidos orgânicos são de suma importância nas Indústrias Química, Farmacêutica e de Alimentos, principalmente pelo seu emprego como *building blocks*, compostos que apresentam uma ampla aplicação industrial, a partir dos quais se obtém uma série de subprodutos, os quais constituem a base para o fornecimento de uma série de substâncias intermediárias e produtos finais, importantes na Indústria Química⁵.

Os ácidos orgânicos também possuem grande utilidade como aditivos. Na indústria de alimentos, por exemplo, os ácidos orgânicos são muito utilizados como conservantes, devido às suas propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas. Como antioxidantes, atuam como sequestrantes de íons metálicos através do íon carboxila, evitando a catálise de reações de oxidação nos alimentos. Além disso, esses ácidos também são importantes aditivos reguladores de pH, devido à sua capacidade de gerar tampões. Também são utilizados como acidulantes para realçar ou melhorar sabores em produtos como: bebidas gasosas, sorvetes, balas, gelatinas, coberturas e doces em geral⁹¹.

Em sua comercialização e utilização na indústria, os ácidos orgânicos são empregados tanto na sua forma pura como sob a forma de seus sais derivados. Sais de ácidos considerados

biocompatíveis, por exemplo, podem ser usados como suplementos alimentares no tratamento da carência de cofatores, como o ferro no caso de anemia ⁹².

2.15 ÁCIDO GLUCÔNICO

O ácido glucônico (glicônico ou pentahidroxicapróico) é um ácido orgânico de fórmula $C_6H_{12}O_7$ e é o mais comum dos 16 estereoisômeros do ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxihexanóico. Sua estrutura molecular está ilustrada na Figura 14. O ácido glucônico existe em equilíbrio com o íon gluconato e com o éster cíclico glucono-delta-lactona em soluções aquosas de pH neutro. O ácido glucônico, bem como seus sais e ésteres, são encontrados com frequência na natureza pois são decorrentes da oxidação da glicose. O ácido glucônico ocorre naturalmente em frutas, mel e vinho. Em 1929, Horace Terhune Herrick desenvolveu o primeiro processo de produção do sal de gluconato por fermentação.

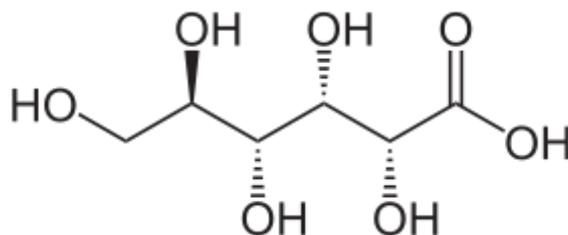


Figura 14 - Ácido glucônico.

Entre as aplicações do ácido glucônico, as mais importantes estão na Indústria de Alimentos e até mesmo na medicina. Alguns medicamentos são injetados na forma de gluconatos, devido à biocompatibilidade dos sais de ácido glucônico. Gluconato de cálcio, na forma de gel, é usado para tratar queimaduras de ácido fluorídrico. Gluconato de quinino é um sal utilizado no tratamento de malária por injeção intramuscular. Injeções de gluconato de zinco são utilizadas na castração de animais. No passado, foi proposto a injeção de gluconato de ferro no tratamento de anemia.

Na Indústria de Alimentos, é usado como regulador de acidez em alimentos (E574) e nas formas gluconato de sódio (E576), gluconato de potássio (E577), gluconato de cálcio (E578) e gluconato de ferro (E579) ^{93,94}. É também muito utilizado em produtos de limpeza como agente quelante. O anion gluconato é capaz de quelar Ca^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} e outros metais.

Naturalmente, o ácido glucônico é formado pela oxidação da glicose com o auxílio da enzima glicose oxidase. Na primeira etapa, a oxidação do grupo aldeído no carbono C1 da glicose leva à formação de uma carboxila, resultando na produção da glucono- δ -lactona e peróxido de hidrogênio. Posteriormente, a hidrólise espontânea da glucono- δ -lactona leva ao ácido glucônico. O peróxido de hidrogênio formado é decomposto pela enzima catalase para formar água e oxigênio. A via bioquímica do gluconato é mostrada na Figura 15. O processo de produção mais comum é a fermentação a partir de *Aspergillus niger*, um fungo, porém a rota química também é possível. Outra possibilidade é a produção de ácido glucônico a partir das enzimas extraídas de *Aspergillus niger*. Nessa rota, o meio não contém células e, por isso, possui a grande vantagem de redução de custos nos processos de separação, principalmente se as enzimas forem imobilizadas. Essa tecnologia ainda não é comum na indústria ⁹².

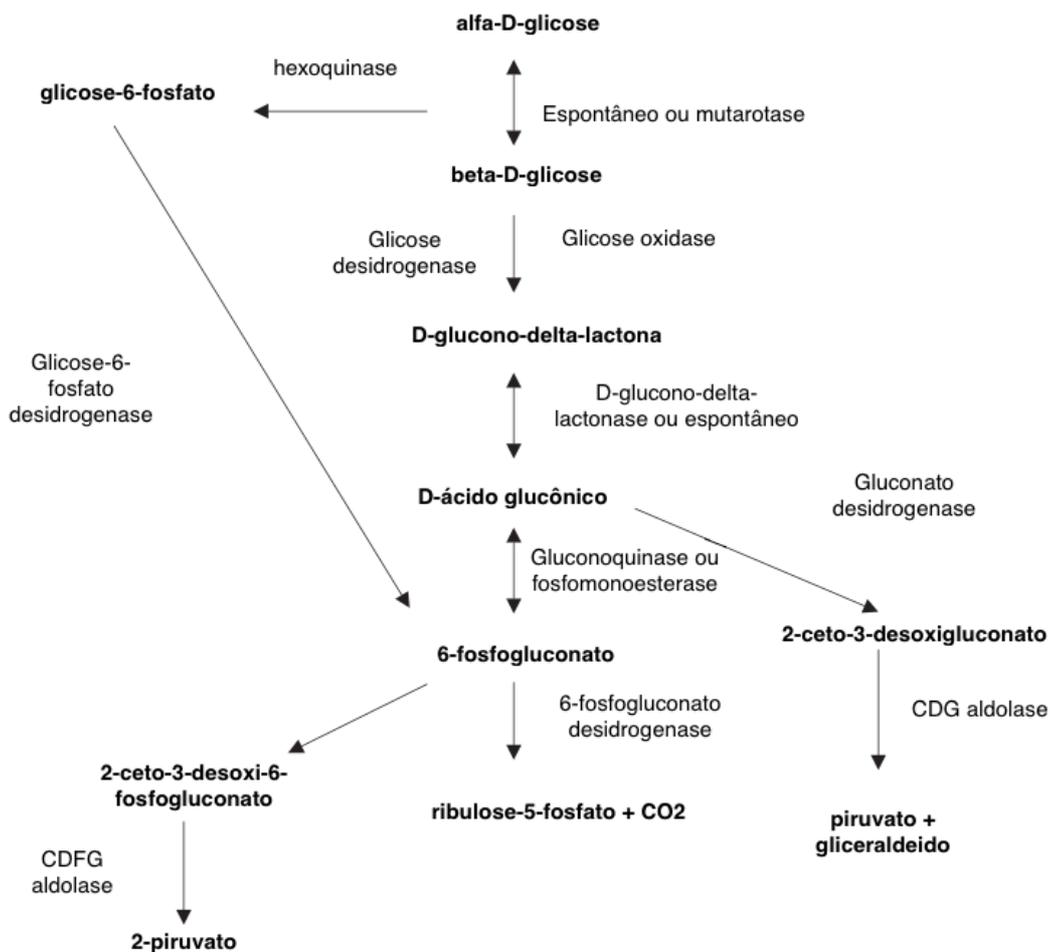


Figura 15 - Via bioquímica do gluconato ⁹².

O ácido glucônico foi descoberto por Hlasiwetz e Habermann em 1870. Posteriormente, Molliard detectou o ácido glucônico em culturas de *Aspergillus niger*.

Estudos de Bernhauer mostraram que *Aspergillus niger* produzia ácido glucônico com alto rendimento se esse fosse neutralizado com carbonato de cálcio e que sua produção era altamente dependente do pH. Apesar disso, foi descoberto que através de culturas de *Penicillium sp.* a dependência do pH não era tão crítica. Utilizando *Penicillium luteum* e *A. niger*, Currie *et al.* ⁹⁵ depositaram uma patente aplicando culturas submersas, com rendimentos em ácido glucônico de até 90% em 48-60 horas. Mais tarde, Moyer *et al.* ⁹⁶ usaram *A. niger* em uma planta piloto e conseguiram produzir 95% do rendimento teórico em solução de glicose de 150 a 200 g.L⁻¹, em 24 horas.

Porges *et al.* ⁹⁷ descobriram que o processo poderia ocorrer de forma semicontínua, com reuso do micélio por 9 vezes repetidamente, no qual o inóculo seria recuperado por filtração ou centrifugação. As descobertas de Moyer *et al.* mostraram que a eficiência de mais de 95% poderia ser atingida pela adição de glicose a 250 g.L⁻¹ e compostos de boro (1% na solução de glicose) em etapas posteriores do crescimento do fungo com reuso do micélio em ciclos de 24 horas cada. ⁹⁸

Atualmente, a produção de gluconato de sódio utiliza fermentação submersa com *Aspergillus niger* e é baseada no processo modificado desenvolvido por Blom *et al.* ⁹⁹. O processo consiste de um cultivo em batelada com alimentações de glicose intermitentes e utiliza hidróxido de sódio como agente neutralizante. O pH é mantido em 6.0-6.5 e a temperatura em torno de 34°C. A produtividade desse processo é muito alta, pois a glicose é convertida em uma taxa de 15 g.L⁻¹.h⁻¹.

O ácido glucônico é inodoro, não-corrosivo, não-volátil e não-tóxico. Ele confere um refrescante sabor azedo aos alimentos como vinho e sucos de fruta. O gluconato de sódio possui um alto poder sequestrante. É um bom quelante em pH alcalino. Sua ação é comparativamente melhor que a EDTA, NTA e outros quelantes. Soluções aquosas de gluconato de sódio são resistentes à oxidação e redução em altas temperaturas. É um eficiente plastificante e retardante de sedimentação. É facilmente biodegradável (98% em 48 horas). Tem uma propriedade especial de inibir o amargor de alimentos. Soluções concentradas de ácido glucônico contêm lactonas na forma do éster cíclico, o que confere propriedades antissépticas. ⁹²

O órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) determinou que o gluconato de sódio faz parte da lista GRAS (*generally recognized as safe*) e por isso seu uso em

alimentos é permitido sem restrições. O ácido glucônico é encontrado em abundância em plantas, frutas e em alimentos como arroz, carne, laticínios, vinho (até 0,25%), mel (até 1%) e vinagre.⁹²

Além de ser um constituinte natural em sucos de fruta e mel, o ácido glucônico também é usado na produção de conservas. Seu éster correspondente, a glucono- δ -lactona, confere um sabor doce que se torna levemente ácido. É usado em carnes e laticínios, particularmente em produtos de panificação, como agente de fermentação em produtos pré-fermentados. É usado como agente flavorizante (em sorvetes por exemplo) e também tem aplicação na redução da absorção de gorduras em alimentos como “donuts”. Entre os alimentos que contêm glucono-d-lactona estão iogurtes, queijo cottage, pães, doces de confeitaria e carnes.⁹²

O ácido glucônico é utilizado como suplemento mineral para prevenir a deficiência de cálcio, ferro, etc. e como sal de tampão. Diferentes sais de ácido glucônico possuem diversas aplicações de acordo com suas propriedades. O gluconato de sódio, por exemplo, é um bom agente quelante de cálcio e outros íons metálicos divalentes ou trivalentes. É utilizado na lavagem de garrafas, prevenindo a formação de incrustações e as removendo da superfície do vidro. Também é indicado na remoção de depósitos de calcário de superfícies metálicas e na remoção de restos de leite e cerveja em ferro galvanizado ou aço inox. Sua capacidade de sequestrar íons de ferro em uma larga faixa de pH é bastante explorada na indústria têxtil, onde ajuda a prevenir depósitos de ferro e a desengomar tecidos de poliéster e poliamida. É utilizado na metalurgia para decapagem alcalina e na lavagem de superfícies pintadas para a remoção de carbonatos metálicos precipitados, sem causar corrosão. Tem aplicações como aditivo para cimento, controlando o tempo de sedimentação e aumentando a força e resistência à água. Participa na fabricação de concreto resistente a geadas e fissuras. Muito utilizado também em produtos de limpeza domésticos e soluções de bochecho para a higiene bucal⁹².

Gluconato de cálcio é utilizado na indústria farmacêutica como fonte de cálcio no tratamento de deficiência de cálcio por administração oral ou intravenosa. Também é encontrado na alimentação animal. Gluconato de ferro e fosfogluconato de ferro são usados em terapias como fonte de ferro. Gluconato de zinco é utilizado como ingrediente no tratamento de constipação, cicatrização de feridas e vários problemas causados por deficiência

de zinco como maturação sexual retardada, letargia mental, alterações da pele e suscetibilidade a infecções ⁹².

2.16 SORBITOL

O sorbitol é um álcool de açúcar amplamente utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Uma de suas principais aplicações é como adoçante de baixa caloria, mas também é bastante utilizado como intermediário na produção de fármacos e surfactantes ¹⁰⁰. Outra importante aplicação do sorbitol é como agente emulsificante. Além disso, o sorbitol é precursor da isosorbida, um importante monômero para fabricação de plásticos. Atualmente, o sorbitol é produzido pela hidrogenação de glicose (Figura 16) proveniente da hidrólise enzimática de amido. Normalmente, as condições reacionais da etapa de hidrogenação são severas, operando a temperaturas entre 100 e 150 °C e pressões de 50 bar. O catalisador mais utilizado na hidrogenação de glicose é o Níquel Raney, porém novos catalisadores com base em Rutênio têm sido propostos devido à sua menor toxicidade.

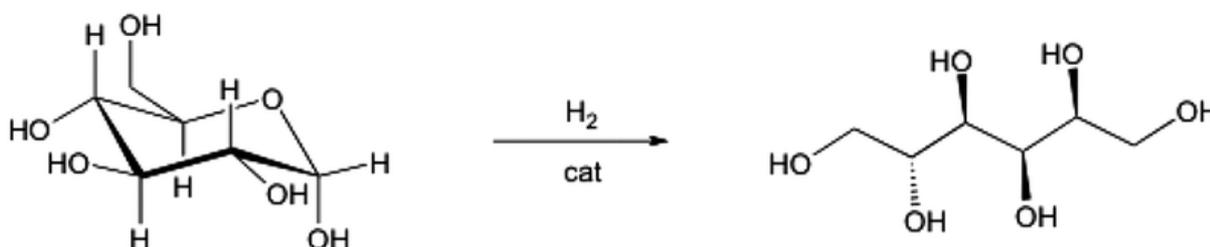


Figura 16 – Hidrogenação de glicose a sorbitol ¹⁰¹

2.17 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Após uma revisão na literatura, é claramente observada a ausência de estudos aprofundados de como a morfologia do suporte utilizado para imobilização de β -glucosidase exerce influência sobre a atividade recuperada. Além disso, nenhum trabalho utilizando nano zeólitas como suporte para a β -glucosidase foi encontrado na literatura.

Em relação às reações combinadas com hidrólise enzimática, são encontrados muitos trabalhos empregando amilases em consórcio com outras enzimas e, até mesmo, catalisadores metálicos. Porém, é escasso o número de trabalhos que utilizam β -glucosidase em reações combinadas, seja em sistemas multienzimáticos ou em reações enzimáticas assistidas por catalisadores metálicos. É com este norte que pretende-se contribuir par o conhecimento integrado de reações enzimáticas e químicas, sistemas que vem sendo denominados de *one-pot*.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propõe preencher as lacunas encontradas na literatura ao estudar detalhadamente a imobilização de β -glucosidase em diferentes materiais ressaltando como as características de cada material influenciam na atividade enzimática. Além disso, serão estudadas reações combinadas empregando β -glucosidase e avaliada a possibilidade de obtenção de produtos de interesse econômico. Para isto, objetivar-se-á investigar reações enzimáticas combinadas com β -glucosidase e glicose oxidase bem como com beta-glucosidase e catalisador de rutênio suportado em carvão.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a influência das variáveis na imobilização de β -glucosidase por ligação covalente.
- Avaliar o desempenho de diferentes suportes na imobilização de β -glucosidase.
- Caracterizar a enzima imobilizada nos melhores suportes quanto aos parâmetros cinéticos, pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e reciclabilidade.
- Verificar a influência dos catalisadores de ouro suportado no rendimento da oxidação enzimática de glicose.
- Avaliar a viabilidade de se produzir ácido glucônico a partir da hidrólise enzimática de celobiose combinada com oxidação enzimática de glicose no mesmo meio reacional, identificando os limitantes do processo.
- Avaliar a viabilidade de se produzir sorbitol a partir da hidrólise enzimática de celobiose combinada com hidrogenação catalítica de glicose no mesmo meio reacional, identificando os limitantes do processo.

3.3 JUSTIFICATIVA

Muitos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de imobilizar β -glucosidase em diferentes suportes objetivando o reciclo e a melhoria da estabilidade da enzima. Entretanto, a maioria desses trabalhos reportou problemas de transferência de massa devido, principalmente, à porosidade do suporte. Apesar da imobilização de enzimas em poros possuir grandes vantagens, como maior área disponível para imobilização, nenhum estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar até que ponto os problemas difusionais poderiam levar à escolha de suportes onde apenas a área externa estivesse disponível para imobilização. Por isso, o presente trabalho propôs imobilizar β -glucosidase em suportes com diferentes características e avaliar qual seria o suporte ideal para imobilização da enzima, principalmente no que diz respeito à acessibilidade do substrato. Além disso, o trabalho visa a preencher as lacunas na literatura a respeito das reações combinadas utilizando β -glucosidase.

O tema do presente trabalho está inserido no contexto de biorrefinaria e uso de matérias-primas renováveis, principalmente biomassa residual, de forma a contribuir para o desenvolvimento de tecnologias relacionadas à hidrólise enzimática de celulose oriunda de biomassa lignocelulósica. Além disso, o trabalho preza pelos princípios da química verde: realizando reações enzimáticas e, por isso, possibilitando operação em condições brandas de temperatura e pressão; visando à conversão de matéria-prima renovável; utilizando catalisadores; e reduzindo etapas de processo, mediante reações combinadas e da recuperação de enzimas.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Tetraetil ortossilicato (TEOS) (98%), hidróxido de tetrapropilamônio (TPAOH) (20%), 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) (99%), isopropóxido de alumínio (99%), hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH) (25%), tolueno anidro (99,8%), etanol absoluto, brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) (99%), solução aquosa de amônia 24% em massa, copolímero Pluronic® 123, solução de glutaraldeído (25%), β -glucosidase de amêndoas (3,4 U.mg⁻¹), ácido D-glucônico (>99%), glicose oxidase de *Aspergillus niger* (138370 U.g⁻¹), D-glicose, D-sorbitol (99%), rutênio em carvão (5% em peso), sorbitol, celobitol e celobiose foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Zeólita NaY (CBV® 100) foi adquirida da Zeolyst.

Nanopartículas de ouro suportadas em alumina, Au/Al₂O₃ (0,9% AUEOLit®), foram adquiridas da AuTEK.

4.2 SÍNTESE DOS SUPORTES E FUNCIONALIZAÇÃO COM APTES

4.2.1 Síntese da nanosilicalita

A nanosilicalita foi preparada de acordo com o método descrito por Davis, T.M. *et al.*¹⁰². Tipicamente, 14 g de TPAOH 20% em água foram adicionados a 7,8 g de TEOS. A mistura foi, então, colocada sob agitação magnética em um becker, por 24 horas, em temperatura ambiente, como etapa de envelhecimento. A composição molar foi: 2,68 SiO₂: 1 TPAOH: 168 H₂O. Para a etapa de cristalização, a mistura foi transferida para um vaso de pressão selado revestido com Teflon e aquecido em um forno convencional por 24 horas a 100 °C. O produto foi recuperado por centrifugação a 19 000 xg por 1 hora e lavado com água

deionizada. Esse procedimento foi repetido até que a solução de lavagem atingisse pH 7. O material foi, então, transferido para forno de secagem a 80 °C durante a noite.

4.2.2 Síntese da sílica mesoporosa

A SBA-15 foi sintetizada segundo Zhao *et al.*¹⁰³. Inicialmente, foram dissolvidos 2 g do copolímero em bloco Pluronic P123 em uma mistura de água destilada (15 mL) e ácido clorídrico 2M (60 mL). A essa solução foram adicionados 4,25 g de TEOS, sendo então colocada sob agitação a 80 °C por 48 horas. Em seguida, o material foi filtrado e colocado para secagem a vácuo em temperatura ambiente durante a noite. Ao final, o material foi calcinado a 550 °C por 6 horas.

4.2.3 Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNS)

A síntese das MSNS foi realizada seguindo o procedimento descrito por Sponchia *et al.*¹⁰⁴. Primeiramente, 145,2 mL de H₂O ultrapura, 22,8 mL de etanol absoluto e 5,73 g de CTAB foram misturados e agitados a uma temperatura de 60 °C. Depois de observada a completa dissolução do CTAB, foi adicionado, gota a gota, 1,25 mL de uma solução de amônia. Decorridos 30 minutos, foram adicionados, lentamente, 14,6 mL de TEOS sob agitação constante e, após 2h, a solução se tornou uma suspensão branca. Essa suspensão foi resfriada até temperatura ambiente e o produto sólido foi recuperado e lavado em cinco ciclos de centrifugação de 30 minutos a 9 000 xg. As primeiras 4 lavagens foram realizadas utilizando água e a última com etanol absoluto. Ao final, o produto foi seco a 100 °C durante a noite e calcinado por 6 horas a 550 °C, de maneira a remover o *template* orgânico.

4.2.4 Síntese da nanozeólita Y

A NanoY foi sintetizada seguindo a composição molar de 0,048 Na₂O: 4,35 SiO₂: 1 Al₂O₃: 2,4 TMA₂O: 249 H₂O. De início, foram misturadas uma solução 1M de NaOH com a quantidade adequada de TMAOH 25% em um bécher sob agitação. A essa mistura, foi adicionada uma solução de isopropóxido de alumínio, aumentando a agitação e aguardando que a mistura retornasse à transparência. Em seguida, a solução de TEOS foi adicionada sob agitação magnética, gota a gota. Após a adição completa de TEOS, foi mantida agitação

constante por 72 horas para o envelhecimento. Posteriormente, a mistura foi transferida para um reator agitado a 300 min^{-1} para cristalização por 144 horas a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente, o material foi recuperado por centrifugação a $10\ 000 \text{ xg}$, lavado com água deionizada e centrifugado novamente. O procedimento foi repetido até que o pH da água de lavagem atingisse valor próximo de 7. O material centrifugado foi armazenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para, posteriormente, ser liofilizado.

4.2.5 Caracterização dos suportes

As análises de difração de raios X (DRX) foram realizadas em um difratômetro PANalytical X'Pert Pro HTS, pelo método do pó, com radiação $\text{Cu K}\alpha$ e 2θ na faixa de 5° a 90° .

As microscopias de transmissão eletrônica (TEM) foram feitas em microscópio JEOL JEM 2100 LaB6 com voltagem de aceleração 200 kV . As amostras foram previamente suspensas em metanol e colocadas em banho ultrassônico para, então, serem suportadas em grade de filme fino de carbono em ouro (mesh 300). A distribuição de tamanhos de partícula foi determinada a partir da contagem de 200 partículas advindas de diferentes imagens.

A distribuição de tamanhos de partícula foi também determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90, fabricado pela Malvern. O gráfico de distribuição de tamanhos, tamanho médio e desvio padrão foram gerados automaticamente por *software* próprio da Malvern.

4.2.6 Funcionalização com APTES

Para introduzir os grupos amino no suporte, o material (2 g) foi colocado em refluxo em 100 mL de uma solução $1\% \text{ v/v}$ APTES em tolueno seco por 3 horas. O material foi, então, centrifugado em tubos TFE/PTFE Nalgene® resistentes a tolueno em uma rotação de $20\ 000 \text{ x g}$ por 30 minutos e lavado 3 vezes com tolueno. Em seguida, o suporte foi transferido para secagem em um evaporador Genevac EZ-2 Plus e armazenado em atmosfera inerte.

4.3 VARREDURA DE CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO

4.3.1 Influência das variáveis na funcionalização com glutaraldeído

Com a intenção de verificar a influência das variáveis pH, tempo de contato e concentração de glutaraldeído na etapa de funcionalização do suporte, foi realizado um planejamento experimental do tipo composto central, consistindo em um planejamento fatorial completo com 2 níveis com a adição de 6 pontos axiais e 3 réplicas no ponto central, totalizando 17 experimentos. A variável resposta avaliada foi a atividade enzimática na hidrólise de celobiose. O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o software Statistica 6.0 da Statsoft.

Uma quantidade fixa de nanosilicalita funcionalizada com APTES (40 mg) foi colocada em cada um dos 17 tubos. Foram adicionados 5 mL de uma solução de glutaraldeído, de 0,000125% v/v a 8% v/v, preparada em diferentes soluções tampão, pH de 6 a 10. Os tampões utilizados para obter pH de 6 a 8 e 9 a 10 foram, respectivamente, tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ e tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$. Os tubos foram incubados sob agitação constante (400 min^{-1}) em um incubador New Brunswick™ Innova® 42, de 4 a 8,5 horas. Posteriormente, o material foi recuperado por centrifugação a $4.000 \times g$ por 5 minutos e lavado diversas vezes com água deionizada. Finalmente, o suporte funcionalizado foi armazenado em solução tampão acetato de sódio, pH 5, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

A etapa subsequente, de imobilização da β -glucosidase, foi realizada nas mesmas condições para todos os experimentos do planejamento. A quantidade de enzima adicionada e o tempo de contato nessa etapa foram suficientes para garantir a saturação do suporte, de modo a não interferir no modelo. A cada tubo, foram adicionados 5 mL de uma solução $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de β -glucosidase em tampão acetato de sódio, pH 5. Os tubos foram incubados sob agitação constante (400 min^{-1}) em um incubador New Brunswick™ Innova® 42 por 24 horas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, o material foi centrifugado a $4.000 \times g$ e lavado diversas vezes com solução tampão pH 5, até que a concentração total de proteínas, de acordo com o método

BCA, fosse inferior a 1% da solução original. Finalmente, a enzima imobilizada foi armazenada em tampão, pH 5, a 4 °C.

A concentração de proteínas foi determinada a partir do método com ácido bicinonínico, utilizando como referência curva de calibração preparada com padrão de albumina de soro bovino (BSA), cuja equação é $y = -4E-07x^2 + 0,0019x + 0,034$ e o coeficiente de determinação $R^2 = 0,999$.

Os testes de hidrólise foram realizados suspendendo as enzimas imobilizadas em solução tampão contendo 25 g.L⁻¹ de celobiose. A reação foi realizada a 50 °C no incubador New Brunswick™ Innova® 42, em uma rotação de 400 min⁻¹, para evitar qualquer limitação difusional durante a hidrólise. A glicose formada foi quantificada por HPLC acoplado com detector DAD, RID e coluna Aminex-HPX-87H. O eluente utilizado foi H₂SO₄ (25 mmol.L⁻¹). O resultado foi representado em termos da atividade enzimática U, ou seja, μmols de produto por minuto.

4.3.2 Concentração de proteína

Em uma próxima etapa, as condições consideradas ótimas anteriormente foram utilizadas para estudar o efeito da concentração de proteína na funcionalização. Levando em consideração a solubilidade da β-glucosidase, 2,0 mg.mL⁻¹, as concentrações escolhidas para estudo foram: 0,1 mg.mL⁻¹; 0,2 mg.mL⁻¹; 0,4 mg.mL⁻¹; 0,8 mg.mL⁻¹; 1,6 mg.mL⁻¹.

O procedimento para imobilização foi similar ao relatado anteriormente, variando-se apenas a concentração de enzima. Os tubos, com volume total de 5 mL, foram incubados por 24 horas e o material foi lavado e centrifugado posteriormente.

Os testes de hidrólise foram realizados em uma solução 25 g.L⁻¹ de celobiose como substrato. A reação foi realizada a 50 °C a uma rotação de 400 min⁻¹. A glicose formada foi quantificada por HPLC.

4.3.3 Avaliação dos suportes

Avaliadas as condições de funcionalização e imobilização, foram, em seguida, avaliados diferentes materiais quanto ao desempenho como suporte para a β -glucosidase nas reações de hidrólise. Os materiais testados foram: nanosilicalita, nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNS), SBA-15, zeólita NaY e zeólita nano Y.

Os materiais testados foram previamente funcionalizados com APTES, seguindo a metodologia explicitada anteriormente. A seguir, a mesma massa de suporte (40 mg) foi funcionalizada com glutaraldeído e usada para imobilização da β -glucosidase a partir das condições otimizadas no procedimento anterior. Finalmente, o desempenho dos materiais foi testado em hidrólise padrão de uma solução 25 g.L⁻¹ de celobiose como substrato. A atividade recuperada foi calculada, comparando-a com a atividade das enzimas livres usadas na imobilização.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

Os suportes que apresentaram o melhor desempenho nos testes de hidrólise foram caracterizados em relação à faixa operacional de pH e temperatura, bem como aos testes de reciclo e estabilidade térmica.

O efeito do pH na atividade da β -glucosidase foi investigado no intervalo de 3 – 8, tanto para a enzima imobilizada quanto para a enzima livre, a uma temperatura fixa de 50 °C. De maneira similar, o efeito da temperatura de hidrólise na atividade enzimática foi estudado em uma faixa de 30 – 80 °C, em um valor de pH fixo e igual a 5. Os experimentos de hidrólise foram realizados durante 30 minutos e a atividade foi calculada com base na formação de glicose. A concentração final de glicose foi medida em HPLC.

Para os testes de estabilidade térmica, as enzimas, livre e imobilizada, foram incubadas a 80 e 65 °C e amostras foram coletadas em diferentes tempos. As amostras foram, então, submetidas ao teste de hidrólise nas mesmas condições supracitadas.

Os testes de reciclo foram realizados centrifugando a enzima imobilizada ao final de cada reação de hidrólise. Essa foi lavada 3 vezes com tampão acetato, pH 5, antes do reuso. Cada hidrólise teve duração de 18 horas, o que corresponderia ao tempo necessário para que fosse atingido 100% do rendimento em glicose.

4.4.1 Cálculo dos parâmetros cinéticos e de imobilização

O rendimento da imobilização (*RI*) foi calculado da seguinte forma:

$$RI = \frac{P_0 - P}{P_0} \times 100\%$$

Onde P_0 é a concentração total de proteína na solução inicial de enzima usada na imobilização e P é a concentração total de proteína no sobrenadante recuperado após a imobilização.

A atividade recuperada (*AR*) foi calculada pela fórmula:

$$AR = \frac{A_I}{A_L} \times 100\%$$

Onde A_I é a atividade da enzima imobilizada e A_L é a atividade da enzima livre da solução inicial usada na imobilização. A atividade foi mensurada colocando-se a mesma massa de proteína, imobilizada e livre, em tubos distintos e realizando hidrólise de uma solução 25 g.L⁻¹ de celobiose por 30 minutos a 50 °C e pH 5. A atividade medida foi a taxa de formação de glicose em μmol.min⁻¹.

O efeito da concentração de substrato na atividade da β -glucosidase, livre e imobilizada, foi avaliado em diferentes concentrações de celobiose. Os testes foram realizados a 50 °C e pH 5. A constante de Michaelis-Menten (K_M) e a taxa máxima de reação (V_{MAX}) foram determinados pela linearização de Lineweaver-Burk, vide a equação:

$$V = \frac{V_{MAX}[S]}{K_M + [S]} \rightarrow \frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}}$$

4.5 OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE ASSISTIDA POR NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.5.1 Síntese das nanopartículas de ouro suportadas em sílica mesoporosa (SBA-15)

Primeiramente, 2 g de SBA-15, sintetizada de acordo com o método descrito na seção 3.2, foram previamente funcionalizados com APTES seguindo o procedimento citado anteriormente. Para introduzir o precursor nos mesoporos, de acordo com Lee *et al.*¹⁰⁵, 0,1 g de SBA-15 funcionalizada e 10 mL de cloreto de ouro (III) tri hidratado 10^{-4} M em água foram misturados e sonificados por 30 minutos. O material foi, então, filtrado e colocado para secagem sob vácuo em temperatura ambiente durante a noite. Finalmente, o material foi calcinado a 200 °C por 1 hora com rampa de aquecimento de 1 °C.min⁻¹.

4.5.2 Avaliação das nanopartículas de ouro suportadas

Os testes de oxidação de glicose por glicose oxidase com o auxílio das nanopartículas de ouro suportadas foram realizados em recipiente aberto com aquecimento e borbulhamento de oxigênio de alta pureza (>99,5%) através de um dispersor. Para tal, 49 mL de uma solução de glicose 2% foram adicionados a um recipiente, juntamente com 1 mL de solução estoque de glicose oxidase, conferindo uma atividade enzimática final de 31,2 U.mL⁻¹. Logo em seguida, 13 mg do catalisador de ouro foram adicionados à mistura. Durante a reação, uma vazão de 60 mL.min⁻¹ de oxigênio foi mantida, e uma agitação de 250 min⁻¹, durante 2 horas. O pH foi controlado em 7 adicionando-se lentamente uma solução de NaOH 1M durante toda a reação. Para garantir a reprodutibilidade dos experimentos, foi utilizado titulador automático

da Mettler Toledo, modelo G20 Compact Titrator. A temperatura da reação foi mantida em 30 °C. A Figura 17 ilustra o esquema reacional preparado. O ácido glucônico produzido foi quantificado por HPLC acoplado com detector DAD (210 nm), RID e coluna Aminex-HPX-87H.

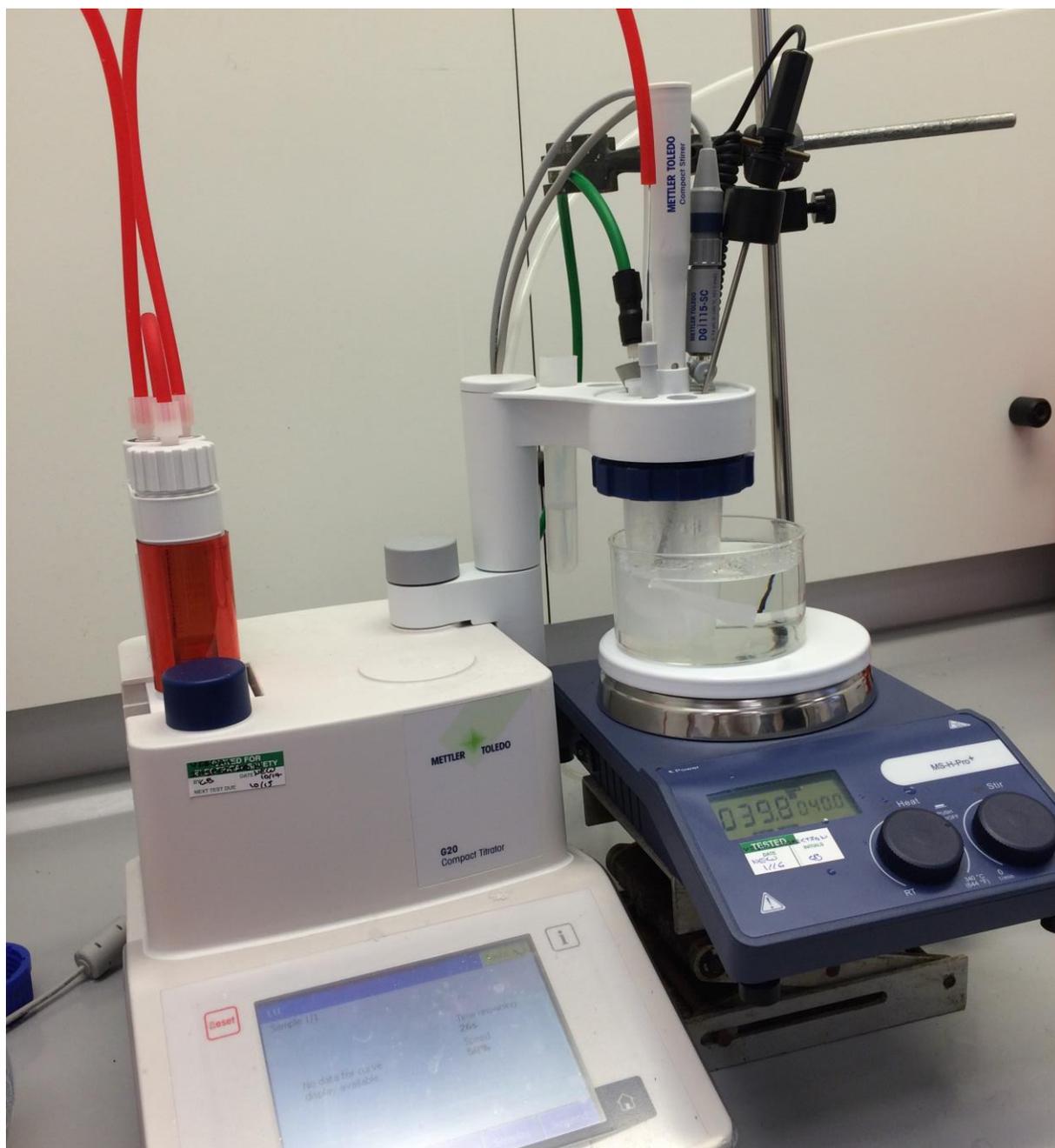


Figura 17 - Esquema reacional para oxidação de glicose.

4.6 HIDRÓLISE DE CELOBIOSE E OXIDAÇÃO DE GLICOSE *ONE-POT* EMPREGANDO ENZIMAS

Foi realizada a reação de hidrólise de celobiose simultânea com oxidação da glicose formada, para verificar a compatibilidade das enzimas empregadas. Para isso, β -glucosidase e glicose oxidase foram adicionadas a uma solução de celobiose 25 g.L⁻¹ para um volume final de 50 mL. As atividades finais das β -glucosidase e glicose oxidase em solução foram 60 U.g⁻¹ de celobiose e 1600 U.g⁻¹ de celobiose, respectivamente. A reação foi realizada a 40 °C por 16 horas, com pH controlado em 5 por tampão acetato de sódio e vazão de oxigênio de 60 mL.min⁻¹. Os produtos foram quantificados por HPLC.

4.7 VIABILIZAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA *ONE-POT* COM HIDROGENAÇÃO DE GLICOSE CATALISADA POR RU/C

Recentemente, novos estudos envolvendo a hidrogenação de açúcares em polióis têm recebido grande atenção devido à importância de seus produtos na indústria. O sorbitol pode ser citado como o mais importante, estando presente como um dos 12 principais building blocks de origem renovável listados pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (DOE) ¹⁰⁶. Industrialmente, o sorbitol é produzido pela hidrólise enzimática de amido em glicose seguida por uma hidrogenação ¹⁰⁷. Portanto, seria interessante do ponto de vista econômico que as reações de hidrólise e hidrogenação ocorressem simultaneamente, em uma reação *one-pot*. Até onde se sabe, não existem indícios na literatura de trabalhos promovendo a hidrólise enzimática de celobiose simultaneamente com hidrogenação de glicose.

A avaliação da reação *one-pot* para produção de sorbitol foi realizada, primeiramente, verificando se os produtos da hidrogenação de glicose e celobiose, sorbitol e celobitol, seriam potenciais inibidores da β -glucosidase. Para isso, foram utilizados 5 mL de uma solução de celobiose 25 g.L⁻¹ como substrato, contendo diferentes concentrações de sorbitol ou celobitol, 10mM, 30mM e 50mM. A cada solução foi adicionada β -glucosidase na proporção de 80 mg.g⁻¹ de celobiose. Todos os experimentos foram realizados a 50 °C e pH 5 (tampão acetato) no incubador New Brunswick™ Innova® 42.

Posteriormente, com o objetivo de avaliar a influência de altas pressões de hidrogênio na hidrólise enzimática, foram executados testes em um reator Parr de 50 mL, a 50 °C. Para

tal, foi adicionada β -glucosidase (80 mg.g^{-1} de celobiose) a 35 mL de uma solução de celobiose 25 g.L^{-1} preparada em tampão acetato de sódio, pH 5. Foram comparadas as hidrólises com 40 bar de pressão de hidrogênio, e sob 1 bar de ar atmosférico.

Por fim, β -glucosidases livres (80 mg.g^{-1} de celobiose) foram adicionadas a 35 mL de uma solução de celobiose 25 g.L^{-1} e colocadas no reator Parr[®] sob 40 bar de hidrogênio, na presença de 40 mg do catalisador comercial de hidrogenação de rutênio suportado em carvão, Ru/C. A reação ocorreu por 3 horas, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 5 (tampão acetato). Os produtos da reação foram quantificados por HPLC.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 HIDRÓLISE DE CELOBIOSE COM B-GLUCOSIDASE IMOBILIZADA

5.1.1 Considerações sobre a técnica de imobilização escolhida

A primeira etapa a ser estudada foi a reação de hidrólise de celobiose utilizando β -glucosidase imobilizada em diferentes suportes e em diferentes condições de imobilização. O procedimento de imobilização está resumidamente ilustrado na Figura 18. A técnica escolhida para fixar as enzimas no suporte foi a imobilização por ligação covalente, devido à preocupação com a reciclabilidade do material. Essa técnica se destaca das demais por conferir uma forte ligação entre a enzima e o suporte, diminuindo a probabilidade de haver dessorção da enzima após o ciclo. Além disso, para a reação de hidrólise em particular, e pensando em escala industrial, é interessante maximizar o número de ciclos de reuso para que o processo se torne economicamente viável.

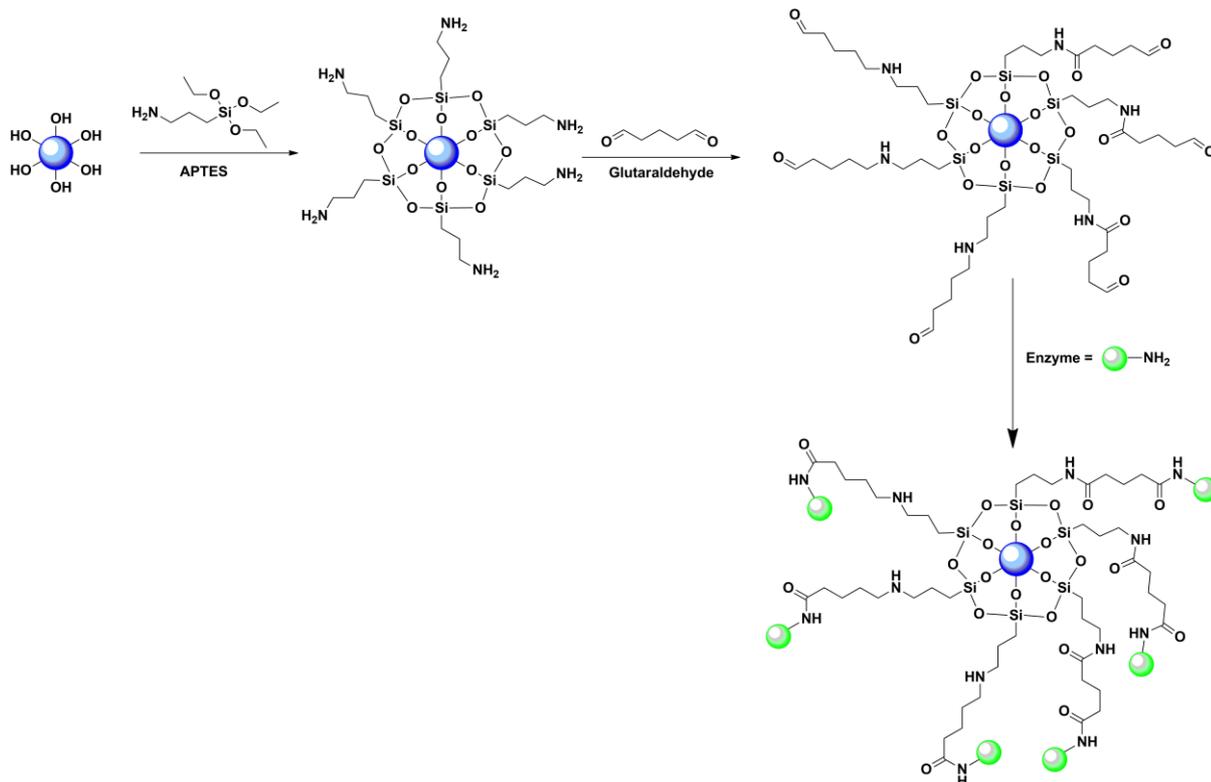


Figura 18 - Procedimento de imobilização por ligação covalente utilizando APTES e glutaraldeído como ligantes.

O procedimento utilizado consiste, primeiramente, em uma funcionalização do suporte, com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), conferindo grupos amino ao material. APTES é um aminosilano, muito utilizado no processo de silanização de superfícies, que consiste na funcionalização com moléculas de alcóxissilanos contendo diferentes grupos funcionais. A ligação Si-O-Si é formada ao reagir APTES com os grupos silanol presentes na superfície do suporte. Muitos fatores influenciam a qualidade da funcionalização com APTES, como concentração, tempo, umidade e temperatura. A presença de água, principalmente, leva à polimerização da camada de APTES, formando multicamadas instáveis¹⁰⁸. Por isso, a funcionalização é realizada em meio não-aquoso.

Posteriormente à funcionalização com APTES, o suporte, contendo grupos amino, é tratado com glutaraldeído para lhe conferir grupos aldeídicos. Glutaraldeído é um aldeído homo bifuncional muito utilizado em processos de *crosslinking* de biomoléculas. Em imobilizações por ligação covalente é necessário que ambos o suporte e enzima apresentem grupos amino para se ligarem aos grupos aldeído. Soluções concentradas de glutaraldeído são prontamente disponíveis e de baixo custo. Outra vantagem, é o tamanho da molécula de ligante, que minimiza problemas de acessibilidade substrato-enzima no meio reacional.

Muitas espécies químicas podem estar presentes em solução, dependendo da temperatura, concentração e pH. O mecanismo de ligação entre o glutaraldeído e grupos amino ainda não foi completamente explicado. A formação de uma base de Schiff e a adição *Michael-type* são os mecanismos mais aceitos pela literatura ⁷⁰. A Figura 19 ilustra esses possíveis mecanismos.

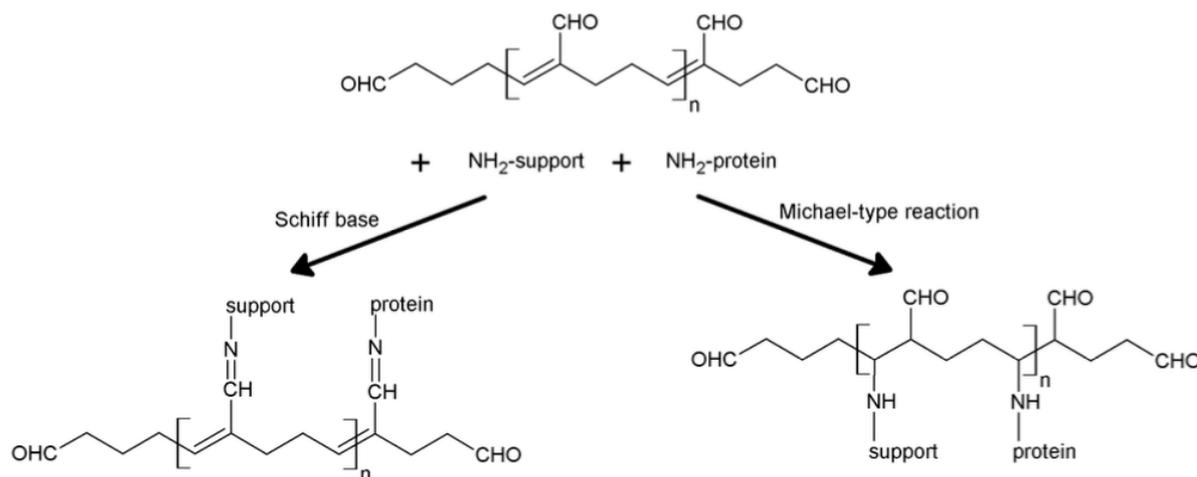


Figura 19 - Possíveis mecanismos de ligação do glutaraldeído.

Devido à complexidade das ligações formadas pelo suporte ativado com glutaraldeído, é evidente que diferentes tipos de interação podem ocorrer, além das ligações covalentes, como troca iônica e adsorção. Portanto, quando se deseja descartar interações mais fracas, deve-se preferir suportes fracamente ativados, ou seja, baixas concentrações de glutaraldeído devem ser usadas. Uma medida semi-quantitativa do grau de funcionalização do suporte é através da mudança de cor promovida pela ligação do glutaraldeído ⁷⁰. Suportes fracamente funcionalizados apresentam coloração mais clara, amarelada, enquanto suportes moderadamente funcionalizados se tornam alaranjados, ou até mesmo avermelhados, em casos de funcionalização severa. A Figura 20 mostra os diferentes graus de funcionalização por glutaraldeído, com as respectivas colorações.

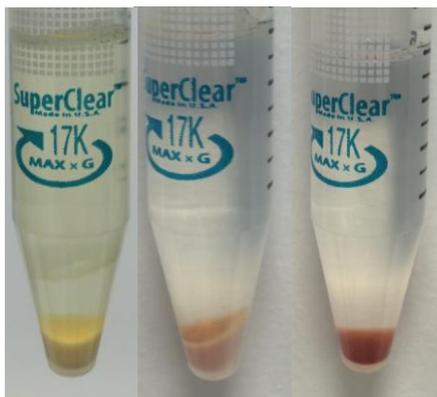


Figura 20 - Diferentes graus de funcionalização em função da concentração de glutaraldeído.

Uma vez funcionalizado com grupos aldeído, o suporte está pronto para se ligar covalentemente às enzimas.

5.1.2 Difração de raios X dos suportes

Os difratogramas dos materiais utilizados como suporte estão apresentados na Figura 21. Os picos indicados para nanosilicalita correspondem àqueles da referência (JCPDS 73-6453) indicando estrutura do tipo MFI, ou seja, similar à zeólita ZSM-5. Nenhum desvio da linha de base ou alargamento dos picos, muitas vezes chamado de halo, foi observado em $2\theta = 20^\circ$ a 30° , o que corresponderia à fase amorfa. Além disso, picos bem definidos foram observados, evidenciando que uma alta cristalinidade foi obtida para a nanosilicalita.

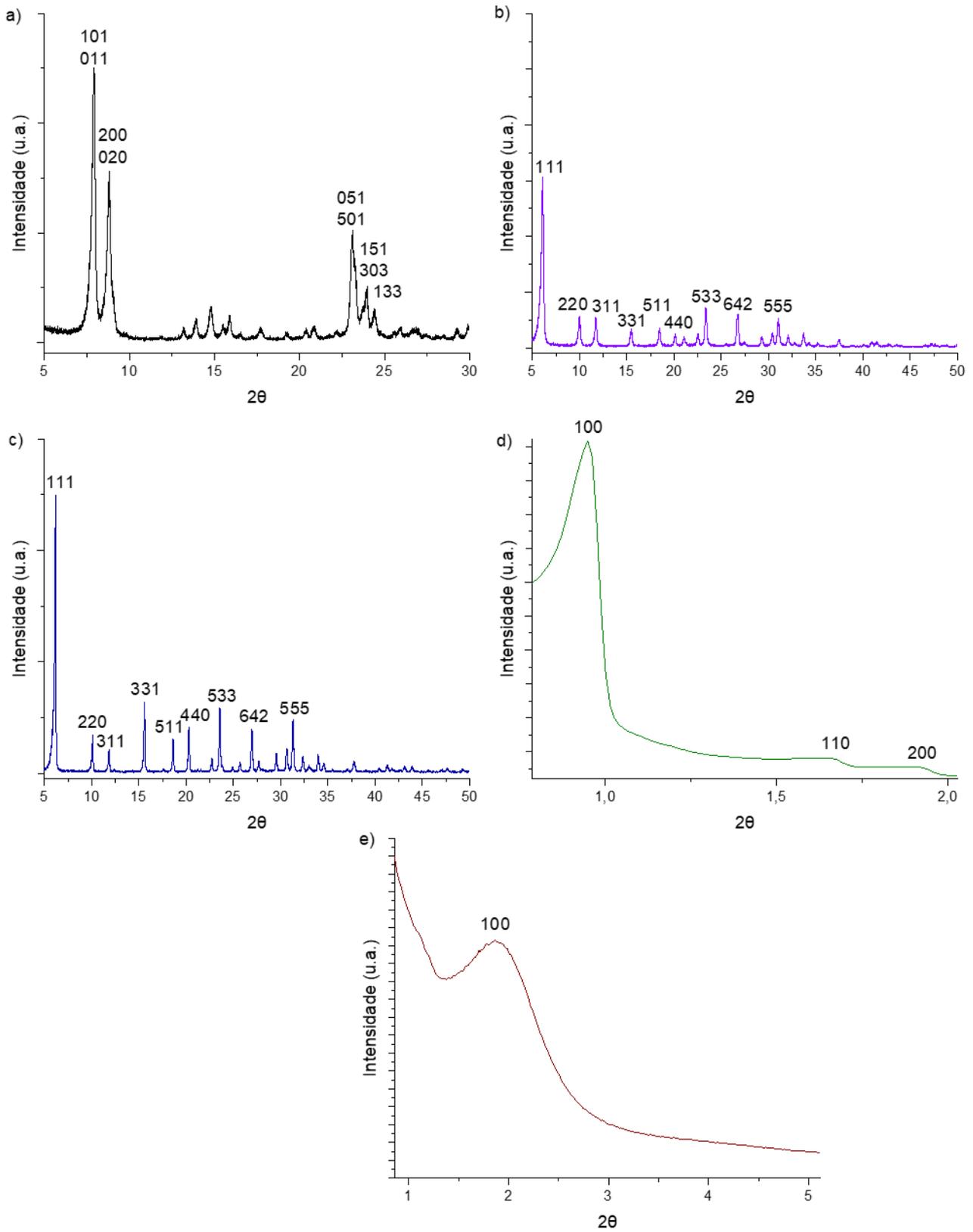


Figura 21 - Difratoogramas da a) nanosilicalita, b) NanoY, c) NaY, d) SBA-15 e e) MSNS.

Observando os difratogramas das zeólitas NaY e nanoY, é possível observar os picos relativos àqueles de uma zeólita Y segundo à referência (JCPDS 43-0168). Devido ao menor tamanho de cristalito no caso da nanoY, os picos no difratograma se mostraram alargados e menos intensos quando comparados à NaY.

O difratograma de baixo ângulo correspondente à SBA-15 mostra um pico de grande intensidade relativo ao plano 100 em $2\theta = 0,9^\circ$ e dois picos de menor intensidade relativos aos planos 110 e 200, em $2\theta = 1,7^\circ$ e $2\theta = 1,9^\circ$, respectivamente. Esses picos são característicos de uma estrutura plana hexagonal ordenada. Por sua vez, o difratograma de baixo ângulo para a MSNS apresentou o pico correspondente ao plano 100 em $2\theta = 2^\circ$, o que é típico de uma estrutura hexagonal de materiais como a sílica MCM-41^{109,110}.

5.1.3 Micrografias dos suportes e determinação de tamanho de partícula

Uma representação das micrografias (TEM) da nanosilicalita está apresentada na Figura 22, destacando sua estrutura microporosa, à direita. Nanocristais uniformes foram observados e, em sua maioria, com partículas em forma esférica. A distribuição de partículas foi determinada pela análise de 200 partículas, obtendo-se um diâmetro médio de 66,5 nm, com desvio-padrão de 14,6 nm.

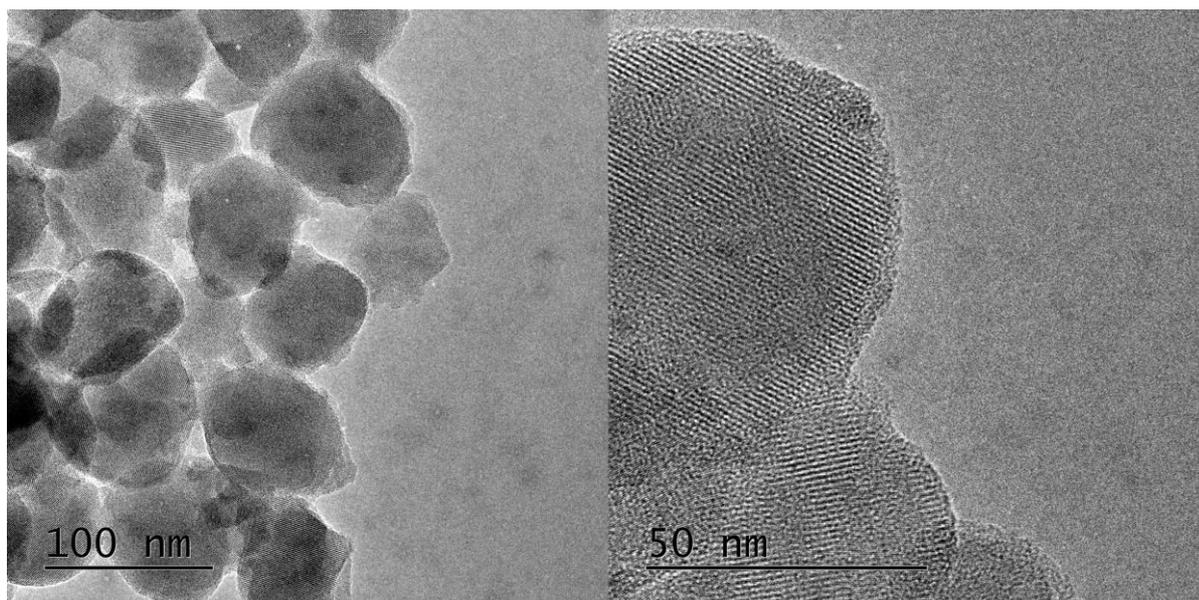


Figura 22 - Micrografias TEM da nanosilicalita com destaque para a estrutura microporosa.

Na Figura 23, é possível observar a micrografia TEM das nano esferas de sílica mesoporosa (MSNS). A contagem das partículas indicou um diâmetro médio de 75 nm. Nota-se que foram obtidas partículas uniformemente esféricas para esse material.

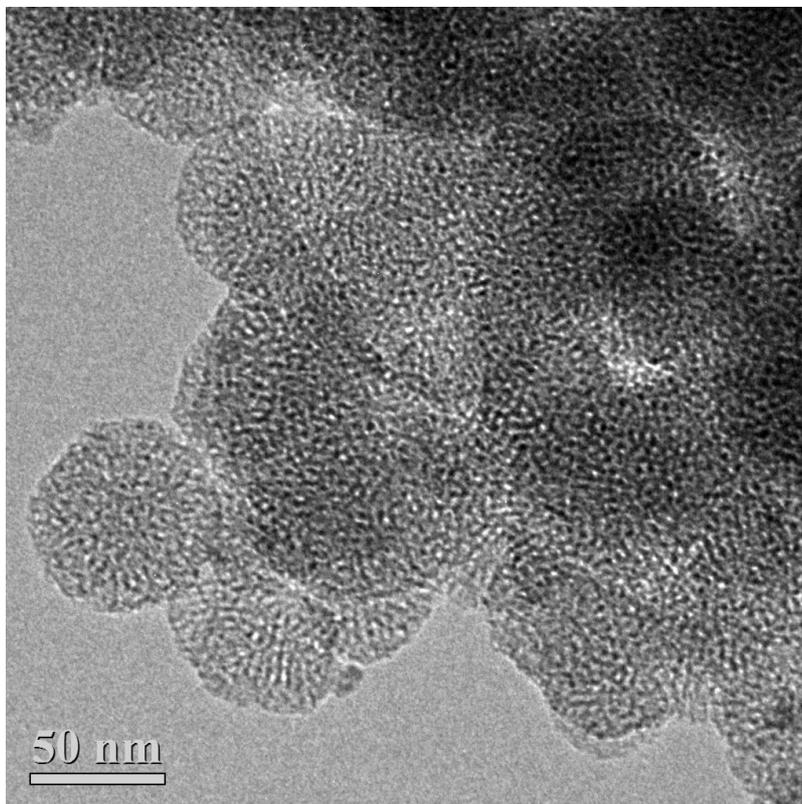


Figura 23 - Micrografia TEM da MSNS.

A Figura 24 mostra a micrografia da sílica SBA-15. Sua estrutura hexagonal ordenada pode, facilmente, ser observada.

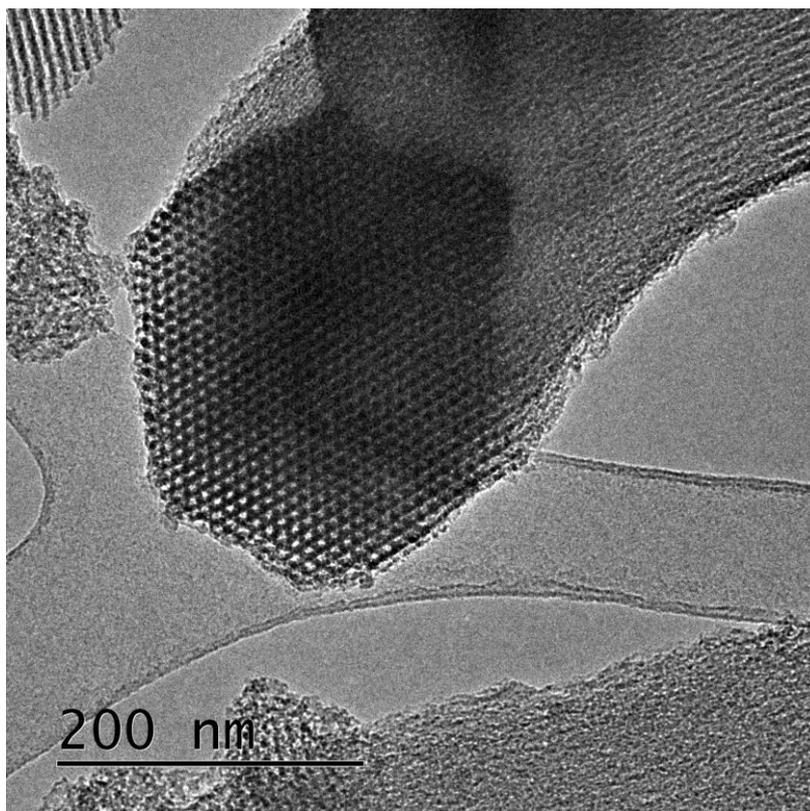


Figura 24 - Micrografia TEM da SBA-15.

Para determinação da distribuição de partículas da zeólita NanoY sintetizada, uma amostra foi submetida à análise DLS, cujo gráfico pode ser observado na Figura 25. O tamanho médio de partículas calculado pelo *software* Malvern foi 65,33 nm, com desvio-padrão de 27,12 nm, indicando que nanozeólitas foram obtidas com êxito a partir da síntese descrita anteriormente.

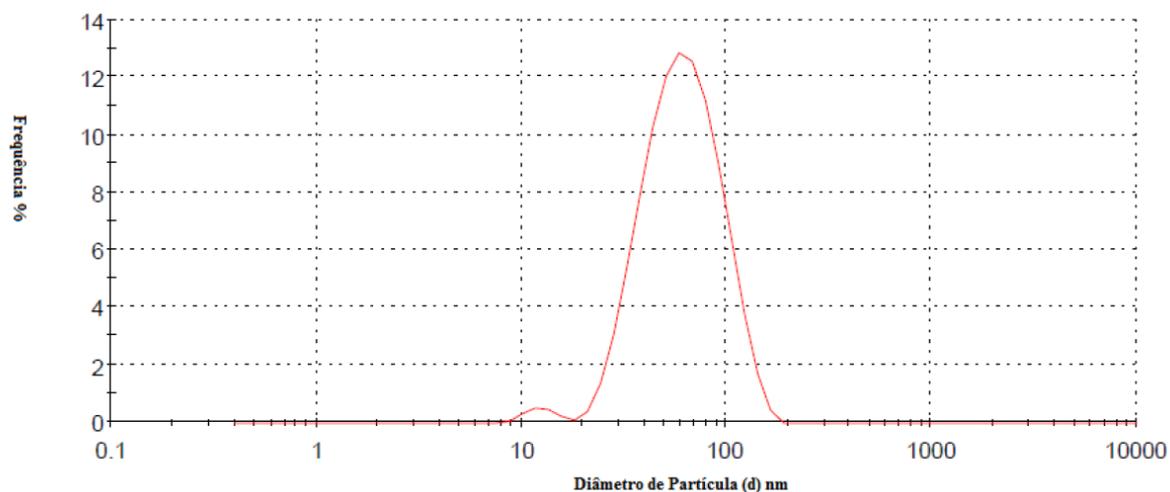


Figura 25 - Gráfico da distribuição de tamanhos das partículas de NanoY, gerado através da análise DLS.

Para fins comparativos, segundo as análises fornecidas pelo fabricante da NaY, adquirida comercialmente, o material é constituído de partículas microporosas com diâmetro médio de, aproximadamente, 1 micrômetro.

5.1.4 Otimização das condições de imobilização

Inicialmente, foi realizado uma varredura das condições experimentais de imobilização da β -glucosidase em nanosilicalita. O objetivo desta etapa foi de identificar em que condições de pH, tempo e concentração de glutaraldeído, seria obtida a maior atividade na hidrólise de celobiose. As três variáveis avaliadas têm influência direta na qualidade do produto final, pois um alto grau de funcionalização poderia acarretar na aglomeração das nanopartículas devido à polimerização do ligante. Tal efeito seria deletério para a reação de hidrólise, uma vez que o tamanho das partículas é um fator determinante na acessibilidade do substrato às enzimas e na área disponível no suporte para imobilização das mesmas. Da mesma forma, a fraca funcionalização do suporte diminuiria sua capacidade de formar ligações covalentes estáveis com as enzimas. Além disso, foi estudada a quantidade de enzima adicionada na última etapa de imobilização, de forma a obter máxima atividade por massa de enzima utilizada. A Figura 26 ilustra a metodologia que foi utilizada.

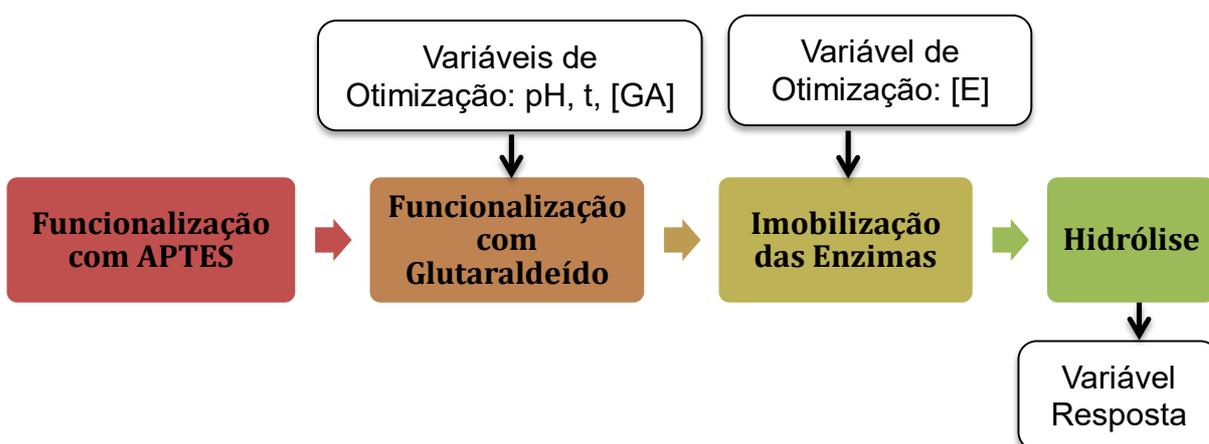


Figura 26 - Esquema de otimização das variáveis de imobilização.

Para isso, o planejamento experimental DCCR foi escolhido. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma das ferramentas mais importantes na seleção de parâmetros de experimentos, pois possibilita a construção de uma superfície de resposta a partir de um modelo empírico ¹¹¹. Diferentemente de um planejamento fatorial a 2 níveis, o

DCCR possibilita a obtenção de curvatura no modelo através da adição de pontos axiais, porém, com menos experimentos que um planejamento fatorial a 3 níveis. O planejamento contém 3 réplicas no ponto central, assumindo erro homogêneo em toda extensão do modelo. O número de experimentos é, então: $2k$ (fatorial de 2 níveis) + $2*k$ (pontos axiais) + 3 pontos centrais. Onde k é o número de variáveis. Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Planejamento experimental.

	Níveis			Valores reais			
	Experimento	pH	t	[GA]	pH	t (h)	[GA] (% v/v)
Fatorial 2 níveis	1	-1	-1	-1	7	4	2
	2	-1	-1	1	7	4	6
	3	-1	1	-1	7	7	2
	4	-1	1	1	7	7	6
	5	1	-1	-1	9	4	2
	6	1	-1	1	9	4	6
	7	1	1	-1	9	7	2
	8	1	1	1	9	7	6
	Pontos axiais	9	α	0	0	10	5,5
10		$-\alpha$	0	0	6	5,5	4
11		0	α	0	8	8,5	4
12		0	$-\alpha$	0	8	2,5	4
13		0	0	α	8	5,5	8
14		0	0	$-\alpha$	8	5,5	0,000125*
Réplicas no ponto central	15	0	0	0	8	5,5	4
	16	0	0	0	8	5,5	4
	17	0	0	0	8	5,5	4

[GA]: Concentração de glutaraldeído

* Diluição máxima obtida onde [GA] tende a zero

Os valores dos níveis selecionados para cada variável foram escolhidos de acordo com a literatura^{67, 70, 108, 112, 113}. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, considerando-se que temperaturas muito altas podem levar à polimerização do glutaraldeído e assumindo a hipótese de que pequenas variações na temperatura não prejudicariam a acurácia do modelo⁷⁰. Além disso, temperaturas subambientais seriam de difícil reprodução na estrutura do laboratório.

Os efeitos dos fatores foram avaliados pelo diagrama de Pareto na Figura 27. Os fatores concentração, tempo e o termo quadrático da concentração se mostraram os mais significantes visando à atividade enzimática. É possível observar que a concentração exerce uma influência negativa na atividade, ou seja, quanto maior a concentração, menor a atividade. Por outro lado, tempos longos favorecem a atividade enzimática final. Os demais fatores e suas combinações foram descartados do modelo por não exercerem grande influência na variável resposta.

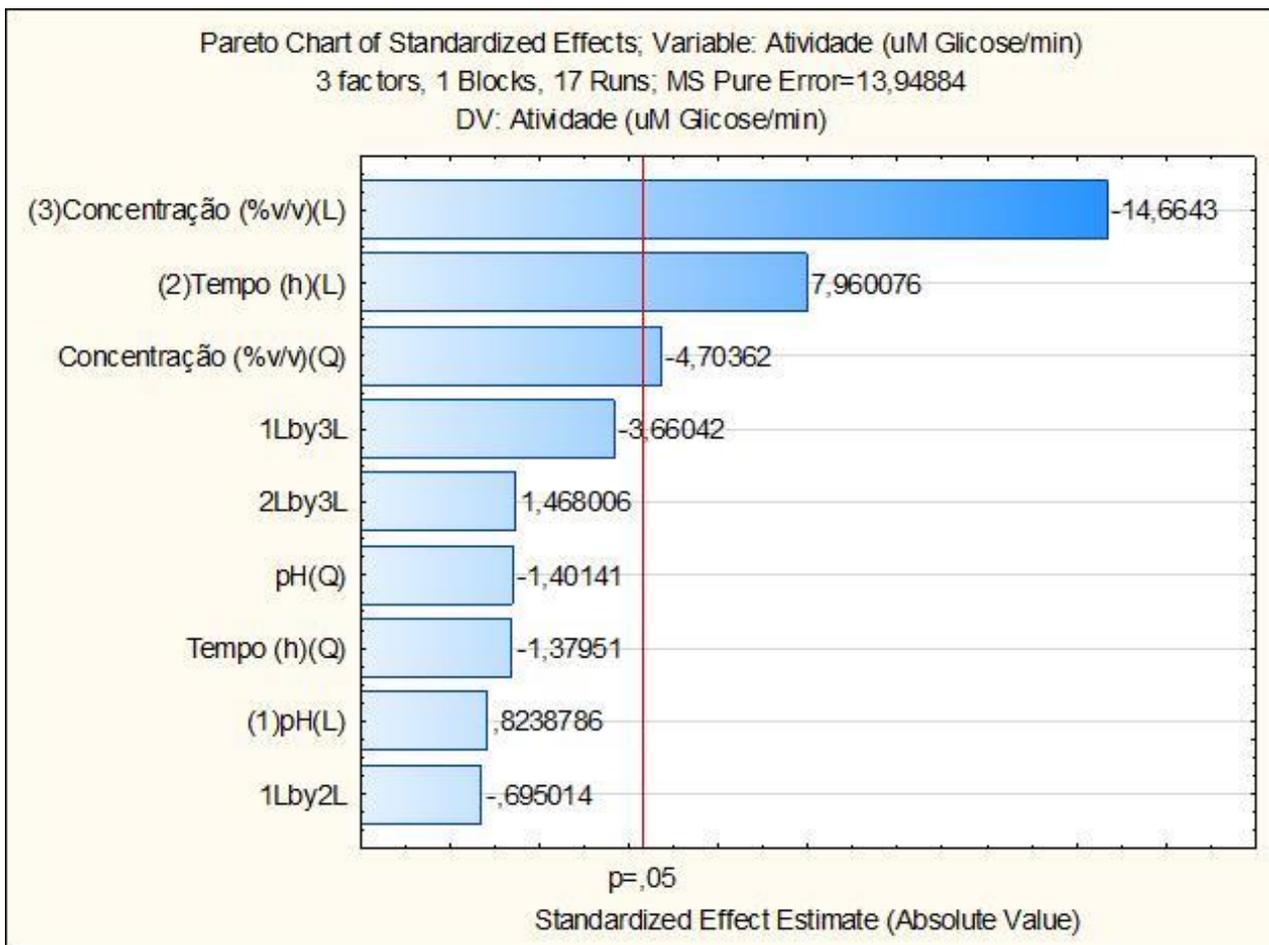


Figura 27 - Diagrama de Pareto para atividade enzimática na hidrólise de celobiose.

A tabela ANOVA do modelo contendo apenas os fatores concentração, tempo e concentração quadrático, está apresentada na Tabela 7. Através da análise de variância, é possível observar que todos os fatores foram considerados significativos, de acordo com o intervalo de confiança ($p \leq 0,05$), e com a significância de cada fator descrita pela probabilidade de Fisher (F), sendo a concentração de glutaraldeído o fator de maior significância no modelo. Outra importante indicação sobre a qualidade do modelo é a falta de ajuste, ou *lack of fit*, que não se mostrou significativo ($p > 0,05$), ou seja, o modelo se ajusta de forma adequada aos pontos experimentais.

Tabela 7 - Tabela ANOVA para o modelo obtido a partir do planejamento DCCR.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Tempo	883,838	1	883,838	63,3628	0,015418
Concentração	2999,603	1	2999,603	215,0432	0,004618
Concentração (Q)	275,532	1	275,532	19,7530	0,047079
Falta de ajuste	570,089	11	51,826	3,7155	0,231080
Erro puro	27,898	2	13,949		
Total	4757,022	16			

A partir do modelo construído pelo planejamento DCCR, foi possível plotar a superfície de resposta representada na Figura 28, utilizando o software Statistica. Nota-se que

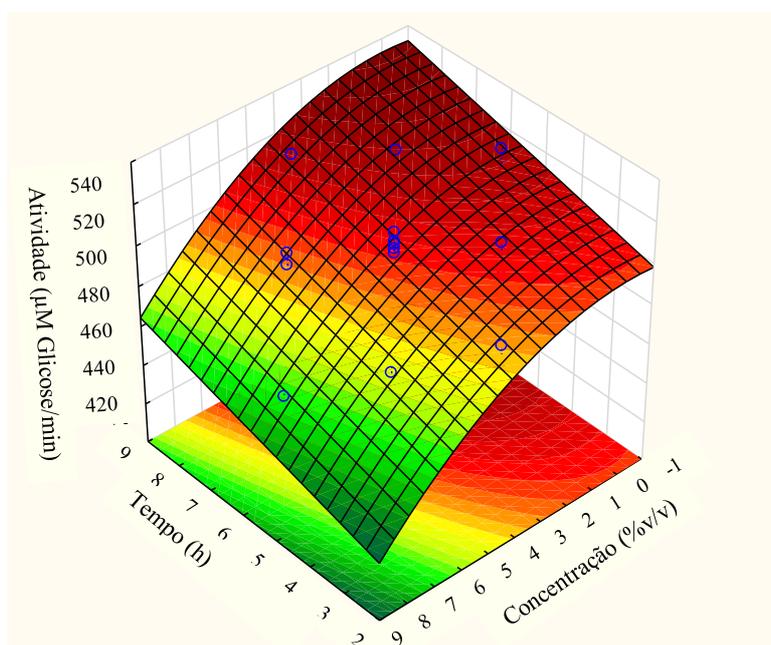


Figura 28 - Superfície de resposta obtida a partir do planejamento DCCR.

o tempo de funcionalização exerce uma influência positiva na atividade enzimática final, enquanto, no caso da concentração de glutaraldeído, essa influência é negativa. Tal comportamento do modelo pode, também, ser observado e confirmado qualitativamente, ao observar a coloração do suporte funcionalizado com diferentes concentrações de glutaraldeído, como explicado anteriormente na seção 4.1. Visivelmente, o suporte funcionalizado com concentrações muito elevadas apresenta coloração fortemente avermelhada e tende a sedimentar com facilidade, indicando que houve, de fato, aglomeração de partículas do suporte, causada por uma funcionalização severa ou polimerização do glutaraldeído. Em contrapartida, quando baixas concentrações são utilizadas, a coloração do suporte torna-se rosada ou fracamente amarelada, e uma suspensão de partículas é observada, com pouca ou nenhuma sedimentação visível. Esse fenômeno pode ser observado na Figura 29. Naturalmente, a aglomeração das partículas de suporte exerce uma influência negativa na atividade enzimática final, à medida que a área específica do suporte disponível para imobilização diminui. Posteriormente, foi também constatado que, estendendo-se o tempo de funcionalização até 24 horas, um ligeiro aumento na atividade enzimática é observado. Portanto, para os experimentos seguintes, a funcionalização foi realizada por 24 horas, visando à otimização e à viabilidade experimental.



Figura 29 - Coloração da nanosilicalita funcionalizada em função da concentração de glutaraldeído.

Por meio da análise do diagrama de Pareto, foi determinado que baixas concentrações de glutaraldeído e longos tempos de funcionalização maximizam a atividade enzimática no suporte e, conseqüentemente, a conversão na hidrólise de celobiose. Posteriormente, uma segunda série de experimentos foi realizada com uma nova faixa de concentração de glutaraldeído, a fim de determinar a concentração ótima. Para isso, foi calculada a quantidade de glutaraldeído teórica necessária para saturar todos os sítios de NH_2 presentes no suporte:

$$\frac{1 \text{ ml APTES}}{2 \text{ g suporte}} \times \frac{0,946 \text{ g}}{\text{ml}} = \frac{0,473 \text{ g APTES}}{\text{g suporte}} = \frac{0,01892 \text{ g APTES}}{0,04 \text{ g}}$$

$$\frac{0,01892 \text{ g APTES}}{221,37 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 8,55 \cdot 10^{-5} \text{ mol APTES} \rightarrow 8,55 \cdot 10^{-5} \text{ mol glutaraldeído}$$

$$\frac{8,55 \cdot 10^{-5} \text{ mol}}{0,005 \text{ L}} = 0,0171 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \therefore 0,0171 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 100,12 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 1,71 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$\frac{1,71 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{1,06 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \cdot 1000 \frac{\text{cm}^3}{\text{L}}} \times 100\% = 0,162 \% \frac{v}{v}$$

As referências para as massas molares do APTES e glutaraldeído, bem como a densidade da solução de glutaraldeído comercial, foram retiradas do website da Sigma Aldrich. Foi determinado, então, que uma solução 0,162 %v/v de glutaraldeído deveria conter a quantidade teórica para saturar os grupos amino presentes no suporte. As concentrações escolhidas foram, portanto: 0.125%; 0.25%; 0.5%; 1%; 2%. Sendo 2% o limite inferior do planejamento experimental realizado anteriormente.

O procedimento de funcionalização foi similar ao reportado na seção 3.2. A nanosilicalita (40 mg) foi transferida para 5 tubos, aos quais foi adicionada a solução de glutaraldeído com as respectivas concentrações. O pH, nesse caso, não foi controlado, haja vista que esse fator não se mostrou significativo na análise estatística. Os tubos foram incubados sob agitação constante (400 min⁻¹) em um incubador New Brunswick™ Innova® 42, por 24 horas. Posteriormente, o material foi recuperado por centrifugação a 4.000 x g por 5 minutos e lavado diversas vezes com água deionizada. Finalmente, o suporte funcionalizado foi armazenado em solução tampão, pH 5, a 4 °C.

A imobilização foi realizada da mesma forma, utilizando 2 mg.mL⁻¹ de β-glucosidase em volume total de 5 mL, pH 5. Os tubos foram incubados por 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 4.000 x g e lavado diversas vezes com solução tampão pH 5, até que a concentração total de proteínas, de acordo com o método BCA, fosse inferior a 1% da solução original. Finalmente, a enzima imobilizada foi armazenada em tampão, pH 5, a 4 °C.

Os ensaios de hidrólise foram realizados como anteriormente, suspendendo as enzimas imobilizadas em solução tampão contendo 25 g.L^{-1} de celobiose. A reação foi realizada a 50°C a uma rotação de 400 min^{-1} . A glicose formada foi quantificada por HPLC.

O gráfico ilustrado pela Figura 30 mostra a atividade enzimática obtida para cada concentração de glutaraldeído experimentada. Foi constatado que uma solução 2% de glutaraldeído levou à atividade enzimática ótima das enzimas imobilizadas. Essa concentração foi utilizada nos demais experimentos que seguiram.

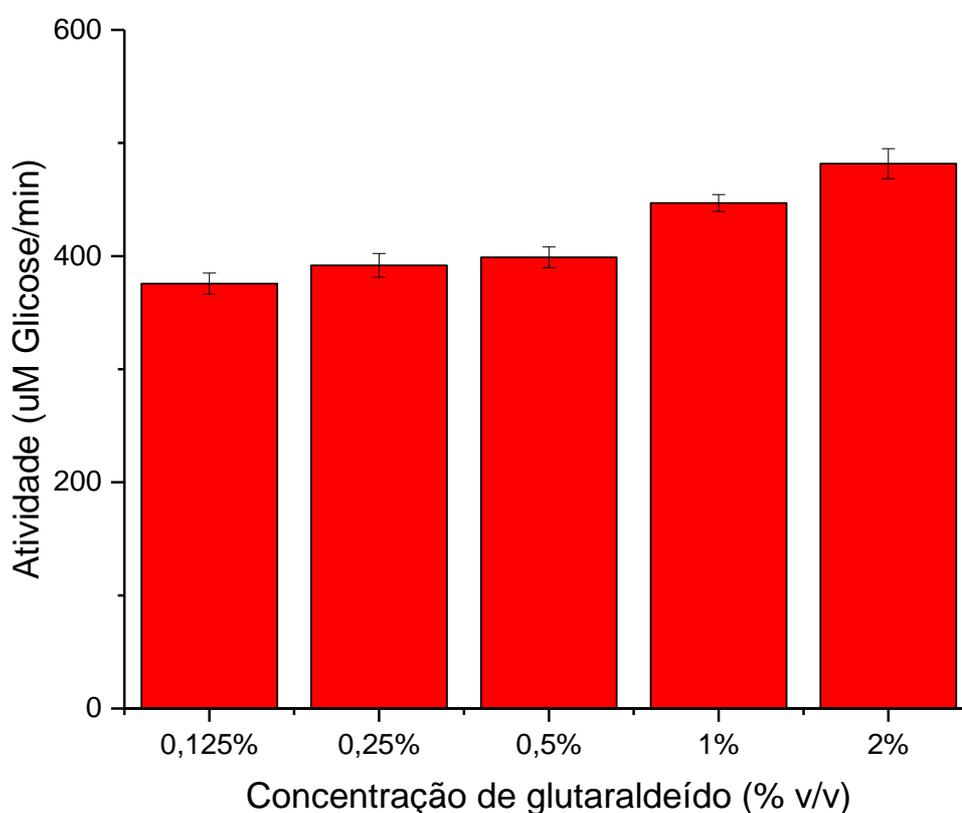


Figura 30 - Atividade β -glucosidásica em função da concentração de glutaraldeído.

5.1.5 Determinação da concentração ótima de proteína

Com as variáveis de funcionalização com glutaraldeído otimizadas, foram realizadas imobilizações com diferentes concentrações de β -glucosidase, a fim de determinar a concentração de proteína na qual seria obtida maior atividade específica, ou seja, atividade

enzimática por miligrama de enzima imobilizada. Na Figura 31, é observada a variação da atividade específica em função da concentração de proteína utilizada na imobilização. Nota-se a presença de máximos locais na faixa selecionada, ou seja, quando a concentração se aproxima de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou de $1,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, a atividade enzimática específica aumenta. Uma possível explicação para esse fenômeno é o fato do erro experimental, e de quantificação de produtos, ser maior quando baixas concentrações de proteína são utilizadas, e o desvio padrão maior nas concentrações $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ é uma evidência disso. A concentração de $1,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi, então, escolhida como concentração ótima para os próximos experimentos.

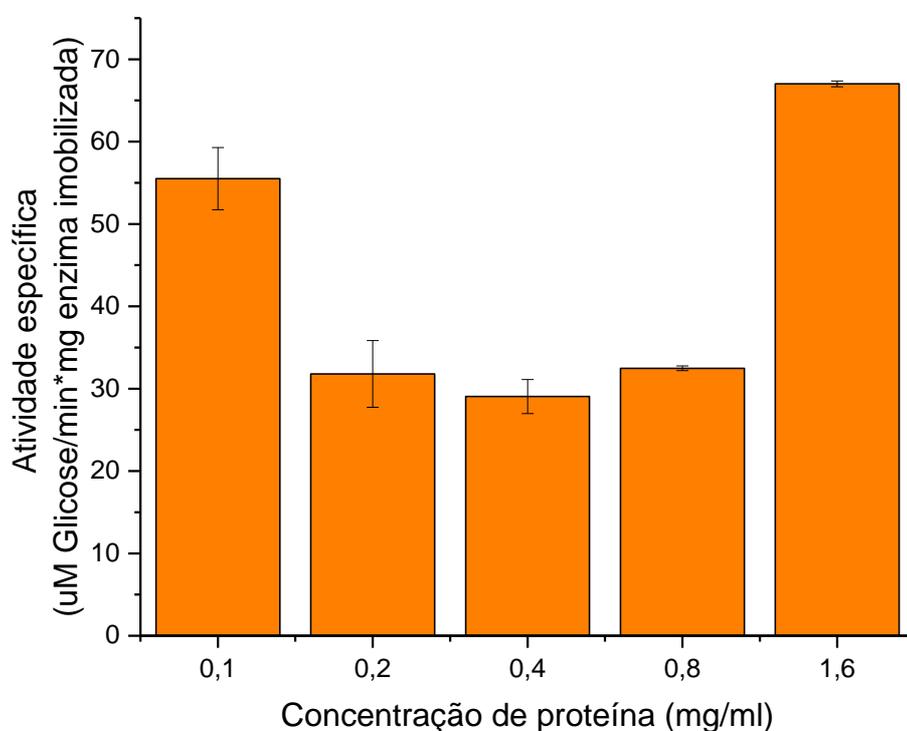


Figura 31 - Atividade enzimática específica em função da concentração de proteína.

5.1.6 Avaliação dos suportes

Foram selecionados suportes com diferentes características para avaliar a imobilização da β -glucosidase. A Figura 32 apresenta os suportes que foram utilizados, classificados pelas suas características. Os materiais pertencentes ao grupo de nano partículas são aqueles que

possuem tamanho de partícula menor que 100 nm. No grupo dos materiais que apresentam microporos, estão aqueles que apresentam tamanho de poro menor que 2 nm. Por sua vez, o grupo dos materiais inertes compreende aqueles que não apresentam sítios ácidos em sua estrutura. Os materiais foram escolhidos de forma a avaliar como essas 3 características poderiam influenciar na atividade da enzima imobilizada.

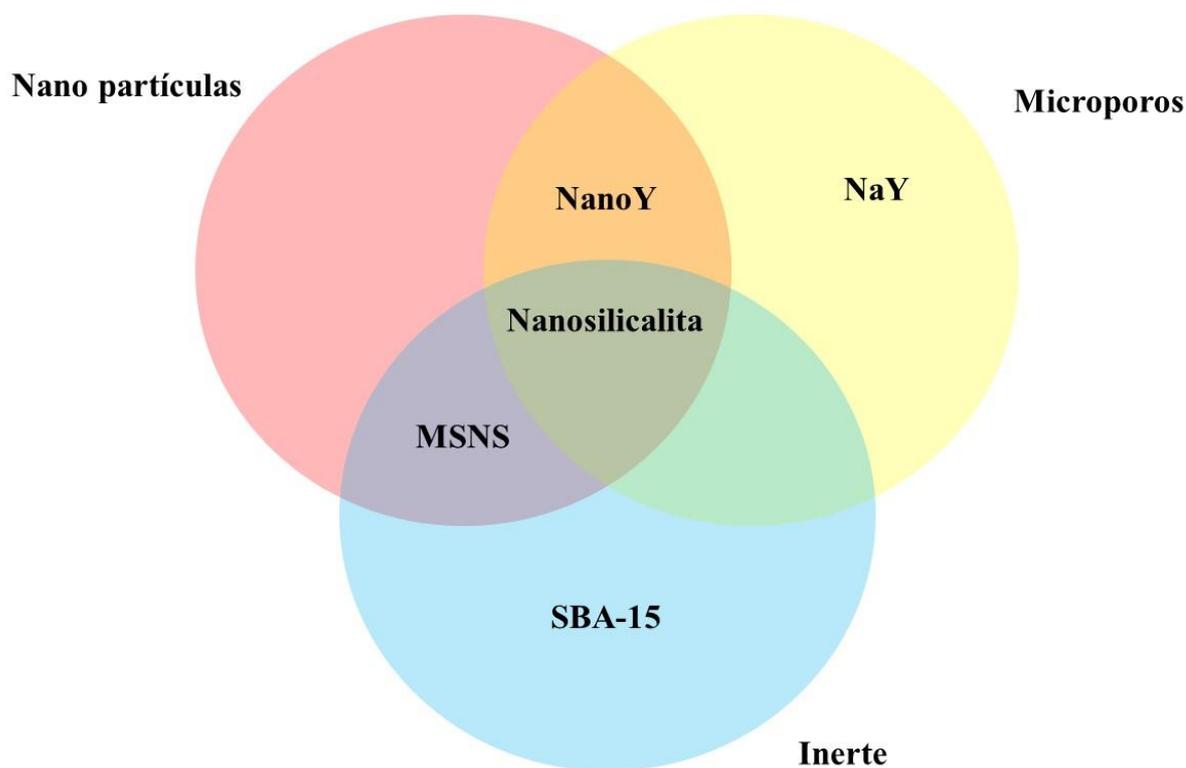


Figura 32 - Classificação dos suportes avaliados segundo suas propriedades.

Na Figura 33 a seguir, é possível avaliar o desempenho desses materiais como suporte para β -glucosidase, na hidrólise de celobiose a 50 °C. É evidente, a partir do gráfico, que os materiais apresentando acidez não são bons candidatos para a imobilização das enzimas, uma vez que a atividade recuperada em zeólitas Y foi menor que 20%. Percebe-se também que a MSNS obteve um desempenho superior à SBA-15, que possui estrutura mesoporosa hexagonal similar à MSNS, indicando que o tamanho de partícula é um fator importante na seleção do suporte. Nitidamente, a nanosilicalita apresentou atividade recuperada muito superior aos demais suportes. Os resultados obtidos para a MSNS e a nanosilicalita, levando-se em consideração suas características, indicam que materiais microporosos seriam melhores candidatos como suporte para β -glucosidase que os materiais mesoporosos. Uma possível explicação seria que a β -glucosidase se mantém mais ativa quando imobilizada apenas na área externa do suporte, uma vez que o tamanho de poro da nanosilicalita é significativamente

menor que o diâmetro aproximado da enzima (diâmetro médio = 6,7 nm). A MSNS, apesar de possuir tamanho de partícula bastante similar à nanosilicalita, apresenta poros suficientemente grandes e acessíveis à enzima. O aprisionamento da enzima nesses mesoporos pode, muitas vezes, causar desativação da mesma, como já reportado na literatura. Essa desativação poderia ser causada por diversos fatores, incluindo impedimento estérico, ou, até mesmo, bloqueio dos poros causado pelo glutaraldeído.

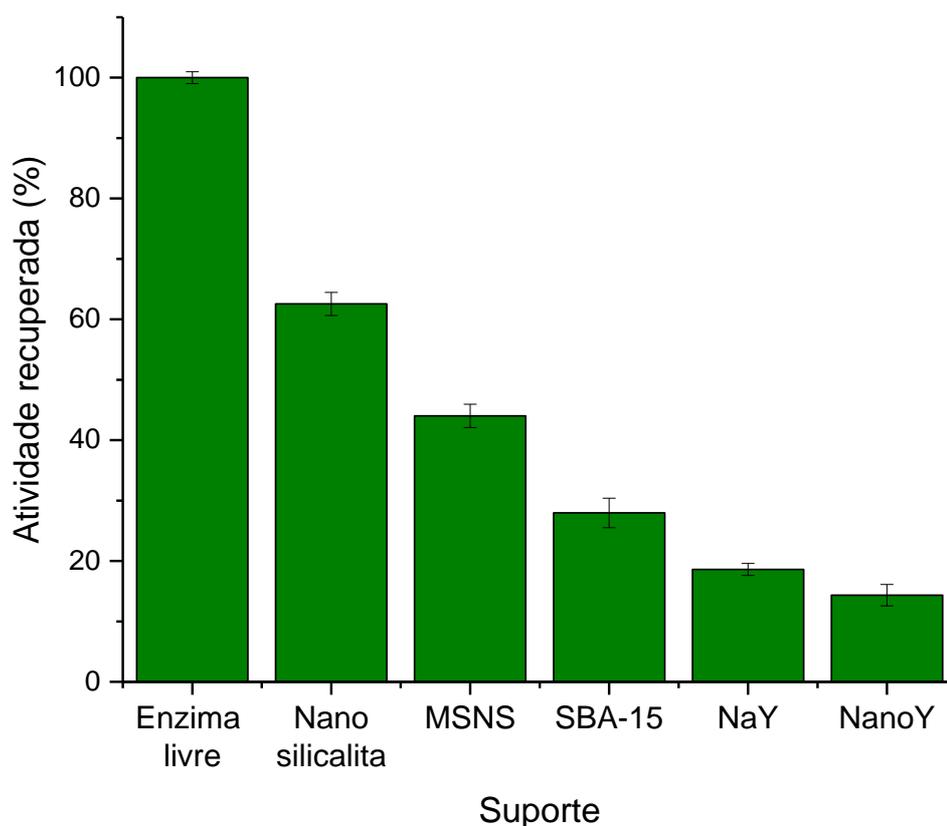


Figura 33 - Desempenho dos suportes na imobilização, expresso em termos da atividade recuperada. Hidrólise de celobiose a 50 °C, pH 5. Solução de enzima livre 1,6 mg.mL⁻¹.

5.1.7 Caracterização da enzima imobilizada

Os suportes que apresentaram o melhor desempenho foram selecionados para caracterização quanto aos parâmetros cinéticos e de imobilização, temperatura e pH ótimos, teste de estabilidade térmica e de reciclo.

A Tabela 8 apresenta os parâmetros cinéticos e de imobilização para a β -glucosidase imobilizada em nanosilicalita (BG/NANOSIL) e MSNS (BG/MSNS), bem como os parâmetros cinéticos da enzima livre (BG), para fins comparativos.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos e de imobilização.

Parâmetro	BG	BG/NANOSIL	BG/MSNS
K_M (mM)	35	106	49
V_{MAX} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	96	164	55
RI (%)	-	57	77
AR (%)	-	63	44

O rendimento de imobilização (RI), determinado pelo método BCA, representa a massa de proteína da solução original que permaneceu ancorada ao suporte após a imobilização. É importante salientar que a enzima ancorada não é, necessariamente, tão ativa quanto a enzima livre. Por isso, a atividade recuperada (AR) também foi calculada. Para a BG/NANOSIL, o rendimento de imobilização foi de 57%, comparativamente baixo em relação ao RI para a BG/MSNS, de 77%. Em termos práticos, significa que a MSNS tem capacidade de imobilizar uma maior quantidade de enzimas, o que faz sentido, por se tratar de um suporte com mais área disponível que a nanosilicalita, devido ao tamanho de seus poros. Os valores de RI para esses suportes foram relativamente altos quando comparados com a literatura. Trabalhos anteriores de imobilização de β -glucosidase utilizando glutaraldeído como ligante apresentaram RI em torno de 32% ¹¹⁴.

Em contrapartida, a atividade recuperada (AR) para a BG/NANOSIL foi maior, 63%, que para a BG/MSNS, 44%. Esse resultado mostra que foi obtida uma maior atividade enzimática total utilizando a nanosilicalita como suporte, apesar da menor quantidade de enzima imobilizada. Com isso, é possível concluir que as enzimas imobilizadas em nanosilicalita sofrem menos desativação causada pela imobilização que as enzimas imobilizadas em MSNS. Portanto, essa é uma forte indicação de que enzimas imobilizadas por ligação covalente dentro de uma estrutura porosa estão mais sujeitas a desativação que enzimas imobilizadas na área externa do suporte. Além disso, os valores de AR para esses suportes foram relativamente altos para o método de imobilização utilizado. Normalmente, há uma queda significativa na atividade das enzimas imobilizadas por ligação covalente, devido a alterações na conformação do sítio ativo, causadas pelas ligações formadas entre a enzima e o suporte ¹¹⁵. Porém, um aumento na atividade enzimática após a imobilização por ligação

covalente já foi reportado em trabalhos com β -glucosidase¹¹⁴. A explicação atribuída pelos autores para tal sinergismo entre enzima e suporte foi o alinhamento dos sítios ativos na direção do seio da reação, aumentando a disponibilidade das enzimas imobilizadas em receber as moléculas do substrato.

Os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 8 foram calculados a partir da linearização de Lineweaver-Burk, como mostrado na Figura 34.

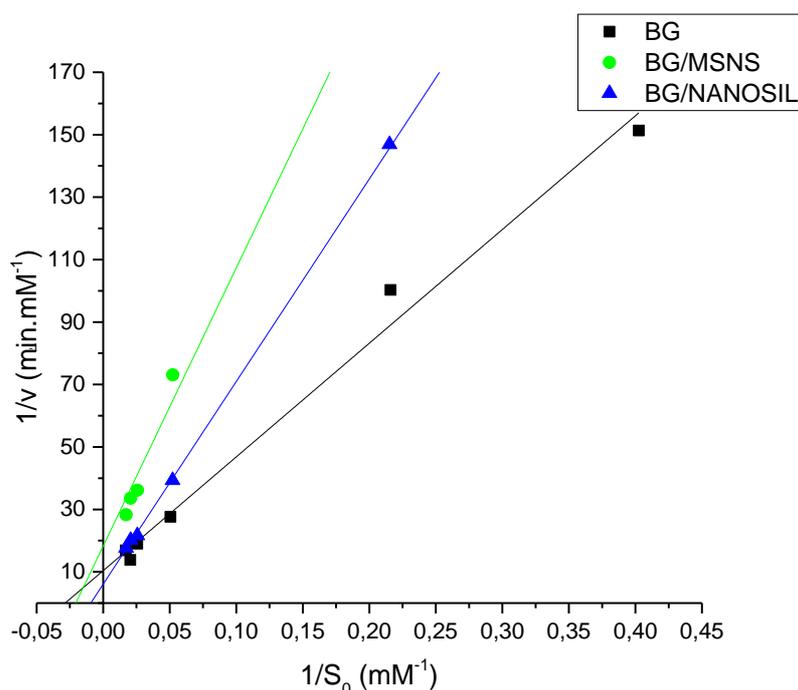


Figura 34 - Método de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos de BG, BG/MSNS e BG/NANOSIL.

Os coeficientes de determinação, R^2 , para BG, BG/MSNS e BG/NANOSIL foram, respectivamente, 0,9994, 0,9962 e 0,9999. É possível observar que o valor de K_M aumentou, tanto para BG/MSNS como para BG/NANOSIL, em relação ao valor para BG. Isso indica que a imobilização causou uma diminuição na afinidade ($1/K_M$) da enzima pelo substrato, ou seja, a enzima imobilizada necessita de uma concentração maior de substrato para atingir a metade de sua taxa máxima de formação de produto. Embora a BG/MSNS tenha apresentado um valor de K_M menor, a BG/NANOSIL apresentou um valor de V_{MAX} maior, ou seja, maior atividade enzimática.

Foram realizadas hidrólises em diferentes condições para avaliar o pH e temperatura ótimos para as enzimas imobilizadas, comparando com o perfil da enzima livre. Na Figura 35, estão apresentadas as atividades das enzimas imobilizadas e livre em diferentes valores de pH, a uma temperatura de 50 °C.

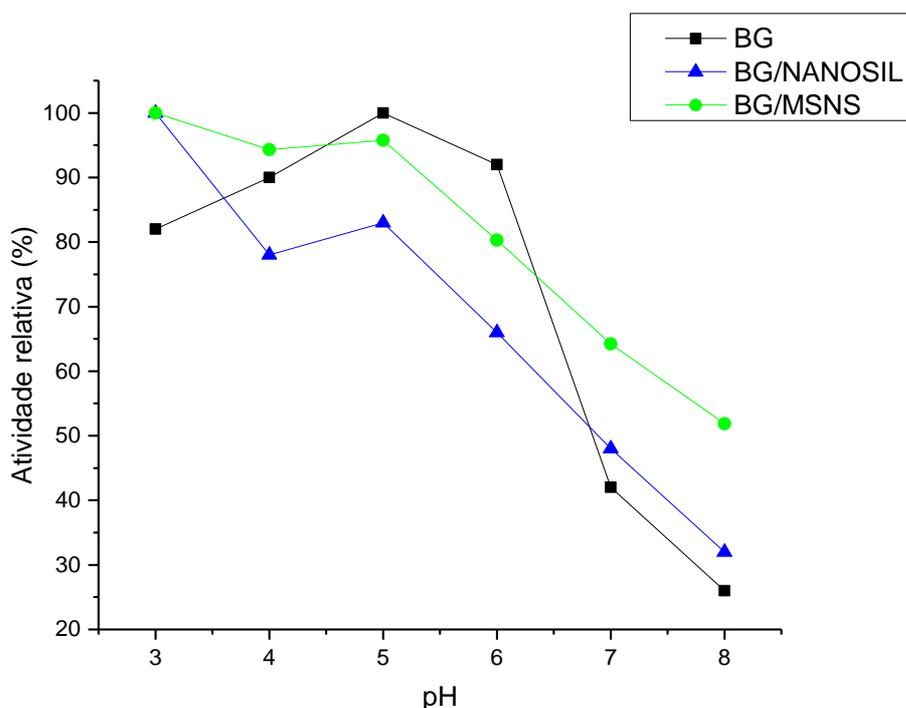


Figura 35 - Atividade relativa de BG, BG/NANOSIL e BG/MSNS em diferentes valores de pH, a uma temperatura de 50 °C.

A β -glucosidase livre (BG) apresentou sua maior atividade em pH 5, sendo relativamente estável na faixa de 3 a 6. No caso da BG/NANOSIL, o pH ótimo se deslocou para 3, diminuindo sua atividade quase que linearmente até pH 8. A BG/MSNS, por sua vez, manteve sua atividade estável de pH 3 a 5, diminuindo também de forma linear até pH 8. Foi observado que em ambas as enzimas imobilizadas, o pH ótimo diminuiu drasticamente para o valor 3. Tal fenômeno foi reportado em trabalhos anteriores e atribuído a um desbalanceamento das cargas dos grupos funcionais próximos ao sítio ativo, devido às ligações covalentes entre enzima e suporte ⁷⁵.

A atividade relativa das enzimas imobilizadas e livre em diferentes temperaturas, pH 5, está apresentada na Figura 36.

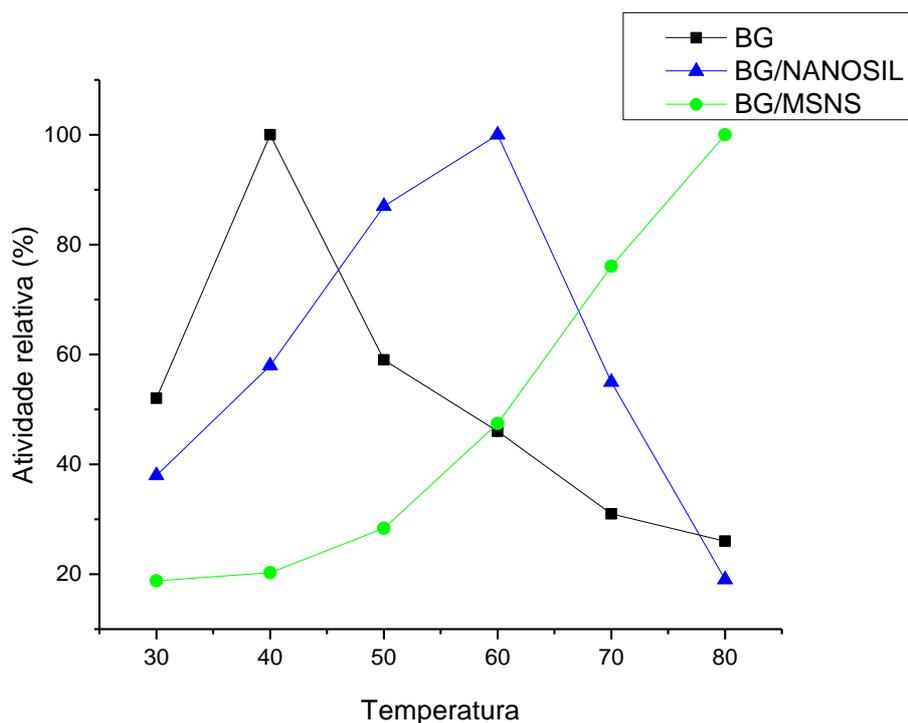


Figura 36 - Atividade relativa de BG, BG/NANOSIL e BG/MSNS em diferentes temperaturas, em pH 5.

A enzima livre apresentou sua atividade máxima a 40 °C, diferentemente da temperatura ótima para β -glucosidases de origem microbiana, normalmente em torno de 50 °C. Além disso, a enzima livre se mostrou pouco estável a temperaturas maiores que 50 °C. Por outro lado, as enzimas imobilizadas apresentaram as maiores atividades em temperaturas altas. A temperatura ótima para BG/NANOSIL foi 60 °C, com atividade maior que 50 % entre 40 e 70 °C. No caso da BG/MSNS, a temperatura de maior atividade no intervalo foi 80 °C, caindo rapidamente à medida que a temperatura diminui. É bastante conhecido que enzimas imobilizadas apresentam um aumento em sua temperatura ótima de operação devido à estabilização e “rigidez” em sua estrutura, causados pelas ligações com o suporte. Neste caso, a enzima imobilizada necessita de temperaturas mais altas para a ativação de seus sítios 50, 54, 78.

Foram realizados testes de estabilidade térmica para verificar se as enzimas imobilizadas se tornaram mais estáveis quando submetidas a altas temperaturas. A estabilidade das enzimas imobilizadas e livre a 80 °C está apresentada na Figura 37.

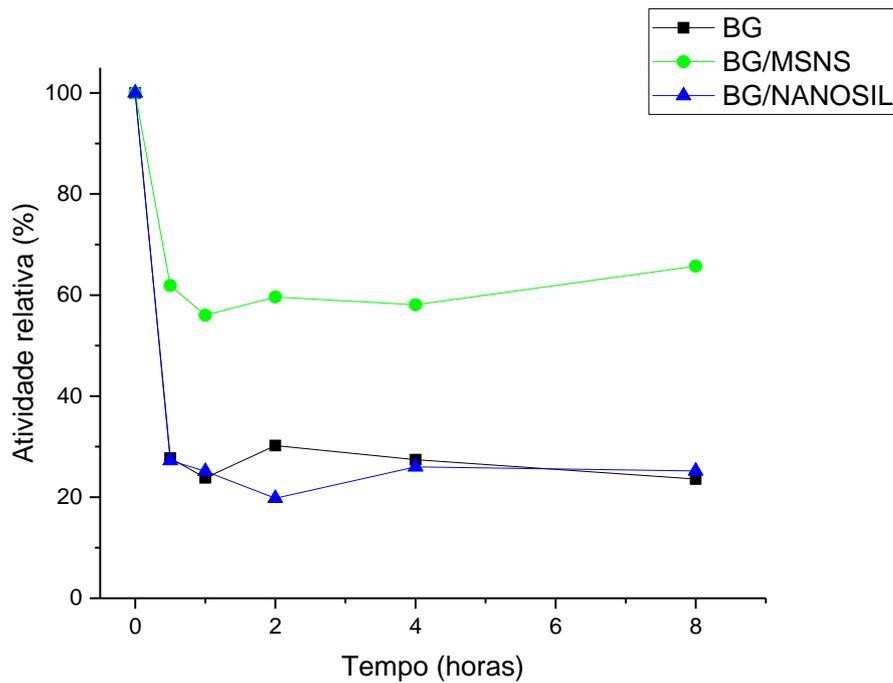


Figura 37 - Teste de estabilidade térmica a 80 °C.

Uma melhora significativa é observada na estabilidade da BG/MSNS, indicando que, mesmo a temperaturas muito elevadas, a β -glucosidase encontra-se mais protegida contra desnaturação. Neste caso, a enzima foi capaz de manter em torno de 60 % de sua atividade inicial durante as 8 horas de ensaio. Em contrapartida, a BG/NANOSIL sofreu desativação tão rapidamente quanto a enzima livre, ou seja, não apresentou resistência à desnaturação a 80 °C.

Foi, então, realizado um segundo ensaio de estabilidade térmica, a 65 °C, para avaliar a BG/NANOSIL. O resultado está apresentado na Figura 38.

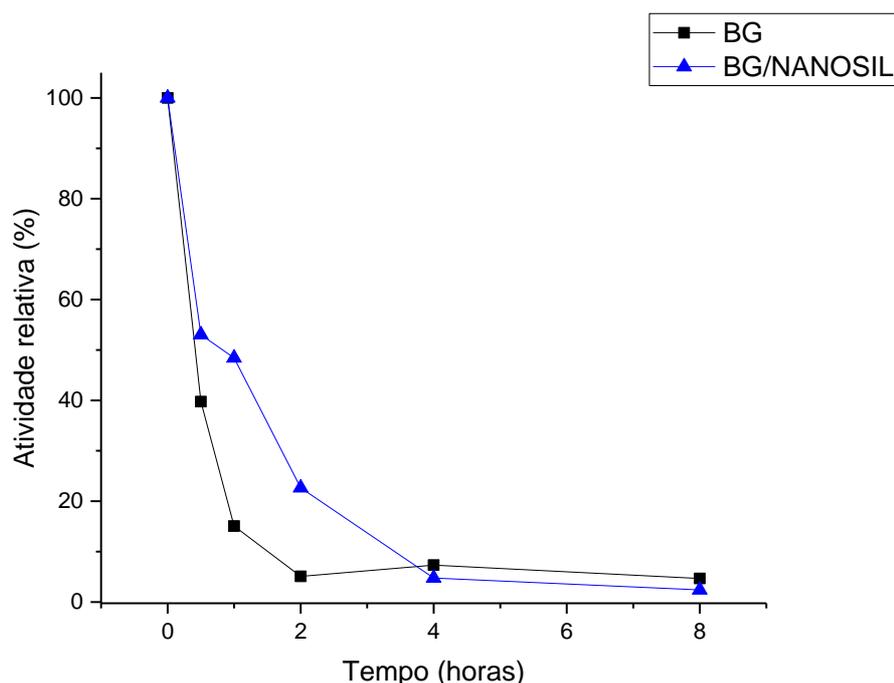


Figura 38 - Teste de estabilidade térmica a 65 °C.

Ao observar o perfil de desativação, aparentemente a BG/NANOSIL se mostrou ligeiramente mais resistente à desnaturação a 65 °C que a enzima livre. Essa diferença significativa na resistência à temperatura, quando comparadas a BG/MSNS e a BG/NANOSIL, pode ser atribuída a uma maior proteção das enzimas immobilizadas nos poros do suporte. É conhecido, na literatura, que enzimas immobilizadas dentro de uma estrutura porosa estão menos sujeitas a condições operacionais severas, aumentando sua resistência^{70, 115, 116}.

Foram também realizados ensaios de reciclo para avaliar a estabilidade operacional dos biocatalisadores. A Figura 39 mostra o rendimento em glicose durante os 6 ciclos de reação para a BG/NANOSIL. É possível observar 81% de rendimento em glicose mesmo depois do 6º ciclo, o que mostra a boa estabilidade deste sistema. As ligações covalentes entre enzima e suporte previnem a dessorção das enzimas e perda de atividade, durante longos tempos reacionais e altas temperaturas. A diminuição da atividade pode estar relacionada à desnaturação durante as reações. Esse resultado é uma evidência de que o biocatalisador é apropriado para uso industrial.

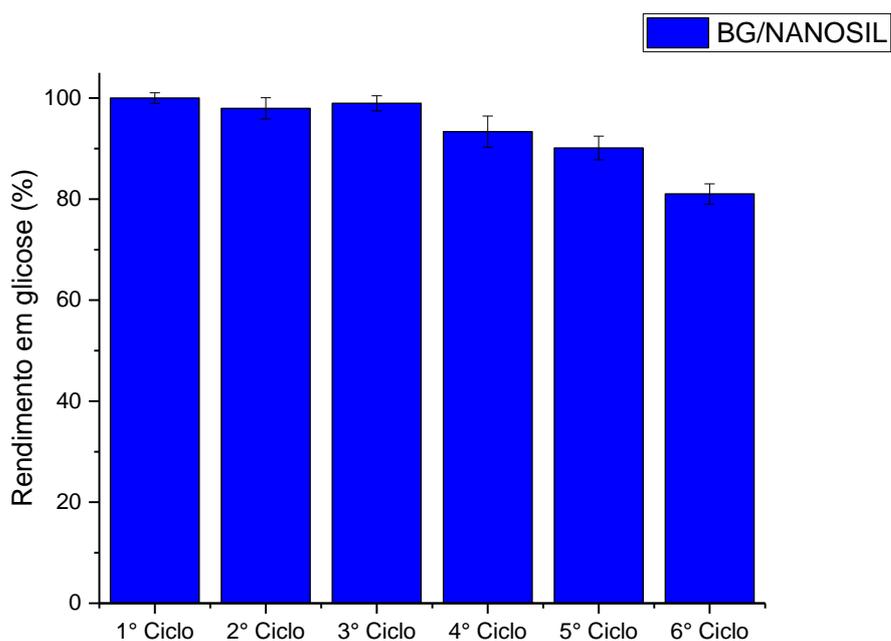


Figura 39 - Ensaio de reciclo da BG/NANOSIL. Condições: 50 °C, pH 5, 18 horas.

Por sua vez, o teste de reciclo para a BG/MSNS está apresentado na Figura 40. Ao contrário da BG/NANOSIL, é observada uma queda drástica do rendimento em glicose, apresentando 79% já no 2° ciclo. Porém, durante o 3° e 4° ciclo, o biocatalisador se manteve estável, apresentando um rendimento em glicose em torno de 73%. Nos últimos ciclos do teste, o rendimento caiu para pouco mais de 60%.

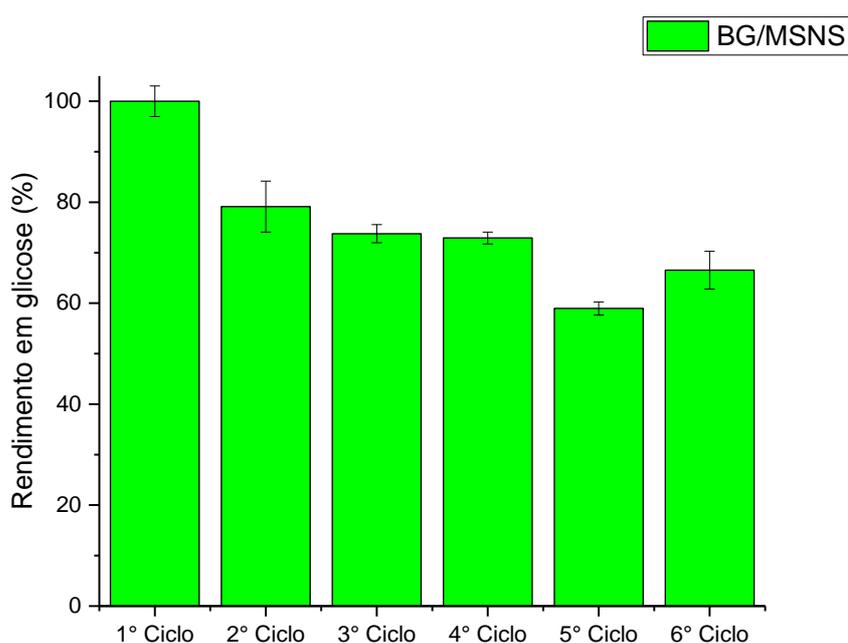


Figura 40 - Teste de reciclo da BG/MSNS. Condições: 50 °C, pH 5, 18 horas.

Uma possível explicação para uma maior desativação da enzima imobilizada em MSNS durante o teste de reciclo seria que, nas condições operacionais do teste, as enzimas presentes apenas na superfície externa tenham sofrido desnaturação ou dessorção, portanto, a atividade residual seria atribuída somente às enzimas imobilizadas nos poros do suporte, que apresentam, naturalmente, menor atividade, como discutido anteriormente.

5.2 AVALIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO SUPORTADAS

No trabalho de Taketoshi *et al.* foi mostrado como nanopartículas de ouro podem aumentar ligeiramente o rendimento da oxidação enzimática de glicose a ácido glucônico, uma vez que o ouro é capaz de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio formado como coproduto dessa oxidação. Como explicado anteriormente, o peróxido de hidrogênio é inibidor da enzima glicose oxidase, portanto, quanto mais rápida sua decomposição, maior o rendimento em ácido glucônico.

De forma a reproduzir os resultados alcançados por Taketoshi *et al.*¹ e avaliar o desempenho de nanopartículas de ouro, foram comparadas as reações de oxidação de glicose com a enzima glicose oxidase na ausência de ouro (GOX), com partículas de ouro suportadas em sílica mesoporosa SBA-15 (GOX + Au/SBA-15) e com um catalisador comercial de partículas de ouro suportadas em alumina (GOX + Au/Al₂O₃). O resultado pode ser observado na Figura 41.

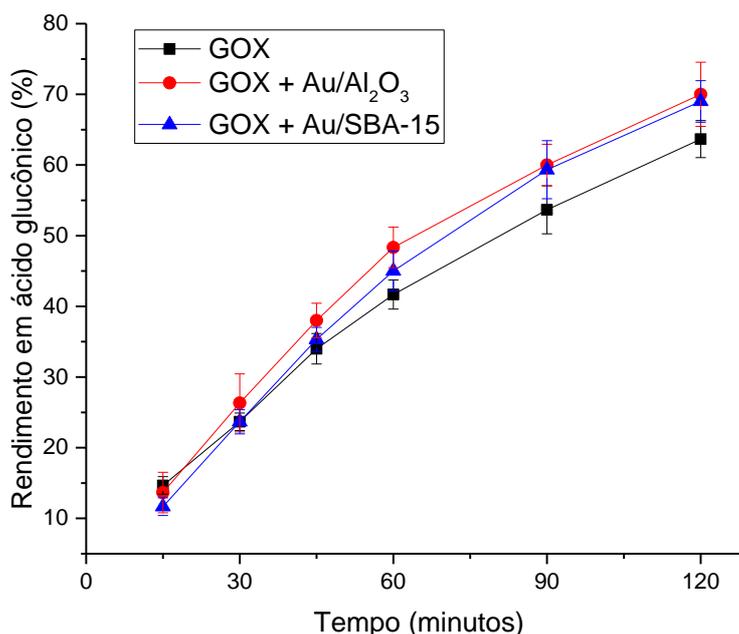


Figura 41 - Oxidação de glicose com glicose oxidase na ausência de catalisador (GOX), na presença de ouro suportado em alumina (GOX + Au/Al₂O₃) e na presença de ouro suportado em SBA-15. Condições experimentais: 30 °C, pH 7 controlado pela adição de NaOH, carga enzimática 31,2 U/mL, borbulhamento de O₂ a 60 mL/min.

Apesar da difícil reprodutibilidade da reação devido à necessidade de um controle rígido de pH e concentração de oxigênio dissolvido no meio, foi possível a realização de triplicatas com desvio-padrão aceitável, graças ao sistema operacional empregando um titulador automático e um dispersor de gases.

Em contradição com as conclusões relatadas por Taketoshi *et al.*, a presença de nanopartículas de ouro não influenciou significativamente o rendimento da reação. Levando em consideração o pequeno aumento no rendimento da reação na presença de Au/Al₂O₃, relatado por Taketoshi *et al.*, de 6% quando comparado com GOX apenas, os resultados são compatíveis com os obtidos na Figura 41, em torno de 6,5% de diferença. Logo, indica se tratar de uma questão de reprodutibilidade dos resultados e, portanto, não se pode afirmar que as nanopartículas de ouro exercem uma influência positiva no rendimento da oxidação, uma vez que os resultados da Figura 41 podem ser considerados iguais, por estarem contidos na faixa de erro.

5.3 HIDRÓLISE DE CELOBIOSE E OXIDAÇÃO DE GLICOSE *ONE-POT*

Foi avaliada a viabilidade de realizar as reações de hidrólise e oxidação de glicose *one-pot*, ou seja, com as duas enzimas, β -glucosidase e glicose oxidase, agindo simultaneamente no mesmo meio reacional. Para tal, foram empregadas, primeiramente, as duas enzimas na forma solúvel, e celobiose como substrato. A reação ocorreu durante 16 horas em um sistema alimentado por uma vazão de oxigênio de $60 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com temperatura controlada em $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 5. O resultado está apresentado na Figura 42.

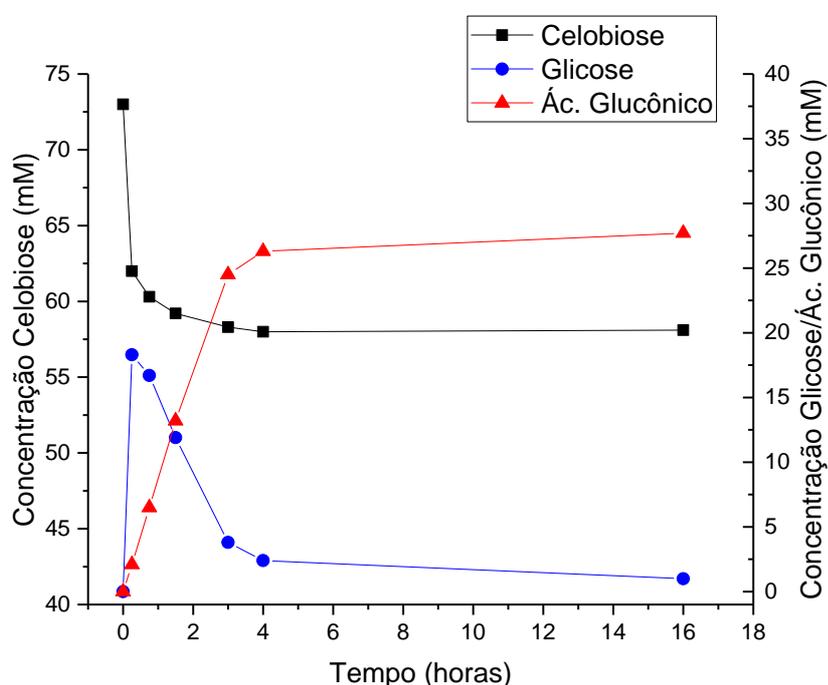


Figura 42 - Reação *one-pot* de hidrólise e oxidação. Condições: $40 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5, borbulhamento de O_2 a $60 \text{ mL}/\text{min}$ e carga enzimática de 60 e $1600 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ de celobiose para β -glucosidase e glicose oxidase, respectivamente.

A hidrólise de celobiose a glicose ocorreu majoritariamente nos primeiros 15 minutos de reação. Observando a concentração de celobiose ao longo da reação, nota-se que a hidrólise cessou nas primeiras horas e a conversão máxima não excedeu os 21%. Por sua vez, a glicose formada foi quase que 100% convertida a ácido glucônico em menos de 4 horas de reação. Ao final, foi obtido um rendimento de 19% em ácido glucônico em relação à celobiose. O resultado indica que a hidrólise seria a etapa limitante, porém, 16 horas nas dadas condições seriam suficientes para atingir conversões próximas a 100% em uma hidrólise convencional. Vale ressaltar que foi obtido resultado similar quando β -glucosidase imobilizada é utilizada.

Devido aos indícios de que o produto de oxidação de glicose poderia acarretar na inibição da β -glucosidase e, por isso, ser o principal motivo pelo qual não foram alcançadas conversões satisfatórias na reação de hidrólise, foram adicionados 50mM de ácido glucônico a uma solução 25 g.L⁻¹ de celobiose contendo β -glucosidases livres (2 g.L⁻¹) e deixado sob agitação durante 24 horas a uma temperatura de 50 °C e pH 5. Ao final, não foi detectada glicose na análise cromatográfica, confirmando que o ácido glucônico seria um potencial inibidor da β -glucosidase.

5.4 VIABILIDADE DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA *ONE-POT* COM HIDROGENAÇÃO DE GLICOSE

Uma vez que a oxidação *one-pot* da glicose produzida via hidrólise não se mostrou viável, ou de solução complexa de engenharia de reatores, devido a problemas de inibição da β -glucosidase, foram realizados experimentos visando à hidrogenação *one-pot* de glicose para produzir sorbitol.

Para avaliar a existência de efeitos inibitórios causados pelos produtos de hidrogenação de glicose sobre a β -glucosidase, foram realizadas reações de hidrólise, pH 5 e 50 °C, adicionando diferentes concentrações de sorbitol e celobitol ao meio reacional. O resultado está apresentado na Figura 43.

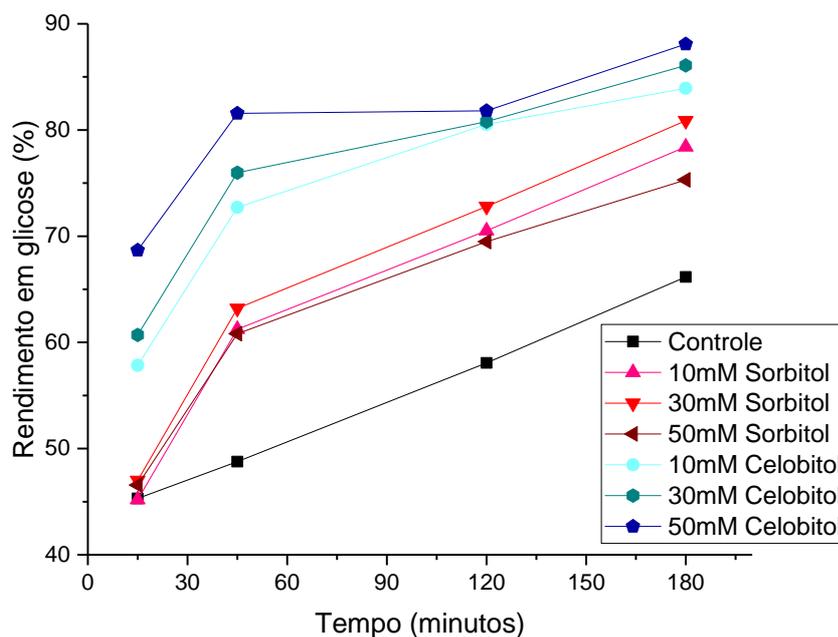


Figura 43 - Efeitos da adição de sorbitol e celobitol na hidrólise de celobiose.

Não foi observado nenhum efeito inibitório tanto para o sorbitol como para o celobitol, mas sim, um efeito promotor em ambos os casos. Com a adição de 10 a 50mM de sorbitol, o rendimento em glicose foi de 12 a 15% maior a partir dos 45 minutos de hidrólise, quando comparado com o controle. No caso do celobitol, logo nos primeiros 15 minutos o rendimento foi de 12 a 23% maior, de acordo com a concentração adicionada. Uma possível explicação para esse fenômeno seria a estabilização da β -glucosidase pela adição de sorbitol e celobitol. O chamado efeito protetor dos polióis foi reportado em outros trabalhos na literatura, como no trabalho de Pereira Jr. *et al.*¹¹⁷, onde foi relatado um aumento da estabilidade térmica de xilanases de *Aspergillus Awamori* com a adição de sorbitol e xilitol. Essas enzimas apresentaram um aumento em sua atividade residual depois de incubadas em temperaturas elevadas na presença de diferentes concentrações dos álcoois de açúcar.

Além disso, foi possível observar que, diferentemente de celobiose e ácido celobiônico, a β -glucosidase não é capaz de hidrolisar celobitol em sorbitol, como pode ser visto na sobreposição dos cromatogramas na Figura 44, embora seja uma enzima capaz de quebrar ligações do tipo β -1-4. Para confirmação, uma solução estoque de β -glucosidase foi adicionada a uma solução 50mM de celobitol e deixada sob agitação por 8 horas a 50 °C e pH 5. Não foi observada conversão.

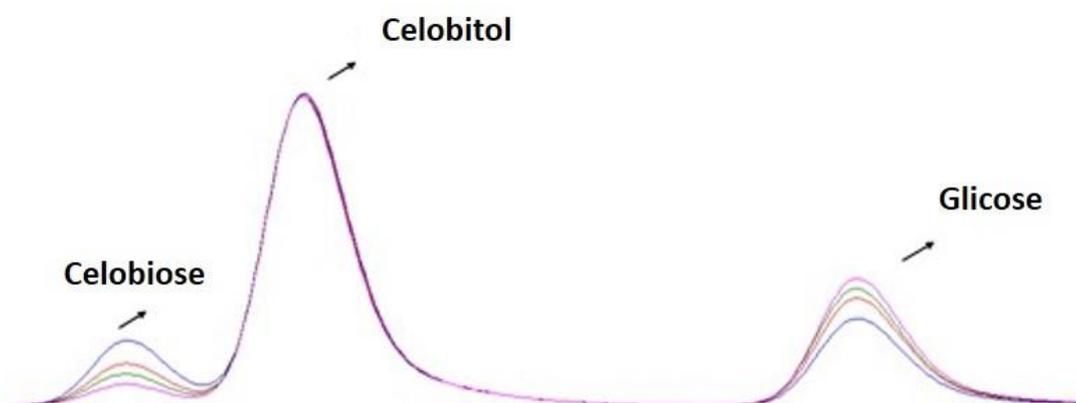


Figura 44 - Sobreposição dos cromatogramas de hidrólise de celobiose na presença de celobitol, em 15, 30, 120 e 180 minutos de reação.

Posteriormente, foi avaliada a compatibilidade da β -glucosidase, na forma solúvel, com altas pressões de hidrogênio, cujos resultados estão apresentados na Figura 45. As reações foram realizadas em um reator Parr durante 3 horas, primeiramente sem adição de gases e, em seguida, em atmosfera de 40 bar de hidrogênio. O pH e temperatura foram mantidos em 5 e 50 °C, respectivamente.

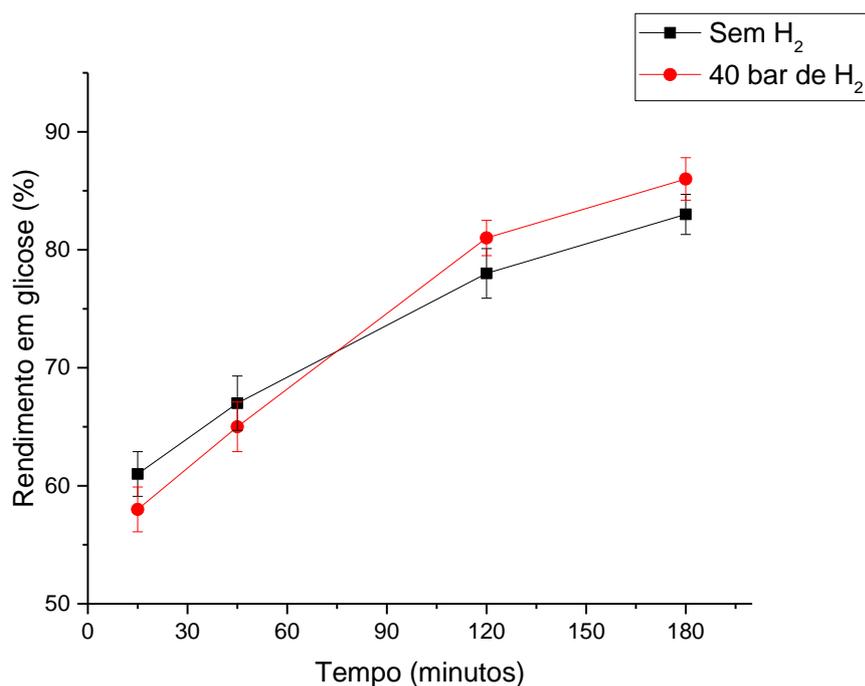


Figura 45 - Hidrólise de celobiose em reator Parr a 50 °C, pH 5, sem hidrogênio e com 40 bar de pressão de hidrogênio.

Tanto nos primeiros minutos de reação como nas últimas horas, não foi observada nenhuma influência, positiva ou negativa, da presença de hidrogênio no rendimento da hidrólise, indicando que a aplicação de altas pressões de hidrogênio visando a obter produtos de hidrogenação pode ser viável.

Por fim, foi realizada hidrólise no reator Parr empregando β -glucosidase livre e partículas de rutênio suportadas em carvão e 40 bar de hidrogênio, a 50 °C e pH 5. O resultado está apresentado na Figura 46.

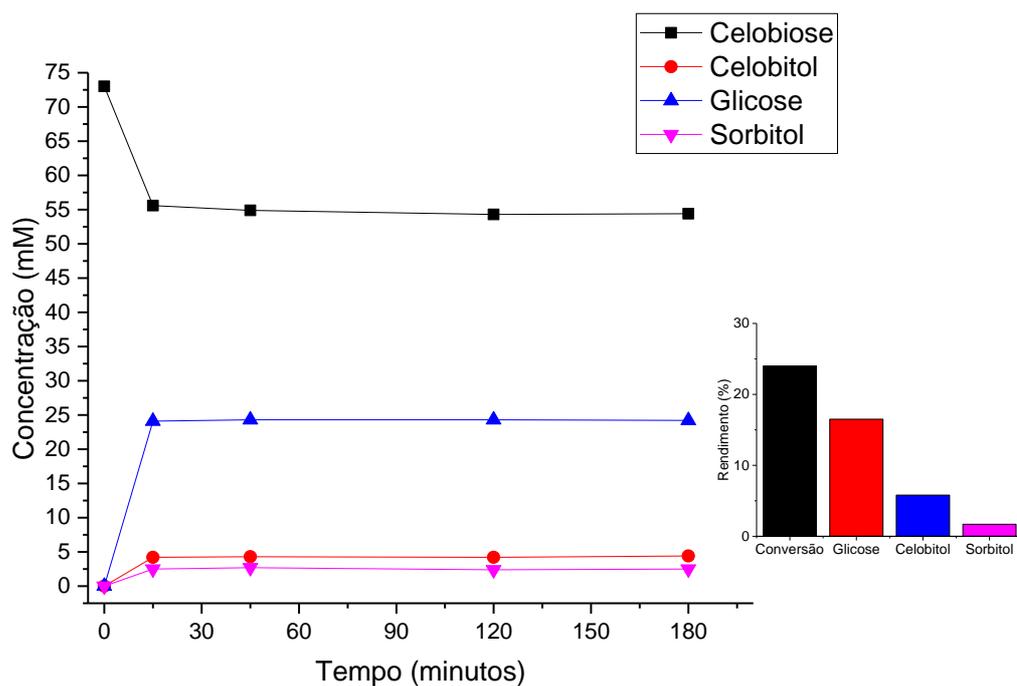


Figura 46 - Reação *one-pot* de hidrólise e hidrogenação. Condições: 50 °C, pH 5, 40 bar de hidrogênio, β -glucosidase 80mg.g⁻¹ de celobiose.

Nos primeiros 15 minutos de reação é possível observar uma conversão 24%, sendo 16,5% de rendimento a glicose, 5,8% a celobitol e 1,7% a sorbitol. No entanto, não foi observada nenhuma evolução nas demais horas, indicando, provavelmente, que houve desativação da β -glucosidase devido ao contato com as partículas de rutênio e vice-versa. A mesma reação foi realizada com β -glucosidase imobilizada em nanosilicalita e MSNS e nenhuma diferença foi observada. Aparentemente, uma possível solução seria a deposição de partículas de rutênio em uma estrutura microporosa, de forma a evitar o contato entre a enzima e o catalisador metálico.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a nanosilicalita, uma estrutura análoga às zeólitas de pequeno tamanho de partícula, foi capaz de reter 63% da atividade enzimática disponível para imobilização. Apesar do rendimento de imobilização superior no caso da MSNS, a atividade recuperada foi de apenas 44%. Esses são fortes indícios de que a β -glucosidase se mantém mais ativa quando imobilizada apenas na área externa do suporte, uma vez que o tamanho de poro da nanosilicalita é significativamente menor que o diâmetro aproximado da enzima. A MSNS, apesar de possuir tamanho de partícula bastante similar à nanosilicalita, apresenta poros suficientemente grandes e acessíveis à enzima. Uma análise da literatura indica que este parece ser o primeiro trabalho de imobilização de β -glucosidase em uma nano zeólita já reportado. Além disso, os testes de reciclo mostraram que o biocatalisador é estável nas condições operacionais e pode ser recuperado e reutilizado sem grande perda de atividade.

Foi também estudada a influência das condições de funcionalização com glutaraldeído para entender quais variáveis seriam mais importantes visando a maximizar a atividade enzimática durante o processo de imobilização. Entre as variáveis avaliadas, o pH do processo de funcionalização não se mostrou significante na faixa estudada. Por outro lado, o tempo de funcionalização e a concentração de glutaraldeído apresentaram uma influência importante na atividade enzimática final. Qualitativamente, foi possível observar que elevadas concentrações de glutaraldeído acarretaram um fenômeno de aglomeração das partículas do suporte, causado por ligações cruzadas entre essas partículas e diminuindo, portanto, a área disponível para imobilização.

Foi constatado que a diferença no rendimento da oxidação, com os catalisadores de ouro e na ausência dos mesmos, seria muito pequena, estando contida na faixa de erro experimental. Além disso, foram combinadas as reações de hidrólise de celobiose e oxidação de glicose, ambas enzimáticas, no mesmo meio reacional. As condições reacionais foram ajustadas de modo a atender a faixa operacional das duas enzimas empregadas. Entretanto, o

rendimento da reação se mostrou relativamente baixo para produção de ácido glucônico. Além disso, foi observada a conversão quase que completa do intermediário de reação, a glicose, indicando que a etapa limitante seria a reação de hidrólise. A hidrólise enzimática de celobiose em meio reacional contendo 50mM de ácido glucônico indicou que o ácido glucônico seria inibidor da enzima β -glucosidase.

Confirmou-se o desempenho da β -glucosidase na presença de sorbitol e celobitol, e concluiu-se que estes não teriam um efeito inibidor mas, sim, estabilizador sobre a enzima. Em seguida foi avaliado se altas pressões de hidrogênio teriam efeito deletério sobre a β -glucosidase, mas nenhuma alteração na atividade enzimática foi percebida. Finalmente, foi empregado catalisador comercial de rutênio suportado em carvão para produção de sorbitol *one-pot* com hidrólise enzimática de celobiose, porém, a β -glucosidase apresentou uma queda de atividade significativa na presença do catalisador de rutênio, e vice-versa, indicando uma incompatibilidade da enzima com o catalisador metálico.

6.2 SUGESTÕES

É recomendado que, em trabalhos futuros envolvendo a avaliação de suportes e condições para imobilização de β -glucosidase ou outras enzimas, sejam estudadas as interações entre as variáveis de funcionalização, como tempo e concentração, com o tipo de suporte utilizado. Mais ainda, recomenda-se um estudo mais abrangente, envolvendo outros suportes com características distintas, de forma a melhor avaliar a influência de cada propriedade desses suportes. Em relação à viabilização de reações *one-pot* envolvendo enzimas, é altamente recomendado que se busquem soluções de engenharia de reatores para contornar problemas como a inibição pelo produto, por exemplo, empregando-se reatores de membrana. No que diz respeito à incompatibilidade da β -glucosidase com catalisadores de rutênio, é sugerida a deposição de partículas de rutênio em um suporte com tamanho de poro menor que o diâmetro da β -glucosidase, ou qualquer solução visando a prevenir o contato enzima-metal.

REFERÊNCIAS

1. TAKETOSHI, A. *et al.* Synergetic combination of an enzyme and gold catalysts for glucose oxidation in neutral aqueous solution. **Applied Catalysis A: General**, v. 468, p. 453-458, 2013.
2. GOLDSTEIN, I. S. **Organic chemicals from biomass**. CRC Press Boca Raton, FL, 1981.
3. DOS SANTOS, D. D. S. *et al.* Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 93-105, 2010.
4. SHLESER, R. Ethanol production in Hawaii. **Department of Business, Economic Development, and Tourism, Honolulu, HI**, 1994.
5. BORGES, E. **Desenvolvimento de um processo biotecnológico para a produção de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes***: Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos 2011.
6. SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
7. JACQUET, N. **Les produits lignocellulosiques comme source de biocarburants de deuxième génération dans un concept de bioraffinage**. Conference Energy Mons 2008.
8. FRENCH, A. D. Combining computational chemistry and crystallography for a better understanding of the structure of cellulose. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, v. 67, p. 20, 2012.
9. RIBET, J. **Fonctionnalisation des excipients : Application à la comprimabilité des celluloses et des saccharoses**: Université de Limoges 2003.
10. PÉREZ, S.; SAMAIN, D. Structure and engineering of celluloses. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, v. 64, p. 25-116, 2010.
11. RUEL, K.; NISHIYAMA, Y.; JOSELEAU, J.-P. Crystalline and amorphous cellulose in the secondary walls of Arabidopsis. **Plant science**, v. 193, p. 48-61, 2012.
12. PAQUOT, M. **Possibilités de développement de l'utilisation de la cellulose**: Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux 1980.
13. CZIHAK, C. *et al.* Dynamics of water adsorbed to cellulose. **Physica B: Condensed Matter**, v. 266, n. 1, p. 87-91, 1999.
14. GÍRIO, F. M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

15. VANDERGHEM, C. *et al.* Impact of formic/acetic acid and ammonia pre-treatments on chemical structure and physico-chemical properties of *Miscanthus x giganteus* lignins. **Polymer degradation and stability**, v. 96, n. 10, p. 1761-1770, 2011.
16. CGEE. **Química Verde no Brasil: 2010 - 2030**. 2010.
17. PEREIRA JR, N.; COUTO, M.; SANTA ANNA, L. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, v. 2, p. 2-45, 2008.
18. SOUSA-AGUIAR, E. F. *et al.* Some important catalytic challenges in the bioethanol integrated biorefinery. **Catalysis Today**, v. 234, p. 13-23, 2014.
19. SOUSA-AGUIAR, E. F. *et al.* Petrobras: The Concept of Integrated Biorefineries Applied to the Oleochemistry Industry: Rational Utilization of Products and Residues via Catalytic Routes. In: (Ed.). **Industrial Biorenewables**: John Wiley & Sons, Inc., 2016. p.451-465. ISBN 9781118843796.
20. BANERJEE, S. *et al.* Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 1, p. 77-93, 2010.
21. MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.
22. ZHANG, Y. H. P. *et al.* Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 214-223, 2007.
23. SILLS, D. L.; GOSSETT, J. M. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1389-1398, 2011.
24. PAPTATHEOFANOUS, M. *et al.* Two-stage acid-catalyzed fractionation of lignocellulosic biomass in aqueous ethanol systems at low temperatures. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 3, p. 305-310, 1995.
25. ZHAO, H. *et al.* Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 1, p. 47-54, 2009.
26. BINDER, J. B.; RAINES, R. T. Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4516-4521, 2010.
27. ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International journal of agricultural and biological engineering**, v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.

28. ZHU, S. *et al.* Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Biosystems engineering**, v. 93, n. 3, p. 279-283, 2006.
29. OKANO, K. *et al.* Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. **Animal feed science and technology**, v. 120, n. 3, p. 235-243, 2005.
30. TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.
31. PEREIRA JR, N. **Lignocellulosic Biorefinery: Trends and Challenges**. . Industrial Symbiosis using Renewable Resources. Ghent, Bélgica 2016.
32. CLOUTHIER, C. M.; PELLETIER, J. N. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1585-1605, 2012.
33. SOLANO, D. M. *et al.* Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource technology**, v. 115, p. 196-207, 2012.
34. GOKHALE, A. A.; LEE, I. Cellulase Immobilized Nanostructured Supports for Efficient Saccharification of Cellulosic Substrates. **Topics in Catalysis**, v. 55, n. 16-18, p. 1231-1246, 2012.
35. VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.
36. MEDVE, J. *et al.* Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. **Biotechnology and bioengineering**, v. 59, n. 5, p. 621-634, 1998.
37. MOREIRA, N. Growing expectations: new technology could turn fuel into a bumper crop. **Science news**, v. 168, n. 14, p. 218-220, 2005.
38. TU, M.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 2, p. 398-406, 2007.
39. SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.
40. TEERI, T. T. *et al.* Domain function in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases. **Journal of biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 169-176, 1992.
41. KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 255-261, 1987.

42. WYMAN, C. **Handbook on bioethanol: production and utilization**. CRC press, 1996. ISBN 1560325534.
43. ZHANG, Y.-H. P. *et al.* A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 2, p. 644-648, 2006.
44. ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1, 2010.
45. ZHANG, C.; XING, X.-H.; LIU, M.-S. Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. **Biochemical engineering journal**, v. 19, n. 2, p. 181-187, 2004.
46. AWAFO, V. A. *et al.* Production of cellulase systems by selected mutants of *Trichoderma reesei* in solid-state fermentation and their hydrolytic potentials. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 461-470, 1996.
47. WOODWARD, J. Synergism in cellulase systems. **Bioresource technology**, v. 36, n. 1, p. 67-75, 1991.
48. DASHTBAN, M. *et al.* Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 302-309, 2010.
49. WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I.; BHAT, K. M. The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. **Biochemical Journal**, v. 260, n. 1, p. 37-43, 1989.
50. TAN, I. S.; LEE, K. T. Immobilization of beta-glucosidase from *Aspergillus niger* on kappa-carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue. **Bioresour Technol**, v. 184, p. 386-94, 2015.
51. KARAGULYAN, H. K.; GASPARYAN, V. K.; DECKER, S. R. Immobilization of fungal β -glucosidase on silica gel and kaolin carriers. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 146, n. 1-3, p. 39-47, 2008.
52. ALFTREN, J.; HOBLEY, T. J. Covalent immobilization of beta-glucosidase on magnetic particles for lignocellulose hydrolysis. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 169, n. 7, p. 2076-87, 2013.
53. JAVED, M. R. *et al.* Cost-efficient entrapment of beta-glucosidase in nanoscale latex and silicone polymeric thin films for use as stable biocatalysts. **Food Chem**, v. 190, p. 1078-85, 2016.

54. FIGUEIRA JDE, A. *et al.* Screening of Supports for the Immobilization of beta-Glucosidase. **Enzyme Res**, v. 2011, p. 642460, 2011.
55. BURTIS, C. A.; GEARY, T. Glossary of bioanalytical nomenclature-Part 1: General terminology, body fluids, enzymology, immunology (IUPAC Recommendations 1994). **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 2587-2604, 1994.
56. SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.
57. CIPOLATTI, E. P. *et al.* Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56-67, 2014.
58. MAGNER, E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6213-6222, 2013.
59. HARTMANN, M.; JUNG, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 844-857, 2010.
60. LIU, Y.; HUA, X. Production of biodiesel using a nanoscaled immobilized lipase as the catalyst. **Catalysis letters**, v. 144, n. 2, p. 248-251, 2014.
61. TRAN, C. T. *et al.* CelB and β -glucosidase immobilization for carboxymethyl cellulose hydrolysis. **RSC Advances**, v. 3, n. 45, p. 23604-23611, 2013.
62. ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Recent progress in biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts. **Topics in Catalysis**, v. 55, n. 16-18, p. 1081-1100, 2012.
63. LAVEILLE, P. *et al.* Hemoglobin immobilized on mesoporous silica as effective material for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons pollutants from water. **New Journal of Chemistry**, v. 34, n. 10, p. 2153-2165, 2010.
64. FALK, M. *et al.* Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 37, n. 1, p. 38-45, 2012.
65. KRISHNAN, S.; ARMSTRONG, F. A. Order-of-magnitude enhancement of an enzymatic hydrogen-air fuel cell based on pyrenyl carbon nanostructures. **Chemical Science**, v. 3, n. 4, p. 1015-1023, 2012.
66. SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem Soc Rev**, v. 42, n. 15, p. 6223-35, 2013.
67. PYESHKOVA, V. N. *et al.* Application of silicalite for improvement of enzyme adsorption on the stainless steel electrodes. **Biopolymers and Cell**, v. 30, n. 6, p. 462-468, 2014.

68. HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas—benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6277-6289, 2013.
69. DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
70. ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139-94, 2014.
71. MORALES-SANFRUTOS, J. *et al.* Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 8, n. 3, p. 667-675, 2010.
72. WANG, P. *et al.* Influence of silica-derived nano-supporters on cellobiase after immobilization. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 158, n. 1, p. 88-96, 2009.
73. HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 45, p. 8582-8594, 2008.
74. BISSETT, F.; STERNBERG, D. Immobilization of *Aspergillus* beta-glucosidase on chitosan. **Applied and environmental microbiology**, v. 35, n. 4, p. 750-755, 1978.
75. TU, M. *et al.* Immobilization of beta-glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnol Lett**, v. 28, n. 3, p. 151-6, 2006.
76. GÓMEZ, J. M. *et al.* Immobilization and enzymatic activity of β -glucosidase on mesoporous SBA-15 silica. **Journal of Porous Materials**, v. 17, n. 6, p. 657-662, 2009.
77. VERMA, M. L. *et al.* Immobilization of beta-glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis. **Bioresour Technol**, v. 135, p. 2-6, 2013.
78. BORGES, D. G. *et al.* Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized beta-glucosidase. **Bioresour Technol**, v. 167, p. 206-13, 2014.
79. HATZINIKOLAOU, D.; MACRIS, B. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 6, p. 530-534, 1995.
80. HATZINIKOLAOU, D. *et al.* A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 371-381, 1996.
81. ERYOMIN, A. *et al.* Quartz sand as an adsorbent for purification of extracellular glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 151-157, 2004.

82. PETRUCCIOLI, M. *et al.* Enhancement of glucose oxidase production by *Penicillium variabile* P16. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 7, p. 397-401, 1999.
83. MIRÓN, J. *et al.* Diauxic production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture: A dynamic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 615-620, 2002.
84. BANKAR, S. B. *et al.* Glucose oxidase--an overview. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 4, p. 489-501, 2009.
85. HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.
86. ZHAO, F. *et al.* Co-immobilization of multi-enzyme on control-reduced graphene oxide by non-covalent bonds: an artificial biocatalytic system for the one-pot production of gluconic acid from starch. **Green Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 2558, 2014.
87. ZHANG, J. *et al.* Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6083-6085, 2010.
88. ALWARAPPAN, S. *et al.* Enzyme-doped graphene nanosheets for enhanced glucose biosensing. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 30, p. 12920-12924, 2010.
89. ZENG, Q. *et al.* Self - Assembled Graphene–Enzyme Hierarchical Nanostructures for Electrochemical Biosensing. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 19, p. 3366-3372, 2010.
90. MAFRA, A. C. *et al.* Gluconic acid production from sucrose in an airlift reactor using a multi-enzyme system. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, n. 4, p. 671-80, 2015.
91. GITIRANA, L. L. **Avaliação do Processo de Extração Líquido- Líquido com a Adição de Sais para Recuperação e Purificação de Ácidos Orgânicos.**: FEQ, UNICAMP 2007.
92. RAMACHANDRAN, S. Gluconic Acid: A Review, Food Technol. Biotechnol. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, n. 2, p. 185-195, 2006.
93. FSA. Current EU approved additives and their E Numbers. <http://www.food.gov.uk/science/additives/enumberlist>, 2014.
94. ANVISA. Resolução no 386, de 05 de agosto de 1999. http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0556e3004745787485bdd53fbc4c6735/R ESOLUCAO_386_1999.pdf?MOD=AJPERES, 1999.
95. CURRIE, J. N.; KANE, J. H.; ALEXANDER, F. **Process for producing gluconic acid by fungi**: Google Patents 1933.
96. MOYER, A. *et al.* Gluconic acid production. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 777-781, 1937.

97. PORGES, N.; CLARK, T.; GASTROCK, E. Gluconic acid production. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 107-111, 1940.
98. J, M. A. **Process for gluconic acid production**: Google Patents 1944.
99. BLOM, R. *et al.* Sodium gluconate production. Fermentation with *Aspergillus niger*. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 435-440, 1952.
100. MURZIN, D.; SIMAKOVA, O. **Biomass Sugars for Non-fuel Applications**. Royal Society of Chemistry, 2015. ISBN 1782622071.
101. GERICKE, D. *et al.* Green catalysis by nanoparticulate catalysts developed for flow processing? Case study of glucose hydrogenation. **RSC Advances**, v. 5, n. 21, p. 15898-15908, 2015.
102. DAVIS, T. M. *et al.* Mechanistic principles of nanoparticle evolution to zeolite crystals. **Nat Mater**, v. 5, n. 5, p. 400-8, 2006.
103. ZHAO, D. *et al.* Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 24, p. 6024-6036, 1998.
104. SPONCHIA, G. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles with tunable pore size for tailored gold nanoparticles. **Journal of nanoparticle research**, v. 16, n. 2, p. 1, 2014.
105. LEE, B. *et al.* Influences of synthesis conditions and mesoporous structures on the gold nanoparticles supported on mesoporous silica hosts. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 122, n. 1-3, p. 160-167, 2009.
106. WERPY, T. *et al.* **Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas**: Department of Energy Washington DC 2004.
107. XU, L. *et al.* Combination of Enzyme and Ru-B Amorphous Alloy Encapsulated in Yolk-Shell Silica for One-Pot Dextrin Conversion to Sorbitol. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 1, p. 251-258, 2014.
108. GUNDA, N. S. K. *et al.* Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. **Applied Surface Science**, v. 305, p. 522-530, 2014.
109. CAI, Q. *et al.* Dilute solution routes to various controllable morphologies of MCM-41 silica with a basic medium. **Chemistry of materials**, v. 13, n. 2, p. 258-263, 2001.
110. NOONEY, R. I. *et al.* Synthesis of nanoscale mesoporous silica spheres with controlled particle size. **Chemistry of materials**, v. 14, n. 11, p. 4721-4728, 2002.

111. BARROS, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. Planejamento e otimização de experimentos: Metodologia de superfície de resposta. **Planejamento e otimização de experimentos: Metodologia de superfície de resposta**, 1995.
112. IVETIC, D.; SRDIC, V.; ANTOV, M. Immobilization of β -glucosidase onto mesoporous silica support: Physical adsorption and covalent binding of enzyme. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 79, n. 5, p. 533-543, 2014.
113. WANG, L. *et al.* Optimal immobilization of β -glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 6, 2013.
114. SINGH, R. K. *et al.* Covalent immobilization of beta-1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, n. 2, p. 337-44, 2011.
115. LEE, C.-H.; LIN, T.-S.; MOU, C.-Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. **Nano Today**, v. 4, n. 2, p. 165-179, 2009.
116. WANG, S. *et al.* Immobilization of cellulase on polyamidoamine dendrimer-grafted silica. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 35-40, 2013.
117. LEMOS, J. L. S. *et al.* Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 205-210, 2000.



Nanosilicalites as Support for β -Glucosidases Covalent Immobilization

Y. Carvalho¹ · J. M. A. R. Almeida¹ · P. N. Romano¹ ·
K. Farrance² · P. Demma Carà² · N. Pereira Jr¹ ·
J. A. Lopez-Sanchez² · E. F. Sousa-Aguilar¹

Received: 27 October 2016 / Accepted: 20 January 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Many different materials have been tested for β -glucosidases immobilization. Such materials, however, often show a poor activity related to a low surface area of the support or even enzyme hindrance caused by entrapment inside porous matrix. In this context, the use of nanosized zeolites as enzymes support is quite new and may be an interesting alternative. The present work evaluates the immobilization of β -glucosidases in nanosized silicalites by covalent coupling. The new biocatalyst was able to convert 100% of cellobiose into glucose in 18 h at 50 °C and pH 5, retaining 85% of its activity after five cycles of reuse. A detailed investigation of the published literature indicates that, apparently, this is the first work concerning the immobilization of β -glucosidases on nanosized zeolites ever reported.

Keywords Enzymes · Immobilization · Zeolites · Cellobiose · Silicalite · β -glucosidase

Introduction

Fine chemicals from biomass have gained attention in the past few years as an alternative to fossil feedstock. Enzymatic hydrolysis is an interesting approach for dealing with cellulosic biomass conversion since it takes place under mild conditions, diminishing the energy consumption when comparing with chemical processes. Nevertheless, enzyme cost has been an issue, since recycling of free enzymes is not possible industrially. For that reason, enzyme immobilization has emerged as an alternative for improving enzyme recyclability. Moreover,

✉ N. Pereira, Jr
nei@eq.ufjf.br

¹ Postgraduate Program in Technology of Chemical and Biochemical Processes, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, Brazil

² MicroBioRefinery Facility, Stephenson's Institute for Renewable Energy, Department of Chemistry, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZD, UK

enzymes have the advantage of being highly selective, avoiding the formation of undesirable co-products [22]. Toxic substances are commonly found as a residue of chemical hydrolysis, which is not the case for enzymatic hydrolysis [13].

The conversion of cellulose into glucose requires the use of enzymatic pools, mainly composed of exo-glucanases, endo-glucanases, β -glucosidases, and accessory proteins, such as swolleins [1, 12]. These enzymes are capable of hydrolysing the 1,4- β -glycosidic bond between glucose molecules, but they differ in their starting point and substrate when hydrolysing cellulose. Endo-glucanases cleave the internal bonds of cellulose fibers producing cellodextrins; exo-glucanases act on the side chains of cellulose to give cellobiose; whereas β -glucosidases are responsible for hydrolysing cellobiose molecules and soluble oligosaccharides into glucose. β -glucosidases plays an important role in cellulose hydrolysis. These enzymes are responsible for avoiding the accumulation of cellobiose, which is an inhibitor of the cellobiohydrolases, in the reaction medium [2, 6, 23]. For this reason, commercial preparations of cellulases are usually supplemented with additional β -glucosidases [6, 13, 14, 21].

Methods of enzyme immobilization include entrapment in a porous support, enzyme cross-linking, and covalent binding. Covalent immobilization has the advantage of forming strong bonds between enzyme and carrier, avoiding enzyme leaching. However, the number of commercial materials for covalent immobilization is small when compared with enzyme adsorbents [17, 24].

In biomass conversion, accessibility is a key parameter, as many bioderived molecules, such as cellulose, starch, and xylan, are bulky and cannot access porous matrix of zeolites. In order to surpass this problem, many studies propose the use of nano-supports for reactions in which a high external surface area is required [8]. In the case of enzymatic hydrolysis using immobilized enzymes, the bulky substrate cannot access entrapped enzymes in porous matrix [16]. Furthermore, the covalent immobilization of enzyme in porous materials such as mesoporous silicas can lead to pore blockages as a consequence of enzyme aggregates forming inside pores [7].

Motivated by the potential of nanosized zeolites for enzyme immobilization, this work evaluates the performance of nanosilicalites as support for β -glucosidases immobilization, to enhance the hydrolysis of cellobiose into glucose. The selected support has a small particle size with a microporous structure, which would prevent the enzyme accessing the pores. Therefore, the hydrolysis takes place on the external surface of the catalyst and no enzyme is trapped inside the pores.

Materials and Methods

Tetraethyl orthosilicate (TEOS) (98%), tetrapropylammonium hydroxide solution (TPAOH) (20%), (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) (99%), glutaraldehyde solution (25%), β -glucosidase from almonds, and cellobiose were purchased from Sigma-Aldrich.

Nanosilicalites Synthesis

The nanosilicalite was prepared according to the procedure described previously by Davis, T.M. et al. [3]. Briefly, 14 g of TPAOH 20% in water was added to 7.8 g of TEOS. The mixture was then stirred for 24 h at a room temperature, as an aging step. The molar gel composition was 2.68 SiO₂: 1 TPAOH: 168 H₂O. For the crystallization, the mixture was transferred to a sealed Teflon-lined autoclave and heated in a conventional oven for 24 h at 100 °C. The

product was recovered by centrifugation at 20,000 rpm for 1 h and washed several times with deionized water. This procedure was repeated until washing solution reached pH 7. The material was then dried overnight at 80 °C.

Functionalization of the Support

β -glucosidases were immobilized onto the support via covalent coupling using APTES and glutaraldehyde as linking agents. For introducing amino groups, the material (2 g) was refluxed in 100 ml of a 1% v/v APTES/toluene solution for 3 h. The material was then centrifuged, in toluene resistant TFE/PTFE Nalgene® Oak Ridge centrifuge tubes, at 20,000 \times g for 30 min and washed three times with toluene. The material was then dried in a Genevac evaporator EZ-2 Plus and stored at inert atmosphere.

For the second functionalization step, amino functionalized nanosilicalite (40 mg) was placed in a vessel with 5 ml of a 2% v/v glutaraldehyde aqueous solution at vigorous stirring. After 24 h, the material was recovered by centrifugation at 4000 \times g for 5 min and washed several times with deionized water. Finally, the functionalized material was stored in acetate buffer, pH 5, at 4 °C.

Enzyme Immobilization

Immobilization of β -glucosidases was achieved by mixing the support (40 mg) with 5 ml of a 1 mg ml⁻¹ enzyme solution in acetate buffer (pH 5). The mixture was stirred vigorously in a New Brunswick™ Innova® 42 incubator shaker for 24 h. The solution was centrifuged at 4000 \times g and washed several times with distilled water/acetate buffer until the total protein concentration, according to the bicinchoninic acid (BCA) assay, was less than 1% of original solution. The immobilized enzyme was stored in acetate buffer (pH 5) at 4 °C.

Protein concentration was determined using a Pierce® BCA protein assay kit with reference to a calibration curve prepared with bovine serum albumin [9].

Calculation of Immobilization and Kinetic Parameters

The immobilization yield (*Y*) was calculated by the formula:

$$Y = \frac{P_0 - P}{P_0} \times 100\%$$

where P_0 is the total protein concentration of the enzyme stock solution used for immobilization and P is the total protein concentration of the supernatant recovered after immobilization step.

The recovered activity (*RA*) was calculated by:

$$RA = \frac{A_{IE}}{A_{FE}} \times 100\%$$

where A_{IE} is the activity of the immobilized enzyme and A_{FE} is the activity of the free enzyme assayed using the original amount of enzyme in the stock solution available for immobilization. The activity is the rate of glucose formation (mmol l⁻¹ min⁻¹) measured by assaying the enzyme for cellobiose hydrolysis for 30 min at 50 °C and pH 5.

The effect of substrate concentration in the free and immobilized β -glucosidase activity was tested in different concentrations of cellobiose. The assay was performed at 50 °C and at pH 5.

The K_M (Michaelis constant) and V_{MAX} (maximum reaction rate) were determined by Lineweaver-Burk linearization.

Immobilized Enzyme Assay and Characterization

The immobilized enzyme was suspended in a substrate/buffer solution, and the reaction was performed in the New Brunswick™ Innova® 42 incubator shaker. A 25 g l^{-1} cellobiose aqueous solution (5 ml) was used as substrate. The stirring rate was set as 400 rpm, to guarantee that no diffusional limitations were taking place during hydrolysis. Glucose was quantified by HPLC coupled with a diode array detector (DAD), a refractive index detector (RID), and an Aminex-HPX-87H column with a H_2SO_4 (25 mmol l^{-1}) eluent.

Effect of pH on relative activity of β -glucosidase was investigated in the range of pH 3–8 for immobilized enzymes and free enzyme at a fixed temperature of 50°C . The effect of temperature on enzyme activity was also investigated in the range of 30 – 80°C for both free and immobilized β -glucosidase at pH 5. The enzymes were assayed for 30 min, and the maximum glucose formation rate ($\text{mmol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$) was considered as 100% starting activity and used as reference for determining relative activities. Moreover, a temperature stability test was done by incubating the free and immobilized enzyme at 80°C and collecting samples at different times for activity assaying. The starting activity was considered 100% and used as reference for determining remaining activity after incubation.

In addition, recycling tests were performed by centrifuging the catalyst at the end of each reaction. The catalyst was washed three times with acetate buffer before the immobilized enzyme was reused. The tests were carried out for 18 h, which is the time required for the reaction with the fresh catalyst to reach 100% yield of glucose.

Support Characterization

Powder X-ray diffraction patterns (PXRD) were recorded in transmission mode with a PANalytical X'Pert Pro HTS diffractometer.

TEM characterization was performed on the functionalized nanosilicalites using a JEOL JEM 2100 LaB6 instrument at 200 kV accelerating voltage. The samples were sonicated in methanol and supported on holey carbon film on gold grids (300 mesh). Particle size distribution was determined from 200 particles obtained from different images.

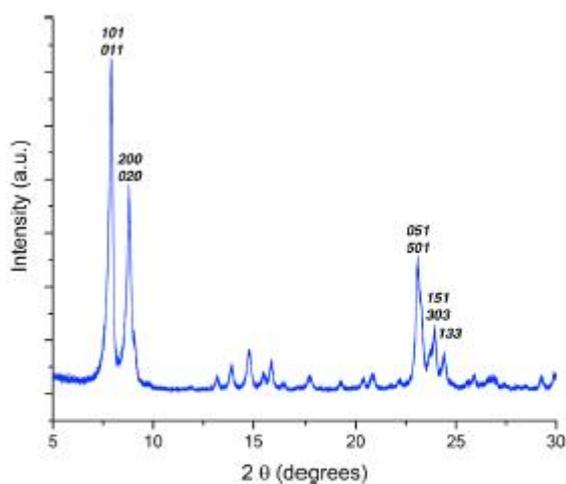
Results and Discussion

Support Characterization

The XRD pattern of the nanosilicalite sample is shown in Fig. 1. The pattern peaks correspond to those of the reference (JCPDS 73-6453) indicating MFI structure. No characteristic baseline deviations or broadening of the peaks, sometimes referred to as “halo”, has been observed in $2\theta = 20^\circ$ to 30° which is assigned to amorphous phase. Furthermore, very sharp peaks have been observed, as evidence that high crystallinity was obtained for the nanosilicalite.

Representative TEM micrograph of the functionalized nanosilicalite sample is shown in Fig. 2 and depicts uniform size nanocrystals mostly with spherical-shaped particles. The particle

Fig. 1 XRD pattern of the nanosilicalite

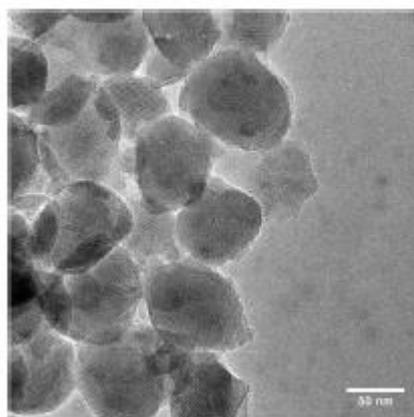


size distribution after analysis of 200 particles gives a diameter of 66.5 ± 14.6 nm. It is possible to see some aggregation of the particles due the functionalization steps. This is caused by cross-linking of the glutaraldehyde resulting in cluster formation and pore blockages [20].

Immobilization Results

Immobilization methods are classified into physical and chemical methods. Within these two categories, the immobilization methods can be further categorized as covalent immobilization, adsorption, cross-linking, and entrapment. Physical methods, as adsorption and entrapment, are the most general and widely used in enzyme immobilization due to its simplicity [5, 15]. Immobilization by covalent binding has the advantage of forming strong bonds between enzyme and support, which is an important feature for industrial applications. This method was chosen as being the most suitable for β -glucosidases immobilization. Figure 3 illustrates

Fig. 2 TEM image of the functionalized nanosilicalite



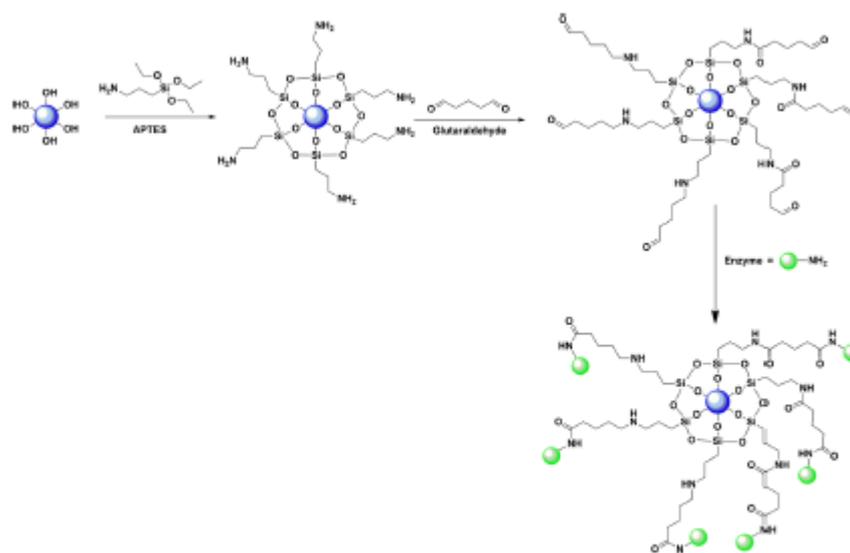


Fig. 3 Scheme of the functionalization and immobilization procedures

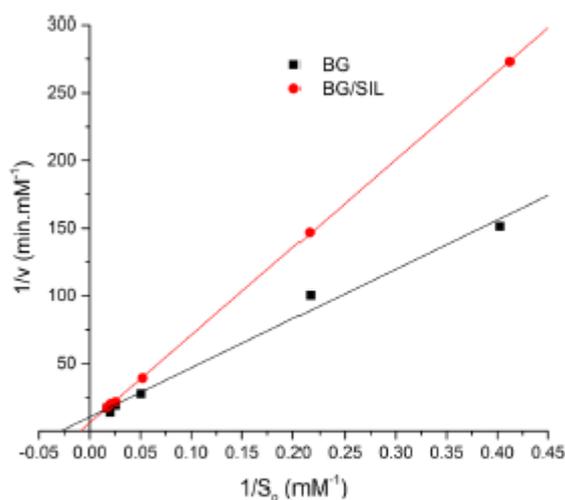
the procedure used for functionalizing the support and anchoring the enzyme. The long-arm ligand formed by the glutaraldehyde and APTES molecules provides mobility to the enzyme [25].

The immobilization yield and recovered activity for the immobilized β -glucosidases on nanosilicalites, named BG/SIL, are shown in Table 1. The immobilization yield represents the mass of enzyme from the original solution that remained anchored to the support after immobilization. It is important to observe that the anchored enzyme is not necessarily as active as the free enzyme. For this reason, recovered activity is also calculated. The immobilization yield determined was 57%, which is expected for immobilization by covalent binding since the proteins are firmly attached to the support. Despite the considerably high yield obtained in this work, previous glutaraldehyde based immobilization of β -glucosidase in the literature has shown lower yields of 32% [18]. The recovered activity of BG/SIL was 63%, which is high considering the immobilization method used. The activity of the covalent coupled enzyme can decrease due to conformational alterations in the active site caused by bonds formed between enzyme and support [11]. However, an increase in the enzyme activity after covalent immobilization has also been reported for β -glucosidase [18]. The explanation

Table 1 Kinetic and immobilization parameters

	Free BG	BG/SIL
K_M (mM)	35	106
V_{MAX} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	96	164
Immobilization yield (%)	–	57
Recovered activity (%)	–	63

Fig. 4 Lineweaver-Burk plot for both free and immobilized beta-glucosidase



for such synergy between enzyme and support is a better alignment of the active sites towards the reaction bulk making the enzyme more available for receiving the substrate molecules [18].

The kinetic parameters for both free and immobilized β -glucosidases, shown in Table 1, were determined through the Lineweaver-Burk method. The Lineweaver-Burk plot is shown in Fig. 4. The coefficient of determination, R^2 , was 0.9994 and 0.9999 for the free and immobilized β -glucosidase, respectively. The K_M of the immobilized enzyme increased threefold when compared to the free β -glucosidase, which is a clear indication that the immobilization decreased the apparent affinity of the enzyme ($1/K_M$) for the substrate.

Time online hydrolysis of cellobiose using immobilized β -glucosidases was performed in the incubator shaker for 18 h at 50 °C and pH 5, as seen in Fig. 5. The linear phase, where the rate of glucose formation is almost constant, takes place at the beginning of reaction (approximately in the first hour). After that, the enzyme activity starts decreasing due to mass transfer

Fig. 5 Cellobiose hydrolysis performed by immobilized beta-glucosidase

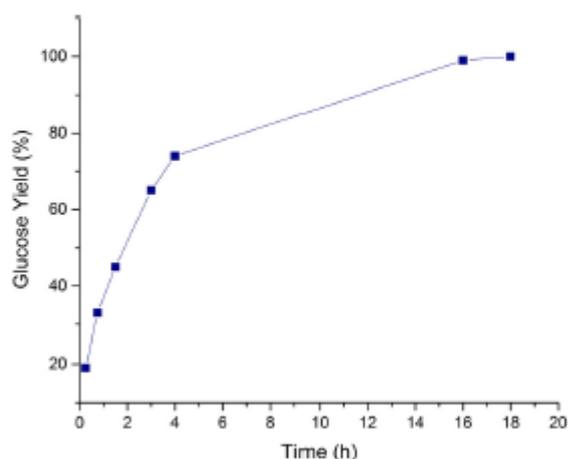
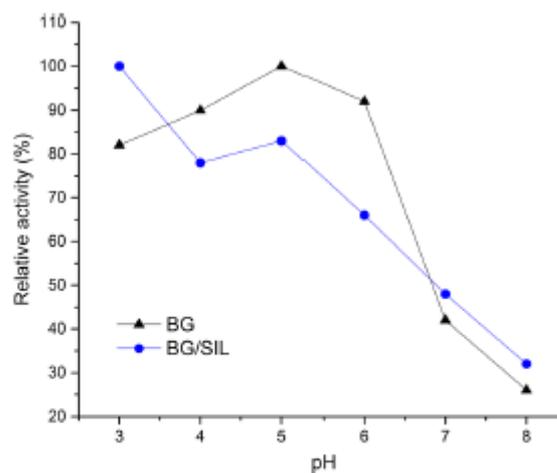


Fig. 6 Relative activity of both free and immobilized beta-glucosidase in different pH values



limitations and inhibition caused by the product. The time needed for full conversion of the cellobiose to glucose using β -glucosidase was 18 h.

Biocatalyst Characterization

The new properties of the immobilized enzyme were studied by assaying the biocatalyst in different conditions and comparing with the correspondent free enzyme. Activity alterations at different pH values are observed in Fig. 6. The free enzyme shows its higher activity at pH 5, being quite stable in the range of 3–6. In the case of the immobilized β -glucosidase, the optimum pH was shifted to 3, decreasing almost linearly its activity until pH 8. This phenomenon has been reported in previous work and should be due to unbalanced charges of protein groups close to the active site, caused by covalent immobilization [21].

Fig. 7 Relative activity of both free and immobilized beta-glucosidase in different temperatures

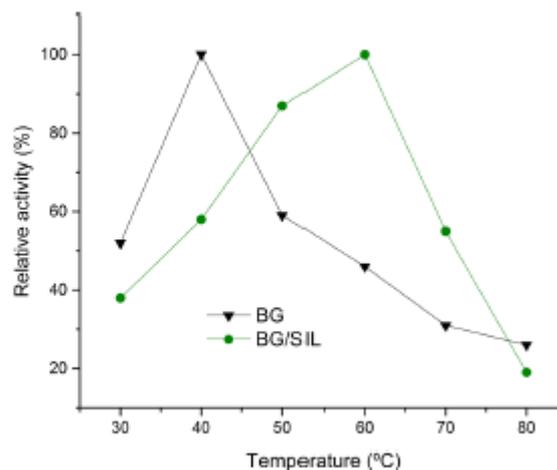
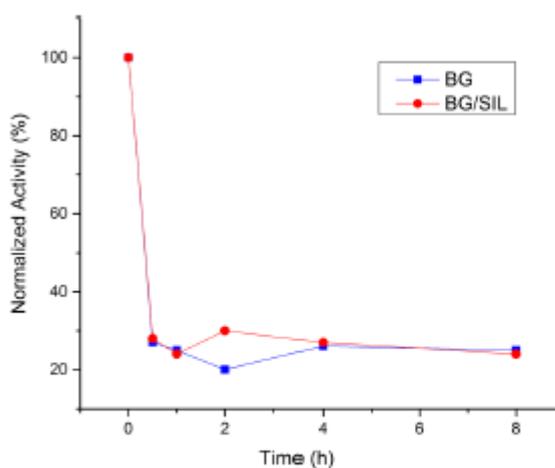
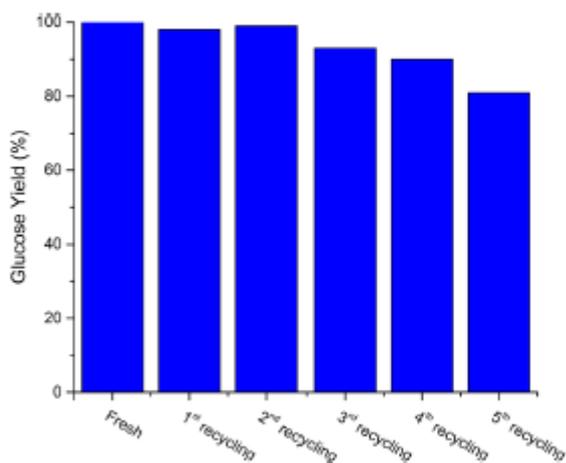


Fig. 8 Temperature stability test at 80 °C

The relative activity was also evaluated for different temperatures, as shown in Fig. 7. The free enzyme shows its higher activity at 40 °C, which is different to microbial β -glucosidases which have an optimal activity at 50 °C [10, 23]. In addition, the free enzyme is poorly stable at temperatures higher than 50 °C. On the other hand, the immobilized enzyme has its higher activity at 60 °C, presenting activities higher than 50% in a broad range of temperatures, 40–70 °C. It is well-known that immobilized enzymes undergo an increase in operational temperatures because of stabilization and rigidity caused by the support. In this case, the immobilized enzyme requires higher temperatures for the activation of its reactive site [2, 4, 19].

The temperature stability test, Fig. 8, was done in order to evaluate any difference in stability due to bond formation after immobilization. However, no temperature resistance was detected as both free and immobilized enzyme activities dropped at the same rate. Thus, no improvement in temperature resistance was observed at 80 °C.

Fig. 9 Immobilized beta-glucosidase recycling tests

Recycling tests were performed for evaluating the stability of the new biocatalyst. Figure 9 displays glucose yield after 18 h for the five subsequent recycling tests of the BG/SIL. It is possible to observe 81% of glucose yield after the fifth recycling test, which demonstrates that the catalyst remains stable upon reuse. The strong bond between enzyme and support prevents leaching and activity loss, after long reaction times and high temperatures. A decrease in glucose yield can be related to enzyme denaturation during reaction. The results bring evidence that the biocatalyst is suitable for industrial applications, which require a high activity and recyclability.

Conclusions

Aiming at overcoming the problem of accessibility of the substrate to the enzymes, that are associated with enzymatic entrapment in large mesoporous structures, β -glucosidases were successfully immobilized to nanosized silicalites particles by covalent binding. To the best of our knowledge, this is the first work on the immobilization of β -glucosidases on nanosized zeolites reported. The immobilization parameters showed 57% of the total protein content in the stock solution was anchored to the support, which remained very active, as shown by the recovered activity assay. The new biocatalyst achieved full conversion of cellobiose into glucose in 18 h, which is compatible with cellulose hydrolysis reaction time at the same conditions. This is an important parameter when aiming at the supplementation of commercial cellulases pools with immobilized β -glucosidases for performance enhancing properties. Moreover, the recyclability tests proved that the biocatalyst is stable under reaction conditions and can be recovered and reused without substantial loss in activity. It is important to point out that the TEM images depict some aggregation of the silicalite particles. This is probably caused by cross-linking when glutaraldehyde was added. For future work, this aggregation effect should be reduced by optimizing immobilization conditions, such as glutaraldehyde concentration and functionalization reaction time.

Acknowledgements The authors are grateful to Thomas Davies for the TEM analysis at the Research Complex at Harwell through the UK catalysis hub funded by EPSRC (portfolio grants EP/K014706/1, EP/K014668/1, EP/K014854/1, and EP/K014714/1). The authors gratefully acknowledge the financial support of CNPq, CAPES-Brazil, EPSRC (grant EP/K014773/1), the Department for Business Skills and Innovation (Regional Growth Fund, MicroBioRefinery project) and the Centre for Materials Discovery.

References

1. Arantes, V., & Saddler, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 1.
2. Borges, D. G., Baraldo Jr., A., Farinas, C. S., Giordano Rde, L., & Tardioli, P. W. (2014). Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized beta-glucosidase. *Bioresource Technology*, 167, 206–213.
3. Davis, T. M., Drews, T. O., Ramanan, H., He, C., Dong, J., Schnablegger, H., Katsoulakis, M. A., Kokkoti, E., McCormick, A. V., Penn, R. L., & Tsapatsis, M. (2006). Mechanistic principles of nanoparticle evolution to zeolite crystals. *Nature Materials*, 5, 400–408.
4. Figueira Jde, A., Dias, F. F., Sato, H. H., & Fernandes, P. (2011). Screening of supports for the immobilization of beta-glucosidase. *Enzyme Research*, 2011, 642460.
5. Galameau, A., Muresanu, M., Atger, S., Renard, G., & Fajula, F. (2006). Immobilization of lipase on silicas. Relevance of textural and interfacial properties on activity and selectivity. *New Journal of Chemistry*, 30, 562–571.

6. Gokhale, A. A., & Lee, I. (2012). Cellulase immobilized nanostructured supports for efficient saccharification of cellulosic substrates. *Topics in Catalysis*, *55*, 1231–1246.
7. Guan, L., Di, B., Su, M., & Qian, J. (2013). Immobilization of beta-glucosidase on bifunctional periodic mesoporous organosilicas. *Biotechnology Letters*, *35*, 1323–1330.
8. Guo, F., Fang, Z., Xu, C. C., & Smith, R. L. (2012). Solid acid mediated hydrolysis of biomass for producing biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, *38*, 672–690.
9. Hill, H. D., & Straka, J. G. (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Analytical Biochemistry*, *170*, 203–208.
10. Kaur, J., Chadha, B. S., Kumar, B. A., Ghaiora, S. K., & Saini, H. S. (2007). Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Electronic Journal of Biotechnology*, *10*, 0–0.
11. Lee, C.-H., Lin, T.-S., & Mou, C.-Y. (2009). Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*, *4*, 165–179.
12. Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*, 506–577.
13. Maeda, R. N., Barcelos, C. A., Santa Anna, L. M., & Pereira Jr., N. (2013). Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology*, *163*, 38–44.
14. Maeda, R. N., Serpa, V. L., Rocha, V. A. L., Mesquita, R. A. A., Anna, L. M. M. S., de Castro, A. M., Driemeier, C. E., Pereira, N., & Polikarpov, I. (2011). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, *46*, 1196–1201.
15. Muresanu, M., Galameau, A., Renard, G., & Fajula, F. (2005). A new mesoporous micelle-templated silica route for enzyme encapsulation. *Langmuir*, *21*, 4648–4655.
16. Pal, A., & Khanum, F. (2011). Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: characterization of immobilized enzyme. *Process Biochemistry*, *46*, 1315–1322.
17. Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, *42*, 6223–6235.
18. Singh, R. K., Zhang, Y. W., Nguyen, N. P., Jeya, M., & Lee, J. K. (2011). Covalent immobilization of beta-1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*, 337–344.
19. Tan, I. S., & Lee, K. T. (2015). Immobilization of beta-glucosidase from *Aspergillus niger* on kappa-carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue. *Bioresource Technology*, *184*, 386–394.
20. Tsai, C. T., & Meyer, A. S. (2014). Enzymatic cellulose hydrolysis: enzyme reusability and visualization of beta-glucosidase immobilized in calcium alginate. *Molecules*, *19*, 19390–19406.
21. Tu, M., Zhang, X., Kurabi, A., Gilkes, N., Mabee, W., & Saddler, J. (2006). Immobilization of beta-glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology Lett*, *28*, 151–156.
22. Verardi, A., Blasi, A., Molino, A., Albo, L., & Calabrò, V. (2016). Improving the enzymatic hydrolysis of *Saccharum officinarum* L. bagasse by optimizing mixing in a stirred tank reactor: quantitative analysis of biomass conversion. *Fuel Processing Technology*, *149*, 15–22.
23. Verma, M. L., Chaudhary, R., Tsuzuki, T., Barrow, C. J., & Puri, M. (2013). Immobilization of beta-glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis. *Bioresource Technology*, *135*, 2–6.
24. Wang, P., Hu, X., Cook, S., & Hwang, H. M. (2009). Influence of silica-derived nano-supporters on cellobiase after immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *158*, 88–96.
25. Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, *19*, 14139–14194.