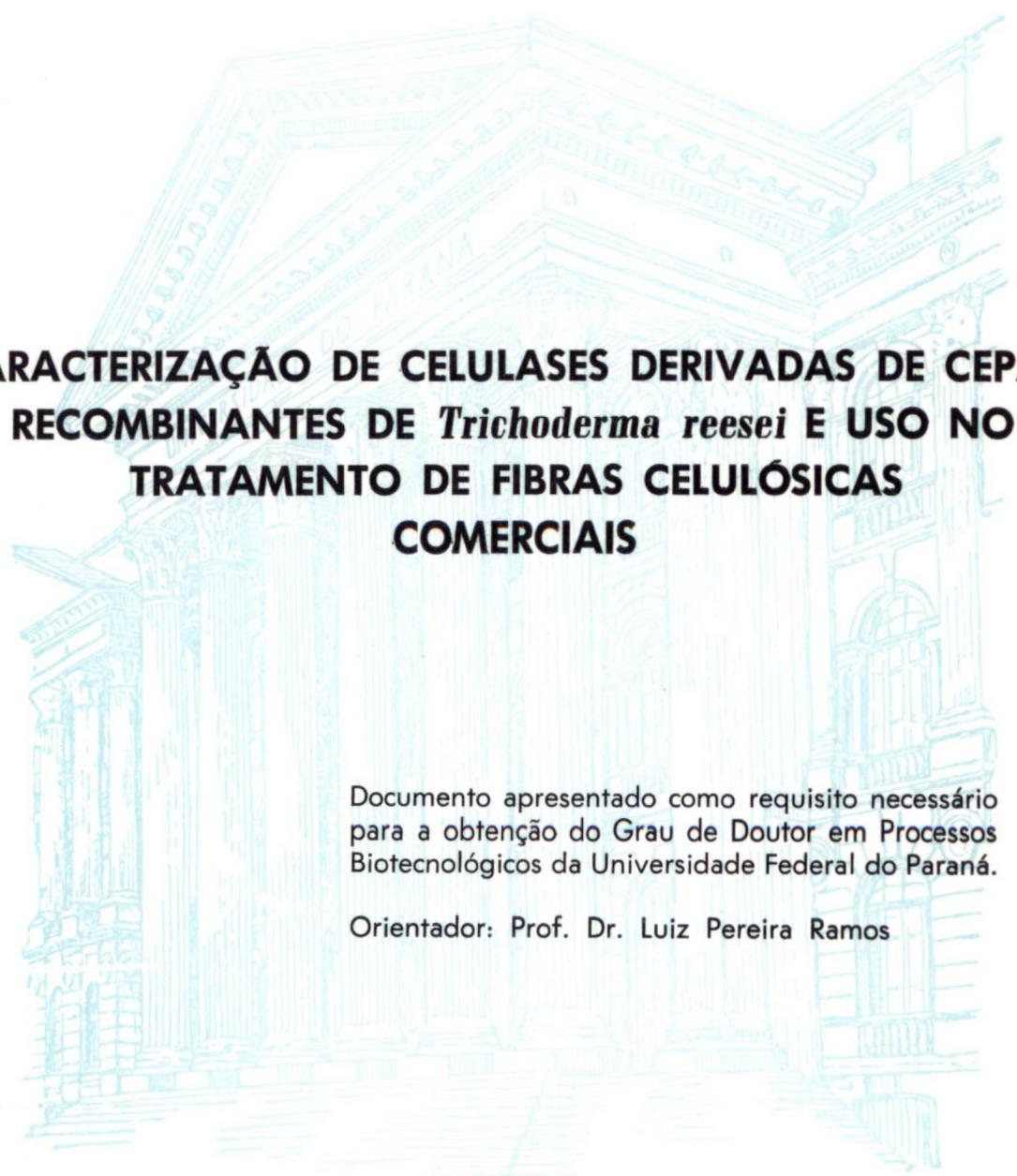


ARION ZANDONÁ FILHO



**CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES DERIVADAS DE CEPAS
RECOMBINANTES DE *Trichoderma reesei* E USO NO
TRATAMENTO DE FIBRAS CELULÓSICAS
COMERCIAIS**

Documento apresentado como requisito necessário
para a obtenção do Grau de Doutor em Processos
Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2001

ARION ZANDONÁ FILHÔ

**CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES DERIVADAS DE CEPAS
RECOMBINANTES DE *Trichoderma reesei* E USO NO
TRATAMENTO DE FIBRAS CELULÓSICAS
COMERCIAIS**

Documento apresentado como requisito necessário
para a obtenção do Grau de Doutor em Processos
Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

**CURITIBA
2001**

RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

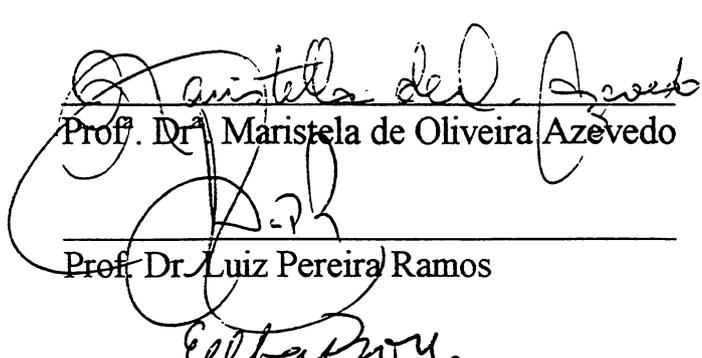
Ao primeiro dia do mês de outubro de 2001 no Salão Nobre no Setor de Tecnologia 2º andar, Centro Politécnico da UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias, coordenador do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, a banca Examinadora para a quinta Defesa de Doutorado, área de concentração Agroindústria. Estiveram presente no Ato, além do Coordenador do curso Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Maristela de Oliveira Azevedo (UNB), Nádia Krieger (UFPR), Luiz Pereira Ramos (UFPR), José Domingos Fontana (UFPR), Elba Bom (UFRJ). Às 14:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato Arion Zandoná Filho a fazer a apresentação da Tese intitulada: “ **CARACTERIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS DERIVADAS DE CEPAS RECOMBINANTES DE *Trichoderma reesi* E EMPREGO DESTES BIOCATALISADORES NO TRATAMENTO DE FIBRAS CELULÓSICAS COMERCIAIS** .” Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a argüição, a banca atribuiu os seguintes conceitos: Prof.^ª Dr.^ª Maristela de Oliveira Azevedo; A, Prof.^ª Dr.^ª Nádia Krieger; A, Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos; A, Prof. Dr. José Domingos Fontana A; Prof.^ª Dr.^ª Elba Bom A.

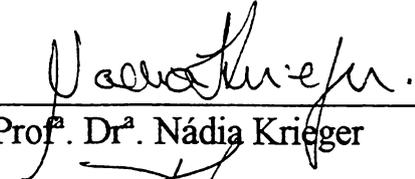
A média obtida resultou na A do candidato, (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

Curitiba, 01 de outubro de 2001.


Prof.^ª Dr.^ª Maristela de Oliveira Azevedo

Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

Prof.^ª Dr.^ª Elba P S Bon


Prof.^ª Dr.^ª Nádia Krieger

Prof. Dr. José Domingos Fontana

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VI
LISTA de ABREVIATURAS	VII
LISTA de FIGURAS	IX
LISTA de TABELAS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Fibras Celulósicas	7
3.2 Estrutura Química das Fibras Celulósicas	11
3.2.1 Celulose	12
3.2.2 Hemicelulose	24
3.2.3 Lignina	27
3.3 Indústria Papeleira	29
3.4 Tecnologia Enzimática	34
3.4.1 Tecnologia Enzimática nos Processos da Indústria Papeleira	36
3.4.2 Tecnologia Enzimática em Outros Processos	37
3.5 Hidrólise Enzimática de Fitobiomassa	39
3.5.1 <i>Trichoderma reesei</i>	43
3.5.2 Mecanismo de Ação Catalítica em <i>T. reesei</i>	44
3.5.2.1 Exoglucanases	51
3.5.2.2 Endoglucanases	54
3.5.2.3 β -Glucosidases	57
3.5.3 Determinação da Atividade Específica em Preparações Celulásicas	59
3.6 Sinergismo	63
3.7 Separação de Celulases por Cromatografia Líquida de Baixa	66

	Pressão (“Fast Protein Liquid Chromatography”, FPLC)	
4	MATERIAIS e MÉTODOS	68
4.1	Materiais	68
4.1.1	Preparações Enzimáticas	68
4.1.2	Substratos	69
4.2	Ensaio	70
4.2.1	Massa-seca e Teor de Umidade	70
4.2.2	Teor de Cinzas	71
4.2.3	Lignina de Klason	71
4.2.4	Análise de Açúcares Solúveis	72
4.2.4.1	Determinação de Açúcares Redutores Totais	73
4.2.4.2	Determinação de Açúcares Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	74
4.2.4.2.1	Análise dos Hidrolisados Ácidos e Enzimáticos por CLAE	74
4.2.4.2.2	Análise Simultânea de Mono e Oligossacarídeos por CLAE	75
4.2.5	Determinação da Concentração de Proteínas	77
4.2.6	Determinação de Atividades sobre Substratos Modelo	78
4.2.6.1	Atividade sobre Papel Filtro	79
4.2.6.2	Atividade Endoglucanásica – CMC	80
4.2.6.3	Atividade Endoglucanásica – HEC	81
4.2.6.4	Atividade Celobiásica	82
4.2.6.5	Atividade Xilanásica	83
4.2.6.6	Atividade Sobre Derivados de <i>p</i> -Nitrofenol	83
4.2.6.7	Atividade Sobre Derivados 4-Metil-Umbeliferílicos	84
4.2.6.8	Atividade Proteolítica	84
4.2.7	Determinação da Distribuição da Massa Molecular da Celulose	85
4.2.7.1	Análise Espectrofotométrica de IVTF das Polpas e Polímeros Gerados por Carbamilação	88
4.3	Difratometria de Raios-X	88
4.4	Análise das Preparações Enzimáticas por FPLC	89
4.4.1	Análise Condutimétrica	91
4.4.2	Análise Monoclonal	91

4.4.3	Determinação da Presença de Domínio Catalítico Livre na Fração Correspondente a CBH I	92
4.5	Hidrólise de Celulose Microcristalina	92
4.6	Avaliação do Efeito do Tratamento Enzimático Sobre as Propriedades Mecânicas de Polpas Celulósicas	93
4.6.1.	Hidrólises Enzimáticas	93
4.6.2.	Ensaio das Propriedades Mecânicas dos Corpos de Prova	94
4.6.2.1	Gramatura e espessura	94
4.6.2.2	Resistência ao Rasgo	94
4.6.2.3	Resistência à Tração e ao Alongamento	95
4.6.2.4	Resistência ao Arrebentamento	95
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO	97
5.1	Caracterização das Enzimas Derivadas de Cepas Recombinantes de <i>T. reesei</i>	97
5.1.1	Avaliação do Teor Protéico nas Preparações Enzimáticas	97
5.1.2	Estudo Comparativo Sobre as Atividades Específicas	100
5.2	Caracterização das Preparações Celulásicas por Cromatografia de Troca Iônica (FPLC)	113
5.2.1	Padronização do Sistema Cromatográfico Utilizando Celluclast 1.5L®	113
5.2.2	FPLC das PCTrR e Atividades Específicas Presentes nas Frações Coletadas	119
5.2.3	Avaliação da Presença do Domínio Catalítico Livre no Intervalo de Eluição de CBH I	127
5.3	Avaliação do Perfil de Hidrólise das Preparações Celulásicas em Estudo	131
5.4	Efeito das Preparações Celulásicas Sobre as Propriedades Mecânicas de Fibras Kraft Branqueadas	145
6	CONCLUSÃO	154
7	REFERÊNCIAS	157

*Aos meus filhos, Camile, Juliana e Rodrigo
Que me apoiaram nos momentos mais difíceis
e me fazem ter a certeza que sem
eles a minha vida é vazia e sem sentido*

*À minha esposa, Elyane (minha príncipeza)
Que soube superar os piores momentos e com
seu amor, companheirismo e amizade
deu-me forças para prosseguir*

*Aos meus pais, Arion e Beatriz
Que me deram a vida e o imenso
orgulho de ser seu filho*

*À minha sogra (Maria) que com seu
jeitinho de ser me apoiou e ajudou a
manter a serenidade em meu lar*

*À minha “irmãzinha” e a minha “cunhadinha”
que souberam entender e apoiar minha príncipeza*

*A DEUS NOSSO SENHOR QUE ME DEU SAÚDE e FORÇAS PARA SUPERAR OS
PIORES MOMENTOS.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos pela orientação segura, conselhos, estímulos e o interesse que fez despertar dentro de mim para esta nova ciência.

Ao amigo Luiz Pereira Ramos que me acompanhou nesta caminhada, sacrificando muitos momentos de lazer com sua família somente para me auxiliar, transformando a nossa amizade em muito mais que gratidão e respeito.

A Universidade Tuiuti do Paraná por apoiar esta pesquisa e investir na qualificação de seu docente, em especial ao Sr. Diretor e colega Prof. Francisco Sardo, aos professores Marilda e Roaldo Roda que me apoiaram em todos os momentos e também a todos aqueles colegas que sempre me incentivaram.

Aos meus queridos amigos, colegas e companheiros Daniel (BUM), Fabiane Horcel (Mortícia), Gracielle(Cork), Tatiane, Pimentinha, Sandy, Anna Karina, Juliana e Thiago, sem a ajuda e interesse dos quais não conseguiria concluir este trabalho.

Aos colegas do CEPPA, Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, pela amizade demonstrada, em especial ao Prof. Gabriel Adolfo Ribeiro Guimarães e seu “staff” administrativo.

À Rhom Enzyme Finland Oy (Primalco) pela participação fornecendo os biocatalisadores de cepas recombinantes.

Aos colegas do curso de Doutorado em Biotecnologia que me ajudaram em muitos momentos, especialmente a Danyella e à professora Adenise .

Ao Prof. Artur Cavaco Paulo pela recepção e orientação dada nos momentos em que estive na Universidade do Minho e na cidade de Guimarães.

Ao colega e amigo Matti Siika-aho, que nos momentos mais difíceis de minha estadia na VTT Biotechnology (Helsinki), me apoiou e me deu suporte para concluir os trabalhos de caracterização das enzimas.

A todos os meus alunos, seria impossível citar nominalmente a todos, pela amizade demonstrada nestes anos e compreensão nos momentos em que estive afastado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AnGlc = anidroglicose

CBH = Celobiohidrolase

CG = cromatografia gasosa

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

CrI = índice de cristalinidade

DC = Domínio Catalítico

DLS = Domínio de Ligação ao Substrato

DLC = Domínio de Ligação a Celulose

EG = endoglucanases

GP = grau de polimerização

Glc = Glucose

FTIR = espectroscopia na faixa do infravermelho com transformada de
Fourier

FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography

Glc_p = glucopiranosose

GPC = cromatografia de permeação em gel

IV = infravermelho

mM = milimolar

M_m = massa molecular

MM_m = Massa Molecular Média

M_m / M_n = número de massa

M_n = massa molecular numérica média

N = n°. Equivalentes gramas / litro de solução

p = para

PCTrR = Preparações Celulásicas de *Trichoderma reesei*
Recombinado

ms = massa seca

nkat = nanokat = nmol/ml/s

THF = tetrahydrofurano

u.m.m. = unidade de massa molecular

UV = ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO DE UMA RAMA DE FIBRAS DE CELULOSE DE MADEIRA E A DISTRIBUIÇÃO DE SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES ESTRUTURAIS (ADAPTADO DE FENGEL & WEGENER, 1989)	8
FIGURA 2 -	CORTE TRANSVERSAL DA PAREDE CELULAR DE CÉLULAS VEGETAIS (A), ESTRUTURA MORFOLÓGICA DE FIBRAS VEGETAIS ORIUNDAS DE MADEIRA (B) (MODIFICADO DE FENGEL & WEGENER, 1989)	10
FIGURA 3 -	MOLÉCULAS DE CELULOSE NA MADEIRA E SUA COMPOSIÇÃO AO LONGO DA ESTRUTURA CELULAR	11
FIGURA 4 -	REPRESENTAÇÃO DO MODELO ESTRUTURAL DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO E DA MOLÉCULA DE CELOBIOSE, SUAS DISTÂNCIAS INTRAMOLECULARES E A NOMENCLATURA DOS ÁTOMOS DA CELULOSE EM RELAÇÃO AOS ÂNGULOS DIHIDRAIS	14
FIGURA 5 -	PLANOS CRISTALINOS DE CELULOSE I E II, PERPENDICULARES AO EIXO DA FIBRA (CAVACO-PAULO, 1995)	16
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO DE UMA MICROFIBRILA DE CELULOSE, COM DUAS UNIDADES CRISTALINAS DISTINTAS DE CELULOSE: UMA MONOCLÍNICA E OUTRA TRICLÍNICA (SUGIYAMA , 1993)	17
FIGURA 7 -	FACES CRISTALINAS DA CELULOSE I DE ACORDO COM GARDNER & BLACKWELL (1974). NESTE MODELO, AS ESFERAS VERDES REPRESENTAM OS OXIGÊNIOS DA LIGAÇÃO GLICOSÍDICA E AS ESFERAS VERMELHAS, OS GRUPAMENTOS HIDROXÍLICOS	18
FIGURA 8 -	CRISTAL DE CELULOSE I COM SEUS PLANOS CRISTALINOS (A) E FÓRMULA DE CÁLCULO (B)	20
FIGURA 9 -	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE POLPA KRAFT BRANQUEADA, COM A IDENTIFICAÇÃO DAS INTENSIDADES UTILIZADAS NA RELAÇÃO EMPÍRICA DE SEGAL ET AL. (1959). VALORES EM PARÊNTESES INDICAM DIFERENTES PLANOS CRISTALOGRAFÍCOS E SEUS RESPECTIVOS (HKL)	21
FIGURA 10 -	ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DE POLPA KRAFT BRANQUEADA EM PASTILHA DE KBR A 1% (P/P)	22
FIGURA 11 -	ANÁLISE DE CELULOSE PER-CARBAMILADA POR CROMATOGRÁFIA DE PERMEACÃO EM GEL, INDICANDO A DISTRIBUIÇÃO EM MASSAS MOLECULARES DO POLÍMERO ORIUNDO DE FIBRAS DE ALGODÃO HIDRÓFILO E POLPA KRAFT BRANQUEADA DE PINUS SPP	23

FIGURA 12 -	ESTRUTURA DE UMA GALACTOGLUCOMANANA, COM A LIGAÇÃO β -(1→4) EM EVIDÊNCIA (BIERMANN, 1996)	25
FIGURA 13 -	ESTRUTURA DE UMA ARABINOGLUCURONOXILANA. A LIGAÇÃO β -(1→4), E AS LIGAÇÕES α -(1→2) E α -(1→3) DO ÁCIDO 4-O-METIL-GLUCURÔNICO E DA L-ARABINOSE, RESPECTIVAMENTE EVIDENCIADAS (BIERMANN, 1996)	26
FIGURA 14 -	ESTRUTURA DA O-ACETIL-4-O-METIL-GLUCURONOXILANA. A LIGAÇÃO β -(1→4) DA CADEIA PRINCIPAL E A LIGAÇÃO α -(1→2) DO ÁCIDO 4-O-METIL-GLUCURÔNICO, SÃO EVIDENCIADAS (BIERMANN, 1996)	26
FIGURA 15 -	ESTRUTURA DA GLUCOMANANA, COM A LIGAÇÃO β -(1→4) EM DETALHE (BIERMANN, 1996)	27
FIGURA 16 -	MODELO ESTRUTURAL DA LIGNINA DE FAIA (NIMZ, 1974), EM QUE OS NÚMEROS DE 1 A 25 INDICAM A PRESENÇA DOS ANÉIS AROMÁTICOS	29
FIGURA 17 -	EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE PRODUTOS DERIVADOS DA INDÚSTRIA PAPELEIRA	31
FIGURA 18 -	MODO DE AÇÃO DE CELULASES (ENDO E EXOGLUCANASES) E β -GLUCOSIDADES (CELOBIASES) SOBRE SUBSTRATOS CELULÓSICOS	45
FIGURA 19 -	DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DAS CELULASES AO SUBSTRATO, COM ÊNFASE À DISPOSIÇÃO PLANAR DOS TRÊS RESÍDUOS DE TIROSINA IDENTIFICADOS COMO Y492, Y493 E Y466	46
FIGURA 20 -	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO DOMÍNIO CATALÍTICO ATRIBUÍDO À EXOGLUCANASES (A) E ENDOGLUCANASES (B)	48
FIGURA 21 -	MECANISMO DE AÇÃO DOS ÁCIDOS GLUTÂMICO E ASPÁRTICO NO DOMÍNIO CATALÍTICO DE EXOGLUCANASES E ENDOGLUCANASES (RÄTTÖ ET AL., 1997): (A) RETENÇÃO E (B) INVERSÃO ESTEREOQUÍMICA DO CARBONO ANOMÉRICO	49
FIGURA 22 -	ESTRUTURA DIAGRAMÁTICA DA CBH I ISOLADA DE <i>T. REESEI</i> QM9414, COM ÊNFASE NAS DIMENSÕES DA ENZIMA COMPLETA, DO PEPTÍDEO DE LIGAÇÃO (PL), DE SEU DOMÍNIO CATALÍTICO (DC) (HAYN et al., 1993; TEERI et al., 1999) E DE SUA INTERAÇÃO COM OS BLOCOS CONSTRUTIVOS DA CELULOSE MICROCRISTALINA	53
FIGURA 23 -	ASSOCIAÇÃO DA CBH I À SUPERFÍCIE DAS MICROFIBRILAS DE CELULOSE (DIVNE et al., 1994), SUGERINDO AÇÃO PROGRESSIVA COM A SUBSEQUENTE LIBERAÇÃO DE CELOBIOSE A PARTIR DA EXTREMIDADE DO TÚNEL	54
FIGURA 24 -	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CARBOHIDRATOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS PRESENTES NOS HIDROLISADOS DAS AMOSTRAS DE POLPA CELULÓSICA	75
FIGURA 25 -	CROMATOGRAMA PADRÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDO ATRAVÉS DO SISTEMA DIONEX	77

FIGURA 26 - REAÇÃO DE CARBAMILAÇÃO; CELULOSE REAGINDO COM ISOCIANATO DE FENILA EM PIRIDINA	85
FIGURA 27 - CROMATOGRAMA DE PERMEAÇÃO EM GEL DE UMA SOLUÇÃO PADRÃO CONTENDO QUATRO PADRÕES MONODISPERSOS DE POLIESTIRENO	86
FIGURA 28 - CURVA DE CALIBRAÇÃO BIMODAL UTILIZADA NA ANÁLISE DE GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS POLPAS, CUJA DISPERSÃO EM TORNO DA MÉDIA FOI DE 0,0306	87
FIGURA 29 - GRÁFICO COMPARATIVO DO TEOR DE PROTEÍNAS CONTIDO NAS PCTRR E NAS PREPARAÇÕES INDUSTRIAIS UTILIZADAS COMO REFERÊNCIA	100
FIGURA 30 - ATIVIDADE SOBRE CMC (A) E ATIVIDADE SOBRE HEC (B) DAS PREPARAÇÕES CELULÁSICAS	102
FIGURA 31 - ATIVIDADE DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS SOBRE PAPEL FILTRO (GHOSE,1987)	105
FIGURA 32 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE AS ATIVIDADES XILANÁSICAS DAS PCTrR E DE CELLUCLAST 1.5L®. XEA, REPRESENTADO POR CINZA CLARO E XMV, POR CINZA ESCURO	106
FIGURA 33 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS ATIVIDADES SOBRE PNF A ATIVIDADE NA AUSÊNCIA DE CELOBIOSE ENCONTRA-SE REPRESENTADA EM BRANCO, ENQUANTO QUE A DETERMINADA NA SUA PRESENÇA FOI REGISTRADA EM CINZA ESCURO	109
FIGURA 34 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE AS ATIVIDADES DAS PCTrR E DE CELLUCLAST 1.5L® SOBRE DOIS TIPOS DE CELULOSE MICROCRISTALINA. AS BARRAS ESCURAS INDICAM A HIDRÓLISE DE AVICEL®, ENQUANTO QUE AS BARRAS TRANSPARENTES, DE SIGMACELL®	110
FIGURA 35 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS PRESENTES NAS PCTrR E NA PREPARAÇÃO INDUSTRIAL UTILIZADA COMO REFERÊNCIA	112
FIGURA 36 - CROMATOGRAMA DA PREPARAÇÃO COMERCIAL CELLUCLAST 1,5L® POR FPLC, COM A IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES FORMADAS A PARTIR DAS ALÍQUOTAS ELUÍDAS DA COLUNA	114
FIGURA 37 - ANÁLISE DAS FRAÇÕES DE FPLC PARA A CELLUCLAST 1.5L®: COMPARAÇÃO ENTRE O TEOR DE PROTEÍNAS (BARRAS) E A ATIVIDADE SOBRE HEC (LINHA)	115
FIGURA 38 - REPRESENTAÇÃO DA QUANTIDADE DE CBH II EXISTENTE EM CADA ALÍQUOTA ELUÍDA POR FPLC A PARTIR DE CELLUCLAST 1.5L® CADA QUADRADO REPRESENTA UM INCREMENTO RELATIVO DE ANTICORPO SENSIBILIZADO	118

FIGURA 39 - CROMATOGRAMAS DAS PCT _r R QUE SOFRERAM SUPRESSÃO DE ENDOGLUCANASES	121
FIGURA 40 - CROMATOGRAMA DAS PCT _r R QUE SOFRERAM SUPRESSÃO DE CELOBIOHIDROLASES	122
FIGURA 41 - RELAÇÃO PERCENTUAL DO TEOR DE PROTEÍNAS EM CADA FRAÇÃO DERIVADA DAS PCT _r R E CELLUCLAST 1.5L [®] (CL) POR FPLC	123
FIGURA 42 - ATIVIDADE SOBRE HEC DETERMINADA NAS FRAÇÕES DERIVADAS DAS PCT _r R E CELLUCLAST 1.5L [®] (CL) POR FPLC (DADOS NORMALIZADOS)	124
FIGURA 43 - ATIVIDADE ESPECÍFICA RECUPERADA POR FRAÇÃO ELUÍDA DO FPLC	126
FIGURA 44 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO F5 (CBH I) DA ENZIMA CELLUCLAST 1.5L [®] EM PHENYL SEPHAROSE [®]	128
FIGURA 45 - DOMÍNIO CATALÍTICO (DC) LIVRE RECUPERADO APÓS ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO F5, COM BASE EM PROTEÍNA TOTAL (BARRAS ACINZENTADAS) E NA ATIVIDADE DIFERENCIAL DA FRAÇÃO CONTRA M _U mbL (BARRAS TRANSPARENTES) NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE CELOBIOSE	131
FIGURA 46 - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DA POLPA KRAFT BRANQUEADA DE PINUS (A) E DO DERIVADO CARBAMILADO OBTIDO A PARTIR DESTA MESMA POLPA	137
FIGURA 47 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES COMERCIAIS SOBRE O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA POLPA KRAFT. O CONTROLE CORRESPONDE À POLPA NÃO HIDROLISADA	139
FIGURA 48 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DEFICIENTES EM ATIVIDADE CELOBIOHIDROLÁSICA SOBRE O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA POLPA KRAFT. O CONTROLE CORRESPONDE À POLPA NÃO HIDROLISADA	140
FIGURA 49 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DEFICIENTES EM ATIVIDADE ENDOGLUCANÁSICA SOBRE O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA POLPA KRAFT. O CONTROLE CORRESPONDE À POLPA NÃO HIDROLISADA	140
FIGURA 50 - DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO (GP) DA CELULOSE EM POLPA KRAFT DE PINUS APÓS O TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM AS PCT _r R E PREPARAÇÕES COMERCIAIS. OS VALORES DE GP ESTÃO REPRESENTADOS PELA MÉDIA PONDERADA EM RELAÇÃO ÀS MASSAS (GPM).	141
FIGURA 51 - EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE A CRISTALINIDADE DA CELULOSE, DETERMINADO POR DIFRATOMETRIA DE RAIO-X.	143
FIGURA 52 - EFEITO DAS PCT _r R SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CORPOS DE PROVA PRODUZIDOS A PARTIR DE POLPAS KRAFT BRANQUEADAS DE PINUS.	151

**FIGURA 53 - EFEITO DAS PCT_rR SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE 152
CORPOS DE PROVA PRODUZIDOS A PARTIR DE POLPAS
KRAFT BRANQUEADAS DE EUCALIPTO.**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	TAMANHO DA SEÇÃO TRANSVERSAL DE FIBRILAS DE DIFERENTES ORGANISMOS SINTETIZADORES DE CELULOSE (CHANZY, 1990)	19
TABELA 2-	EXPORTAÇÕES DE PRODUTOS E DERIVADOS DA INDÚSTRIA PAPELEIRA (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2000)	30
TABELA 3-	POSIÇÃO DOS PRODUTOS BRASILEIROS NO MERCADO MUNDIAL (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2000)	31
TABELA 4-	COMPARAÇÃO ENTRE PONTOS POSITIVOS E NEGATIVOS DO PROCESSO KRAFT (SJÖSTRÖM, 1993)	32
TABELA 5-	ENZIMAS CLÁSSICAS INDÚSTRIAS E SUAS FONTES DE USO (GERHARD & WOLFGANG, 1991)	35
TABELA 6-	AÇÃO DE ENZIMAS EM DIFERENTES COMPONENTES DA MADEIRA	37
TABELA 7-	PROPRIEDADES E ESTRUTURA ORGANIZACIONAL DAS CELULASES DE <i>T. reesei</i> (BUCHERT & HEIKINHEIMO, 1998)	50
TABELA 8-	MÉTODOS UTILIZADOS PARA MEDIR ATIVIDADES CELULOLÍTICAS E β -GLUCOSIDÁSICAS EM PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS (ADAPTADO DE CLARKE, 1999)	61
TABELA 9-	PREPARAÇÕES CELULÁSICAS DE <i>T. reesei</i> GENETICAMENTE MODIFICADO (ROHM ENZYME FINLAND OY) E DAS FORMULAÇÕES ENZIMÁTICAS COMERCIAIS (NOVO NORDISK)	69
TABELA 10-	SUBSTRATOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE HIDRÓLISE E SEUS RESPECTIVOS FABRICANTES	70
TABELA 11-	GRADIENTE QUATERNÁRIO UTILIZADO PARA A ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS PELO SISTEMA DIONEX	76
TABELA 12-	ATIVIDADES ESPECÍFICAS DETERMINADAS NAS PREPARAÇÕES EM ESTUDO	79
TABELA 13-	PADRÕES DE POLIESTIRENO UTILIZADOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO SOBRE A QUAL FOI DETERMINADO O DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS POLPAS CELULÓSICAS	87
TABELA 14-	PROGRAMAÇÃO UTILIZADA COMO GRADIENTE DE ELUIÇÃO NAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR FPLC	90
TABELA 15-	PROGRAMA UTILIZADO COMO GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE ANIÔNICA (FPLC)	92
TABELA 16-	TEOR PROTÉICO SEGUNDO OS MÉTODOS DE LOWRY E DE BRADFORD DAS PCTRR E DAS FORMULAÇÕES ENZIMÁTICAS COMERCIAIS	98
TABELA 17-	ATIVIDADES ESPECÍFICAS PARA PF, CMC, HEC, XEA E XMV DAS PCTrR E DAS FORMULAÇÕES INDUSTRIAIS(GHOSE, 1987)	102

TABELA 18-	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS SOBRE SUBSTRATOS CROMOFÓRICOS DEMONSTRADAS PELAS PCTrR E FORMULAÇÕES INDUSTRIAIS	108
TABELA 19-	PROTEÍNAS E ATIVIDADE HEC PARA CELLUCLAST 1.5L [®] NAS FRAÇÕES COLETADAS APÓS O FPLC	116
TABELA 20-	VALORES DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA NAS DILUIÇÕES DAS ENZIMAS PARA O FPLC	120
TABELA 21-	ATIVIDADE SOBRE HEC NAS FRAÇÕES COLETADAS APÓS O FPLC	124
TABELA 22-	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DOMÍNIO CATALÍTICO (DC) LIVRE NA FRAÇÃO F5 (CBH I) DAS PCTrR	130
TABELA 23-	RENDIMENTOS DE HIDRÓLISE OBTIDOS A PARTIR DA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA POLPA KRAFT BRANQUEADA DE PINUS	133
TABELA 24-	GRUPAMENTOS QUÍMICOS ALTERADOS NA CARBAMILAÇÃO E SUAS DEFORMAÇÕES ESPACIAS CAUSADAS POR ENERGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	136
TABELA 25-	EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO E CRISTALINIDADE DA POLPA KRAFT BRANQUEADA DE PINUS	138
TABELA 26-	TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE POLPAS KRAFT BRANQUEADAS	146
TABELA 27-	AVALIAÇÃO DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS POLPAS KRAFT APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM AS PCTrR E CELLUCLAST 1.5L [®] (CL)	147
TABELA 28-	PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CORPOS DE PROVA PREPARADOS A PARTIR DE POLPAS CELULÓSICAS SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM AS PCTrR E CELLUCLAST 1.5L [®]	149
TABELA 29-	PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CORPOS DE PROVA PREPARADOS A PARTIR DE POLPAS DE EUCALÍPTO, SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM ENDOGLUCANASES PURIFICADAS DE <i>T. reesei</i>	153

RESUMO

Preparações enzimáticas obtidas a partir de cepas recombinantes do fungo *Trichoderma reesei* (Röhm Enzyme Finland Oy, Finlândia) foram inicialmente caracterizadas com relação às suas atividades específicas e teor protéico, sendo posteriormente comparadas a um sistema celulásico completo representado pela preparação industrial Celluclast 1.5L[®] (Novo Nordisk). Foram oito as preparações enzimáticas obtidas a partir das cepas recombinantes, a saber, quatro enzimas de supressão isolada (A, CBH I-; B, CBH II-; C, EG I-; D, EG II-), duas de supressão dupla (E, CBH I/II-; F, EG I/II-) e duas de supressão tripla (G, EG II-/CBH I/II-; H, CBH II-/EG I/II-).

A atividade protéica das enzimas recombinantes mostrou-se substancialmente diferente da atividade observada em Celluclast 1.5L[®]. Esta observação foi decorrente do ensaio de atividade contra vários substratos incluindo papel de filtro, celobiose, *p*-nitrofenil-glucosídeo, *p*-nitrofenil-lactosídeo, xilana de aveia, xilana de videiro, carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose (HEC) e azocaseína. A inclusão desse último substrato foi necessária para que se pudesse demonstrar a presença de atividade proteásica residual em todas as preparações enzimáticas.

A análise cromatográfica por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) foi usada para separar os componentes das preparações celulásicas de acordo com o *pI* e raio hidrodinâmico, seguindo-se de análises de atividade específica em cada fração coleta.

A coeluição de CBH II com outras enzimas presentes no sistema celulásico (por exemplo, EG I) foi caracterizada por ensaios imunoquímicos utilizando anticorpos monoclonais, enquanto que a ocorrência de EG II foi testada baseando-se na capacidade da fração enzimática em hidrolisar a ligação heterosídica do metilumbeliferil- β -D-celotriosídeo. Por outro lado, a presença do domínio catalítico de CBH I em frações específicas do FPLC foi determinada por cromatografia de interação hidrofóbica, sendo que o ensaio contra metilumbeliferil- β -D-celotriosídeo, na presença

e ausência de celobiose, serviu de estratégia para confirmar a ausência de EG I nos volumes de eluição de CBH I e de seu respectivo domínio catalítico livre.

Os principais constituintes proteicos do sistema celulásico de *T. reesei* foram separados em cinco frações: EG II e III na fração F1, EG II e CBH II na fração F2, CBH II e EG I na fração F3, EG I na fração F4 e CBH I na fração F5. Entretanto, para todas as enzimas de A a H, a fração do FPLC (fração F5) que continha a CBH I, esta fração para muitas das enzimas demonstrou ser quase que exclusivamente constituída de domínio catalítico livre.

Em condições específicas de hidrólise (4 mg de proteína por grama de polpa seca por 2 horas à 45°C, 145 rpm) foram ensaiadas fibras celulósicas de pinus e eucalipto provindas de processo Kraft, nenhuma das preparações enzimáticas em estudo apresentou um efeito significativo sobre o grau de polimerização da celulose. A única exceção a esta regra foi o comportamento da enzima E sobre polpa de eucalipto, provavelmente devido a sua alta atividade específica sobre substratos de caráter amorfo mais pronunciado (alta atividade endoglucanásica).

A enzima G forneceu os melhores resultados sobre as propriedades de polpas Kraft branqueadas de eucalipto para a confecção do papel. Ganhos foram observados em quase todas as propriedades mecânicas às quais os corpos de prova foram submetidos. No entanto, um pequeno efeito foi detectado sobre a resistência ao rasgo dos corpos de prova. A enzima G também apresentou um efeito bastante favorável sobre as propriedades da polpa Kraft branqueada derivada de pinus. Um aumento de 36% na resistência à tração foi observado nos corpos de prova ensaiados sem que qualquer efeito fosse detectado nas resistências ao alongamento e arrebentamento (estouro). Porém, a resistência ao rasgo foi comprometida em cerca de 22% em relação ao controle.

Computados os efeitos sobre todas as propriedades dos corpos de prova, a enzima H foi a que proporcionou o melhor resultado sobre polpas de pinus porque não apresentou qualquer efeito negativo sobre a resistência ao rasgo.

ABSTRACT

Enzyme preparations from eight deletion strains of *Trichoderma reesei* were initially characterized in regard to their specific activities and protein profile and subsequently compared to the complete cellulase system of the industrial enzyme preparation Celluclast 1.5L (Novo Nordisk). The enzyme preparations derived from recombinant strains of *T. reesei* were kindly provided by Röhms Enzyme Finland Oy and were formerly classified as mono, di and tri-deletion preparations, namely 4 single (A, CBH I-; B, CBH II-; C, EG I-; D, EG II-), 2 double- (E, CBH I/II-; F, EG I/II-) and 2 tri-deletion enzymes (G, EG II-/CBH I/II-; H, CBH II-/EG I/II-).

The activity profile of the recombinant enzymes was shown to be substantially different from that of Celluclast 1.5L. This was observed against a range of model substrates including filter paper, cellobiose, *p*-nitrophenyl-glucoside, *p*-nitrophenyl-lactoside, oat spelt xylan, larchwood xylan, carboxymethylcellulose, hydroxyethylcellulose (HEC) and azocasein. Inclusion of the latter substrate was required because all of the enzyme preparations were shown to variable amounts of residual protease activity.

Fast protein liquid chromatography was used to characterize each cellulase preparations in regard to their protein profile and specific activity against HEC. The band-spreading and/or co-elution of CBH II with other enzyme components of the cellulase system (*e.g.*, EG I) was characterized by immunochemical assays using monoclonal antibodies, whereas the occurrence of EG II was assessed based on the capability of the enzyme fractions to cleave the heterosidic bond of methylumbellyferyl- β -D-celotrioside. On the other hand, the occurrence of CBH I core protein within the CBH I fraction of the FPLC profile was determined by hydrophobic interaction chromatography. This CBH I fraction, containing either the truncated or untruncated enzyme, was also assayed against methylumbellyferyl- β -D-lactoside, in the presence and absence of cellobiose, to ensure that this protein band was not contaminated with any EG I activity.

The main protein constituents of the *T. reesei* cellulase system were pooled into five fractions containing EG II and III (fraction 1), EGII and CBH II (fraction 2), CBH II and EG I (fraction 3), EG I (fraction 4) and CBH I (fraction 5). However, the CBH I fraction of the FPLC profile (fraction 5) was demonstrated to be almost exclusively composed of the CBH I core protein in all of the recombinant enzyme preparations.

Under the conditions used for fiber modification (4 mg of protein per gram of dry pulp for 2 h at 45°C, 145 rpm), none of the enzyme preparations had a significant effect of pulp cellulose degree of polymerization. The only exception to this rule was enzyme E on eucalyptus pulp, probably due to its high specific activity against amorphous cellulose (high endoglucanase activity).

Enzyme G provided the best treatment for fiber modification of eucalypt Kraft pulps, with improvement of all mechanical properties tested in this study except tearing. The enzyme G also had a favorable effect on pine Kraft pulp. A 36% increase in tensile strength was observed with no detectable effect on both stretching and bursting strength, but handsheet tearing was decreased by 22% in relation to the control. However, enzyme H provided the best handsheet properties of pine Kraft pulps.

These results provide further evidence to the widely accepted contribution that genetic engineering may have to the development of efficient enzymes systems to modify pulp fibers. In this regard, both double and three deletion enzymes derived from recombinant *T. reesei* strains have shown interesting properties for fiber modification in pulp and paper manufacturing.

1 INTRODUÇÃO

“Vivemos o dia-a-dia sem entendermos quase nada do mundo. Pouca atenção damos ao mecanismo que gera a luz do Sol e possibilita a vida; a gravidade que nos cola à Terra, que de outra forma, nos lançaria em rotação pelo espaço; ou aos átomos do que somos feitos e de cuja estabilidade dependemos fundamentalmente.”

Stephen W. Hawking, 1988.

O século XX foi caracterizado por um grande desenvolvimento e difusão do conhecimento humano, sendo que o fator mais decisivo neste processo foi o uso dos meios de comunicação. O desenvolvimento de novos modelos de transmissão da informação à distância também resultou em um menor tempo entre a descoberta científica e o seu uso.

Dentre os mais diversos ramos de pesquisa científica encontramos aqueles que se dedicaram ao estudo da matéria, em suas formas e funções. Ao buscar o domínio sobre a matéria, a ciência deparou-se com novos universos e novos paradigmas, que desencadearam novos sub-ramos do conhecimento científico. Neste preâmbulo podem-se imaginar muitos mundos paralelos com suas dimensões física e química e, dentre esses, o mundo microscópico, onde um infinito número de substâncias são sintetizadas ou modificadas por intermédio do metabolismo biológico de animais ou vegetais. Sabe-se que o ecossistema que envolve o planeta Terra é uma incessante fábrica destas moléculas, as quais possuem as mais variadas formas, tamanhos e funções.

Foram alguns cientistas brilhantes como: Aristóteles; Lavoisier, Dalton, e

Leonardo da Vinci, que ao se colocarem fora de seu tempo cronológico, iniciaram a observação desses pequenos fatos ou fenômenos e que fizeram destas simples observações uma ciência complexa. Mais de cem anos se passaram deste então e atualmente possuímos tecnologia para a manipulação e aplicação de muitas destas biomoléculas. Dentre elas, encontram-se os polímeros naturais, que são largamente utilizados pelo homem para a sua sobrevivência e conforto.

Graças aos recentes avanços da tecnologia pode-se isolar, purificar, modificar e otimizar processos envolvendo moléculas orgânicas e bioinorgânicas. Assim, são inúmeros os monômeros ou polímeros de origem natural que estão sendo aplicados nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica, papelaria, de resinas, tintas, plásticos, couro, membranas orgânicas e outros artigos manufaturados (FINCH & ROBERTS, 1985). Nesse cenário, uma das matérias-primas naturais de maior interesse à sociedade humana tem sido a fitobiomassa, particularmente devido ao seu caráter renovável. Esta biomassa vegetal é constituída majoritariamente por polissacarídeos (amido, celulose e hemicelulose) e um polímero fenólico (lignina), formando um “composto biodegradável” que pode ser convertido em alimentos, rações, combustíveis líquidos e insumos para a indústria química (BU’LOCK & KRISTIANSEN, 1991).

Dentre as diversas aplicações de fibras celulósicas destacam-se as indústrias têxteis e de papel e celulose (CAVACO-PAULO, 1997; POMMIER et al., 1989; 1990). De um ponto de vista têxtil, o termo fibra tem sido aplicado em um sentido vago, seja para indicar pêlos unicelulares, como a fibra do algodão, ou feixe de tecidos multicelulares, como a fibra do sisal. A importância das chamadas “fibras têxteis” remonta ao homem primitivo, e as suas necessidades básicas de se proteger. Todavia, apesar de sua importância econômica e social, esse segmento não foi abordado no presente estudo. Por outro lado, a indústria de celulose e papel é a mais importante dentre todas aquelas dedicadas à química de fitobiomassa, sendo que os dois mercados juntos foram responsáveis por 3,2% das exportações brasileiras no ano de 2000,

conforme resenha anual da Gazeta Mercantil (2001).

Os mercados de celulose e papel atualmente se encontram fortemente globalizados e neles difundido o uso de fibras celulósicas de pinus e eucalipto. Em um passado não muito distante, tínhamos a Europa e a América do Norte como os principais mercados produtores e consumidores de celulose e papel, mas, embora esta liderança esteja ainda sendo mantida, países emergentes têm mostrado forte influência no mercado mundial. Dentre esses podemos citar o Sudeste Asiático (com sua economia em crescimento acelerado) e a América do Sul, onde o Brasil se destaca como maior fornecedor de fibra de eucalipto (madeira dura). Estas variações estão cada vez mais definindo o futuro dos mercados de celulose e papel, que crescem incessantemente. Atualmente, estimativas publicadas pela Carteira de Exportação do Banco do Brasil (<http://www.bcb.gov.br>) indicam uma movimentação anual de 100 bilhões de dólares e que deverá dobrar até o ano de 2005. Calcula-se que em vinte anos, o consumo de papel e papelão deverá ser expandido para aproximadamente 200 milhões de toneladas/ano.

Esta visão de mercado transporta o Brasil para uma posição invejável no contexto mundial. Portanto, transformações no perfil do setor industrial brasileiro de celulose e papel são previstas para médio e longo prazo, onde a estratégia básica é a de associação de empresas, com um único objetivo central: ganhos de escala e de mercado. É por isso que a indústria de celulose e papel foi considerada estratégica pelo BNDES, tendo sido a segunda colocada no ranking de grandes financiamentos concedidos por este banco em 1996. Com efeito, as exportações de celulose de eucalipto cresceram no ano de 2000 em 25% e a de papelão ondulado, em 95%, segundo informe da GAZETA MERCANTIL (2001) em seu caderno especial de final de ano. Para tanto, foi imprescindível o desenvolvimento tecnológico da área para fazer frente aos preços praticados pelos demais países competidores.

Por ser a celulose uma fonte abundante na natureza, sua utilização biotecnológica sugere muitas possibilidades baseadas em processos hidrolíticos e/ou

fermentativos. Porém, mesmo com toda tecnologia, ainda não conhecemos totalmente os vários mecanismos que ocorrem durante a degradação da celulose e quais são de fundamental importância para a biotecnologia industrial.

A importância sócio-econômica da biotecnologia pode ser ilustrada pelo valor associado ao seu mercado mundial em 2000, estimado em torno de 6 bilhões de dólares somente no comércio de enzimas aplicadas a indústria. Esses números representaram um crescimento de 20% em relação a 1999 (GAZETA MERCANTIL, 2001). O mercado brasileiro de enzimas, embora seja tipicamente importador e pequeno frente ao mercado mundial (cerca de US\$ 160 milhões), apresenta grande potencialidade, sobretudo considerando-se a enorme disponibilidade de resíduos agroindustriais.

A eficiência com a qual a celulose é hidrolisada depende de múltiplos fatores que envolvem, dentre muitos, as características do substrato e a natureza do sistema enzimático. Portanto, para se entender quais os mecanismos relacionados ao processo, é necessário que se conheça a estrutura supramolecular das proteínas (enzimas) e do substrato lignocelulósico (fitobiomassa), assim como as modificações realizadas sobre as propriedades mecânicas das fibras. Utilizam-se para esta finalidade técnicas analíticas de caráter físico e/ou químico, onde os dados gerados fornecem os subsídios para uma melhor interpretação das interações que ocorrem entre estes biocatalisadores e a biomassa lignocelulósica.

O governo brasileiro, segundo nota divulgada pelo ministro de Ciência e Tecnologia durante o Fórum de Biotecnologia e Biodiversidade (Brasília/1999), tem como uma de suas principais políticas apoiar o desenvolvimento biotecnológico em nosso país. Para tal, inclui a biotecnologia como prioridade em seu Plano Plurianual de Governo, denominado “Avança Brasil - 2000-2003” (vide <http://www.mct.gov.br>). Foram mais de 270 milhões de reais adicionais às linhas de fomento, a serem aplicados nos próximos quatro anos com objetivos específicos de conservar recursos genéticos e desenvolver produtos e processos biotecnológicos relevantes para a produção

industrial, agropecuária e relativa à saúde humana. Sabe-se que o Brasil possui uma imensa biodiversidade e, portanto, cabe ao governo definir o futuro da biotecnologia, pois dele dependem as ações de controle e utilização de tecnologias que assegurem qualidade ao homem e ao meio ambiente. No entanto, o sucesso dessa iniciativa depende do reconhecimento de que a biotecnologia é uma ciência inerentemente multidisciplinar e que seu desenvolvimento induz aos estudos de bioprocessos não mais com um caráter especificamente bioquímico ou de ciência pura, mas como uma ciência onde os preceitos de engenharia estão intimamente ligados aos demais ramos do conhecimento humano (BU'LOCK & KRISTIANSEN, 1991).

Finalmente, a sociedade como um todo tem uma importante parcela de responsabilidade ao acompanhar, junto aos seus governos, a criação de novas formas de uso de seus recursos naturais que sejam perfeitamente adaptados às suas necessidades tecnológicas e culturais. Acreditamos no livre arbítrio dos povos quanto à gestão de seus recursos naturais e de tecnologias disponíveis para um desenvolvimento sólido e sustentável. Não podemos esquecer os riscos que novas tecnologias, quando utilizadas sem os protocolos de estudos adequados, podem oferecer ao homem. Portanto, o desenvolvimento de novas tecnologias somente poderá ser aceito pela sociedade quando estiver aliado a um compromisso de não agredir, sob qualquer forma, o direito dos indivíduos, a sua liberdade de escolha e o seu compromisso com as gerações futuras.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho está voltado ao estudo de aspectos biotecnológicos e bioquímicos da aplicação de Preparações Celulásicas de cepas de *Trichoderma reesei* Recombinado (PCTrR), cujo desenvolvimento foi baseado em quatro etapas:

A) na primeira, o objetivo foi de caracterizar o modo de ação catalítica das preparações celulásicas derivadas de cepas recombinantes de *T. reesei* e comparar as suas eficiências com o complexo enzimático secretado por uma cepa industrial de alto rendimento;

B) na segunda, ênfase foi dada à separação e caracterização do perfil protéico constituinte das preparações, empregando métodos de cromatografia líquida de baixa pressão e de determinação da atividade específica presente em cada alíquota isolada a partir das PCTrR;

C) na terceira, a intenção foi de investigar o modo de ação das PCTrR, em alta carga protéica, sobre a composição química e estrutural de polpas kraft branqueadas de pinus, com ênfase na caracterização do efeito obtido sobre o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose;

D) na quarta e última etapa, o objetivo foi de investigar o efeito das PCTrR, em baixa carga protéica, sobre as propriedades mecânicas de polpas kraft branqueadas de pinus e de eucalipto, visando avaliar a viabilidade destas como biocatalisadores no processo de fabricação de papel e celulose.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FIBRAS CELULÓSICAS

Os recursos celulósicos disponíveis na natureza são estimados em 324 bilhões de metros cúbicos (m^3), sendo que a produção mundial dessa biomassa gira em torno de $4 \cdot 10^{10}$ toneladas por ano (FAN et al., 1987; DURAN et al., 1995). Sabe-se que 50% desse valor é convertido à dióxido de carbono e esse processo de biotransformação é realizado por microrganismos que degradam naturalmente o material lignocelulósico, cuja composição química é majoritariamente composta por três componentes orgânicos de elevada massa molecular, a celulose, a hemicelulose e a lignina (BROWN, 1985; FENGEL & WEGENER, 1989).

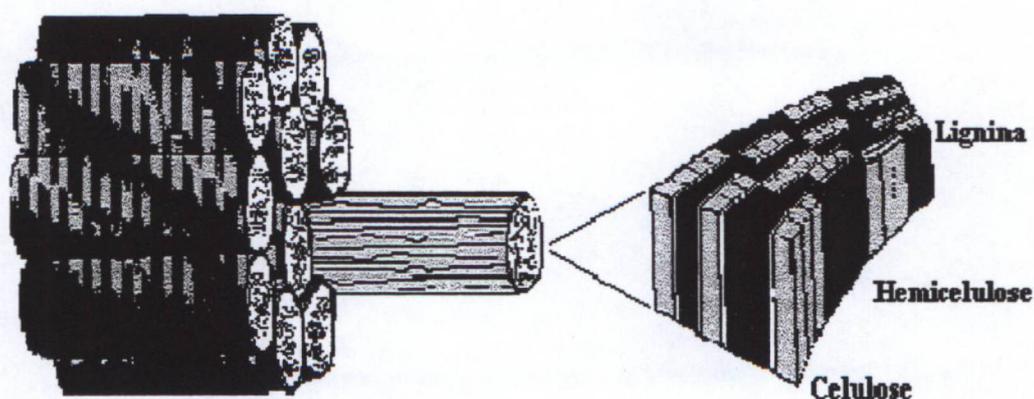
O termo fibra é empregado quando as células esclerenquimatosas estão na forma prosenquimatosas, ou seja, o seu comprimento é igual a muitas vezes a sua largura. Dessa maneira, de um ponto de vista estritamente histológico, o termo fibra tem sido usado para designar uma grande variedade de células, vegetais ou animais, que se caracterizam por uma forma alongada e parede secundária espessa (AFONSO et al., 1991; BAUER et al., 1973).

As fibras naturais de celulose têm sido muito utilizadas pelo homem por possuírem razoável resistência mecânica e baixo custo de produção, quando comparados com compósitos sintéticos. Esta resistência deve-se a regiões celulósicas cristalinas que estão associadas em filamentos, os quais são envolvidos por uma matriz amorfa que aglutina estas fibras (lignina), mantendo-as juntas e definindo os diversos formatos e estruturas básicas da fitobiomassa. A compatibilização da interface entre estes dois elementos é feita pela hemicelulose, através de ligações covalentes com o agente aglutinante (lignina) e interações físicas com a estrutura básica da celulose. Na Figura 1, pode-se observar as disposições destes constituintes na fibra (HIGUCHI,

1985).

A celulose compõe a maior parte dos tecidos vegetais, perfazendo aproximadamente a metade dos componentes constituintes das madeiras, tanto em gimnospermas (coníferas ou madeiras moles) quanto em angiospermas (folhosas ou madeiras duras) (FENGEL & WEGENER, 1989).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DE UMA RAMA DE FIBRAS DE CELULOSE DE MADEIRA E A DISTRIBUIÇÃO DE SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES ESTRUTURAIS (ADAPTADO DE FENGEL & WEGENER, 1989)



A síntese da celulose não é executada única e exclusivamente por vegetais, pois é também encontrada em organismos Eucariontes e Procariontes, incluindo bactérias, protistas, algas e alguns animais. Um exemplo de síntese efetuada por procariontes é a bactéria gram-negativa *Acetobacter xylinum*, que produz biofilmes de celulose cujas propriedades vêm sendo motivo de uma variedade de aplicações na indústria médica, farmacêutica e de alimentos (FONTANA et al., 1997; CHANZY, 1990). Já os Eucariontes, como as algas, apresentam uma maior diversificação quando comparada com os Procariontes. A *Valonia ventricosa* e a *Boergesenia forbesi* têm membranas celulares de natureza celulósica, enquanto que as carapaças *Tunician halocythya rooretzi*, um tipo de invertebrado marinho, possuem um teor considerável de celulose (ATALLA, 1993). Curiosamente, os mamíferos, incluindo o homem, também podem ter a capacidade de sintetizar celulose. MARROM (1979), já discutiam esta possibilidade, porém mantendo uma distância do enfoque dos botânicos,

afirmando que somente sob circunstâncias patogênicas, como é o caso do escleroderma, ocorre a síntese da celulose nos seres humanos.

Na análise evolutiva do reino vegetal, partindo das algas para as plantas multicelulares mais complexas, a celulose executa o papel preliminar de um material de reforço. Tal papel é complementado pela associação à hemicelulose e lignina, que define uma maior resistência do todo, permitindo o desenvolvimento de plantas multicelulares de grande porte (ASHFORD & NEUBERGER, 1980).

A quantidade da celulose encontrada em vegetais e outros organismos varia significativamente, desde os 95 a 99% do algodão e os 80 a 85% da fibra de rami até a faixa dos 20 a 25% de vários tipos de bactérias, protozoários e algas-marinhas (BAUER et al., 1973; NULTSH, 2000). Nas paredes das células de vegetais superiores, o teor de celulose varia de 40 a 50%, sendo que fibras vegetais como o algodão podem apresentar teores de até 90 a 100% (BUCHERT & HEIKINHEIMO, 1998; PONER, 1999). Por outro lado, as paredes primárias apresentam até 20% de celulose em sua composição, enquanto que nas paredes secundárias esse valor pode se aproximar de 100%.

As características macro-estruturais mais importantes das fibras estão associadas ao sentido e direção que estas assumem no momento da sua formação, pois destas disposições resultam resistências mecânicas distintas e propriedades químicas diversas (Figura 1). Por exemplo, fibras do tronco de árvores não possuem a mesma resistência à tração longitudinal e à compressão do que aquelas oriundas do talo de um mesmo vegetal (KEEGSTRA et al., 1973).

A morfologia das fibras vegetais tem sido alvo de inúmeros estudos desde o século passado. Porém, ainda encontramos dificuldades na literatura especializada em esclarecer completamente os mecanismos biossintéticos de formação das fibras e de definição de sua ordem estrutural (VICENT, 1999; BROWN, 1985; BROWN et al., 1996). Por exemplo, ainda hoje existem dúvidas de como a célula controla e regula a polimerização das cadeias de glucose, o tamanho das microfibrilas formadas, sua

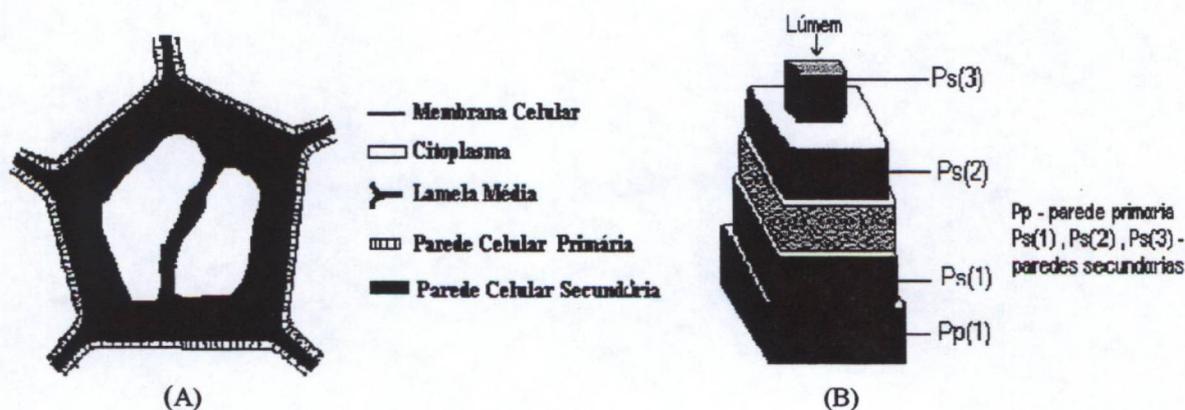
orientação e expansão durante os diferentes ciclos de crescimento da célula (DELMER et al., 1985; MARROM, 1979).

Segundo VINCENT (1999), o melhor modelo até hoje apresentado para a produção de celulose foi proposto por PRESTON em 1974 e apresenta as enzimas sintetizadoras (“Rosettes”) arranjadas de maneira hexagonal em ramas de 100 ou mais, encaminhando-se ao redor da membrana celular e deixando para trás uma série de microfibrilas, cada qual com aproximadamente 40 cadeias de celulose, 5 μm de diâmetro e 20 μm de comprimento (KARR, 1976; KIERMAYER & SLEYTR, 1979; MUELLER, 1982).

Em geral, as células vegetais são constituídas de membrana celular, lamela média, parede primária e/ou secundária e citoplasma (Figura 2), o qual contém substâncias solúveis e insolúveis responsáveis pela nutrição das plantas (CHAFE, 1970; NULTSCH, 2000). Observa-se nesta figura a organização da parede celular de fibras celulósicas, bem como as suas subdivisões.

A espessura da parede celular varia entre 0,1 μm e vários micrometros, não sendo estas tão seletivas quanto as membranas celulares (FRY, 1986; VIAN & REIS, 1991).

FIGURA 2 – CORTE TRANSVERSAL DA PAREDE CELULAR DE CÉLULAS VEGETAIS (A), ESTRUTURA MORFOLÓGICA DE FIBRAS VEGETAIS ORIUNDAS DE MADEIRA (B) (MODIFICADO DE FENGEL&WEGENER,1989)

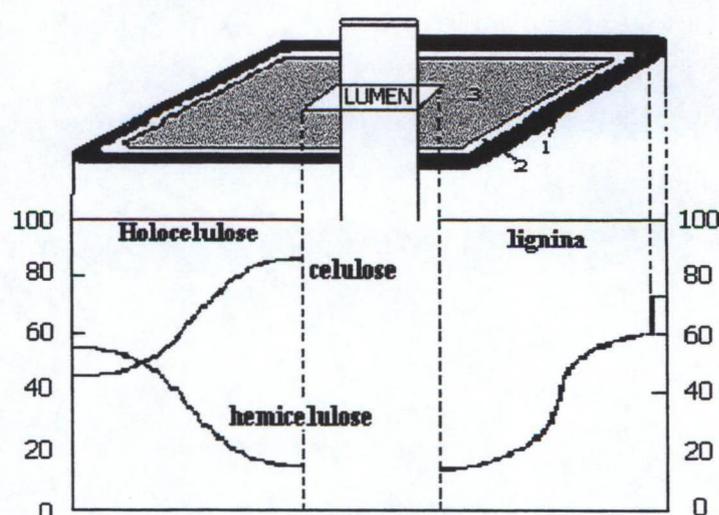


Durante o desenvolvimento da parede secundária, as camadas denominadas de lamelas S1, S2 e S3 se orientam paralelamente umas às outras. No entanto, a orientação das microfibrilas que compõem as lamelas pode mudar de camada para camada, com alterações nos ângulos do plano cristalino da celulose. Frequentemente, em paredes celulares muito fortes como no algodão, as microfibrilas estão arranjadas ao longo do eixo das células como um parafuso (ROLAND & VIAN, 1979). Por outro lado, alguns autores relataram que, após a divisão celular, as células na região de crescimento se expandem em apenas uma única direção (VICENT, 1999).

3.2 ESTRUTURA QUÍMICA DAS FIBRAS CELULÓSICAS

Como já foi visto no capítulo anterior, as paredes das células de plantas superiores contêm celulose (polissacarídeo de elevada massa molecular), hemicelulose (que contém uma quantidade variada de polissacarídeos como as xiloglucanas, arabinoglucanas, rhamnogalactanas e glucomananas) e lignina, um polímero fenólico composto por uma estrutura randômica (TALMADGE et al., 1973; NEVELL, 1985; SARKO, 1986). A Figura 3 apresenta esquematicamente uma típica distribuição destes materiais na parede celular de *Pinus* sp. (modificado de GANDINI, 1992).

FIGURA 3 - MOLÉCULAS DE CELULOSE NA MADEIRA E SUA COMPOSIÇÃO AO LONGO DA ESTRUTURA CELULAR



A reatividade química e/ou microbiológica de polissacarídeos da fitobiomassa é orientada basicamente pela sua organização supramolecular, que resulta em um arranjo espacial que permitirá ou não as interações moleculares. Em referência à estrutura química propriamente dita, tem-se que: os grupos hidroxilas podem reagir com agentes de adição, substituição e oxidação; os grupos acetais podem sofrer hidrólise tanto em meio ácido como em meio alcalino; e os grupos aldeídicos terminais podem ser reduzidos para grupos alcoólicos, oxidados à carboxilas, ou, quando na presença de álcali, rearranjados para formar grupos terminais alcóolicos ou carboxílicos.

A reatividade em processos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos inclui também propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização da celulose e/ou hemiceluloses, a área superficial, a associação com compostos não celulósicos e a sua organização molecular ou índice de cristalinidade (WONG et al., 1988 ; RAMOS, 2001).

A seguir são apresentadas algumas das principais características químicas da celulose, das hemiceluloses e da lignina.

3.2.1 Celulose

A celulose é considerada o composto orgânico de maior importância na natureza por constituir a base estrutural da parede celular das plantas. Como os vegetais correspondem à maior parte dos organismos vivos existentes na crosta terrestre, a celulose também é o polímero de maior ocorrência natural (WOOD, 1991).

A celulose é um homopolímero linear, composto basicamente por unidades de glucose que se unem através de ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), ou seja, entre os carbonos C₁ e C₄ da β -D-glucopiranosose. No entanto, a análise conformacional da celulose indicou que a celobiose (4-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosose), e não a glucose, é a sua unidade estrutural básica (ATALLA et al., 1984). Devido a posição

(equatorial) das hidroxilas constituintes do anel hemiacetálico, há uma tendência estrutural à linearidade destas cadeias, permitindo com que se forme uma rede intra- e intermolecular de ligações de hidrogênio envolvendo principalmente o oxigênio hemiacetálico e as hidroxilas ligadas aos carbonos C-3 e C-6 do anel (FENGEL & WEGENER, 1989).

Apesar da molécula de glucose possuir grupamentos hidroxílicos nas duas extremidades, o grupamento ligado ao carbono 1 (C₁) possui poder *reductor*, enquanto que o outro terminal (C₄) é chamado de *não reductor* (FRANZ & BLASCHEK, 1990).

As moléculas adjacentes de celulose formam inicialmente as fibrilas elementares, que correspondem a um agregado composto de aproximadamente 40 unidades macromoleculares altamente organizadas entre si. Por sua vez, fibrilas elementares organizam-se entre si formando as microfibrilas, cujo diâmetro médio encontra-se em torno de 20 a 30 nm (BOKER & MILLES, 1997; RAMOS, 1992b). Finalmente, a fibra de celulose, tal qual comercializada para a confecção do papel, é formada por uma rede de microfibrilas insolúveis em água que apresentam regiões cristalinas e amorfas, estruturalmente amalgamadas pela interveniência de hemiceluloses e protolignina (BROWN et al., 1996; KIERMAYER & SLEYR, 1979; HERTH, 1983). Detalhes sobre estes polímeros amorfos, que constituem a parede celular da fibra vegetal, encontram-se apresentados no ítem 3.2.2 e 3.2.3.

De um modo geral, a estrutura de celulose pode ser definida em termos de três níveis organizacionais (Figura 4) (ATALLA, 1993):

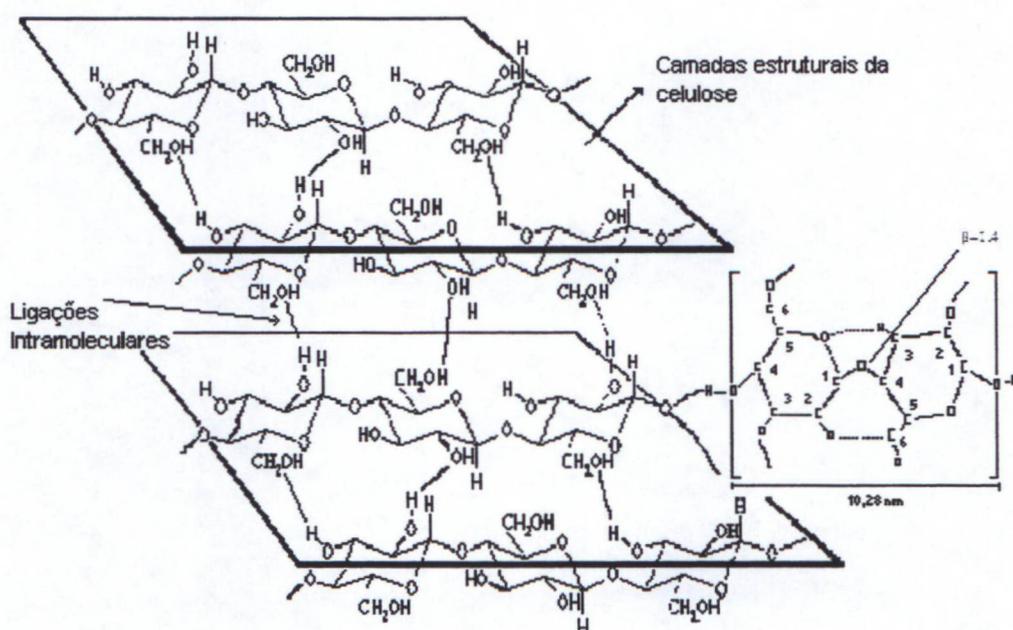
a) primeiro nível: definido pelas ligações covalentes, correspondendo a um homopolímero de anidrogucose interligado por ligações do tipo β -(1,4);

b) segundo nível: descreve a conformação molecular, que é caracterizada pelas distâncias interatômicas e seus respectivos ângulos, bem como pelas ligações de hidrogênio intramoleculares;

c) terceiro nível: define a associação das moléculas, formando uma estrutura cristalina, que depende das ligações intermoleculares de hidrogênio.

Portanto, apesar da celulose ser um polímero relativamente simples, as microfibrilas, quando unidas, formam um complexo muito difícil de ser analisado, composto por cadeias lineares interligadas não covalentemente que resultam em um compósito quimicamente estável e extremamente insolúvel (MARCHESSAULT & SUNDARAJAN, 1983).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DO MODELO ESTRUTURAL DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO E DA MOLÉCULA DE CELOBIOSE, SUAS DISTÂNCIAS INTRAMOLECULARES E A NOMENCLATURA DOS ÁTOMOS DA CELULOSE EM RELAÇÃO AOS ÂNGULOS DIHIDRAIS



A massa molecular da celulose é representada na forma de seu grau de polimerização (GP) cujo valor médio se encontra na faixa de 1.000 a 15.000 unidades de anidroglicose (AnGlc) ou 162.000 a 243.000 unidades de massa atômica (Daltons). A origem e a degradação da amostra, bem como o conteúdo empregado para a determinação do GP, têm influência marcante sobre o valor obtido. Por exemplo, nas paredes primárias das células vegetais encontram-se β -(1,4)-D-glucanas com aproximadamente 6.000 unidades de AnGlc, enquanto que na parede secundária, este número aumenta para o intervalo de 13.000 a 16.000 unidades (FENGEL & WEGENER, 1989; FINCH & ROBERTS, 1985).

Sabe-se por cristalografia de raios-X que a unidade repetitiva de celobiose

possui um comprimento de 10,28 nm. Portanto, o comprimento total de uma cadeia de celulose de 10.000 unidades de AnGlc será de aproximadamente 5 μm . Como a unidade cristalina da celulose apresenta um comprimento de aproximadamente 8 a 25 nm (KUGA & BROWN, 1987), presume-se que esta macromolécula participe de vários cristalitos formando uma espécie de rede neural, onde a porção amorfa corresponderia às interligações destes blocos construtivos de alta organização molecular. A complexidade da parede celular, no que tange à estrutura supra molecular da celulose, pode então ser predita ao projetar estas medidas para as dimensões de uma fibra de celulose, cujo comprimento, no caso de fibras de papel, apresenta-se em torno de 1 a 3 mm, ou seja, entre 200 a 600 vezes o comprimento da cadeia usada como modelo nesta simulação.

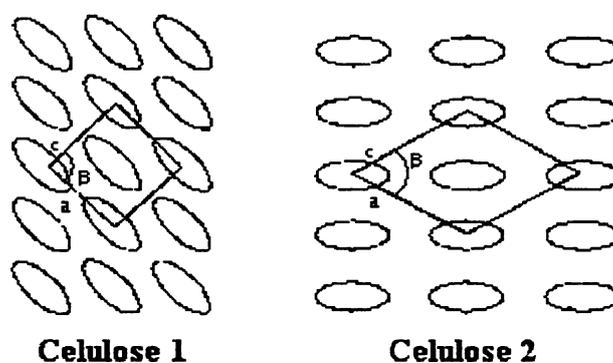
Na forma cristalina, a celulose realiza um número grande de ligações de hidrogênio devido a disposição tridimensional das cadeias. KUGA & BROWN (1987) demonstraram que a superfície de contato entre as unidades fibrilares é virtualmente indistinguível entre os planos no cristal, mas estudos de microscopia ótica revelaram que os cristais de celulose polarizam a luz, e que o estudo na passagem desta luz pode determinar a orientação das microfibrilas (MUELLER & BROWN, 1982; PERE et al., 1998).

O estudo em difração de raios-X mostra que a celulose pode ser cristalizada de quatro formas diferentes, designadas como: celulose I, II, III e IV (SARKO, 1986). Nos últimos dez anos, a literatura descreve a celulose I como sendo formada por moléculas de celulose em disposição anti-paralela (FENGEL & WEGENER, 1989). Todavia, somente após a publicação de SUGIYAMA (1993) é que foi definido que as moléculas de celulose se organizam de fato paralelamente, ou seja, com uma orientação paralela entre si e em relação ao eixo da microfibrila (ATTALA, 1993; GANDINI, 1992).

A celulose II é produzida por tratamento alcalino da celulose I (Figura 5), sendo que na indústria têxtil este processo é chamado de mercerização. Esta

conversão, que ocorre com aparente com inversão da polaridade das moléculas, não é totalmente compreendida.

FIGURA 5 - PLANOS CRISTALINOS DE CELULOSE I E II, PERPENDICULARES AO EIXO DA FIBRA (CAVACO-PAULO, 1995)



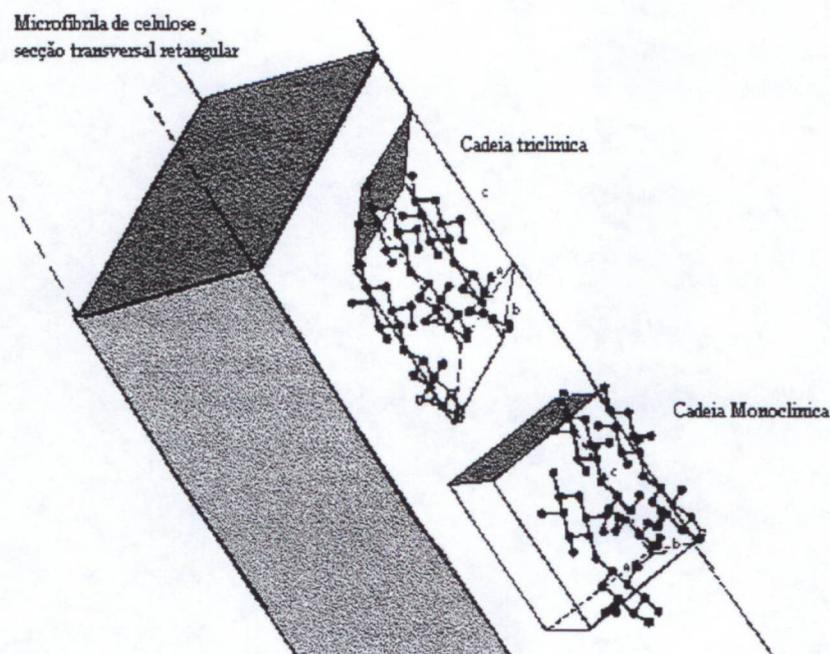
Admite-se que microfibrilas adjacentes de celulose I apresentam estatisticamente uma disposição anti-paralela e que, na presença de NaOH, há um cruzamento de moléculas entre as microfibrilas, motivado pelo aumento da distância interplanar no retículo cristalino. Assim, com base nesse modelo, a transformação de celulose I em celulose II não implicaria necessariamente na inversão da polaridade das moléculas (SARKO, 1986).

Outras organizações moleculares podem ser obtidas a partir da celulose. Por exemplo, o tratamento da celulose I com amônia produz celulose III e IV, e o uso de glicerol sobre a celulose II produz celulose III e IV. No entanto, em qualquer desses casos, as cadeias de celulose assumem uma disposição em camadas, diferindo apenas na organização das ligações de hidrogênio que se estabelecem entre as diferentes lamelas (CHANZY, 1990).

Com base em estudos espectroscópicos, ATTALA et. al. (1984) foram os pioneiros em sugerir que os cristais de celulose I possuem duas fases ou formas alomórficas. Posteriormente, a utilização de microdifratometria de raios X, espectroscopia Raman e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C confirmou que a

celulose I é constituída por dois tipos de malha cristalina: a celulose I_{α} , predominante em bactérias (*Acetobacter* sp.) e algas (*Laminaria* sp., *Valonia* sp.) e a I_{β} , predominante nas plantas superiores. A celulose I_{α} corresponde à fase triclinica e a celulose I_{β} , à fase monoclinica (Figura 6) (SUGIYAMA, 1991). Estas duas estruturas aparentemente coexistem dentro de uma única microfibrila, pois não é claro que tenham ocorrência em regiões distintas. No entanto, existem indicações de que o interior dos cristais contém preferencialmente a fase I_{β} e que na superfície das fibras, prevalece a fase I_{α} . A abundância relativa dessas duas fases depende da origem da celulose. Celuloses advindas de algas e bactérias geralmente contêm 60 – 70% fase I_{α} , enquanto que a celulose de vegetais com algodão e rami contém apenas 70 a 40% desta fase, predominando portanto a fase I_{β} . Tal, o dimorfismo da celulose nativa pode estar associado com a multiplicidade de celulasas que ocorrem na natureza (SUGIYAMA, 1993).

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DE UMA MICROFIBRILA DE CELULOSE, COM DUAS UNIDADES CRISTALINAS DISTINTAS DE CELULOSE: UMA MONOCLINICA E OUTRA TRICLINICA (SUGIYAMA, 1993)



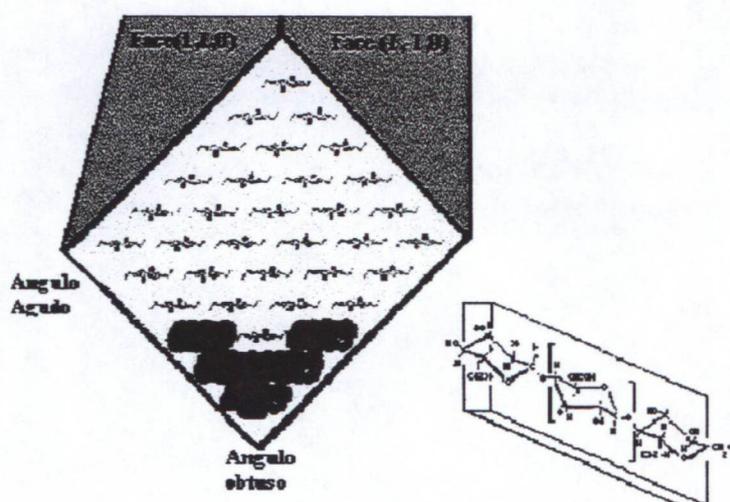
A celulose regenerada (celulose II) contém 90% de fase I_{β} quando

comparada com a celulose de tunicina, que é considerada pura em fase I_β . Portanto, a celulose em fase I_β é termodinamicamente mais estável e mais suscetível à hidrólise enzimática (NIDETZKY et al., 1994). Dados espectroscópicos também têm demonstrado que os dois alomorfos têm pequenas diferenças no arranjo estrutural das ligações de hidrogênio (FRANZ, 1990), sendo que a fase I_β permite a ocorrência de um número maior de interações intermoleculares (REINIKAINEN, 1994). Aparentemente, restrições termodinâmicas impedem a obtenção artificial e/ou purificação de celulose em sua fase alomórfica I_α .

A microfibrila de celulose forma cristais individuais, e estes variam de tamanho conforme a origem da celulose (KUGA & BROWN, 1987; SUGIYAMA, J., 1994; BOKER & MILES, 1997).

Com base nas coordenadas atômicas da estrutura de cristais de celulose I, HENRISSAT et al. (1985) propuseram um modelo da superfície atômica de cristais monoclinicos, constituído de arranjos 4 X 4 de cadeias de celulose. A análise desse modelo mostra que cristais equivalentes de celulose apresentam um número diferente de resíduos de glucose quando avaliadas nas duas faces dos cristais na microfibrila, podendo variar com o tipo de celulose, conforme demonstrado na Figura 7.

FIGURA 7 – FACES CRISTALINAS DA CELULOSE I DE ACORDO COM GARDNER & BLACKWELL (1974). NESTE MODELO, AS ESFERAS VERDES REPRESENTAM OS OXIGÊNIOS DA LIGAÇÃO GLICOSÍDICA E AS ESFERAS VERMELHAS, OS GRUPAMENTOS HIDROXÍLICOS



Segundo CHANZY (1990), diferentes valores podem ser encontrados para o tamanho da seção transversal da microfibrila de celulose. Em citação de MUELLER & BROWN (1982), estudos de síntese realizados por ROSS (1991), afirmaram que as cadeias de glucose são arranjadas dentro das unidades fibrilares com uma largura de 1,5 a 3,0 nm. Na Tabela 1, são apresentados os tamanhos das seções transversais das fibrilas de celulose encontrados na natureza.

TABELA 1 - TAMANHO DA SEÇÃO TRANSVERSAL DE FIBRILAS DE DIFERENTES ORGANISMOS SINTETIZADORES DE CELULOSE (CHANZY, 1990)

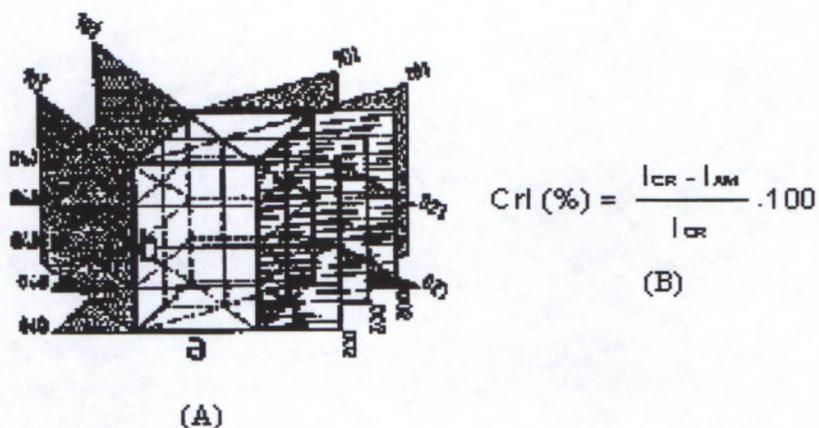
	Seção Transversal (nm)
Valonia	20
Tunicina	10
Rami	5
Madeiras	3-4

Estudos enzimáticos sobre a celulose freqüentemente incluem os termos “celulose amorfa” e “celulose cristalina”. Entretanto, em nível estrutural, é difícil determinar com exatidão a natureza do termo amorfa. Geralmente, considera-se celulose amorfa aquela que possui menor organização estrutural com arranjo irregular das cadeias de glucose. Métodos para determinar o índice de cristalinidade em materiais celulósicos foram indicados por PILZ et al. (1990) e GAMA et al. (1994).

A estrutura supramolecular da celulose pode então ser caracterizada através de métodos que permitam a determinação de sua cristalinidade e grau de polimerização. A cristalinidade pode ser avaliada por difração de raios-X (SARKO, 1986; RAMOS *et al.*, 1993; RAMOS, 2001), empregando o método empírico de SEGAL *et al.* (1959) (Figuras 8 e 9).

Neste método, (a) a região cristalina é estimada pela intensidade de difração no plano $(hkl) = (002)$, correspondente a um ângulo de Bragg (2θ) de $22,5^\circ$, (b) a região amorfa é caracterizada pela intensidade mínima na região de $2\theta = 18,5^\circ$ e (c) o índice de cristalinidade é calculado através da seguinte expressão (a) da figura 8.

FIGURA 8 – CRISTAL DE CELULOSE I COM SEUS PLANOS CRISTALINOS (A) E FÓRMULA DE CÁLCULO (B)



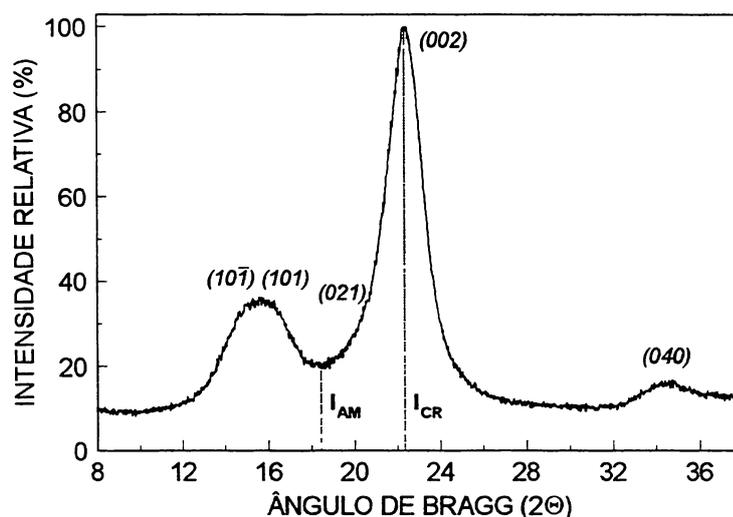
Nesta figura estão representados os planos ou faces mais importantes de um cristal de celulose I. No estudo da hidrólise enzimática de pastas kraft de eucalipto RAMOS et al. (1993) verificaram, que a espessura dos cristais nos planos 040 e 002 se mantêm aproximadamente constantes durante a bioconversão, mesmo quando o rendimento de hidrólise atinge 90% , indicando que em cada fase da hidrólise, a maior parte das microfibrilas residuais se conservam intactas.

No entanto, a interpretação dos dados de difração de raios-X deve sempre ser muito cuidadosa, principalmente quando este método é utilizado para avaliar o efeito de um processo hidrolítico e/ou degradativo sobre a celulose. A medida que a superfície das fibrilas (ou mesmo os cristalitos, em uma menor dimensão) de celulose são atacadas por agentes quer químicos quer biológicos, moléculas de menor grau de polimerização são geradas. Estas moléculas, durante o preparo da amostra para difração de raios-X, são suscetíveis à recristalização devido a remoção de água por processos como a liofilização, muitas vezes mascarando o real efeito causado pelo processo degradativo em estudo (ATALLA, 1984; SJÖNSTRÖM,1993).

Resumidamente, o grau de organização da celulose e de outras fibras é geralmente expresso em termos do índice de cristalinidade e das dimensões do cristal de celulose. O índice de cristalinidade é a difração de raios-X assumem que a celulose

é constituída por uma estrutura difásica e estabelece a definição mais ou menos arbitrária entre elas nos respectivos difratogramas (Figura 9). Desse modo pouco rigoroso, a fase cristalina é separada da fase amorfa, sendo que este procedimento é o mais freqüentemente utilizado em estudos de degradação enzimática da celulose (WOOD, 1991).

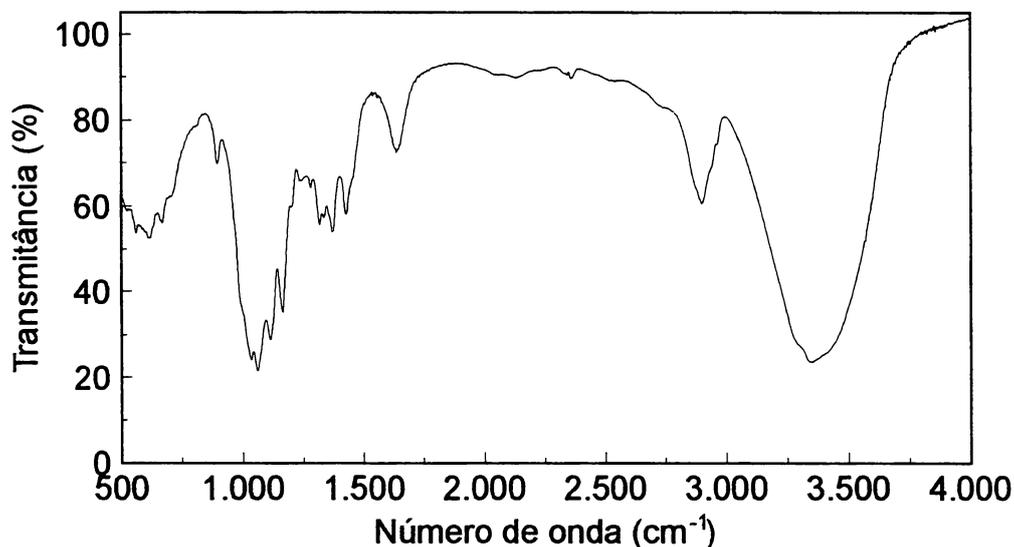
FIGURA 9 - DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE POLPA KRAFT BRANQUEADA, COM A IDENTIFICAÇÃO DAS INTENSIDADES UTILIZADAS NA RELAÇÃO EMPÍRICA DE SEGAL ET AL. (1959). VALORES EM PARÊNTESES INDICAM DIFERENTES PLANOS CRYSTALOGRAFICOS E SEUS RESPECTIVOS (HKL)



Recentemente, outros métodos analíticos, tais como a ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido e a espectrometria no infravermelho (FTIR) do material compactado em pastilhas de KBr (EVANS et al., 1994), têm sido sugeridos para a determinação da cristalinidade, embora os métodos espectroscópicos (FTIR e NMR) ainda não atingiram o grau de aceitabilidade usualmente associado à difração de raios-X. A análise por FTIR é geralmente realizada a partir de pastilhas de KBr (Figura 10). Os espectros no infravermelho próximo são geralmente gravados de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} antes da aplicação da transformada de Fourier. Alternativamente, os espectros de FTIR podem ser gerados a partir de materiais celulósicos utilizando-se da técnica de reflectância difusa (ou “DRIFT”), cuja execução dispensa a confecção de pastilhas de KBr e, por conseguinte, a moagem das

fibras celulósicas. Embora menos comuns, outras regiões do espectro do infravermelho, como o infravermelho distante e a espectroscopia Raman, têm também sido aplicadas com sucesso na caracterização de materiais celulósicos.

FIGURA 10- ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DE POLPA KRAFT BRANQUEADA EM PASTILHA DE KBR A 1% (P/P)

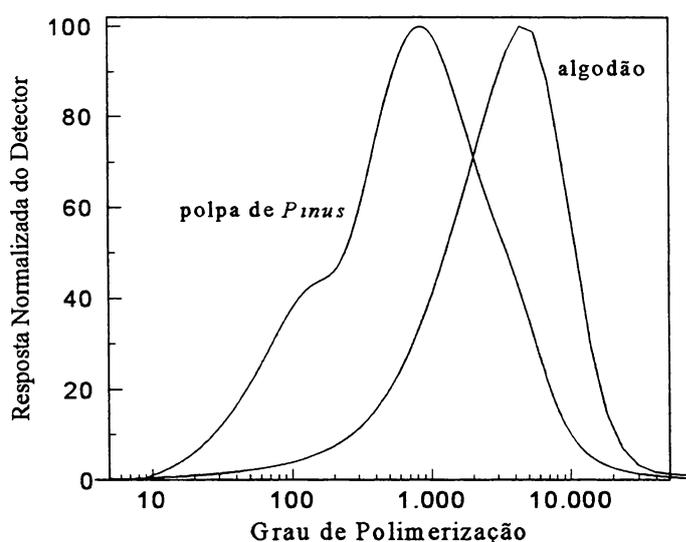


O grau de polimerização da celulose pode ser determinado por vários processos, dentre eles a determinação de sua viscosidade intrínseca após solubilização em um solvente reativo (cuoxam, cuproetilenodiamina ou cadoxen) e a determinação de sua distribuição em massas moleculares por cromatografia de permeação em gel após per-carbamilção (VALTASAARI AND SAARELA, 1975). O derivado per-carbamilado, obtido por reação com isocianato de fenila em meio contendo piridina, é totalmente solúvel em tetrahidrofurano e portanto passível de análise cromatográfica (RAMOS, 1992; RAMOS et al., 1993b, 1999b). Uma vantagem fundamental da análise cromatográfica reside no fato de que não apenas um valor de referência é obtido, mas sim um perfil de distribuição que pode revelar detalhes importantes de um processo tipicamente degradativo da celulose.

A Figura 11 apresenta o perfil cromatográfico obtido a partir dos derivados tricarbamilados da celulose presente no algodão e em polpas celulósicas branqueadas do tipo kraft. Obviamente, a celulose do algodão apresenta massas moleculares

superiores aos da polpa kraft pois esta última é decorrente de um processo quimicamente degenerativo e hidrolítico (polpação kraft). A análise de outros derivados da celulose, tais como o seu produto de nitratação, permitem igualmente com que se determine o seu grau de polimerização. Porém, neste caso, o derivado obtido é menos estável que aquele obtido pela reação de carbanilação (WOOD et al., 1986).

FIGURA 11- ANÁLISE DE CELULOSE PER-CARBAMILADA POR CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL, INDICANDO A DISTRIBUIÇÃO EM MASSAS MOLECULARES DO POLÍMERO ORIUNDO DE FIBRAS DE ALGODÃO HIDRÓFILO E POLPA KRAFT BRANQUEADA DE PINUS SPP



Quanto as características físico mecânicas na região cristalina, a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação. Por exemplo, a resistência à tração na região cristalina é quinze vezes superior ao valor apresentado na região amorfa, onde a fibra tem sua maior flexibilidade (FINCH & ROBERTS, 1985).

Existem vários tipos de celulose microcristalina disponíveis no mercado sendo que as mais comumente empregadas como substrato para ensaios enzimáticos são as denominadas de Avicel[®] (Merck) é microcristalina e a forma designada de Sigmacell[®] (Sigma Co.) é chamada de pulveriforme.

Na literatura também aparecem designações de celulose como holocelulose, α -celulose, β -celulose e γ -celulose. À celulose da madeira que foi tratada e

deslignificada designa-se o termo “holocelulose”, enquanto que a α -celulose corresponde à fração insolúvel em soluções concentradas de hidróxido de sódio. Por outro lado, β -celulose é a fração que precipita após neutralização da solução alcalina anterior, sendo que a γ -celulose será aquela que permanecerá na solução alcalina (POLGLASE, 1995; FRANZ & BLASCEK, 1990).

3.2.2 Hemicelulose

O segundo componente majoritário das fibras celulósicas são as hemiceluloses (POUTANEN et al., 1996). A classificação química das “hemiceluloses” pode ser feita considerando-as uma família de heteropolissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos dos quais participam pelo menos dois tipos de unidades de açúcar. Dentre esses, os grupamentos mais importantes são as glucuronoxilanas, as arabinoglucuronoxilanas, as glucomananas, as arabinogalactanas e as galactoglucomananas (VIAKARI et al., 1999). Portanto, o termo “hemicelulose” não designa um composto químico definido, mas sim uma classe de componentes polissacarídeos presentes em vegetais fibrosos.

Em termos gerais, as hemiceluloses participam nas madeiras em 20 a 30 % da composição total, enquanto que nas gramíneas estes valores podem variar de 20 a 40 % (FENGEL & WEGENER, 1989). Assim, as hemiceluloses isoladas de madeira são misturas complexas de polissacarídeos unidos por diferentes tipos de ligações, formando estruturas ramificadas e de organização estrutural relativamente restrita (amorfa).

Como no caso da celulose e da lignina, o teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses de madeira variam grandemente entre diferentes espécies e, provavelmente, de árvore para árvore em uma mesma espécie e de tecido para tecido em uma mesma árvore (STEPHEN & DENCE, 1992).

Em 1970, KENNETH já sugeria que a hemicelulose estaria ligada

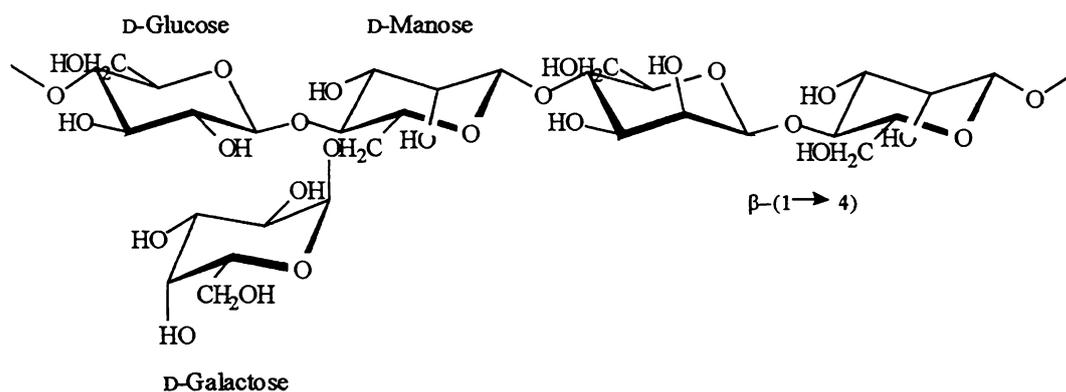
quimicamente à lignina, protegendo a celulose da ação de enzimas e conferindo à fibra maior resistência mecânica ao alongamento e ao estresse (STEPHEN&DENCE,1992).

As hemiceluloses apresentam na sua composição monomérica unidades distintas de:

- a) Pentoses: β -D-xilose e β -L-arabinose, nas suas formas furanosídicas ou piranosídicas;
- b) Hexoses: β -D-glucose, β -D-manose e β -D-galactose;
- c) Ácido urônico: ácido β -D-glucurônico;
- d) Deoxi-açúcares: (β -D-rhamnose e β -L-fucose).

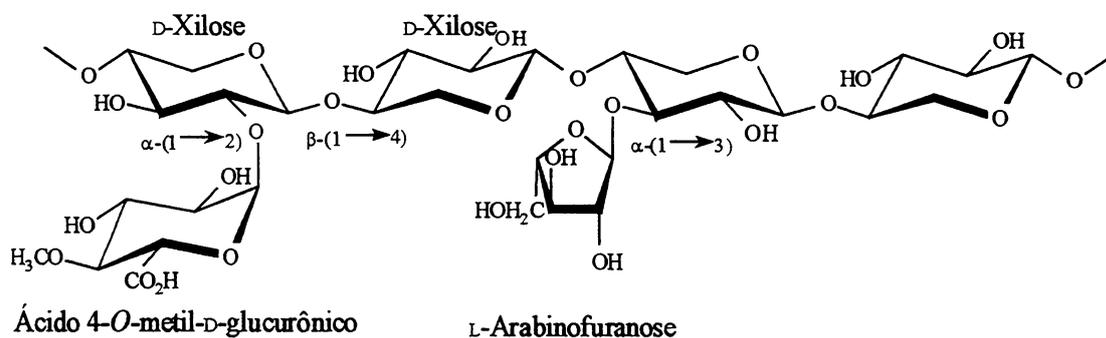
Nas Figuras 12, 13, 14 e 15 encontram-se representadas as principais unidades monossacarídicas que compõem a cadeia das hemiceluloses, bem como as regiões de acessibilidade química desses heteropolissacarídeos.

FIGURA 12 – ESTRUTURA DE UMA GALACTOGLUCOMANANA, COM A LIGAÇÃO β -(1 \rightarrow 4) EM EVIDÊNCIA (BIERMANN, 1996)



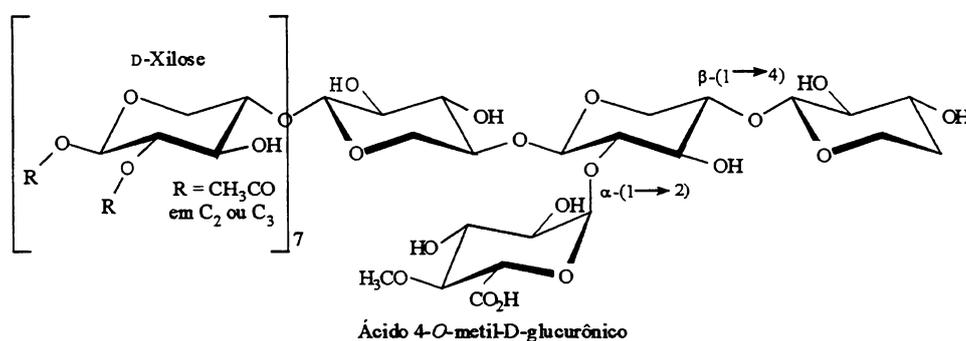
As hemiceluloses são reativas em seus grupos hidroxílicos (OH) através de processos como a metilação e a nitratação, também podendo estabelecer ligações éter ou éster (SUURNÄKKI et. al, 1996). Por oxidação desses grupos, podem ser obtidos grupos carbonílicos que são facilmente degradados por álcali, mesmo a frio. Se a oxidação for mais severa, formam-se grupos carboxílicos que são mais estáveis (ATTALA, 1993; GANDINI, 1992).

FIGURA 13 – ESTRUTURA DE UMA ARABINOGLUCURONOXILANA. A LIGAÇÃO β -(1 \rightarrow 4), E AS LIGAÇÕES α -(1 \rightarrow 2) E α -(1 \rightarrow 3) DO ÁCIDO 4-O-METIL-GLUCURÔNICO E DA L-ARABINOSE, RESPECTIVAMENTE EVIDENCIADAS (BIERMANN, 1996)



As hemiceluloses são praticamente amorfas e por isso apresentam maior acessibilidade e reatividade que as regiões cristalinas da celulose. Portanto, as reações de oxidação e degradação afetam mais rapidamente as hemiceluloses do que a celulose (MARCHESSAULT & SUNDARAJAN, 1983).

FIGURA 14- ESTRUTURA DA O-ACETIL-4-O-METIL-GLUCURONOXILANA. A LIGAÇÃO β -(1 \rightarrow 4) DA CADEIA PRINCIPAL E A LIGAÇÃO α -(1 \rightarrow 2) DO ÁCIDO 4-O-METIL-GLUCURÔNICO ENCONTRAM-SE EVIDENCIADAS (BIERMANN, 1996)

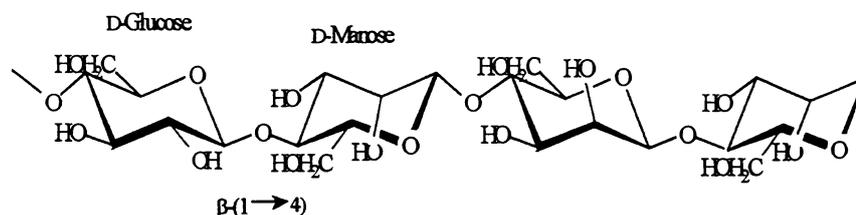


POLGLASE (1995), relatou que existem indícios de que xilanas e galactoglucomanas podem se tornar cristalinas após perderem alguns de seus constituintes moleculares. Isso pode ocorrer durante o processo “kraft” (vide subitem 3.3), quando as xilanas ou galactoglucomanas reprecipitam de volta à superfície das fibras com um maior grau de associação molecular. Nestes casos, a desacetilação é

provavelmente a principal razão para que a estrutura assuma uma forma de maior organização molecular e/ou estrutural.

Além das xilanas, as madeiras duras contêm cerca de 2 a 5% de glucomananas, as quais são compostas por unidades de D-glucopiranosose e D-manopiranosose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4). A relação glucose:manose varia entre 1:2 e 1:1, dependendo da espécie de madeira (BIERMANN et al., 1996).

FIGURA 15- ESTRUTURA DA GLUCOMANANA, COM A LIGAÇÃO β -(1 \rightarrow 4) EM DETALHE (BIERMANN et al., 1996).



3.2.3 Lignina

O último componente de maior proporção nas fibras celulósicas é a lignina, um polímero fenólico de estrutura bastante complexa, que é formado por álcoois aromáticos em distribuição randômica. Constitui parte das paredes celulares e da lamela média dos vegetais, estando intimamente ligada à hemicelulose por ligações covalentes (FREUDENBERG & NEISH, 1968; TAKAY et al., 1983).

Devido a suas características físico-químicas, a lignina protege a celulose da ação enzimática e justifica as propriedades mecânicas da fibra decorrentes da íntima associação entre ela e os polissacarídeos da fitobiomassa (FENGEL & WEGENER, 1989). Portanto, trata-se de um dos principais componentes dos tecidos vasculares de gimnospermas e angiospermas. A lignina tem também um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência

mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos lignificados contra o ataque de microrganismos. Vegetais primitivos como fungos, algas e líquenes não são lignificados .

Em 1821, PAYEN (citado por FENGEL & WEGENER, 1989), tratou diferentes amostras de madeiras com ácido nítrico, verificando que todas as amostras estudadas continham uma substância com a mesma composição do amido, que acabou sendo chamada de “celulose”. Entretanto, como foi observado que o conteúdo mássico de carbono da madeira era bem maior que o da celulose, Payen denominou o material restante de “material incrustante”. O termo lignina foi introduzido em 1857 para nomear tal material. Em 1890, alguns pesquisadores verificaram a presença de grupos metoxila na madeira, que sabiam não existir na celulose (FREUDENBERG & NEISH, 1968). Em 1907, Klason foi o primeiro a desenvolver um método para o isolamento da lignina, removendo os polissacarídeos por reação com ácido sulfúrico 72% e permitindo o isolamento de um produto negro, denominado lignina de Klason (FENGEL & WEGENER, 1989).

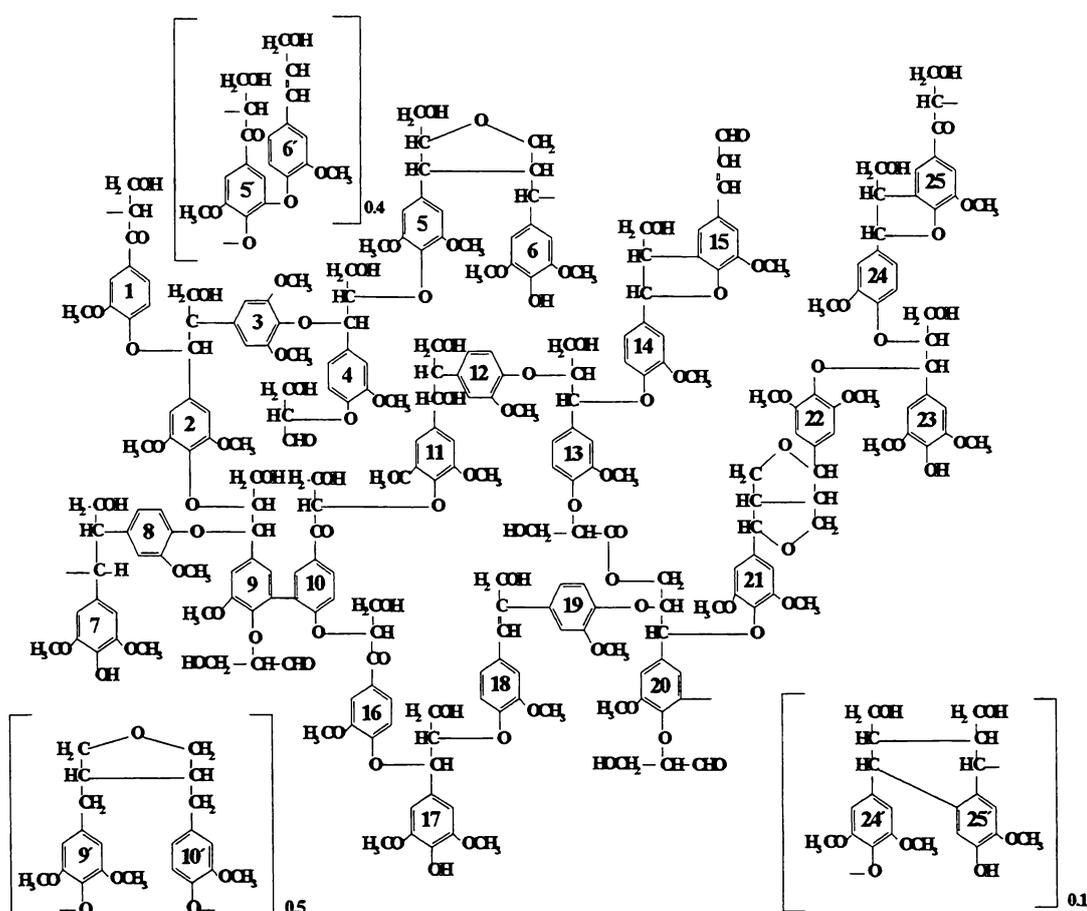
A lignina é um polímero natural proveniente da condensação desidrogenativa de três álcoois precursores: p-cumarílico, trans-coniferílico e trans-sinapílico (MARRON, 1979; GANDINI, 1992), sendo que a polimerização radicalar destes álcoois geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (FREUDENBERG & NEISH, 1968). Sua ocorrência em plantas superiores é muito variada, podendo residir entre 20 a 40% para diversos tipos de madeiras (NULTSCH, 2000).

A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não é conhecida completamente. As ligninas de madeiras duras apresentam, em sua composição, além de grupos guaiacil, proporções mais altas de grupos siringil, enquanto que as madeiras moles são mais ricas em grupos guaiacil (HIGUCHI, 1990).

Diferentes tipos de ligninas que variam de espécie para espécie e até mesmo dentro de uma mesma espécie, dependendo das variações nas condições ambientais,

tais como o clima e as condições do solo. A Figura 16 mostra uma representação da estrutura molecular da lignina de um tipo de madeira dura (faia ou *Fagus sp.*), de acordo com os estudos de Nimz e colaboradores (HIGUCHI, 1990).

FIGURA 16- MODELO ESTRUTURAL DA LIGNINA DE FAIA (NIMZ, 1974), OS NÚMEROS DE 1 A 25 INDICAM A PRESENÇA DOS ANÉIS AROMÁTICOS



3.3 INDÚSTRIA PAPELEIRA

O comércio mundial de celulose tem uma dimensão ao redor de 30 milhões de toneladas, participando a fibra de eucalipto com 17%, sendo que o Brasil é responsável por 52% de tal volume. Portanto, além de se caracterizar como o principal exportador de celulose de fibra curta de eucalipto, o Brasil é um importante fornecedor de papéis não-revestidos de impressão e escrita no mercado internacional.

O consumo mundial de papel apresentou, nos últimos cinco anos, uma taxa

de crescimento anual da ordem de 2,3%. No entanto, países como Estados Unidos, Canadá, Japão e a Europa Ocidental alcançaram valores inferiores ao índice mundial (1,7%), muito embora representem 71% do consumo total. Em valores reais, a quantidade de papel consumida no Brasil no ano de 1999 atingiu cerca de 213 milhões de toneladas (GAZETA MERCANTIL, 2001).

Nas Tabelas 2 e 3 e na Figura 17 encontram-se os valores referentes aos itens de exportação derivados da indústria papeleira, segundo a classificação da Carteira de Exportação do Banco do Brasil – MDIC/Secex (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2000).

TABELA 2 – EXPORTAÇÕES DE PRODUTOS E DERIVADOS DA INDÚSTRIA PAPELEIRA (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2000)

Ano	Papel e manufaturados (toneladas)	Papel para imprimir e escrever (toneladas)	Pasta química (toneladas)
2000	1.224.549	265.118	2.916.506
1999	1.329.657	420.187	3.013.247
1998	1.217.021	454.556	2.698.129
1997	1.329.435	565.679	2.381.515

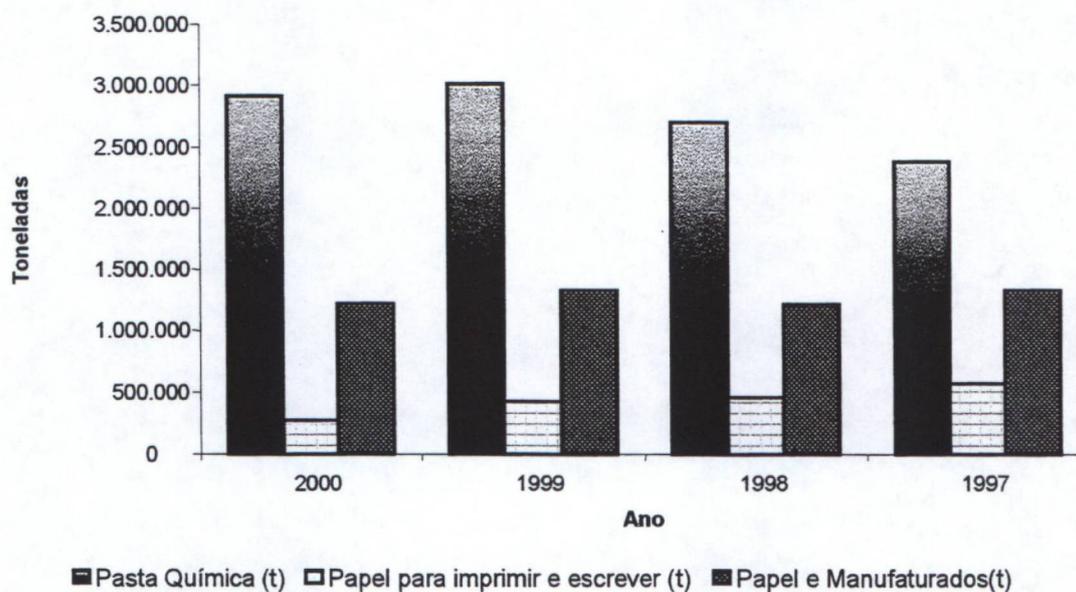
A principal matéria-prima para a produção de papel é a madeira, sendo que no Brasil, a madeira mais empregada é a de *Eucalyptus* sp. No entanto, para a obtenção do papel propriamente dito, uma série de processos (polpação) são necessários para separar das fibras do material lignocelulósico, o que pode ser realizado por processos químicos, mecânicos ou por uma combinação desses.

Na polpação mecânica, devido a utilização de moinhos de bola rotatórios e jatos de água, ocorre a perda da resistência da polpa, resultando em um papel de baixa qualidade, além de elevados custos operacionais. Apesar das adaptações como discos de refino a altas pressões, estes processos continuam relativamente inviáveis (SUURNÄKKI et. al, 1997).

TABELA 3 – POSIÇÃO DOS PRODUTOS BRASILEIROS NO MERCADO MUNDIAL (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2000)

Posição no Mercado Mundial em 2000	
Consumo de Papel	9° (4,473 milhões Toneladas)
Produtor de Papel	11° (2,2% da produção Mundial)
Consumo de Fibras	8°
Produtor de Fibras	6°
Produtor de Celulose e Pastas	3°

FIGURA 17- EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE PRODUTOS DERIVADOS DA INDÚSTRIA PAPELEIRA



Processos químicos de polpação são aqueles que removem grande parte da lignina através de reações que levam à despolimerização desta macromolécula, solubilizando-a no licor de cozimento e liberando as fibras de celulose. O processo deve evitar ao máximo o ataque aos polissacarídeos para não ocorrer a despolimerização da celulose e da hemicelulose, o que acarretaria danos nas propriedades físico-mecânicas da polpa e no rendimento da polpa para a fabricação do papel (KENNETH, 1970).

Os processos químicos industriais mais importantes são os processos kraft e sulfito (FINCH & ROBERTS, 1985). No Brasil e em muitas partes do mundo, o processo kraft é o mais amplamente empregado. Já nos Estados Unidos, 70% de toda a produção de polpas de celulose são oriundas desse processo químico e o mesmo acontecendo na Europa, com exceção da Alemanha, onde o processo sulfito é o mais empregado.

O processo de polpação kraft consiste no cozimento dos cavacos de madeira, a uma temperatura de aproximadamente 170°C, em uma solução alcalina de sulfeto de sódio, denominada de licor branco. A presença do sulfeto no licor de cozimento oferece algumas vantagens como a rapidez na deslignificação e menor exposição da madeira à solução alcalina, o que permite a produção de polpas mais resistentes em função da menor degradação de celulose e hemiceluloses.

A grande aceitação do processo kraft, segundo SJÖNSTRÖM (1993), deve-se a inúmeros fatores, muito embora existam fatores negativos, tais como os discriminados na Tabela 4.

As espécies ativas envolvidas na deslignificação são os íons sulfeto (S_2^-) e bissulfeto (HS^-), que podem ser inclusive regenerados na caldeira de recuperação a partir do sulfato de sódio, e os íons hidroxila. Os íons sulfeto e bissulfeto, altamente nucleofílicos, reagem exclusivamente com a lignina através da quebra de ligações α -aril e β -aril éter, formando fenolatos solúveis no licor de cozimento (SJÖNSTRÖM, 1993).

Reações indesejáveis de condensação ocorrem tanto no processo de polpação sulfito como no kraft, principalmente nas posições C-5 das unidades fenólicas da lignina. Além dessas, ocorrem reações de formação de subestruturas com grupos cromóforos que são parcialmente responsáveis pela coloração escura que as polpas apresentam (SJÖNSTRÖM, 1993).

TABELA 4- COMPARAÇÃO ENTRE PONTOS POSITIVOS E NEGATIVOS DO PROCESSO KRAFT (SJÖNSTRÖM, 1993)

PONTOS POSITIVOS	PONTOS NEGATIVOS
<p>Baixa exigência quanto à qualidade da madeira, podendo ser madeiras moles, duras ou até uma combinação destas. Além disso, esse processo possui grande tolerância quanto à presença de extrativos e cascas;</p> <p>Curto tempo de cozimento;</p> <p>Geração de calor para as caldeiras com a queima da lignina;</p> <p>Polpa de excelente qualidade e resistência ;</p> <p>Obtenção de alvura elevada após as etapas de branqueamento;</p> <p>Recuperação parcial dos reagentes químicos empregados;</p>	<p>Odor desagradável ocasionado pelos gases derivados do enxofre;</p> <p>Custos enormes para instalação de uma fábrica;</p> <p>Coloração escura da polpa resultante;</p> <p>Baixo rendimento de polpa (45 a 55%)</p>

O baixo rendimento dos processos sulfito, kraft e alcalinos está relacionado com a degradação dos carboidratos (celulose e hemiceluloses) através das reações com os íons hidroxilas. A solvatação dos carboidratos pelas fortes soluções alcalinas leva ao rompimento das ligações de hidrogênio entre as várias cadeias, provocando um processo de inchamento da madeira, onde as hemiceluloses são dissolvidas e/ou desacetiladas por hidrólise alcalina previamente à sua dissolução no licor. Ademais, pode ocorrer também a despolimerização terminal da celulose, onde o grupo aldeídico terminal da glucose se rearranja, levando em seguida a uma eliminação β -alcóxi com a formação de uma nova unidade na extremidade da molécula. Essas reações seguem sucessivamente até a formação de uma unidade terminal resistente à despolimerização (GANDINI, 1992).

Ao longo dos últimos anos, desenvolvimentos significativos vêm sendo empreendidos ao processo kraft para reduzir o teor de lignina residual na polpa, sem com isso gerar qualquer alteração de suas propriedades físico-mecânicas. Quatro princípios foram listados como fundamentais para que este objetivo pudesse ser atingido: reduzir a concentração de álcali no início e aumentar esta concentração no final do processo; manter alta a concentração de íons HS^- no início do processo de deslignificação; manter baixas concentrações de lignina e íons sódio no licor; e

controlar a temperatura em níveis baixos, particularmente no início e no final do cozimento. Tais princípios foram incorporados em um processo denominado de MCC (“Modified Continuous Cooking”), ou cozimento contínuo modificado. Variações do cozimento MCC podem ainda ser implementadas com o intuito de otimizar o processo, sendo que delas surgiram os processos EMCC (“Extended Modified Continuous Cooking”) e ITC (“Isothermal Cooking”). A primeira modificação advém da adição de parte da carga alcalina do processo diretamente no licor oriundo da lavagem “high heat”, que é então recirculado, enquanto que a segunda modificação diz respeito à condução de todo o processo em uma temperatura pré-fixada, donde o termo *isotérmico* (SANTOS *et al.*, 1994).

3.4 TECNOLOGIA ENZIMÁTICA

A aplicação da catálise enzimática em processos industriais pode ser dividida em quatro campos distintos que são listados a seguir:

- 1)- na obtenção de agentes terapêuticos;
- 2)- como ferramenta para a manipulação de materiais biológicos;
- 3)- como reagentes analíticos;
- 4)- como catalisadores industriais.

A bioconversão de produtos naturais vem sendo empregada de maneira crescente pela indústria nos últimos 20 anos. Um indicador deste fato é o aumento da produção mundial de enzimas, principal catalisador destes processos, girando em torno de 70.000 t/ano e envolvendo cifras da ordem de US\$ 520 milhões (GAZETA MERCANTIL, 1999).

Na Tabela 5 encontram-se algumas enzimas de interesse industrial e o seu potencial de uso na manufatura de produtos requeridos pelo mercado consumidor (BU’LOCK & KRISTIANSEN, 1991; GERHARD & WOLFGANG, 1991).

TABELA 5 - ENZIMAS CLÁSSICAS INDÚSTRIAS E SUAS FONTES DE USO (GERHARD & WOLFGANG, 1991)

Enzima	Fonte	Usos principais
β-Amilase	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus amiloliquefaciens</i>	Hidrólise do amido para xaropes açucarados, fabricação de cerveja
Celulase	<i>Bacillus tricheniformis</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Penicillium sp.</i>	Têxteis Polpa e papel Processamento de frutas e verduras
β-Glucanase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólise de β-glucanas na fabricação da cerveja
Glucoamilase	<i>Rhizopus sp.</i> <i>Aspergillus niger</i>	Produção de xarope de glucose a partir do amido
Lactase	<i>Saccharomyces sp.</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Hidrólise da lactose do leite e do soro do leite
Lipase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Rhizopus sp.</i>	Modificação do aroma do queijo e da manteiga Detergentes
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	Extração e clarificação de sucos de frutas
Protease	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amiloliquefaciens</i> <i>Endothea parasitica</i> <i>Mucor miehei</i>	Indústria do couro e detergentes Fabricação de cervejas e pão Manufatura do queijo

No segundo período ao final dos anos 80, constatou-se um expressivo aumento nas importações de enzimas(em torno de 500%), o que coincidiu, em 1989, com o lançamento no mercado brasileiro de biodetergentes que as utilizam em suas formulações. Constatado o êxito comercial dos biodetergentes, houve um aumento nas escalas de produção de indústrias como a Novo Nordisk do Brasil (Curitiba, PR), ao mesmo tempo em que foi observada uma sensível queda na importação de enzimas, resultando em um balanço negativo da ordem de US\$ 864.000,00 (oitocentos e sessenta e quatro milhões de dólares). A terceira fase veio com a globalização da economia e a política de comércio exterior menos reguladora, resultando em um aumento no volume de importação e comprovando que a demanda do mercado interno por biocatalisadores realmente encontrava-se reprimida (WISEMAN, 1986; GAZETA MERCANTIL, 2000).

3.4.1 Tecnologia Enzimática nos Processos da Indústria Papeleira

No início da década de 80, surgiram na indústria papeleira os primeiros estudos utilizando enzimas para tratamento de celulose (VIAKARI, 2000; (RAHKAMO et al., 1998 a,b ; PERE, et al., 1995). Este interesse estava fortemente ligado à dificuldade na redução dos problemas causados no processo de industrialização do papel, principalmente na etapa de branqueamento, e na necessidade de reduzir a sua carga poluente. Estudos envolvendo enzimas têm demonstrado que é possível reduzir a carga tóxica destes efluentes por via biológica (por exemplo: organoclorados e dioxinas) (WISEMAN, 1986).

Conforme DURÁN et al. (1995), enzimas podem ser empregadas em diversos estágios da fabricação do papel, dentre eles:

- (a) na redução de energia gasta no descascamento da madeira;
- (b) no pré-tratamento do cavaco antes da polpação e das polpas antes do branqueamento (YAMASHIKI et al. 1990);
- (c) no biodeslignificação dos cavacos por fungos lignolíticos (biopolpação);
- (d) no biobranqueamento das polpas por xilanases, ligninases e lacases (TENKANEN,1997); e
- (e) na biorremediação de efluentes industriais.

Vários autores reiteram o fato de que algumas dessas aplicações já atingiram a escala comercial, como é o caso do uso de xilanases no processo de branqueamento, de enzimas oxidativas para processos de delignificação e de celulases para redução do requerimento de energético das etapas de refino (RAHKMO et al.,1998a). Uma descrição das enzimas que encontram aplicação na indústria de papel e celulose é dada na Tabela 6, juntamente com o efeito esperado sobre os diferentes componentes da polpa e/ou da madeira (KANTELINEN et al., 1997; VIAKARI, 2000).

Todos os processos de transformação enzimática descritos nesta tabela se baseiam nas atividades específicas de determinadas enzimas, assim como no

aproveitamento de seu produto de ação catalítica (BU'LOCK & KRISTIANSEN, 1991). Atualmente, são conhecidas e caracterizadas aproximadamente 2000 enzimas, dentre as quais 50 podem ser obtidas biotecnologicamente em grande escala (WISEMAN, 1986; BU'LOCK & KRISTIANSEN, 1991; VIKARI, 2000).

TABELA 6 - AÇÃO DE ENZIMAS EM DIFERENTES COMPONENTES DA MADEIRA.

<i>Componentes</i>	<i>Enzima</i>	<i>Modificação físico-química</i>	<i>Benefício técnico</i>
Celulose	Celobiohidrolase Endoglucanase Mistura	Microfibrilação Despolimerização Despolimerização	Redução da energia de refino Aumento da flexibilidade das fibras Redução do índice de retenção de água da polpa Melhoria da qualidade das fibras
Xilana	Endoxilanase	Despolimerização	Extração de lignina
Glucomanana	Endomananase Acetil esterase Glucomananase	Despolimerização Decréscimo da estabilidade coloidal Decréscimo na solubilidade	Extração de lignina Aumento na velocidade da máquina de papel (remoção de gomas) Efeito sobre o alongamento das fibras
Pectina	Pectinase	Despolimerização	Decréscimo da demanda catiônica na máquina de papel
Lignina	Lacase	Despolimerização	Decréscimo na cor
Extrativa	Lipase	Aumento da hidrofiliçidade	Efeito sobre o alongamento das fibras Aumento na velocidade da máquina de papel (remoção de extrativos)

Enzimas derivadas de organismos normais e daqueles modificados geneticamente também começam a surgir no mercado mundial. Dentre as muitas aplicações destacam-se aquelas que tem por finalidade aumentar a produção de enzimas industriais e/ou aumentar a atividade específica destas enzimas em processos de bioconversão (GERHARD & WOLFGANG, 1991, CAVACO-PAULO et al., 1997).

3.4.2 Tecnologia Enzimática em Outros Processos

Por ser a celulose uma fonte abundante na natureza, sua utilização biotecnológica sugere muitas possibilidades atrativas baseadas em processos

hidrolíticos e/ou fermentativos (SADDLER, 1991; HENRIKSSON et al., 1995). Nos anos 90, grandes incentivos foram ofertados para a produção de álcool combustível a partir de celulose, o que levou inúmeros pesquisadores a avanços significativos na descoberta de processos de produção de enzimas, pré-tratamentos, avaliação de substratos e utilização de sub-produtos que contribuíssem para a viabilização econômica do processo. Um marco nesses grandes avanços foi o desenvolvimento de uma *Escherichia coli* recombinante que converte em etanol tanto pentoses quanto hexoses oriundas da hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos pré-tratados (ALTERTHUM et al., 1994). Tal descoberta possibilitou a realização, em uma etapa única, da Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS) da fitobiomassa pré-tratada, fato de grande contribuição para a viabilização econômica da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos residuais como o bagaço de cana (FINCH & ROBERTS, 1985).

A validade do método SFS tem sido documentada por muitos autores (GERHARD & WOLFGANG, 1991; WOOD, 1991). Tal método baseia-se na suposição de que os açúcares liberados do substrato pela hidrólise enzimática são rapidamente fermentados por leveduras ou microrganismo a etanol. A ação de celulasas em substratos pode, portanto, prosseguir sem nenhuma interferência de altas concentrações de açúcares na mistura de reação. A maioria dos trabalhos publicados neste sentido tem utilizado celulasas fúngicas para o processo hidrolítico (FAN et al., 1987; NEVALAINEN et al., 1991; OKSANEN et al., 1997). Por outro lado, pré-tratamentos apropriados podem reduzir a quantidade de enzimas necessárias à sacarificação enzimática (RAMOS et al., 1992a).

Um dos métodos de pré-tratamento mais promissores é a explosão a vapor, que atenua sensivelmente o caráter altamente recalcitrante da lignocelulose nativa (RAMOS, 1992, RAMOS et al., 1993). Durante o pré-tratamento, a estrutura da parede celular lignocelulósica é modificada radicalmente pela penetração de vapor saturado a altas temperaturas. Esta modificação estrutural da parede celular lignocelulósica

resulta de uma hidrólise ácida parcial da hemiceluloses, deixando um resíduo celulósico de alta susceptibilidade à hidrólise enzimática (RAMOS & SADDLER, 1994; TENKANEN et al., 1994).

As celulasas também têm tido aplicação crescente na formulação dos pós de lavagem domésticos, por aumentarem o seu poder de ação detergente (LINKO, 1993; CAVACO-PAULO, 1995) e também por limparem a superfície das fibras de algodão (biopolimento), removendo fibrilas soltas, borbotos e partículas de sujeira retidas na superfície. Isto vai conferir ao produto lavado um tato mais macio e um melhor aspecto, com cores mais vivas (MIETTINEN-OINONEN et al., 1999). O tratamento com celulasas também é usado no amaciamento de fibras ligno-celulósicas, como o linho, o cânhamo e a juta, facilitando o seu processamento industrial (MIETTINEN-OINONEN et al., 1996; PERE et al., 1996).

Entre outras aplicações, cita-se a utilização de celulasas como aditivo para o crescimento dos fungos celulolíticos em resíduos celulósicos para a produção de ração animal (BU'LOCK & KRISTIANSEN, 1991), na indústria têxtil em substituição do processo "stone-washing" (CAVACO-PAULO et al., 1997), na clarificação de sucos, na produção de detergentes (OIJUSLUOMA et al., 1996; MIETTINEN-OINONEN et al., 1999) e na área farmacêutica, no auxílio à digestibilidade da celulose em doentes gastroendêmicos ou acometidos de colites.

3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FITOBIOMASSA

Como função principal, as enzimas hidrolíticas fragmentam macromoléculas que não podem ser assimiladas diretamente pelas células, como é o caso do amido, da celulose e da pectina; portanto, a absorção através da membrana celular se dá via seus constituintes de menor massa molar, ou seja, mono e dissacarídeos e ácidos urônicos (ERIK et al., 1988).

A geometria da estrutura cristalina da celulose é muito importante nos

processos de tratamento enzimático, sendo que as enzimas poderão atacar preferencialmente um dos dois tipos de estrutura. Estudos de modelagem sugerem que sítios de menor organização molecular, localizados na superfície do cristal são mais susceptíveis ao ataque enzimático (COUGHLAN, 1985, BUCHERT et al., 1996).

Componentes valiosos são liberados com a remoção enzimática da parede celular, tais como: aromas, polissacarídeos, enzimas e outras proteínas, ou ainda, a liberação de protoplastos vegetais para pesquisa genética e desenvolvimento de vegetais superiores (WISEMAN, 1986).

A biodegradação da fitobiomassa tem sido muito estudada há várias décadas e é um assunto parcialmente elucidado do ponto de vista bioquímico, sendo que na natureza esta função é exercida principalmente fungos e bactérias (VICENTE, 1989).

A eficiência com a qual a fitobiomassa é hidrolisada depende de múltiplos fatores que envolvem as características do substrato e a natureza do sistema enzimático usado. É, portanto, importante considerar estes dados na avaliação do processo de bioconversão celulolítica (WOOD, 1989; BUCHERT et al., 1994).

Muitos microrganismos como os fungos filamentosos, presentes em grande quantidade na natureza, são capazes de fazer a bioconversão de materiais lignocelulósicos em unidades de fácil assimilação para o seu metabolismo vital (KANTELINEN et al., 1997; WOOD et al., 1978).

No caso da biodegradação de polioses, esta ocorre de forma semelhante à da celulose, sendo que as enzimas envolvidas na biodegradação são hidrolases específicas que clivam determinados tipos de ligação existentes nos polissacarídeos. Assim, as β -(1,4)-glucanases hidrolisam as ligações glicosídicas existentes na molécula de celulose, as xilanases rompem ligações glicosídicas entre unidades monoméricas de xilose, as mananases atuam sobre ligações glicosídicas entre moléculas de manose e as glucuronidases, sobre ligações de ácidos urônicos com outros açúcares.

Uma quantidade grande destas enzimas extracelulares, particularmente as celulolíticas, são produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*. Muito tem se investigado

quanto à capacidade destas enzimas em degradar a fitobiomassa, sendo esta apontada como ideal pela complexidade de seu sistema e pelas variações na sua composição centesimal. Outros fungos celulolíticos também têm sido estudados com este objetivo, como é o caso do *Phanerochaete chrysosporium*, do *Penicillium pinophilum* e do *Fusarium solani* (ERIKSSON et al., 1990).

Os sistemas celulolíticos dos fungos e de algumas bactérias (*Cellulomonas fimi* e *Thermonospora fusca*) são constituídos por enzimas extracelulares que atuam no meio (endoglucanases) ou na extremidade (exoglucanases) da cadeia da celulose. Por seu lado, as bactérias anaeróbias degradam a celulose usando enzimas ligadas à membrana celular. Estas enzimas estão organizadas em um complexo com diversos componentes designado “celulossoma” (SRISODSUK, 1994), que inclui tipicamente várias endoglucanases e exoglucanases, além de xilanases e outras proteínas de função ainda não totalmente esclarecida.

Os sistemas enzimáticos de fungos que apresentam os dois tipos principais de glucanases, endo e exo, são designados como completos porque degradam a celulose cristalina eficientemente. Noutros casos, como os fungos do bolor marrom, as exoglucanases estão ausentes. Em seu lugar, estes fungos usam compostos oxidantes, de baixa massa molecular, que degradam as zonas amorfas da celulose com eficiência (KLEMAN-LEYER et al., 1994).

Outras enzimas podem eventualmente participar do processo de hidrólise da celulose quando presentes, como as exoglucohidrolases e algumas enzimas oxidativas como a celobiodesidrogenase (CDH) e a celobiono oxi-redutase, que atuam simultaneamente sobre a lignina e celulose (COUGHLAN, 1985; GOYAL et al., 1991). Nesses casos, as lactonas produzidas no estágio oxidativo da digestão da celulose são convertidas em ácido celobiônico pela lactonase.

Outro grupo importante é o das hemicelulases, que são divididas em três grupos: as endo-hemicelulases, que hidrolisam o polímero ao acaso, liberando fragmentos de menor massa molar; as exo-hemicelulases que hidrolisam os fragmentos

gerados pelas endo-hemicelulases; e as xilosidases, que hidrolisam dímeros a açúcares mononéricos (HIGUCHI, 1985; ERIKSSON et al., 1990).

Dentre os fungos filamentosos de interesse industrial, destacam-se principalmente o *Trichoderma* sp e *Aspergillus* sp como modelos de produção de enzimas celulolíticas, amilolíticas e β -glucosidásicas. Estudos com outros fungos também têm sido realizados para definir o potencial de produção de enzimas no processo de biodegradação, dentre eles o fungo termofílico *Humicola grisea* (KOIVULA, 1994). Estes estudos têm sido realizados com o intuito de se obter maiores eficiências de fermentação e altas taxas de produtividade.

A produção de enzimas do complexo celulolítico está sujeita à indução e repressão. O melhor indutor destas hidrolases é a própria celulose, como o algodão e a celulose microcristalina. No entanto, como esses substratos são essencialmente insolúveis, a celobiose é na realidade o verdadeiro indutor. Por esta razão, a presença de baixos níveis de β -glucosidade extracelular é recomendada para que a comunicação via oligômero solúvel (celobiose) seja facilitada e leve a níveis de indução mais altos do complexo enzimático. Outros bons indutores para o *T. reesei* são a lactose e a soforose, enquanto que a glucose reprime ativamente a produção de enzimas do complexo celulolítico, presumivelmente por repressão catabólica (LINKO, 1993).

Avanços têm sido possíveis mediante o uso de técnicas de engenharia genética e novas linhagens vêm sendo desenvolvidas, produzindo enzimas de altas atividades específicas com aplicações ainda mais diversificadas do que as já existentes (ENARI & NIKU-PAAVOLA, 1987). Assim, as informações que estão presentes em nível de genoma podem fornecer muitas respostas sobre sua regulação. O seqüenciamento de genes nos fornece dados sobre a proteína, seus sítios de restrição, a localização de íntrons e exons, seus códons de iniciação e de terminação, bem como de regiões reguladoras para a transcrição dos genes (CAAT box, TATA box, GC box, e outros). Nesses estudos, a expressão gênica heteróloga tem se demonstrado como uma das alternativas mais viáveis para aplicações industriais (SALOHEIMO et al., 1997a)

3.5.1 *Trichoderma reesei*

O gênero *Trichoderma* define várias espécies de fungos que se desenvolvem no solo e está incluído nos *Deuteromycotina* (*Fungi Imperfecti*). Este gênero também pode ser relacionado com o gênero *Hypocrea* e com o gênero *Podostroma*, já que a fase assexuada destes fungos não se distingue morfológicamente das encontradas no gênero *Trichoderma* (EVELEIGH et al., 1985). Nos *Fungi Imperfecti*, o gênero *Trichoderma* está incluído no grupo taxonômico dos *Hyphomycetes* (*Moniliales*). Os fungos pertencentes aos *Hyphomycetes* caracterizam-se por formarem conídios em um micélio indiferenciado ou sobre conidóforos especializados, que podem ser simples ou compostos, solitários ou agregados (NULTSCH, 2000).

O fungo *T. reesei* é considerado um organismo não patogênico e as condições utilizadas para a produção de celulases não apresentam o inconveniente da produção de toxinas ou antibióticos (NEVALAINEN et al., 1995 ; 1991).

O *Trichoderma* foi descoberto durante a II Guerra Mundial na Ásia, pela sua capacidade de destruir os tecidos de algodão das tendas do Exército Americano (TEERI, 1997). Em 1950, o grupo de Edwin T. Reese nos Laboratórios do Exército Americano identificou o fungo *T. viride* como sendo o responsável pela degradação dos tecidos das tendas. Nesta altura, o algodão já tinha sido substituído pela poliamida no fabrico das tendas, mas o novo interesse neste fungo residia agora na possibilidade da conversão da biomassa para aproveitamento energético (LINKO, 1993).

Foram efetuados numerosos estudos no sentido de obter mutantes da *T. viride*, com o objetivo de aumentar a capacidade de produção de enzimas e maximizar a capacidade hidrolítica destas frente a substratos celulósicos. O *T. reesei* é um destes mutantes, sendo-lhe atribuído este nome desde 1977 (WISEMAN, 1986; TEERI et al., 1999).

Segundo RIFAI (1969), citado por SALOHEIMO et al. (1993), o gênero *Trichoderma* possui nove espécies. No entanto, estudos mais recentes consideram a

existência de mais de 27 espécies, sendo que *T. reesei* é tido como sinônimo ou subespécie de *T. longibrachiarium*. O uso específico do sufixo *reesei* é dedicado a E. Reesei, um dos primeiros e principais investigadores a estudarem o taxon (SALOHEIMO et al., 1993). Segundo EVELEIGH et al. (1985), a espécie tem 6 ou 7 cromossomas com variações na quantidade de mega pares de base entre 31 e 39 Mpb.

Das celulases do *T. reesei*, a estirpe QM 6A foi a que deu origem a todas as outras por mutagênese físico-química, mediante métodos como a irradiação com raios ultravioleta, radiação γ e bombardeamento com elétrons de alta energia. Atualmente, a estirpe mais estudada é a QM 9414 e nenhuma das estirpes mutantes conseguidas desde 1978 ultrapassou a sua atividade celulolítica (EVELEIGH et al., 1985; TEERI et al., 1995a).

Conhecem-se espécies do gênero *Trichoderma* com capacidade para produzir outras enzimas como as acetil-esterases, amilases, lacases, mananases, proteases, quitinases, quitobiases, ribonucleases, transglucosidases, xilanases e α -galactosidase (EVELEIGH et al., 1985). Outras espécies têm a capacidade de acumular lípidos (BROWN et al., 1996), de degradar o ácido aspergílico e outros anéis heterocíclicos e de produzir compostos com atividade antibiótica e fungicida (NYSSÖNEN & KERÄNEN, 1985).

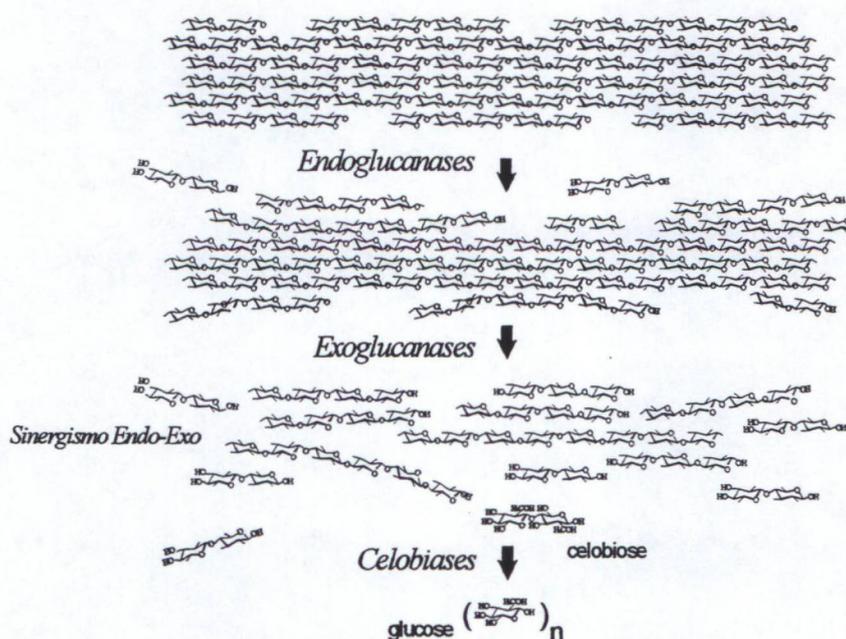
3.5.2 Mecanismos de Ação Catalítica em *T. reesei*

O complexo celulásico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases também designadas exoglucanases e as β -glucosidases. As endoglucanases (EGs) clivam internamente e preferencialmente as regiões menos cristalinas das microfibrilas, enquanto as exoglucanases (CBHs) clivam a celobiose das extremidades livres da celulose e as β -glucosidases hidrolisam à glucose a celobiose e pequenos oligômeros solúveis produzidos pelas endoglucanases e exoglucanases (KOIVULA,

1994). Na Figura 18 encontra-se representada esquematicamente a ação dos três grupos majoritários de enzimas celulolíticas do *T. reesei*.

O *T. reesei* produz uma celobiase (β -glucosidase), duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II) e pelo menos cinco endoglucanases (EG I, EG II, EG III, EG IV, EG V), sendo que os genes destas enzimas já foram devidamente identificados e isolados (EVANS et al., 1994; BUCHERT et al., 1996; CLARKE, 1999).

FIGURA 18 – MODO DE AÇÃO DE CELULASES (ENDO E EXOGLUCANASES) E β -GLUCOSIDADES (CELOBIASES) SOBRE SUBSTRATOS CELULÓSICOS



A composição relativa das quatro principais celulases na mistura original é de aproximadamente 60% (CBH I), 14% (CBH II), 5% (EG I) e cerca de 1% (EG II) (FAN et al., 1987). Quanto a sua classificação e estrutura molecular, as celulases da *T. reesei* apresentam homologia em cerca de 60 a 70% na seqüência de seus aminoácidos (STAHLBERG et al., 1995).

As CBHs têm sido consideradas pelos pesquisadores como as principais enzimas do complexo celulolítico por sua capacidade de hidrolisar celulose microcristalina (NIDETZKY et al., 1994).

Duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II) já foram identificadas e

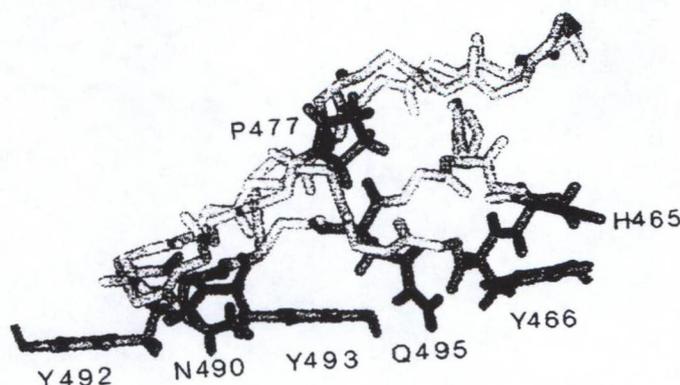
caracterizadas em *T. reesei*, sendo que a CBH I parece ser a de maior importância no complexo celulolítico natural, pois constitui aproximadamente 60% da proteína produzida pelo fungo. Acredita-se também que todas as celobiohidrolases (CBHs) possuam ação catalítica capaz de hidrolisar preparações celulósicas microcristalinas, pois atuam nas regiões terminais das moléculas de celulose e promovem a sua despolimerização gradativa, através da remoção de unidades de celobiose terminais (SALOHEIMO et al., 1993; KOIVULA, 1994).

Baseado em critérios estruturais e funcionais, a estrutura molecular das CBHs e EGs pode ser dividida em três diferentes domínios:

- a) um domínio de ligação à celulose (DLC, ou CBD como em “cellulose-binding domain”);
- b) um peptídeo de ligação (PL, ou “linker”);
- c) um domínio catalítico (DC ou “core protein”);

O domínio de ligação ao substrato (DLC) é altamente conservado em celulasas fúngicas, geralmente apresentando 38 resíduos de aminoácidos de comprimento (Figura 19). Contendo duas ou três pontes dissulfeto em uma estrutura em cunha hidrofóbica com uma face hidrofílica, o DLC está envolvido diretamente na adsorção da enzima ao substrato (TEERI et al., 1996). Alguns autores definem as “celulasas verdadeiras” como aquelas capazes de adsorver fortemente sobre o substrato, através de seus DLCs (TEERI & KOIVULA, 1995a).

FIGURA 19 – DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DAS CELULASES AO SUBSTRATO, COM ÊNFASE À DISPOSIÇÃO PLANAR DOS TRÊS RESÍDUOS DE TIROSINA IDENTIFICADOS COMO Y492, Y493 E Y466



O mecanismo de adsorção dos DLC à celulose não é inteiramente conhecido, porém a presença de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina) sugere que estes resíduos têm um papel fundamental nesta ligação (REINIKAINEN, 1994), definindo a superfície da celulose a que as enzimas adsorvem preferencialmente. Dois mecanismos foram sugeridos para explicar o efeito favorável que os DLC apresentam sobre a atividade celulásica (TEERI et al., 1997b): um baseia-se no aumento da concentração efetiva de enzima na superfície do substrato; o outro sugere que os DLC estão envolvidos na ruptura de ligações não covalentes que estruturam a celulose, contribuindo para o aumento da área superficial à semelhança do papel atribuído por E. Reese a um hipotético fator C1.

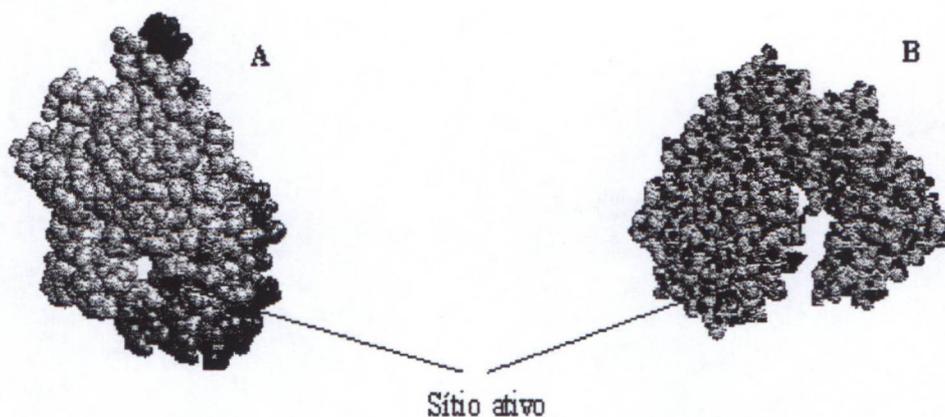
Foi demonstrado que a remoção do “CBD”, genética ou enzimaticamente, afeta a atividade enzimática. A remoção do DLC da enzima CenA, existente na bactéria *Cellulomonas fimi*, reduz a atividade da enzima sobre Avicel em cerca de 20-50% e, em celulose bacteriana, em cerca de 80%. Simultaneamente, verifica-se o aumento da atividade sobre Avicel amorfa e carboximetilcelulose (TEERI et al., 1990). No caso das enzimas CBH I e II, a remoção do CBD implica em uma redução da atividade em Avicel de cerca de 85 e 50%, respectivamente, mas não altera a atividade sobre compostos solúveis (TEERI et al., 1998).

Os peptídeos de ligação de celulasas fúngicas não estão obrigatoriamente conservados na seqüência primária, mas são ricos em treonina, prolina e/ou serina. O efeito estrutural destas seqüências sugere uma inibição da formação de uma α -hélice, criando então uma conexão flexível entre os domínios catalítico (DC) e o DLC.

A resolução da estrutura tridimensional dos domínios catalíticos das celulasas por cristalografia de raios-X representou um importante marco para o esclarecimento dos seus modos de ação catalítica (SARKO, 1986; PILZ et al., 1990). As exoglucanases possuem um sítio ativo em forma de túnel, mais fechado do que o das endoglucanases, o que restringe a sua ação hidrolítica às extremidades da cadeia de celulose (Figura 20). Esta característica intramolecular tem sido utilizada para

distinguir as exo- das endoglucanases (CLAEYSSSENS et al., 1990).

FIGURA 20 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO DOMÍNIO CATALÍTICO ATRIBUÍDO À EXOGLUCANASES (A) E ENDOGLUCANASES (B)

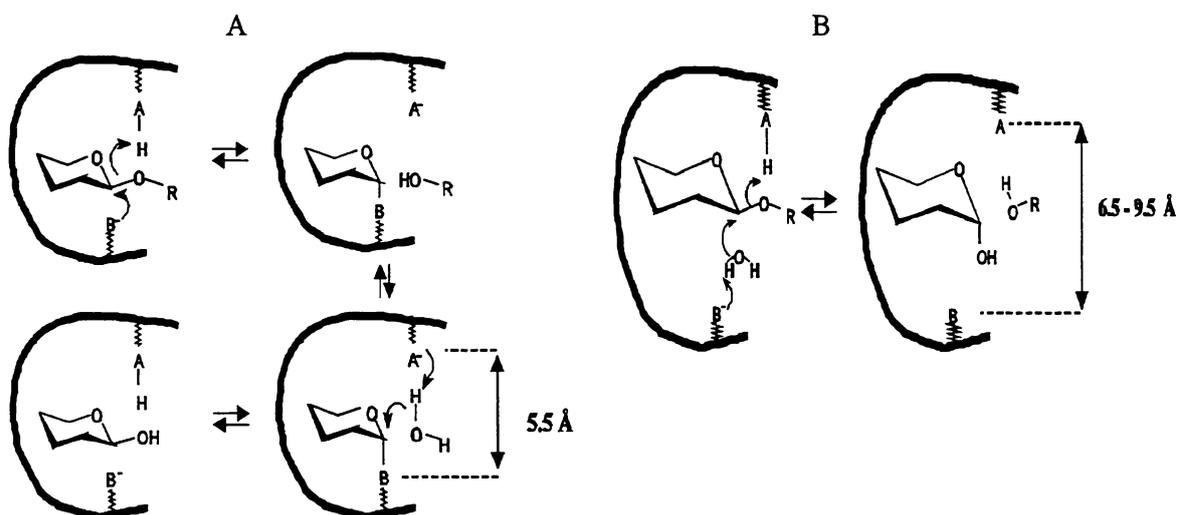


A estrutura das endoglucanases do *T. reesei* ainda não foram totalmente resolvidas, mas a estrutura da Endoglucanase I do *Humicola insolens* apresenta um sítio ativo em forma de fenda, distinto do das celobiohidrolases, o que aparentemente restringe a sua ação hidrolítica ao interior das cadeias de celulose. A Figura 20 procura representar as diferenças na estrutura do domínio catalítico que estão associadas ao tipo de atividade das celulasas, seja do tipo endo ou exo (DIVNE et al., 1994; CARRARD, et al. 1999 ; TENKANEN et al., 1999).

É geralmente assumido que o mecanismo de reação catalisada pelas glucohidrolases, incluindo xilanases e celulasas, é um mecanismo de reação do tipo ácido-base. Duas moléculas localizadas no centro do domínio catalítico estão envolvidas nesta reação. Uma atua como catalisador ácido (ácido glutâmico) e promove a protonação do átomo de oxigênio da ligação glicosídica. Conforme o mecanismo esta ação resulta na retenção estereoquímica do carbono anomérico (Figura 21A), ou mesmo na sua inversão (Figura 21B) (LINKO, 1993; RÄTTÖ et al., 1997). A outra (ácido aspártico) atua como nucleofílica, podendo interagir eletrostaticamente com o cátion intermediário, no caso das enzimas com retenção de configuração anomérica, ou promovendo a formação de um grupo hidroxílico a partir de uma

molécula de água, nos casos em que se dá inversão da configuração (STAHLBERG et al., 1995). Este mecanismo foi proposto com base na homologia dos centros ativos destas enzimas com o da lisozima.

FIGURA 21 – MECANISMO DE AÇÃO DOS ÁCIDOS GLUTÂMICO E ASPÁRTICO NO DOMÍNIO CATALÍTICO DE EXOGLUCANASES E ENDOGLUCANASES (RÄTTÖ et al., 1997): (A) RETENÇÃO E (B) INVERSÃO ESTEREOQUÍMICA DO CARBONO ANOMÉRICO



Acredita-se que devido a maior dimensão do seu sítio ativo, a CBH I tende a permanecer mais tempo ligada à celulose do que a CBH II, hidrolisando um maior número de ligações antes da sua desorção (SRISODSUK, 1994). No entanto, as duas enzimas são distintas quanto ao caráter sequencial do seu modo de atuação, embora esta afirmativa necessite de confirmação (WOHLFARHRT et al., 1997). O mecanismo de ação da CBH I e da EG II mantém a configuração dos glicosídeos, enquanto que a ação de CBH II inverte a sua configuração.

Os domínios catalíticos das celulasas e xilanases podem ser classificados em famílias, de acordo com o grau de homologia da sequência de aminoácidos. Atualmente, a classificação de glucanases, incluindo quitinases, amilases, β -(1,3)-glucanases, além de xilanases e celulasas, inclui 45 famílias de enzimas. Algumas destas famílias contêm enzimas com diferentes especificidades. Por exemplo, a família

C inclui endoglucanases e celobiohidrolases e a família D contém β -(1,3)-glucanases e β -(1,4)-glucanases (NIDETZKY et al., 1994).

A elucidação do modo de ação catalítica das celulases tem norteado as pesquisas envolvendo a construção de microrganismos capazes de produzir, em alto título, enzimas celulásicas com propriedades variadas que se caracterizam por uma alta atividade específica. Desta forma, através da investigação das propriedades destas enzimas de quarta geração, o mecanismo de ação sinérgica das celulases poderá ser definitivamente elucidado (TEERI et al., 1994; MÄNTYLÄ et al., 1998).

Os genes de EG I, EG II, CBH I e CBH II podem ser manipulados em *T. reesei*, resultando em cepas recombinantes onde, nas celulases produzidas, a atividade de qualquer um dos referidos componentes não se encontra presente (SUOMINEN et al., 1993; KARHUNEN et al., 1993; NEVALAINEN et al., 1991).

Na Tabela 7 estão representadas as celulases e suas organizações estruturais. Nesta classificação, o tipo de família está associada à estrutura de resíduos de aminoácidos e a sua relação com o seu ponto isoelétrico.

TABELA 7 – PROPRIEDADES E ESTRUTURA ORGANIZACIONAL DAS CELULASES DE *T. reesei* (BUCHERT & HEIKINHEIMO, 1998)

Enzima	Família	Resíduos de aminoácidos	Massa Molecular (KDa)	Ponto Isoelétrico (pI)	Organização Estrutural	
EG I	7	437	50-55	4,6		33 36
EG II	5	397	48	5,5	36 34	
EG III	12	218	25	7,4		
EG IV	61	326	(37) ^a	-		56 37
EG V	45	225	(23) ^a	2,8-3	23 36	
CBH I	7	497	59-68	3,5-4,2		31 36
CBH II	6	447	50-58	5,1-6,3	36 44	

^a Massa molecular calculada a partir da sequência de aminoácidos;

Domínio Catalítico

Região de Ligação

Domínio de Ligação à Celulose

3.5.2.1 *Exoglucanases*

As Exo-1,4- β -D-glucanases atuam cataliticamente removendo glucose ou celobiose a partir de uma das extremidades da cadeia de celulose, redutora ou não redutora, conforme o tipo da enzima em questão (SADDLER, 1986). Estas enzimas não atuam sobre celobiose, nem sobre celulosas solúveis, por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, seja carboximetílico (em CMC) ou hidroxietílico (em HEC). Alguns autores afirmam que estas enzimas podem causar um aumento do poder redutor de soluções de CMC, o que é atribuído à hidrólise de ligações nas extremidades da molécula, envolvendo resíduos não substituídos (TEERI et al., 1995b; SUURNÄKKI et al., 1997).

As exoglucanases atuam também sobre celulose amorfa, produzindo uma gradual redução do grau de polimerização. Apresentam uma atividade sobre Avicel[®] e outras celulosas com elevada cristalinidade que é superior à das endoglucanases. Por esse fato, os ensaios de atividade sobre carboximetilcelulose (característico de EGs) e Avicel[®] (característico de CBHs) são habitualmente utilizados na diferenciação desses tipos de enzimas. Neste contexto, a atividade sobre Avicel deve ser entendida como a solubilização máxima conseguida pelas enzimas, e não como a velocidade inicial de hidrólise (STAHLBERG et al., 1995).

A CBH I é a enzima produzida em maior quantidade pelo *T. reesei*, podendo constituir cerca de 60% do total de proteína liberada para o meio de cultura (EVELEIGH et al., 1985). Em sua composição foram identificados 497 aminoácidos, com uma variação na massa molecular de 59 à 68 kDa, que apresenta razoável homologia com a EG I (*T. reesei*) e com endoglucanases de outros fungos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Humicola grisea* e *T. viride* (HENRISSAT et al., 1985). Seu ponto isoelétrico (pI) encontra-se na faixa entre 3,5 e 4,2, variação esta atribuída à diferentes níveis de glicosilação e a ocorrência de múltiplas isoformas (KLEMANLEYER et al., 1996).

A análise química da CBH I resultou em diferentes valores de massa molecular, que podem ser explicados pela presença e atuação de proteases nas formulações. Portanto, nos ensaios em que a massa molecular relativa era inicialmente de 65 kDa, esse valor diminuiu para aproximadamente 58 kDa num estágio de purificação (NEVALAINEN & PENTILLÄ, 1995).

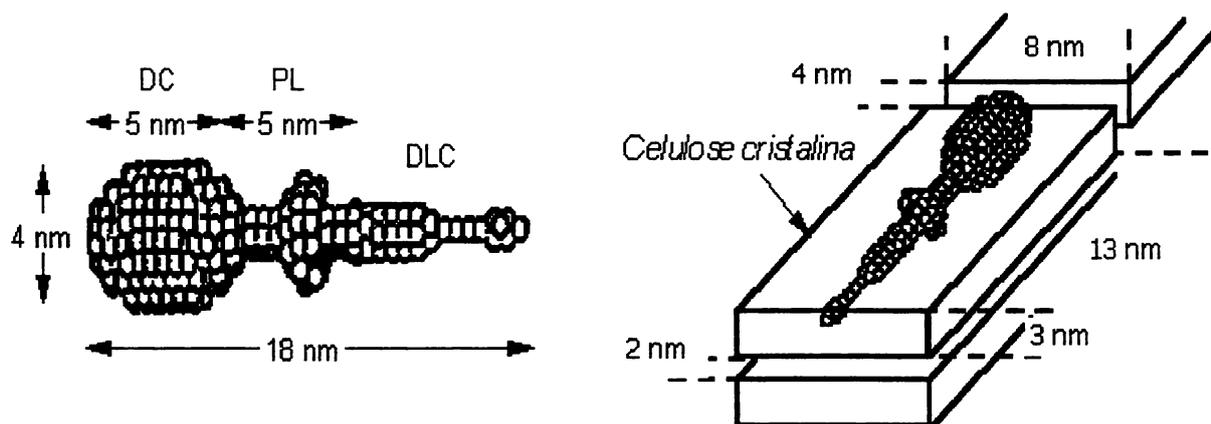
A separação das celobiohidrolases por cromatografia de afinidade foi muito aceita por utilizar apenas diferentes concentrações de celobiose para remover as CBHs das colunas de afinidade, enquanto que na separação através de resinas de troca aniônica (Bio-Gel A), a CBH I fica retida na coluna juntamente com outras enzimas, sendo eluída da coluna com gradiente de fosfato ou cloreto de sódio. A purificação da CBH I pode então ser obtida por cromatografia de afinidade em Avicel[®], mediante um gradiente de pH (BELDMAN et al, 1988).

O sítio catalítico da CBH I é formado por um túnel que se prolonga 40 Å (ou 400 nm) no interior da proteína, acomodando uma única cadeia de celulose. Compreende 7 subsítios (A-G), dos quais 4 contêm resíduos de triptofano, que se admite serem importantes no processo de ligação do domínio catalítico ao substrato. Ao contrário da CBH II (vide abaixo), a CBH I ataca a celulose a partir da extremidade redutora (TEERI et al., 1995b). É uma enzima tipicamente ativa em celulose cristalina, não atuando sobre celulose modificada, carboximetilcelulose (CMC), hidroxietilcelulose (HEC) ou β -glucana da cevada (STAHLBERG et al., 1995).

A conformação diagramática da enzima CBH I apresenta a forma denominada de "girino", com um comprimento total de 18 nm. No terminal carboxílico encontra-se no domínio de ligação à celulose (DLC), que é composto por duas faces distintas: uma chamada de "face plana", que contém três unidades de tirosinas, e outra chamada "face desigual", localizada em oposição à anterior (Figura 14). Acredita-se que o DLC, além da adsorção à celulose, pode ser também responsável pela desagregação da estrutura intermolecular do polímero (TEERI,

1997b), pois estudos mostraram que a remoção do DLS elimina a capacidade da enzima em atuar sobre a celulose microcristalina (REINIKAINEN, 1994). As três regiões que compõem a CBH I encontram-se representadas na Figura 22 .

FIGURA 22 - ESTRUTURA DIAGRAMÁTICA DA CBH I ISOLADA DE *T. reesei* QM9414, COM ÊNFASE NAS DIMENSÕES DA ENZIMA COMPLETA, DO PEPTÍDEO DE LIGAÇÃO (PL), DE SEU DOMÍNIO CATALÍTICO (DC) (HAYN, 1993; TEERI, 1999) E DE SUA INTERAÇÃO COM OS BLOCOS CONSTRUTIVOS DA CELULOSE MICROCRISTALINA



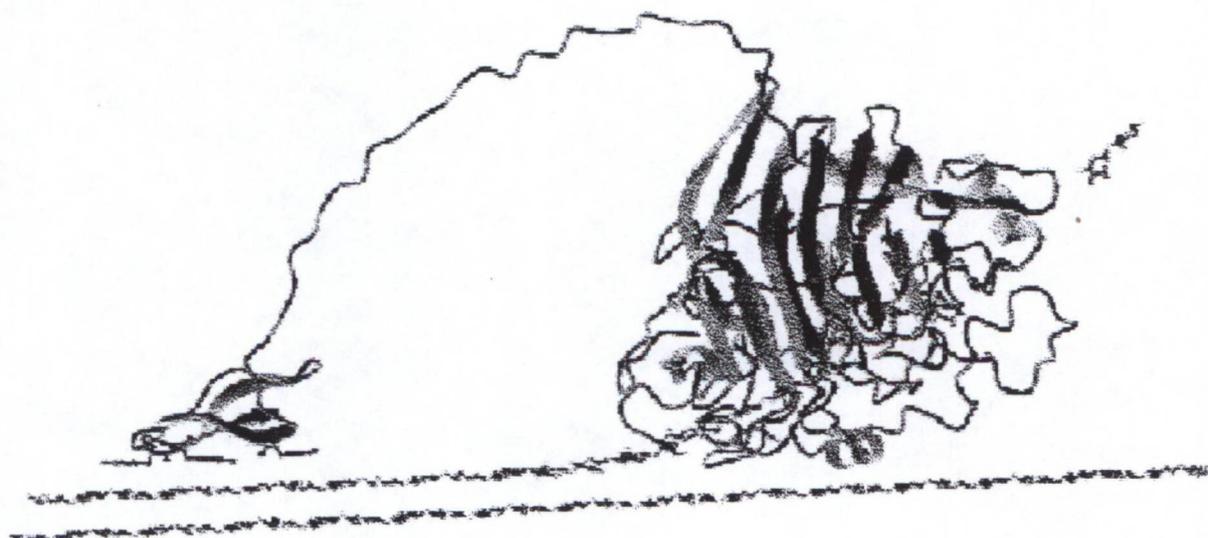
A **CBH II** representa cerca de 20% da proteína total liberada pelo *T. reesei*. Em sua estrutura são encontrados 447 aminoácidos, gerando uma massa molecular média entre 50-58 kDa. Seu ponto isoelétrico varia entre 5,1 e 6,3 (TEERI et al., 1999). A enzima encontra-se em grande quantidade ligada à superfície dos conídios e ultrapassa nessa estrutura biológica a concentração de qualquer outra celulase. Segundo BELDMAN et al. (1988), a CBH II catalisa a hidrólise da celulose em celobiose e glucose, tendo a celobiose como o primeiro produto da reação mas sendo capaz de convertê-la posteriormente à glucose. Estes resultados foram porém contrariados por NIDETZKY et al. (1994), ao afirmarem que a celobiose não é um bom substrato para a enzima. A atividade sobre Avicel[®] da CBH II é duas vezes superior às endoglucanases I ou II, não apresenta atividade xilanásica e tem baixa atividade sobre celotriose. Quando se estuda a cinética com substratos de GP de 3 a 6, verifica-se que o Km decresce e a velocidade máxima aumenta à medida que o GP se

aproxima de 6.

O primeiro domínio catalítico a ser resolvido foi o da CBH II (Figura 20A). Sabe-se que o sítio ativo é constituído por um túnel com 20 Å (ou 200 nm) de comprimento, contendo pelo menos 4 subsítios (A-D) de ligação à cadeia de celulose. A catálise tem lugar entre os subsítios B e C por inversão da configuração anomérica, enquanto que a forma em túnel do sítio ativo aparentemente limita o ataque enzimático às extremidades não reductoras.

As propriedades catalíticas da CBH II são semelhantes às da CBH I, mas foi descrita também atividade sobre a β -glucana da cevada. De acordo com os resultados de CHANZY (1990), a comparação da CBH II e da CBH I indica que a CBH I é uma exoglucanase restrita. Suas dimensões em comparação à estrutura cristalina da celulose pode ser vista na Figura 22, enquanto que a Figura 23 ilustra a ação progressiva da CBH I sobre a superfície da celulose (DIVNE et al., 1994), com a subsequente liberação de celobiose a partir da extremidade superior do túnel localizado no domínio catalítico.

FIGURA 23 – ASSOCIAÇÃO DA CBH I À SUPERFÍCIE DAS MICROFIBRILAS DE CELULOSE (DIVNE et al., 1994), SUGERINDO AÇÃO PROGRESSIVA COM A SUBSEQUENTE LIBERAÇÃO DE CELOBIOSE A PARTIR DA EXTREMIDADE DO TÚNEL



3.5.2.2 *Endoglucanases*

As endo-1,4- β -D-glucanases hidrolisam as cadeias de celulose de modo aleatório. Estas enzimas hidrolisam celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis) como carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose. A celulose microcristalina e o algodão, ambos substratos com elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular que apresentam.

Como já foi mencionado, todas as EGs possuem um domínio catalítico, um peptídeo de ligação (“linker”) e um DLC, com exceção dada à EG III, que só possui o domínio catalítico (DC). Embora não tenha ainda determinada completamente a estrutura das endoglucanases do *T. reesei*, estudos mostram que a estrutura da EG I do *Humicola insolens* apresenta um sítio ativo em forma de fenda (MACKENZIE et al., 1998).

A EG I exibe uma elevada atividade sobre substratos solúveis e relativamente baixa sobre celulose cristalina. É uma proteína constituída por 437 aminoácidos, dos quais 363 fazem parte do domínio catalítico que se situa junto ao terminal amínico. Possui uma massa molecular de 50 kDa e um ponto isoelétrico de 4,6. Não hidrolisa a celobiose e não sofre inibição por este composto, o que pode ser usado para distingui-la da CBH I. A EG I pode também hidrolisar xilanas, ao contrário das celobiohidrolases (KOTIRANTA et al., 1999). Estudos cinéticos demonstraram que endoglucanases como a EG I, sempre que ativas na hidrólise de xilanas, apresentam também uma maior afinidade para as ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ da celulose (SIIKA-AHO et al., 1995).

A enzima EG I pertence à mesma família da CBH I (CLARKE, 1999) retendo, de igual modo, a configuração \square da celobiose após o processo hidrolítico. É uma glicoproteína e, dos carboidratos que a compõe, a manose é o de presença majoritária (73%). O gene que codifica para a EG I foi isolado a partir de dois mutantes da espécie *T. reesei*, sendo que ambos revelaram uma sequência de bases

idêntica .

A **EG II**, anteriormente designada EG III, é uma proteína com 397 aminoácidos, 48 kDa dos quais 15% são carboidratos, correspondendo a 47 hexoses (SALOHEIMO et al., 1994). São também conhecidas referências a 6% de carboidratos e um ponto isoeletrico de 5,5 (GOYAL et al., 1991).

A **EG II** corresponde apenas de 0,5% (p/v) da proteína total secretada no extrato enzimático de *T. reesei*. A 30 °C, a enzima é estável desde pH 3,0 a 8,0 mas, quando a temperatura é de 55°C, a estabilidade só se verifica entre pH 4,0 e 6,3. Para a celotriose, a atividade máxima observa-se entre o pH 4,0 e 5,0; contudo, quando o substrato é CMC, a atividade máxima é determinada precisamente a pH 4,8 (KLEYWEGT et al., 1997).

Outras endoglucanases de baixa massa molecular foram identificadas e purificadas a partir do sistema celulolítico de *T. reesei*. Estas enzimas apresentaram atividade de desfibramento em celulose cristalina, além de uma elevada atividade sobre CMC e substratos cromogênicos (BELDMAN et al., 1988). Outros estudos demonstraram que o *T. reesei* realmente apresenta dois genes que codificam para pequenas proteínas de atividade endoglucanásica e estes provavelmente correspondem às EGs III e V (SALOHEIMO et al., 1997b).

Em um primeiro trabalho, BELDMAN et al. (1988) apresentaram um grupo de enzimas com características distintas das outras endoglucanases como: baixa atividade quando o substrato é CMC e alta atividade com Avicel, designando-as de **EG III**. Esta enzima foi a segunda EG caracterizada, sendo que três subespécies já foram purificadas (KUBICEK, 1992). Estas liberam como produtos da reação celotriose, celobiose e glucose. Quando em conjunto com as exoglucanases (mas não com as endoglucanases) resulta incremento significativo na capacidade catalítica. Baseado nessas características, SALOHEIMO (1988) e colaboradores a classificaram como sendo uma endoglucanase. Este pequeno grupo de enzimas possui uma massa molecular entre 20 e 23,5 kDa (EVELEIGH, et al. 1985).

A EG IV (BELDMAN et al., 1988) é uma enzima aparentemente pouco específica e pode igualmente catalisar a hidrólise de xilana, levando alguns autores a designá-la inicialmente como uma xiloglucanase. Quando atua sobre a xilana, os produtos da reação são principalmente a xilobiose, xilotriose e suas ligações com arabinose. Não catalisa a hidrólise das ligações entre arabinoses, assim como não catalisa a hidrólise de pequenos xilo-oligossacarídeos. Catalisa, no entanto, a hidrólise de xilo-oligossacarídeos de maior massa molecular (BELDMAN et al., 1988).

Finalmente, SALOHEIMO et al (1994) determinaram a estrutura primária de uma endoglucanase de 25 kDa com base em um gene de *T. reesei*. Esta enzima, designada de EG V, apresentou menor afinidade ao substrato quando comparada à EG I. Ensaio de viscosidade indicaram atividade sobre CMC, ao mesmo tempo em que houve um aumento no poder redutor do meio de reação (BELDMAN et al., 1988).

3.5.2.3 β -Glucosidases

A β -glucosidase, também denominada celobiase, possui a principal função de desdobrar a celobiose gerada pelas CBHs e EGs em glucose. Não é estritamente uma celulase, mas tem uma função importante na hidrólise da celulose porque a celobiose tem uma forte ação inibitória sobre endoglucanases e exoglucanases.

A caracterização e correspondente nomenclatura das β -glucosidases existentes nos fungo da espécie *T. reesei* é um assunto que ainda não se encontra devidamente esclarecido, havendo diferentes resultados experimentais cuja interpretação diverge no número e caracterização de β -glucosidases que o fungo pode sintetizar. Assim, foram descritos vários tipos de β -glucosidases para a espécie *T. reesei*, sendo duas destas enzimas segregadas para o exterior da célula. Uma delas tem uma massa molecular relativa de 47 kDa e a outra, 76 kDa (SALOHEIMO et al, 1993). Uma β -glucosidase intracelular foi descrita como tendo uma massa molecular relativa de 98 kDa (REINIKANEN, 1994). O pH ótimo desta enzima é 6,8 e o seu

ponto isoelétrico, 4,4. A partir do sobrenadante de culturas do fungo, JACKSON & TALBURT (1988) isolaram uma β -glucosidase com massa molecular relativa de 78,5 kDa e um ponto isoelétrico de 8,35. Esta enzima também encontra-se presente na membrana celular.

BELDMAN e colaboradores (1988) descreveram uma outra β -glucosidase em *T. reesei* que tem atividade sobre substratos como *p*-nitrofenil- β -glucopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -xilopiranosídeo, CMC, Avicel[®] e xilanas, mas é incapaz de exercer atividade sobre celobiose. A enzima tem massa molecular relativa de 71 kDa, ponto isoelétrico de 8,7 e contém 0,12% de carboidratos. A sua temperatura ótima é de 65 a 70°C e o pH ótimo, de 4,6. A baixa atividade específica desta enzima, assim como a sua elevada massa molecular, levaram alguns autores a sugerir que o processo de isolamento não permitiu com que fosse obtida no estado puro, mas sim como um conjunto de sacaridasas que podem somente ser separadas em condições desnaturantes.

Tudo indica que pelo menos um tipo de β -glucosidade é constitutiva em *T. reesei* e está principalmente localizada em uma zona semelhante ao periplasma das bactérias. Dados obtidos por UMILE & KUBICEK (1986) demonstraram que a maior parte da enzima constitutiva está realmente ligada à membrana celular.

A β -glucosidase, ao degradar a celobiose, tem uma função fisiológica importante, diminuindo a concentração de um potente inibidor das celulasas. Outra função da β -glucosidase pode não estar relacionada com a degradação da celulose, mas sim com a formação da parede celular durante a conidiogênese. Segundo STUTZENBERGER (1990), citado por NEVALAINEN & PENTILLA (1995), comparando-se a termoestabilidade das β -glucosidasas de origem bacteriana e fúngica, pode-se concluir que no caso das bactérias as diferentes β -glucosidasas têm uma temperatura ótima abaixo daquela que é característica do crescimento da espécie que a produz, enquanto nos fungos, se verifica o oposto .

A β -glucosidase isolada da espécie *T. reesei* evidencia inibição pelo

substrato quando este é celobiose ou salicina (álcool 2-*O*- β -D-benzil-glucopiranosídeo), mas o mesmo não acontece com o nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo. A enzima sofre inibição competitiva na presença de glucose, maltose e frutose, enquanto que o *p*-nitrofenol é um inibidor não competitivo. Outro inibidor conhecido é a gluconolactona. Finalmente, o estudo da atuação da β -glucosidase revela um mecanismo de retenção da configuração anomérica do produto da reação, a β -D-glucopiranosose (MATA et al., 1992).

3.5.3 Determinação da Atividade Enzimática em Preparações Celulásicas

A caracterização das enzimas celulolíticas levanta dificuldades que raramente são encontradas no estudo de hidrolases. A heterogeneidade dos substratos celulósicos, bem como a multiplicidade e complexidade do modo de ação sinérgico dos sistemas celulolíticos, estão na origem dessas dificuldades. Portanto, uma grande variedade de substratos, desde celuloses nativas à preparações modificadas, tem sido empregada na caracterização das enzimas responsáveis pela sacarificação da celulose. Por outro lado, diferentes ensaios enzimáticos têm sido adotados por diferentes investigadores, o que muitas vezes torna difícil a comparação entre os resultados apresentados na literatura (REINIKAINEN, 1994).

Numa tentativa de corrigir esta situação, a Comissão de Biotecnologia da “International Union of Pure Applied Chemistry” (IUPAC) fez publicar, em 1987, uma série de procedimentos de referência (GHOSE, 1987) que foram imediatamente adotados por muitos laboratórios. Os procedimentos recomendados são normalmente utilizados na detecção e rastreio de atividades celulolíticas e, em alguns casos, são também utilizados em estudos de enzimologia. Os principais substratos utilizados para estas finalidades incluem a carboximetilcelulose (CMC), hidroxietilcelulose (HEC) a Avicel[®] (celulose microcristalina comercial) e o *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NFG), úteis para a detecção de atividades endoglucanásica (CMCase),

celobiohidrolásica (Avicelase) e β -glucosidásica (PNFGase), respectivamente (EVELEIGH, et al. 1991).

A atividade específica sobre papel de filtro é recomendada para a medição da atividade celulolítica total, sendo expressa em Unidades de Papel de Filtro (UPF), pois este substrato contém ambas as formas de organização estrutural da celulose, “amorfa” e cristalina. A atividade endoglucanásica, como já foi dito, é medida usando CMC mas substratos alternativos como a hidroxietilcelulose (HEC) vêm sendo crescentemente utilizados devido a sua maior solubilidade em água e facilidade de manuseio. Finalmente, a atividade de β -glucosidase deve ser medida através da ação sobre *p*-NFG mas a conversão de celobiose em glucose é muitas vezes mais representativa do processo de sacarificação. Assim, define-se o termo atividade celobiásica, que corresponde apenas a uma fração da atividade β -glucosidásica total do sistema celulásico. Nos dois primeiros casos (atividades endo e exoglucanásicas), o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) é usado na medição dos açúcares redutores liberados por hidrólise enzimática, enquanto que no terceiro caso (atividade celobiásica), a glucose formada é medida pelo método da glucose oxidase (GHOSE, 1987). Todavia, o emprego de métodos cromatográficos, como as cromatografias de troca iônica e de filtração em gel (cromatografia de exclusão), é em muitos casos útil para a compreensão dos mecanismos de catálise enzimática, assim como a utilização de outros substratos que exibem diferentes propriedades estruturais.

A utilização de diferentes substratos para a caracterização de enzimas celulolíticas têm propiciado indiscutíveis progressos no esclarecimento das diferenças de especificidade entre os diversos tipos de celulasas, não impedindo no entanto que persistam algumas dúvidas na questão essencial da distinção entre as atividades endo e exo. Assim, métodos utilizados para a medição do grau de polimerização da celulose (viscosimetria capilar em soluções de etilenodiamina cúprica e cromatografia de exclusão a partir de derivados solúveis em solventes orgânicos) permitem uma melhor avaliação do processo de despolimerização, particularmente aquele resultante de ações

endoglucanásicas (GOYAL, et al. 1991; CLAEYSSSENS & AERTS, 1992).

Um conhecimento mais profundo destas enzimas tem sido acompanhado da proposta de novas metodologias, que permitem uma aferição mais conveniente de suas propriedades catalíticas. Entre outros, deve-se destacar o estudo da despolimerização de substratos solúveis e insolúveis por viscosimetria ou cromatografia de exclusão (KLEMAN-LEYER, 1992; 1994; RAMOS et al., 1993, 1999), a medição por colorimetria das extremidades reductoras geradas em substratos insolúveis (GAMA et al., 1994), e o desenvolvimento de novos métodos colorimétricos que se utilizam de glicosídeos cujas agliconas correspondem a cromóforos de alta absorvidade molar.

Na Tabela 8 estão apresentados métodos de ensaios diversos para enzimas celuláicas e glucosidásicas sobre diversos substratos segundo CLARKE (1999).

TABELA 8 - MÉTODOS UTILIZADOS PARA MEDIR ATIVIDADES CELULOLÍTICAS E β -GLUCOSIDÁSICAS EM PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

ENZIMAS	SUBSTRATOS	MÉTODO DE DETECÇÃO	
Celulases	Endo	Carboximetilcelulose	açúcar redutor
		Hidroxietilcelulose	redução na viscosidade
		celulose inchada com ácido fosfórico	açúcar redutor
		celulose tingida	colorimetria
		4-metilumbeliferil- β -D-celotriosídeo (EG II) ¹	espectrometria de fluorescência
		4-metilumbeliferil- β -D-celobiosídeo (EG I) ¹	
		celo-oligossacarídeos solúveis	açúcar redutor, CLAE
	Exo	Avicel [®]	açúcar redutor, CLAE
		Sigmacell [®]	
		celulose bacteriana	açúcar redutor
		4-metilumbeliferil- β -D-celobiosídeo ²	espectrometria de fluorescência
		<i>p</i> -nitrofenil- β -lactosídeo ²	espectrometria no ultravioleta
		celo-oligossacarídeos insolúveis	açúcar redutor, CLAE
	Total	Algodão	açúcar redutor, CLAE
β -Glucosidases	papel de filtro		açúcar redutor, CLAE
		<i>p</i> -nitrofenil- β -glucosídeo	espectrometria no ultravioleta
		<i>O</i> -nitrofenil- β -glucosídeo	
		4-metilumbeliferil- β -D-glucosídeo	espectrometria de fluorescência
		salicina	glucose, açúcar redutor
		esculina	
		celobiose	glucose, CLAE
celo-oligossacarídeos insolúveis	açúcar redutor		

¹ Ensaios realizados na presença dos inibidores de β -glucosidases (glucono-1,5-lactona) e celobiohidrolases (celobiose);

² Ensaio realizado na presença de glucono-1,5-lactona (β -glucosidases).

A reação de carbanilação, seguida de análise por cromatografia de permeação em gel do derivado solubilizado em tetrahidrofurano, tem sido utilizada como método para determinar a distribuição do grau de polimerização da celulose. Os primeiros estudos feitos por VALTASSARI & SAARELA (1975) comprovam as vantagens de estabilidade do derivado tricarbanilado em relação ao trinitrato, que era inicialmente empregado para esta função.

A calibração do método consiste na relação entre o volume de eluição e a massa molecular (MM) de padrões monodispersos de poliestireno, gerando massas moleculares aparentes (ou seja, em relação ao poliestireno) que são por sua vez convertidas em grau de polimerização por calibração universal. Esta calibração baseia-se na consideração teórica de que, sob as mesmas condições experimentais, polímeros que apresentam o mesmo volume de eluição (ou de volume hidrodinâmico equivalente) também apresentam equivalência entre as suas viscosidades intrínsecas ($[\eta]$). Os cálculos são baseados na relação $[\eta] = K \times MM^\alpha$ com base nas constantes de Mark-Houwink (K e α) para o poliestireno e para os derivados tricarbanilados em THF. Uma vez calibrado o sistema analítico, podem ser comparados polímeros de natureza química distinta, possibilitando assim a determinação do grau de polimerização da celulose apesar de não existirem padrões comerciais monodispersos de celulose per-carbanilada (WOOD et al., 1986; COLL, 1970).

Enfim, todos os métodos descritos permitem a obtenção de informações complementares para a caracterização de complexos celulásicos, mas a análise dos resultados deve ser feita tendo sempre em mente que os substratos são, principalmente no caso das celulosas solúveis e dos oligossacarídeos e seus derivados cromogênicos, muito diferentes dos substratos naturais. Nesses casos, é importante considerar que o modo de ação das enzimas é também ser influenciado por fenômenos associados à catálise heterogênea (adsorção), como alterações na área superficial, distribuição de cargas e porosidade de substratos celulósicos de natureza fibrosa (HORII, F. 1987; TEERI, 1990). Certamente, esses fatores, ligados diretamente às características

estruturais do substrato, têm marcada influência sobre a maneira pela qual as enzimas estabelecem interações produtivas, ou seja, aquelas que efetivamente resultam em atividade catalítica (MOONEY et al., 1999).

3.6 SINERGISMO

A degradação da celulose é feita pela ação de três grupos de enzimas que atuam sinergicamente, as CBHs, as EGs e as β -glucosidades. Os diferentes grupos de enzimas atuam de forma cooperativa, causando a hidrólise completa da celulose até glucose (HIGUCHI 1985; ERIKSSON et al., 1990; EVANS et al., 1994). As três classes de enzimas celulolíticas, através de suas propriedades complementares, apresentam um alto grau de sinergismo durante a hidrólise da celulose.

Este sinergismo decorre da observação de que a atividade efetiva do “complexo” resulta em taxas de degradação superiores àquelas correspondentes à somatória das atividades individuais de cada enzima sobre o mesmo substrato. Assim, a atividade hidrolítica da mistura é superior à soma das atividades individuais das enzimas. Este efeito de sinergia, como já foi dito, é normalmente observado em substratos celulósicos de alta organização estrutural, mas não em celuloses solúveis e de baixo grau de polimerização (HENRISSAT et al., 1985).

Os modelos preliminares explicativos do fenômeno de sinergia, apresentados por REESE desde 1950, descreviam a sinergia como o resultado das atividades das endoglucanases, designadas Cx, com um fator não catalítico e independente, C1, que seria responsável pela quebra de ligações de hidrogênio na região cristalina da celulose, desse modo facilitando a ação das endoglucanases. Todavia, nunca foi encontrada qualquer evidência experimental do fator C1 e os modelos posteriores abandonaram esse conceito. O estudo dos sistemas enzimáticos de *Phanaerochate crhyso sporium* (ERIKSSON et al., 1990) e de *T. koningii* (WOOD, 1978) conduziram à descoberta e caracterização das celobiohidrolases, bem como da sinergia desta enzima

com endoglucanases e β -glucosidases. Considera-se que as CBH's atuam sequencialmente, sendo que a sua atividade depende da hidrólise aleatória elicitada pelas endoglucanases, preferencialmente em zonas amorfas. Desse modo, as endoglucanases aumentam a atividade das exoglucanases por aumentarem a disponibilidade de grupos terminais redutores e não redutores.

Nem todas as endoglucanases e exoglucanases apresentam o mesmo grau de sinergia e a proporção dos dois tipos de enzima e sua otimização na reação depende da origem das enzimas utilizadas. Alguns autores (BAKER et al., 1995) sugeriram que as enzimas que atuam sinergicamente poderiam formar um complexo e que nem todas as enzimas estabeleceriam entre si essas interações.

A sinergia acontece, em muitos casos, entre enzimas com diferente origem microbiana (MACKENZIE et al., 1998) sem qualquer padrão estrutural evidente e comum entre elas, aos níveis de especificidade da hidrólise, organização estrutural ou funcional. Este fato sugere que haja alguma interações entre moléculas. Por outro lado, a verificação de que a adição sequencial de endoglucanases e exoglucanases ao meio de reação, com inativação da primeira enzima antes da adição da segunda, mostra que a sinergia não depende da formação desse tipo de complexos (NIDETZKY et al., 1994).

Foi também sugerido que a associação das enzimas com substratos poderia ser a chave para o fenômeno de sinergia, implicando em interações entre proteínas que favoreceriam um equilíbrio dinâmico entre a solução e a superfície da celulose. Os DLCs das diferentes enzimas poderiam então estar na origem da preferência das enzimas por determinadas zonas da superfície da celulose, sendo responsáveis pelos diferentes graus de sinergia apresentados por diferentes combinações de endoglucanases e exoglucanases. Um outro aspecto da atividade das enzimas que pode ter relevância para a sinergia é o caráter sequencial da hidrólise. As enzimas que hidrolisam apenas uma ligação química ao adsorver, seriam mais favoráveis à sinergia com outras enzimas de ação catalítica complementar (CLARKE, 1999).

Alguns autores detectaram também sinergia entre celobiohidrolases. Este tipo de sinergia poderia ser explicado, segundo WOOD (1991), admitindo-se que as celobiohidrolases são específicas a um nível estereoquímico, cada uma delas preferiria uma das duas possíveis configurações dos resíduos celobiosídicos expostos na superfície da celulose. Outra explicação, também não fundamentada experimentalmente, é a de que as duas celobiohidrolases poderiam hidrolisar preferencialmente as celuloses $I\alpha$ ou $I\beta$. Todavia, em relação a qualquer dos tipos de sinergia, subsiste a dúvida quanto ao grau de pureza das enzimas utilizadas.

A obtenção de enzimas puras é muito difícil. A contaminação, por exemplo, de uma exoglucanase por uma endoglucanase, ainda que em teores muito baixos, pode alterar significativamente a atividade exibida pela proteína (REINIKAINEN et al., 1995). Por outro lado, é também questionável se as CBH I são exoglucanases estritas ou se poderão apresentar alguma atividade hidrolítica no interior da cadeia de celulose. Utilizando uma metodologia de medição do poder redutor de fibras insolúveis para medição da atividade endoglucanásica (GAMA et al., 1994), STAHLBERG (1995) observou atividade CMCásica em uma amostra de CBH I purificada, sugerindo que as exoglucanases, apesar de preferirem atacar a molécula de celulose a partir de uma extremidade, poderão também atuar no meio da cadeia. Nesse caso, a sinergia do tipo endo-exo verifica-se também em misturas de exoglucanases.

Um aspecto essencial relacionado à sinergia tem a ver com os substratos utilizados. De fato, a eficiência do ataque enzimático depende das propriedades estruturais dos substratos, como a cristalinidade (e tipo de malha cristalina), o teor em outros compostos, a área superficial, a porosidade, o grau de polimerização, a forma e o tamanho das partículas. A influência destas propriedades no modo de ação das enzimas é capital, podendo estar relacionada com o grau de sinergia verificado, com o caráter sequencial da hidrólise e com os parâmetros cinéticos de cada enzima.

A elevada afinidade dos DLCs pelas fibras de celulose levou alguns autores a especular sobre as vantagens de um tratamento das fibras com DLCs purificados. DIN

(1991) detectaram um efeito de fragmentação de fibras de celulose, não acompanhado de atividade hidrolítica, que possui aplicação na modificação de fibras de pastas de papel e de algodão para a indústria têxtil. Este tipo de atividade dos DLCs resulta na melhoria da textura de tecidos de algodão e no aumento da área superficial e força de ligação das fibras em pastas de papel.

3.7 SEPARAÇÃO DE CELULASES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE BAIXA PRESSÃO (“FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY”)

A compreensão do mecanismo de ação catalítico de celulasas tem aumentado muito nas últimas décadas pela utilização de componentes enzimáticos purificados obtidos através de processos cromatográficos seletivos e diferenciados (SALOHEIMO et al., 1993; VIKARI et al., 1999). No entanto, a baixa seletividade obtida nos processos de purificação de cada componente enzimático presente no sistema dificulta em muito qualquer conclusão sobre a real missão que essas enzimas individualmente possuem no processo de sacarificação da celulose. Por exemplo, é muito difícil garantir que a ocorrência de pequenas quantidades de CBH II em preparações endoglucanásicas não venham a interferir no comportamento dessas últimas enzimas sobre substratos celulásicos. Esses problemas tem sido gradualmente resolvidos através de estudos que empregam a engenharia genética, onde procura-se clonar cada uma dessas enzimas em vetores capazes de produzi-las em alto rendimento e facilitando sua subsequente purificação.

Enzimas dessa natureza vêm gradativamente sendo produzidas para melhor elucidação de suas funções catalíticas. Uma outra alternativa que tem sido explorada por outros grupos é o uso de sistemas celulásicos destituídos de um ou mais componentes importantes para o seu modo de ação catalítica. Essa estratégia permite com que se verifique, não a ação de um componente isoladamente, mas o que significa tê-lo ausente do sistema celulásico como um todo. O método de FPLC foi empregado

para separação e purificação de celobiohidrolases completas e seu DC, afim de se obter rapidamente e em grande quantidade o DC destas celulases.

O uso da FPLC foi registrado por MEDVE (1997) que realizou estudos com a finalidade de purificar as formas isomórficas de celulases de culturas de *T. reesei*. Nestes experimentos, conseguiu separar CBH I, CBH II e EG II comprovando que a metodologia poderia ser uma excelente ferramenta para isolamento de celulases. Seguiram-se na mesma linha de ação os trabalhos feitos por SALOHEIMO et al. (1997a) e KOTIRANTA et al. (1999), que obtiveram celulases purificadas utilizando colunas Resource Q[®] e Mono Q[®] (Pharmacia Biotech). Diferenças significativas apresentadas por este procedimentos analíticos estão associadas aos diferentes gradientes de eluição utilizados para isolar as hidrolases.

A detecção das proteínas em FPLC foi realizada a 280 nm utilizando o conceito espectrofotométrico de absorção molar neste comprimento de onda. Para o caso específico das moléculas que constituem as proteínas, esta associação se dá nos centros cromofóricos dos seus peptídeos constituintes. As absortividades molares para as celulases são indicados por STAHLBERG (1995) como 78.800 L/mol.cm para CBH I para uma concentração molar de 64 kg/mol; 92.000 L/mol para CBH II com 53 kg/mol e 78.000 L/mol para EG II com 48 kg/mol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Preparações Enzimáticas

No presente, estudo foram utilizadas duas (02) preparações comerciais e oito (08) preparações celulásicas de cepas de *Trichoderma reesei* Recombinantes (PCTrR).

As formulações industriais (Celluclast 1,5L[®] e Novozym 188[®]) foram gentilmente cedidas pela Novo Nordisk (Denmark). A Novozym 188[®] é declarada pelo fabricante como uma preparação puramente β -(1,4)-glucosidásica produzida pelo fungo *Aspergillus niger*, enquanto que a Celluclast 1,5L[®] é uma preparação celulásica (mistura exo e endo) produzida pelo *Trichoderma reesei*.

As oito preparações celulásicas provenientes de fungos modificados geneticamente foram gentilmente cedidas pela Primalco Biotechnology Ltd. (Finlândia), empresa que posteriormente foi incorporada pela Röhm Enzyme Finland Oy. As técnicas utilizadas para a obtenção das PCTrR utilizaram: (a) fermentação convencional das cepas de *T. reesei* em escala de bancada; (b) eliminação de um ou mais genes do genoma de *T. reesei*, especificamente aqueles que codificam para componentes enzimáticos tidos como majoritários para o complexo celulásico (CBH I, CBH II, EG I e EG II), através da técnica de “high-frequency one-step gene replacement” (nocaute de genes) (NEVALAINEN, 1993; SUOMINEN et al., 1993; KARHUNEN et al., 1993); e (c) produção das PCTrR.

Na Tabela 9 encontram-se apresentados os códigos empregados neste estudo e suas sinônimas. A terminologia supressão isolada, supressão dupla e supressão tripla foi utilizada para definir a quantidade de genes eliminada do genoma padrão, limitação

esta definida em relação à ação celulásica da cepa original de *T. reesei*. Portanto, a enzima A apresenta ação exocelulásica recessiva para Celobiohidrolase I (CBH I), mantendo as demais atividades específicas.

TABELA 9 - PREPARAÇÕES CELULÁSICAS DE *TRICHODERMA REESEI* GENETICAMENTE MODIFICADO (ROHM ENZYME FINLAND OY) E DAS FORMULAÇÕES ENZIMÁTICAS COMERCIAIS (NOVO NORDISK).

Código	PCTrR
A	Supressão isolada de CBH I
B	Supressão isolada de CBH II
C	Supressão isolada de EG I
D	Supressão isolada de EG II
E	Supressão dupla de CBH I e CBH II
F	Supressão dupla de EG I e EG II
G	Supressão tripla de EG II, CBH I e CBH II
H	Supressão tripla de CBH II, EGI e EG II
Novozym 188 [®]	Preparação β -(1,4)-glucosidásica (N188)
Celluclast 1.5L [®]	Mistura de enzimas celulásicas (CL)

4.1.2 Substratos

Os substratos utilizados nos ensaios com **PCTrR**, bem como os das formulações enzimáticas comerciais, foram divididos em dois grupos de interesse: o primeiro, relativo às metodologias padronizadas pela “International Union of Pure and Applied Chemistry” (GHOSE, 1987) para mensurar as atividades específicas destas hidrolases, e o segundo, relativo aos ensaios de hidrólise controlada realizados para avaliar o modo de ação catalítica das enzimas sob uma mesma carga protéica.

Todos os substratos listados na Tabela 10 foram obtidos de empresas especializadas. Estes foram preservados em dessecador à temperatura ambiente, enquanto que as polpas Kraft foram mantidas em geladeira com um teor de umidade em torno de 40%.

As polpas kraft branqueadas de *Pinus taeda* e de *Eucalyptus grandis* foram gentilmente cedidas pela Klabin Fabricante de Celulose e Papel S/A (Telêmaco Borba,

PR), sendo que a obtenção da polpa seguiu o processo kraft convencional e uma sequência de estágios de branqueamento totalmente livres de cloro.

Na Tabela 10 encontram-se listados os substratos utilizados nos ensaios de hidrólise, quer seja sob condições padrão, quer seja por outras condições de avaliação de suas susceptibilidades à hidrólise.

TABELA 10 - SUBSTRATOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE HIDRÓLISE E SEUS RESPECTIVOS FABRICANTES

Substratos	Nome Comercial – (Fabricante)
CELULOSE	Sigmacell [®] (Sigma Co. cat# S5504)
	Papel de filtro Whatman no. 1
	Avicel [®] (Sigma Co. cat# 11365)
	Polpa kraft branqueada de <i>Pinus taeda</i> e de <i>Eucalyptus grandis</i> (Klabin Fabricante de Papel e Celulose SA, Telêmaco Borba, PR)
XILANAS	Xilana de tegumento de aveia (“oat spelt xylan”) e de madeira de vidoeiro (birchwood) (Sigma Co. cat# X1075 e X1082, respectivamente)
CELOBIOSE	Celobiose (Merck cat# 2352)
CELULOSE MODIFICADA	Carboximetilcelulose (CMC) (Sigma Co. cat# C4146)
	Hidroxietilcelulose (HEC) (Aldrich Co. cat# 434965)
SUBSTRATOS CROMOGÊNICOS	4-metilumbeliferil- β -D-celotriosídeo (Sigma Co. cat# M628)
	4-metilumbeliferil- β -D-lactopiranosídeo (Applichem Co. cat# A1274)
	p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (Merck cat# N7006)
	p-nitrofenil- β -D-lactopiranosídeo (Merck cat# N1752)
	p-nitrofenil- β -D-celotriosídeo (Merck cat# N5759)
PROTEÍNA	Azocaseína (Sigma Co. cat# A2765)

4.2 ENSAIOS

4.2.1 Massa-Seca e Teor de Umidade

A determinação da massa seca seguiu a metodologia TAPPI (1996), em seu protocolo T 550. Uma massa de 10,0000 g ($\pm 0,5$ mg) de amostra dos substratos foi adicionada a pesa-filtros previamente tarados, e colocadas em uma estufa aquecida a 100°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) por uma hora. Após esse período, foram esfriados em dessecador e pesados com a mesma precisão. Repetiu-se esta operação até massa constante. A

massa seca foi o resultado obtido ao final do ensaio, quando a massa medida permanece constante ao longo do tempo. A massa seca (MS) da amostra foi obtido através da equação:

$$\text{MS (\%)} = \frac{\text{Massa final da amostra após secagem (g)} \cdot 100}{\text{Massa inicial da amostra úmida (g)}}$$

4.2.2 Teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas, foi utilizada a norma M11/77 da ABCP (Associação Brasileira de Celulose e Papel), sem modificações.

Cadinhos de porcelana com tampas resistentes foram colocados em uma mufla e aquecidos a 575°C (+/- 25°C) por uma hora. Após esse período, foram esfriados em dessecador e pesados com precisão de 0,1 mg. Então, amostras “absolutamente secas” (cerca de 5 g) foram colocadas nos cadinhos e estes foram tampados, levados à mufla e aquecidos à mesma temperatura de 575°C por 1 hora, permitindo-se assim a incineração inicial. Mantendo a mufla à temperatura de 575°C, foram retiradas as tampas e as amostras foram calcinadas por 3 horas. Verificando-se a ausência total de partículas de carvão nas cinzas, os cadinhos juntamente com as tampas foram retirados da mufla, esfriados em dessecador até a temperatura ambiente e pesados com precisão de 0,1 mg. O teor de cinzas (TC) foi calculado segundo a equação:

$$\text{TC (\%)} = \frac{\text{Massa das cinzas (g)} \cdot 100}{\text{Massa inicial da amostra seca (g)}}$$

4.2.3 Lignina de Klason

O método utilizado neste ensaio foi desenvolvido por GOMIDE & DEMUNER (1986). Foram pesados aproximadamente 300 mg de substrato livre de

extrativos, com precisão de 0,1 mg. Esta massa foi transferida quantitativamente para um tubo de ensaio de cerca de 60 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro. O material foi então hidrolisado em banho-maria com 3,0 mL de ácido sulfúrico 72%, durante 1 h a 30°C. Após este tempo, a mistura foi diluída a 84 ml com água e transferida quantitativamente para um frasco de 100 mL, que foi fechado hermeticamente e autoclavado durante 1 h a 118°C. A mistura obtida foi filtrada ainda quente em cadinho de vidro sinterizado, previamente tarado, com papel de fibra de vidro. Em seguida, o cadinho foi seco em estufa a 105°C, por 12 horas, e pesado para quantificação do resíduo insolúvel, denominado de lignina de Klason (LK). O teor de LK foi calculado segundo a equação:

$$\text{LK (\%)} = \frac{\text{Massa final de material insolúvel após secagem (g)} \cdot 100}{\text{Massa inicial da amostra seca (g)}}$$

A lignina parcialmente solubilizada em ácido foi também quantificada por espectrometria no ultravioleta, utilizando o método “TAPPI Useful 250”.

4.2.4 Análise de Açúcares Solúveis

As análises de açúcares foram divididas em duas categorias e as amostras foram analisadas sempre em triplicata: a primeira, referente aos açúcares redutores totais (ART), utilizaram as metodologias espectrofotométricas do ácido dinitrossalicílico (DNS) (GHOSE, 1987) e de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1952; CHAPLIN & KENNEDY, 1994) e, a segunda, através de métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A opção pelo método analítico empregado nos ensaios dependeu dos níveis de açúcares gerados durante as hidrólises enzimáticas (PCTrR e controles analíticos), assim como do mecanismo de ação das enzimas, dos interferentes gerados durante as

hidrólises, dos limites de detecção analítica e da necessidade da resolução individualizada dos monossacarídeos liberados no processo.

4.2.4.1 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)

Dois métodos foram utilizados com esta finalidade: o método do DNS padronizado por GHOSE (1987) e o método de Somogyi-Nelson, segundo o método modificado da referência original (SOMOGYI, 1952) por CHAPLIN & KENNEDY (1994). A faixa de trabalho sugerida para o DNS foi de 0,2–2,0 mg de glucose por mililitro de solução, enquanto que o método de Somogyi-Nelson serviu para faixas de sensibilidade iguais a 10-100 µg de glucose por mililitro de solução.

No ensaio do DNS, foram transferidas para tubos de ensaio alíquotas de 1,0 ml da amostra e de 5 (cinco) soluções padrões de glucose com concentrações entre 0 e 2,0 mg/ml. A estes adicionaram-se 3,0 ml da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Merck cat# 800141). A solução foi agitada e colocada em um banho-maria em ebulição por 5 minutos. Adicionou-se então um volume de 5,0 mL de água fria, para, depois de bem homogeneizados, os meios de reação serem lidos em espectrofotômetro Varian modelo Cary 100, em comprimento de onda fixado em 550 nm. A concentração de açúcares redutores totais foi determinada comparando-se a absorbância das amostras contra a concentração do complexo colorido gerado entre o DNS e a glucose. Os resultados foram expressos em mg de açúcares redutores totais por mL de solução amostra. A concentração de ART liberados durante a hidrólise foi obtida multiplicando-se o valor encontrado pela diluição efetuada sobre as amostras (CHAPLIN & KENNEDY, 1994).

No ensaio de Somogyi-Nelson, alíquotas de 1,0 ml das amostras sofreram a adição de 1,0 ml de uma solução aquosa recentemente preparada de tartarato duplo de sódio e potássio, carbonato de sódio, sulfato de sódio e sulfato de cobre (reagente C). A solução foi agitada e colocada em um banho-maria por 15 minutos. Adicionou-se

então 5,0 ml de água fria e 1,0 ml de uma solução de molibdato de amônio, arsenito ácido de sódio e ácido sulfúrico (reagente D). Depois de bem homogeneizados, os meios de reação foram lidos em espectrofotômetro Varian modelo Cary 100 em comprimento de onda fixo em 520 nm. A concentração de açúcares redutores totais foi determinada interpolando-se a absorbância das amostras contra uma curva de calibração constituída com padrões de glucose. A concentração de açúcares redutores totais foi obtida multiplicando-se o valor encontrado pela diluição da amostra e os resultados foram expressos em mg de ART por mL de solução (SOMOGYI, 1952; CHAPLIN & KENNEDY, 1994).

4.2.4.2 *Determinação de Açúcares Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

A cromatografia de afinidade ou troca iônica é uma técnica de separação química versátil para a determinação de espécies químicas diversas. O uso desta técnica se deve a sua sensibilidade e seletividade na separação, detecção e quantificação de um ou mais carboidratos em solução, fornecendo resultados rápidos e exatos e permitindo análises relativamente complexas em uma única injeção.

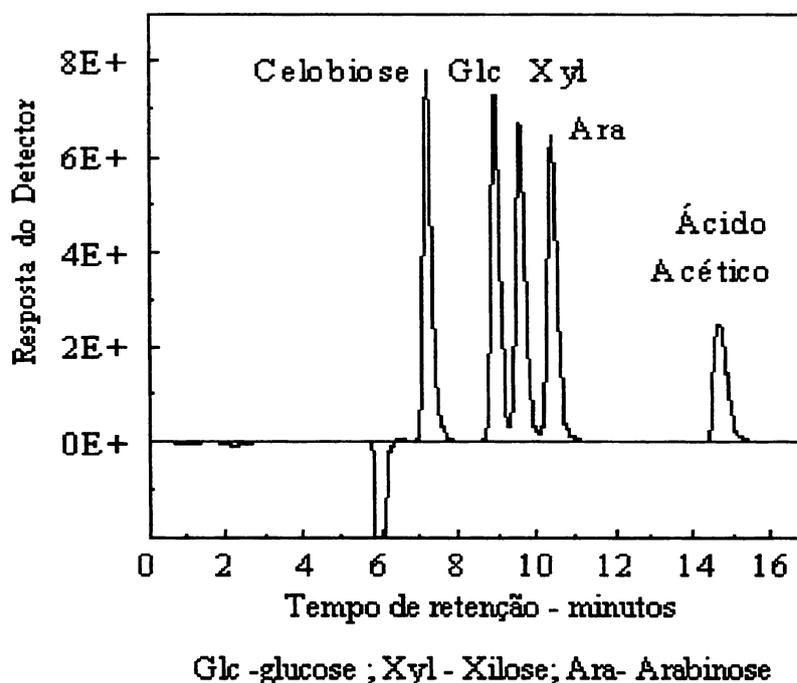
A composição qualitativa e quantitativa de carboidratos foi feita no hidrolisado solúvel das reações de hidrólise ácida ou enzimática. O método cromatográfico empregado fundamentou-se no fenômeno da troca iônica utilizando uma coluna separadora, um sistema supressor químico (vide item 4.2.4.2.) e uma unidade de detecção, quer de refratometria diferencial, quer mediante o uso de uma célula de condutividade.

4.2.4.2.1 *Análise dos Hidrolisados Ácidos e Enzimáticos por CLAE*

Para a análise dos monossacarídeos e dissacarídeos liberados por hidrólise ácida, empregou-se a cromatografia de troca iônica no modo isocrático. Foi utilizada uma coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (BIO-RAD) a 65°C, precedida por uma

pré-coluna cátion-H (BIO-RAD) para remoção de cátions interferentes (BUCHERT, et al. 1993). O sistema cromatográfico utilizado foi o da Shimadzu Scientific Instruments Inc., com módulo de bomba modelo LC10AD, amostrador automático modelo SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO10A, detetor de índice de refração modelo RID10A e sistema de aquisição de dados específico do fabricante (CLASS 10). A fase móvel utilizada foi o ácido sulfúrico 0,8 mM, a uma vazão de 0,6 mL/min. Os mono e dissacarídeos eluídos da coluna foram identificados e quantificados por refratometria diferencial através da comparação com padrões primários de açúcares (Figura 24).

FIGURA 24 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CARBOHIDRATOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS PRESENTES NOS HIDROLISADOS DAS AMOSTRAS DE POLPA CELULÓSICA



4.2.4.2.2 Análise Simultânea de Mono e Oligossacarídeos por CLAE

A análise quantitativa de carboidratos oligoméricos utilizando CLAE sob condições alcalinas foi feita segundo CHAPLIN & KENNEDY (1994).

A cromatografia de ânions consistiu em um trocador aniônico de base forte,

de baixa capacidade, enquanto que a coluna separadora foi um trocador catiônico do tipo forte, de alta capacidade, na forma H⁺. O eluente, nesse caso, foi uma solução alcalina e os ânions separados foram detectados na forma de seus ácidos fortes em um meio de baixa condutividade. O sistema utilizado foi o da Dionex Corporation modelo DX500, equipado com pré-coluna CarboPac PA-100 e coluna CarboPac PA-1 (4,6 X 250 mm). A análise foi realizada em gradiente quaternário, tendo como eluente principal o NaOH 100 mM sob um gradiente complementar de acetato de sódio e água, para um tempo final de 82 minutos (Tabela 11). A vazão média foi de 1,0 mL/min e o detector utilizado foi o amperométrico com eletrodo de ouro (PAD). Uma análise típica está representada na Figura 25, que inclui oligômeros como G2, G3, G4, G5 e G6.

TABELA 11 – GRADIENTE QUATERNÁRIO UTILIZADO PARA A ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS PELO SISTEMA DIONEX

Tempo (min)	%A	%B	%C	%D
0,0	97,5	2,5	0	0
23,00	97,5	2,5	0	0
40,00	0	100	0	0
60,00	0	50	50	0
60,10	0	0	100	0
64,00	0	0	100	0
64,10	0	0	0	100
67,00	0	0	0	100
67,10	97,5	2,5	0	0
82,00	97,5	5,5	0	0

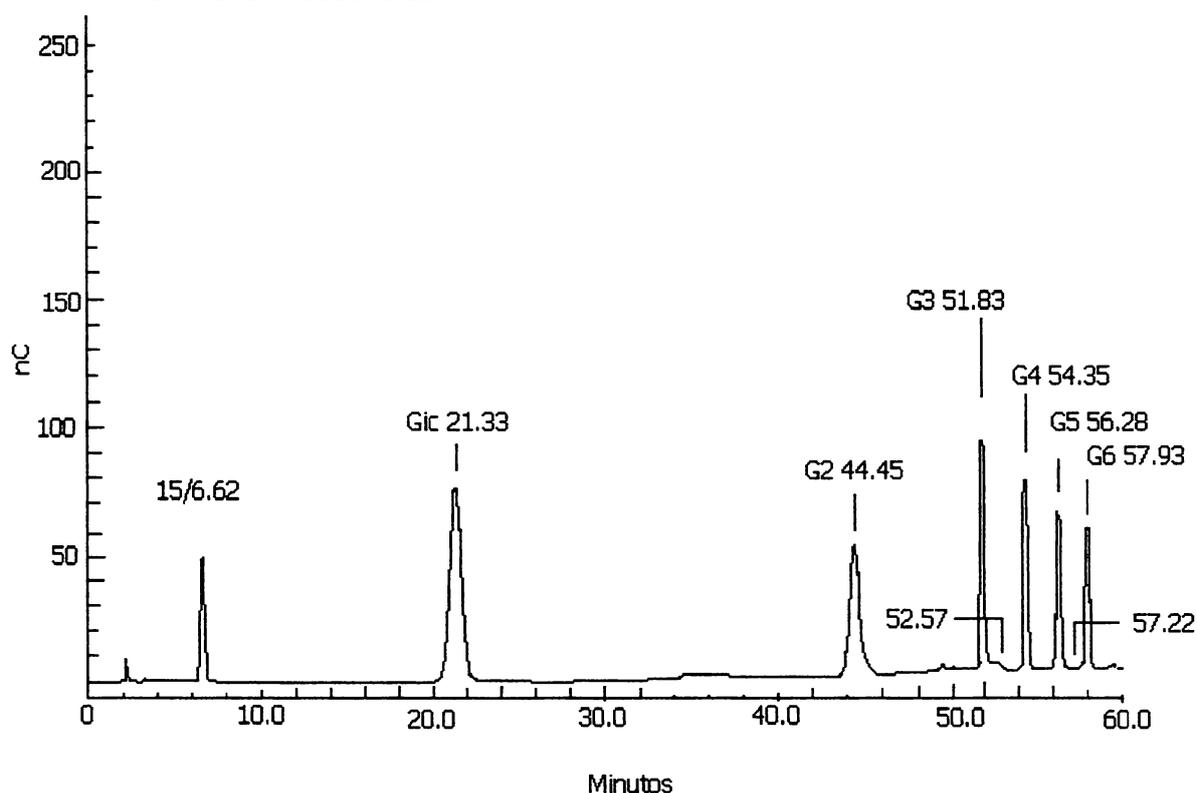
A= Água Ultrapura;

B=100 mM NaOH;

C= 300 mM Acetato de Sódio/100 mM NaOH;

D= 300 mM NaOH , Reagente pós coluna = 300 mM NaOH (0,3 ml/min)

FIGURA 25 – CROMATOGRAMA PADRÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDO ATRAVÉS DO SISTEMA DIONEX



4.2.5 Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração de proteína nas amostras foi estimada pelos métodos de LOWRY et al. (1951) e BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA - SIGMA Co. cat# B4287) como padrão primário. O ensaio denominado “branco” foi preparado utilizando-se o mesmo procedimento analítico onde o volume de amostra foi substituído por água destilada. Os resultados obtidos foram expressos em mg de proteína por mL de solução. Os métodos consistem basicamente na reação de redução do reagente de Folin-Ciocalteu quando da presença de aminoácidos que contenham tirosina.

Para o ensaio de LOWRY foram transferidos 0,5 mL da enzima diluída a uma concentração de aproximadamente 2,5 mg/mL para um tubo de 1,5 mL. Adicionados 1,0 mL do reagente A e 5 mL do reagente C, a mistura foi

homogeneizada e, após 10 minutos, foi adicionado 0,5 mL do reagente Folin 1N. Finalmente, a leitura em espectrofotômetro de absorção no ultravioleta (Varian, modelo Cary 100) foi efetuada a 750 nm após 30 minutos de estabilização da cor desenvolvida pela reação. Os padrões utilizados para fazer a curva de calibração foram preparados pesando-se 0,025 g de albumina de soro bovino dissolvidos em 50 mL de tampão acetado pH 4,8 (concentração de 0,5 mg/mL). Cinco outras soluções em níveis decrescentes foram preparadas afim de compor a curva de calibração.

Para o método de BRADFORD, foi utilizada como padrão uma solução de albumina de soro bovino a uma concentração de 5 mg/mL. As concentrações utilizadas no ensaio foram obtidas diluindo esta solução em tampão acetato pH 4,8. Amostras (100 μ L) de solução-padrão e dos ensaios de hidrólise enzimática foram transferidos para tubos de ensaio, onde adicionou-se 1 mL de reagente de BRADFORD. A leitura foi feita em espectrofotômetro de absorção no ultravioleta (Varian, modelo Cary 100) entre 5 a 60 minutos do momento da adição do reagente, em um comprimento de onda ajustado em 595 nm.

4.2.6 Determinação da Atividades Sobre Substratos Modelo

Os ensaios de atividade nas enzimas celulolíticas incluíram determinações de atividades específicas, além de outros ensaios de hidrólise usando substratos não convencionais. A atividade específica das enzimas foi definida como a quantidade de ligações β -(1,4)-glicosídicas hidrolisadas por unidade mássica de proteína (enzima) na unidade de tempo.

Vários métodos padronizados foram utilizados para determinar as atividades hidrolítica das PCTrR. Na Tabela 12 estão representados os métodos utilizados e internacionalmente aceitos para a determinação de atividades em preparações celulásicas (GHOSE, 1987).

TABELA 12 - ATIVIDADES DETERMINADAS NAS PREPARAÇÕES EM ESTUDO

<i>Atividade</i>	<i>Substrato</i>	<i>Método para a Determinação</i>
Atividade celulásica total	Papel filtro Whatman n. 1	CLAE
Endoglucanásica	Carboximetilcelulose (CMC); carboxietilcelulose (HEC)	açúcar redutor total
Exoglucanásica	Avicel [®] , Sigmacell [®]	açúcar redutor total
Xilanásica	xilana de casca de aveia e de madeira dura	CLAE , açúcar redutor total
Preferencial (Exo ou Endo conforme inibidores presentes)	4-metilumbeliferil- β -D- celotriosídeo; 4-metilumbeliferil- β -D-lactosídeo	espectrofotometria de fluorescência
	p-nitrofenil-lactosídeo; p-nitrofenil-celobiosídeo	espectrofotometria de absorção no ultravioleta
Celobiásica	celbiose	CLAE
β -Glucosidásica	p-nitrofenil-glucosídeo	espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Todos os ensaios foram conduzidos em tampão acetato 50 mM a pH 4,8. Uma unidade internacional (UI) de atividade enzimática correspondeu à liberação de 1 μ mol de equivalentes de glucose por unidade de volume e minuto de reação. Alternativamente, 1 UI/mL pode ser transformada em 1 nkat/mL mediante multiplicação do primeiro por um fator igual a 16,67.

4.2.6.1 *Atividade contra Papel Filtro (UPF)*

Em um tubo de ensaio foi colocada uma tira de papel de filtro Whatman n^o 1 (1,0 x 6,0 cm) pesando aproximadamente 70 mg sobre 1,0 mL de tampão acetato 50 mM, pH 4,8 (NIDETZKY et al., 1994). Foram adicionados a cada tubo de ensaio 1,0 mL de uma solução das enzimas devidamente diluídas em tampão acetato, afim de se obter uma concentração equivalente a 1 mg de glucose no meio de reação ao final da

hidrólise. As enzimas adicionadas ao meio de reação foram pré-condicionadas a 50°C. Transcorridos 60 minutos de incubação, os tubos de ensaio foram transferidos para um banho-maria fervente e lá permaneceram por 5 minutos. Após remoção do excesso de substrato por centrifugação, os açúcares solúveis foram medidos por CLAE utilizando a metodologia descrita no item 4.2.4.2.1. Adicionalmente, foram efetuados ensaios de açúcar redutor total pelo método do DNS, conforme descrito no item 4.2.4.1.

O cálculo para a determinação da atividade contra papel filtro foi obtido através da seguinte equação:

$$\text{UPF/ml} = \frac{\text{EqGlc (mg/ml)} \cdot E_{\text{dil}} \cdot V_{\text{T}} \text{ (ml)}}{\text{Tempo (min)} \cdot 1\mu\text{mol glucose (0,18mg)} \cdot V_{\text{E}} \text{ (ml)}}$$

onde E_{dil} representa a diluição efetuada sobre a enzima para atingir os níveis desejados de atividade hidrolítica, V_{T} é o volume total de reação, V_{E} é o volume de enzima adicionado ao meio reacional e EqGlc corresponde aos equivalentes de glucose liberados no meio de reação, conforme a equação abaixo:

$$\text{EqGlc (mg/ml)} = [\text{Glc}] \text{ (mg/mL)} + (F_{\text{CM}} \cdot [\text{celobiose}])$$

onde F_{CM} é o fator de correção mássica que converte um mol de celobiose em dois moles de glucose ($F_{\text{CM}} = 1,0526$).

4.2.6.2 Atividade Endoglucanásica sobre CMC

A um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 ml da solução de 2% (p/v) do substrato CMC. Foram adicionados a cada tubo de ensaio 0,5 mL de uma solução das enzimas devidamente diluídas em tampão acetato e o meio reacional foi mantido durante 30 minutos a 50°C em banho maria. Os açúcares redutores totais assim

liberados foram analisados pelo método do DNS, conforme descrito no item 4.2.4.1.. Para efeito de cálculo, somente as diluições que aconteceram a liberação de 1 mg/mL de equivalentes de glucose foram considerados.

O cálculo para a determinação da atividade contra CMC foi obtido através da seguinte equação:

$$\text{CMCU/ml} = \frac{\text{ART (mg/ml)} \cdot E_{\text{dil}} \cdot V_{\text{T}} \text{ (ml)}}{\text{Tempo (min)} \cdot 1\mu\text{mol glucose (0,18mg)} \cdot V_{\text{E}} \text{ (ml)}}$$

onde ART corresponde aos açúcares redutores totais determinados contra uma curva de calibração de glucose pelo método do DNS, E_{dil} representa a diluição efetuada sobre a enzima para atingir os níveis desejados de atividade hidrolítica, V_{T} é o volume total de reação e V_{E} é o volume de enzima adicionado ao meio reacional.

4.2.6.3 *Atividade Endoglucanásica sobre HEC*

A um tubo de ensaio foi adicionado 1,8 ml da solução de 1% (p/v) do substrato HEC em tampão acetato. Em seguida, a cada tubo de ensaio foram adicionados 0,2 ml de uma solução de enzima devidamente diluída em tampão acetato e o meio reacional foi mantido durante 10 minutos a 50°C em banho-maria. Os açúcares redutores totais assim liberados foram analisados pelo método de DNS, conforme descrito no item 4.2.4.1 . Para efeito de cálculo, somente as diluições que resultaram na liberação de 1 mg/mL de equivalentes de glucose foram consideradas e o cálculo para a determinação da atividade foi obtido através da seguinte equação:

$$\text{UHEC/ml} = \frac{\text{ART (mg/ml)} \cdot E_{\text{dil}} \cdot V_{\text{T}} \text{ (ml)}}{\text{Tempo (min)} \cdot 1\mu\text{mol glucose (0,18mg)} \cdot V_{\text{E}} \text{ (ml)}}$$

onde ART corresponde aos açúcares redutores totais determinados contra uma curva de calibração de glucose pelo método do DNS, E_{dil} representa a diluição efetuada sobre a enzima para atingir os níveis desejados de atividade hidrolítica, V_T é o volume total de reação e V_E é o volume de enzima adicionado ao meio reacional.

4.2.6.4 Atividade Celobiásica

A um tubo de ensaio foi adicionado 1,0 ml da solução de 15 mM do substrato celobiose em tampão acetato 50 mM. Foram adicionados a cada tubo de ensaio 1,0 mL de uma solução de enzimas devidamente diluída em tampão acetato. O meio reacional foi mantido durante 30 minutos a 50°C em banho-maria, donde foram transferidos por 5 minutos para um banho-maria fervente. Após centrifugação, os açúcares presentes no meio reacional foram medidos por CLAE utilizando a metodologia descrita no ítem 4.2.4.2.1 . Para efeito de cálculo, somente as diluições que liberaram cerca de 1 mg/mL de equivalentes de glucose foram considerados.

O cálculo para a determinação da atividade celobiásica foi obtido através da seguinte equação:

$$UCB/ml = \frac{[Glc] (mg/ml) \cdot E_{dil} \cdot V_T (ml)}{\text{Tempo (min)} \cdot 2\mu\text{mol glucose (0,36mg)} \cdot V_E (ml)}$$

onde [Glc] corresponde à concentração de glucose liberada no meio de reação, E_{dil} representa a diluição efetuada sobre a enzima para atingir os níveis desejados de atividade hidrolítica, V_T é o volume total de reação e V_E é o volume de enzima adicionado ao meio reacional.

4.2.6.5 *Atividade Xilanásica*

Foi preparada uma suspensão de 0,5 mg/mL de xilanas (Sigma) em tampão acetato 50mM a pH 4,8. A cada tubo de ensaio foram adicionados 0,5 ml de uma solução des enzima devidamente diluída em tampão acetato e o meio de reação foi mantido durante 30 minutos a 50°C em banho-maria, donde foram transferidos por 5 minutos para um banho-maria fervente. Após centrifugação, os açúcares presentes no meio reacional foram analisados pelo método de DNS, conforme descrito no item 4.2.4.1.. Para efeito de cálculo, somente as diluições em que foi observada a libeção de 1 mg/mL de equivalentes de xilose foram consideradas e o cálculo para a determinação da atividade foi obtido através da seguinte equação:

$$UX/ml = \frac{ART \text{ (mg/ml)} \cdot E_{dil} \cdot V_T \text{ (ml)}}{\text{Tempo (min)} \cdot 1\mu\text{mol xilose (0,15 mg)} \cdot V_E \text{ (ml)}}$$

onde ART corresponde aos açúcares redutores totais determinados contra uma curva de calibração de xilose pelo método do DNS, E_{dil} representa a diluição efetuada sobre a enzima para atingir os níveis desejados de atividade hidrolítica, V_T é o volume total de reação e V_E é o volume de enzima adicionado ao meio reacional.

4.2.6.6 *Atividade contra derivados do p-Nitrofenol*

Adicionou-se em tubos de ensaio 0,25 mL de solução 4,0 mM de derivados do *p*-nitrofenol e a esta solução 0,5 ml de tampão acetato 50mM e 0,25 ml de uma diluição apropriada das enzimas foram acrescentados. O meio de reação foi incubado a 42°C durante 10 minutos. Em seguida, acrescentou-se 1,0 mL de carbonato de sódio 1 M para interromper a reação e a concentração de *p*-nitrofenol liberado no meio reacional foi determinada no comprimento de onda de 405 nm por espectroscopia no ultravioleta/visível. A curva de calibração foi construída com soluções padrão de *p*-

nitrofenol, sendo que, no cálculo da concentração, usou-se uma absorvidade molar de 13700 L/mol.cm (CLAEYSSSENS & AERTS, 1992).

4.2.6.7 *Atividade contra Derivados 4-metil-Umbeliferílicos*

A atividade sobre glucosídeos 4-metilumbeliferílicos, como o celotriosídeo (MUmbG₃) e o lactosídeo (MUmbL), foi determinada utilizando-se uma solução 1,0 mM em tampão acetato 50 mM, pH 5,0, contendo 0,2 mM de glucono-1,5-lactona como inibidor de atividade β -glucosidásica. A 0,25 mL destas soluções adicionaram-se 0,25 mL de uma diluição apropriada da enzima e a mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos. Ao término da reação, foi adicionado 1,0 ml de Na₂CO₃ 1M para interromper a reação e as umbeliferonas liberadas foram dosadas espectrofotometricamente a 347 nm (NIKU-PAAVOLA et al., 1986). MUmbG₃ foi utilizado como substrato específico para EG II (KOIVULA, 1994), enquanto que MUmbL serviu para caracterizar a presença de CBH I e EG I. Porém, nesse último caso, a diferenciação entre ação exo (CBH I) e endo (EG I) foi decorrente da condução do ensaio na presença e ausência de 1 mM de celobiose, que atua como inibidor competitivo da CBH I.

4.2.6.8 *Atividade Proteolítica*

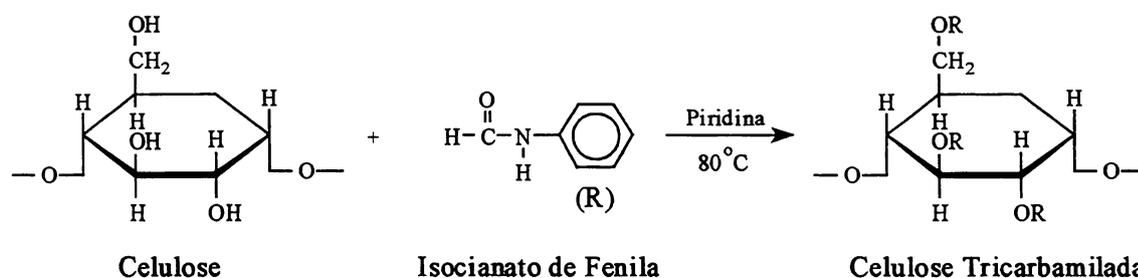
Na análise de atividade proteolítica (LEIGHTON et al., 1973), foi utilizada a azocaseína a 1% (m/v) preparada em tampão acetato 50 mM pH 7,2. A um tubo de ensaio adicionaram-se 0,25 ml da solução de azocaseína e 0,15 ml de uma diluição apropriada da enzima. A mistura foi incubada a 37°C por 60 minutos e, após este tempo, foram adicionados 1,2 ml de ácido tricloroacético (TCA 10%, v/v). Após centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi recebido em outro tubo de ensaio que continha 1,4 ml de NaOH 1N. A atividade proteolítica foi determinada por espectrometria no ultravioleta/visível a 440 nm, usando como base unidades de atividade conhecida de azocaseína.

4.2.7 Determinação da Distribuição da Massa Molecular da Celulose

A distribuição em massas moleculares de amostras de celulose, antes e após os procedimentos de hidrólise enzimática, foram determinadas utilizando Cromatografia de Permeação em Gel (CPG). As amostras foram carbamiladas e seus derivados comparados com as curvas de calibração, que usaram poliestireno como padrão primário a uma concentração média de 1,0 mg/ml.

O objetivo da reação de carbamilação (Figura 26) foi o de derivatizar a celulose para sua posterior solubilização em tetrahidrofurano (THF). A polpa de celulose (50 mg), seca em dessecador sob vácuo contra P_2O_5 , foi suspensa em piridina (4 mL) e então reagida com isocianato de fenila (0,5 mL) em tubos reacionais fechados, por um período de 48 horas, em um bloco de aquecimento a 80°C com agitação ocasional. Após este período, a mistura resultante foi precipitada em metanol/água (80:20). O precipitado foi lavado exaustivamente com a solução metanol/água, seco em dessecador sob vácuo contra P_2O_5 e acondicionado em tubos fechados, reservados para posterior análise por cromatografia de permeação em gel (CPG) (COLL & GILDING, 1970; DANHELKA & KOSSLER, 1976; WOOD et al., 1986).

FIGURA 26- REAÇÃO DE CARBAMILAÇÃO; CELULOSE REAGINDO COM ISOCIANATO DE FENILA EM PIRIDINA

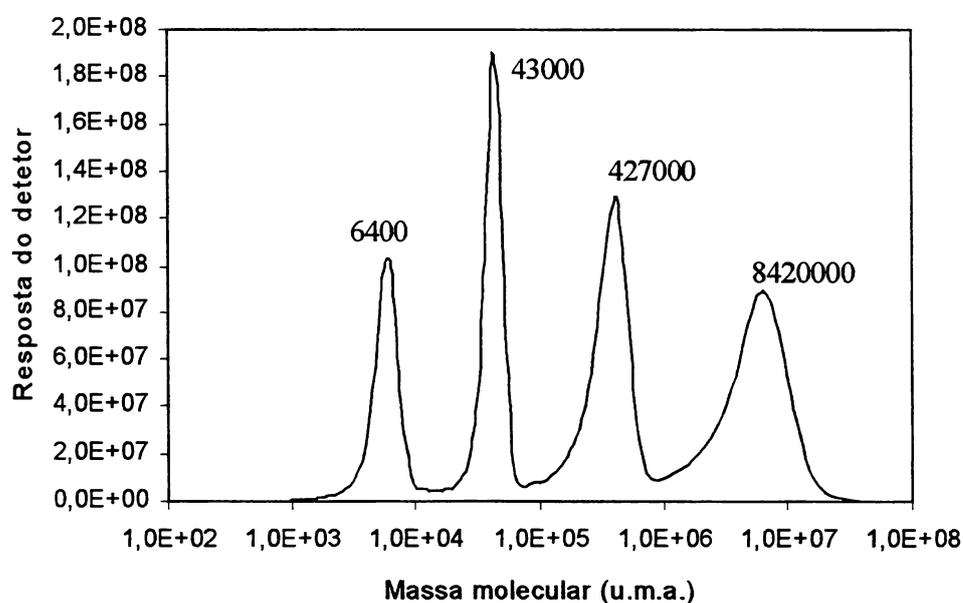


As amostras de celulose percarbamiladas foram analisadas em equipamento da marca Shimadzu, modelo LC10AD, com uma coluna de guarda e quatro colunas Tosoh TSK Gel (7.8 x 300 mm) com limites de exclusão equivalentes a 4×10^7 (TSK

6000 HXL), 4×10^5 (TSK 4000 HXL), 6×10^4 (TSK 3000 HXL) e 1×10^3 (TSK 1000 HXL) unidades de massa atômica, dispostas em série em um forno de aquecimento mantido a 45°C . A fase móvel utilizada foi o THF a uma vazão de 1 ml/min. e o volume de injeção foi correspondente a $20 \mu\text{L}$.

Um mínimo de três amostras foram injetadas para cada replicata e o eluato do sistema foi monitorado por um detector de absorção no ultravioleta Shimadzu SPD-10A em comprimento de onda fixado em 254 nm.. Um cromatograma típico pode ser visto na Figura 27.

FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DE PERMEAÇÃO EM GEL DE UMA SOLUÇÃO PADRÃO CONTENDO QUATRO PADRÕES MONODISPERSOS DE POLIESTIRENO



Os resultados foram tratados por software específico de CPG para aquisição e tratamento de dados, sendo que a curva de calibração foi efetuada sobre a análise de padrões monodispersos de poliestireno de massa molecular entre 2500 e 8420000 u.m.a., respectivamente (Tabela 13, Figura 27). A partir dos respectivos volumes de retenção apresentados pelos padrões, foi possível traçar uma curva padrão (Figura 30), cujo fator de dispersão, em ajuste polinomial, foi de apenas 0,0306.

Os parâmetros universais utilizados para a calibração (coeficientes de Mark-

Houwink) foram aqueles propostos por VALTASAARI & SAARELA (1975), onde $K_p = 1,18 \cdot 10^{-4}$ e $\alpha_p = 0,74$ para poliestireno em THF e $K_c = 2,01 \cdot 10^{-5}$ e $\alpha_c = 0,92$ para os derivados carbanilados de celulose em THF.

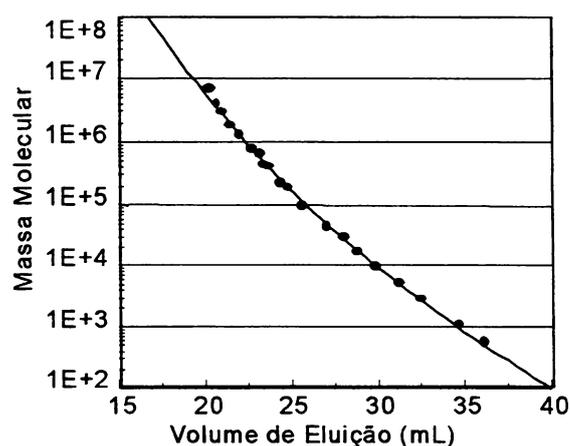
TABELA 13- PADRÕES DE POLIESTIRENO UTILIZADOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO SOBRE A QUAL FOI DETERMINADO O DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS POLPAS CELULÓSICAS

Massa Molecular (uma)	Volume de retenção (mL)	Massa Molecular (uma)	Volume de retenção (mL)
8420000	21,314	184000	25,979
5480000	21,416	110000	26,576
3840000	21,739	98900	26,84
1800000	22,583	43000	28,305
1300000	23,346	17300	30,105
900000	23,597	10300	31,331
791000	23,865	5000	32,49
600000	24,257	2500	34,357
400000	24,692	537	36,130
220000	25,48	92	40,175

A expressão matemática utilizada nos cálculos está apresentada pela equação:

$$\log M = - 0,00028708 x^3 + 0,01579371 x^2 - 0,4885546 x + 8,59838088$$

FIGURA 28- CURVA DE CALIBRAÇÃO BIMODAL UTILIZADA NA ANÁLISE DE GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS POLPAS, CUJA DISPERSÃO EM TORNO DA MÉDIA FOI DE 0,0306



O cálculo da massa molecular foi procedido pelo método de calibração universal, orientado pela seguinte equação : (RAMOS, 2001).

$$\ln M_c = \frac{(1 + \alpha_p) \ln M_p + \ln(K_p / K_c)}{1 + \alpha_c}$$

Assim, baseados na curva de calibração dos padrões de poliestireno, foi possível calcular o comprimento médio da cadeia (MM_n) (ou média aritmética das massas moleculares, MM_N) e a média ponderada das massas moleculares, (MM_M) da celulose per-carbamilada, sendo que o grau de polimerização (GP) foi calculado pela relação $GP = MM/519$ onde o denominador corresponde à massa molecular de uma unidade de anidroglicose per-carbamilada. Por fim, a razão MM_M/MM_N foi utilizada como medida da polidispersidade da polpa, que representa o desvio padrão da distribuição em torno de seu ponto central (YAU et al., 1979).

4.2.7.1 *Análise Espectrofotométrica de IVTF das Polpas e Polímeros Gerados por Carbamilação*

Para análise qualitativa por IVTF (Espectrofotometria na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (RAMOS et al., 1993), foram preparadas pastilhas em KBr com concentração em torno de 1 a 2% das polpas e dos polímeros gerados por carbamilação. As análises de IVTF foram realizadas em equipamento BOMEM MB100, interfaceado com um PC 486 sob ambiente DOS. Os espectros foram gravados de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Para cada espectro foram coletados 32 interferogramas antes da aplicação da transformada de Fourier.

4.3 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

O preparo da amostra foi realizado a partir de uma suspensão de fibras em água, a qual foi filtrada de modo a se formar um disco de fibras superpostas de superfície a mais regular e homogênea possível. A amostra assim preparada foi seca

em dessecador sob vácuo e P_2O_5 como agente secante e posteriormente transferida para uma placa de vidro com auxílio de cola de silício (graxa de vácuo). Uma leve prensagem, mediante superposição com outra placa de vidro, garantiu uma maior homogeneidade superficial para aquisição dos difratogramas.

Os difratogramas de raios-X das polpas foram obtidos em um equipamento Rigaku, no laboratório de Difractometria de Raios-X do Departamento de Física da UFPR, utilizando um gerador de voltagem de 40 kV e uma corrente de 20 mA. A fonte de radiação utilizada foi a linha alfa do cobalto ($CoK\alpha = 0,179$ nm com filtro de Ni).

O índice de cristalinidade da celulose foi determinado de acordo com o método empírico de Segal *et al.* (1959), conforme a Equação

$$CrI (\%) = [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] \times 100$$

onde CrI é o índice de cristalinidade, I_{002} é a intensidade máxima do pico no plano (002) (plano de maior orientação molecular ou cristalinidade) e I_{am} é a intensidade de difração no ângulo de Bragg $2\theta = 18^\circ$, correspondente à contribuição devida à região amorfa.

4.4 ANÁLISE DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS POR FPLC

Para a separação e identificação dos componentes presentes nas PCTrR e posterior análise de suas propriedades catalíticas, foi utilizado um método cromatográfico específico denominado de “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC™, Pharmacia Fine Chemicals). Essas corridas cromatográficas utilizaram um equipamento provido dos seguintes módulos operacionais: duas bombas P-500, detetor de absorção no ultravioleta ajustado em 280 nm, controlador modelo LCC-500 Plus e registrador modelo REC 102. A coluna cromatográfica utilizada foi a Resource Q® (4 cm x 2 cm), eluída conforme o gradiente de eluição descrito na Tabela 10. Como fase

móvel do sistema, foram utilizados tampão fosfato pH 7,0 (A) e tampão fosfato pH 7,0 com adição de cloreto de sódio 1 M (B).

Para que o sistema cromatográfico tivesse a eficiência esperada, foi necessário fazer uma dessalinização prévia das amostras, utilizando uma pré-coluna Econo-Pac 10 DG (BioRad™). A condutividade das amostras preparadas para injeção foram também ajustadas para evitar interferências no processo de migração cromatográfica. Alíquotas de 2,0 mL de uma solução previamente dessalinizada contendo aproximadamente 5 mg/mL de proteína foram injetada no sistema cromatográfico (TOMAZ & QUEIROZ, 1999).

A calibração e os cálculos de controle analítico do método foram feitos utilizando a enzima comercial Celluclast 1,5L[®]. Com base nos resultados inicialmente obtidos para esta enzima, foi estabelecido o gradiente de eluição utilizado experimentalmente e apresentado na Tabela 14.

TABELA 14 – PROGRAMAÇÃO UTILIZADA COMO GRADIENTE DE ELUIÇÃO NAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR FPLC

<i>Volume de eluição(ml)</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>	<i>Vazão ml / min</i>
Inicial	100	0,0	2,0
12	100	0,0	
37	83,0	17,0	
49	83,0	17,0	
73	60,0	40,0	
74	0,0	100,0	
86,0	0,0	100,0	
Método de regeneração da coluna			
Inicial	100,0	0,0	2,0
100,0	100,0	0,0	

*(A)-tampão fosfato pH 7,0 ; (B)-tampão fosfato pH 7,0 com adição de cloreto de sódio 1 M.

O eluato da coluna cromatográfica foi recolhido em alíquotas de 2,0 ml através de um coletor de frações da marca Gilson Microcol, modelo TDC 80. As alíquotas assim obtidas foram analisadas isoladamente e, após a confirmação de suas

propriedades, foram agrupadas em cinco grandes frações em que os principais componentes do sistema celulásico de *T. reesei* foram separados.

Cada fração derivada da análise por FPLC teve a sua concentração em proteínas determinada pelo método de Lowry (vide ítem 4.2.5), assim como foi também determinada a atividade endoglucanásica presente em cada uma delas, utilizando HEC como substrato conforme descrito no ítem 4.2.6.3 .

4.4.1 Análise Condutivimétrica

Conforme descrito acima, todas as amostras a serem cromatografadas por FPLC foram dosadas, antes da análise, em um condutivímetro da EDT Instruments, modelo BA330. Os procedimentos de calibração e leitura das amostras seguiram as recomendações do fabricante, conforme descrito no manual do equipamento. A unidade de medida foi definida como $K\mu S$.

4.4.2 Análise Monoclonal

As frações provenientes do FPLC foram separadas em grupos e analisadas através do uso de anticorpo monoclonal para identificar a presença de CBH II (NIEVES et al., 1991). A técnica consistiu na adição de 2,0 μl das frações enzimáticas diluídas a uma membrana de nitrato de celulose seca. Em seguida, adicionou-se solução tampão TBS pH 8,0 (10 mM Tris/HCL, 150 mM NaCl) e solução do anticorpo monoclonal à CBH II (Mab 8) em uma concentração de 1,1 mg/ml. A membrana foi então incubada sob agitação e à temperatura ambiente por no mínimo 1 hora e em seguida lavada e seca ao ambiente. A presença de manchas e sua intensidade relativa nos locais onde foram aplicadas as enzimas indica a presença de CBH II. A sensibilidade deste método foi calculada em 2,5 ng/ μl . Os anticorpos monoclonais foram cedidos pela VTT Biotechnology (Finlândia).

4.4.3 Determinação da Presença de Domínio Catalítico Livre na Fração Correspondente à CBH I

A cromatografia de afinidade molecular foi usada para avaliar a extensão em que a enzima CBH I encontrava-se hidrolisada em seus domínios catalítico (DC) e de ligação ao substrato (DLC). Para tal, foi utilizada a coluna denominada de “Phenyl Sepharose High Performance” (Pharmacia Fine Chemicals). O volume de amostra injetada no FPLC foi de 2,0 mL, usando o mesmo sistema descrito anteriormente porém sob condições distintas de eluição gradiente, conforme descrito na Tabela 15. Neste procedimento, o coletor de frações foi programado para coletar alíquotas de 0,5 mL, que foram utilizadas para separar o DC livre da enzima que não sofreu proteólise.

A solução B composta de solução de acetato de sódio 5 mM adicionado de sulfato de amônio 500mM . Ambas foram controladas através da sua leitura condutivimétrica, que foi de 23,1 K μ S para a solução B, enquanto a solução A composta somente do tampão foi de 144 μ S.

TABELA 15 – PROGRAMA UTILIZADO COMO GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE ANIÔNICA (FPLC)

<i>Volume de eluição (ml)</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>	<i>Vazão (ml/min)</i>
Inicial	100	0	0,5
5	100	0	
5,1	0	100	
11,0	0	100	
Método de regeneração da coluna			
Inicial	100	0	0,5
7,0	100	0	

4.5 HIDRÓLISE DE CELULOSE MICROCRISTALINA

Para a determinação da atividade das enzimas sobre celulose microcristalina (atividade avicelásica), incubou-se em banho-maria a 50°C por 2 horas uma mistura contendo 1 mL de uma suspensão a 1% (m/v) de Sigmacell® em tampão acetato 50

mM, pH 4,8 com 1 mL de uma diluição da enzima contendo 200mg de proteína/g de substrato. Em seguida, ferveu-se o meio de reação por 10 minutos para inativar a enzima. O meio reacional foi então centrifugado e dele recolheu-se 0,5 mL para análise de açúcares solúveis pelo método do DNS, conforme descrito no item 4.2.4.1. O restante foi submetido à análise por CLAE conforme o item 4.2.4.2.1.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE AS PROPRIEDADES DE POLPAS CELULÓSICAS COMERCIAIS

4.6.1 Hidrólise Enzimática

Foram realizados ensaios de tratamento enzimático sobre polpas kraft branqueadas oriundas do processamento de *Eucalyptus* sp. (madeira dura ou folhosa) e *Pinus* sp. (madeira mole ou conífera).

As hidrólises das polpas foram realizadas utilizando tempos e cargas protéicas diversas para que estas diferenças permitissem avaliar a ação das PCTrR e das preparações comerciais sobre os substratos.

Das condições de hidrólise foram mantidas constantes: (a) a consistência das polpas em 5% (m/v); (b) a temperatura (45°C); e (c) a agitação do meio de reação em 150 rpm. Já as cargas protéicas e os tempos de hidrólise foram os seguintes: para ensaios de sacarificação, usou-se uma carga de 40 mg de proteína/g de substrato e um tempo de hidrólise de 4 horas, enquanto que para a modificação das propriedades polpas kraft, foi usada uma carga de 4 mg de proteína/g de substrato e um tempo de 2 horas de hidrólise.

As hidrólises foram controladas analisando-se o título de proteínas (método de Lowry) das soluções de trabalho, antes e depois das reações. Por outro lado, o ensaio de sacarificação contou com a adição de uma carga exógena de β -glucosidases para evitar o acúmulo de celobiose no meio.

O meio reacional aquoso dos tratamentos enzimáticos foi testado para açúcares redutores totais (método DNS) e carboidratos mono- e oligômeros (método CLAE), enquanto que as fibras parcialmente hidrolisadas foram lavadas exaustivamente com água e reservadas para as análises do grau de polimerização e para a preparação de corpos de prova que serviram para a avaliação das propriedades mecânicas da polpa. Estes procedimentos estão descritos na próxima seção.

4.6.2 Ensaio das Propriedades Mecânicas dos Corpos de Prova

Todos os testes efetuados neste item utilizaram os corpos de prova preparados conforme a norma TAPPI T 205, bem como as recomendações de calibração e aceitabilidade dos resultados previstas na norma TAPPI T 400.

4.6.2.1 Gramatura e Espessura

Um número representativo de folhas (sete no mínimo), formadas segundo a norma TAPPI T 205, foram cortadas e suas dimensões medidas, sendo que cada folha não possuiu tamanho menor que 500 cm². Um escalímetro digital foi utilizado para medir a espessura do papel e a variação aceita foi inferior a 0,2%, para uma escala de 0,5 mm. A folha circular de papel foi pesada em uma balança de precisão analítica e a sua gramatura foi determinada em relação à área do corpo de prova (g/mm²), com base na norma TAPPI 410 om-98.

4.6.2.2 Resistência ao Rasgo

O índice de resistência ao rasgo foi determinado no aparelho Elmendorf (Regmed S&A) seguindo os procedimentos da norma TAPPI T 414 om-98. Os valores médios obtidos no equipamento para uma folha ou corpo de prova foram expressos como índice de rasgo (IR), cuja fórmula utilizou a seguinte equação:

$$\text{IR (mN.m}^2\text{/g)} = \frac{9,807 \cdot L_r \cdot 16}{G \cdot N}$$

onde G é a gramatura da folha ou corpo de prova, N é o número de amostras e Lc é a leitura corrigida do aparelho ($L_c = -0,122 + 0,9759 \cdot \text{força}$).

4.6.2.3 Resistência a Tração e ao Alongamento

Estes ensaios foram realizados com os corpos de prova em equipamento de testes universal “Instron”, equipado com um sistema microprocessado e computadorizado de coleta de dados. A norma utilizada foi a TAPPI T 4949 om-96. A distância entre garras no corpo de prova foi de 100 mm, a velocidade do teste de 25 mm/min e a capacidade de carga de 100 ou 1000 N. A energia de deformação dos corpos de prova foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{IR (J/m}^2\text{)} = \frac{10000 \cdot A}{L \cdot L_a \cdot G}$$

onde A é a área sobre a curva de força vs. deformação, L é o comprimento da amostra (cm) e La é largura da amostra (cm) e G é a gramatura da folha ou corpo de prova.

4.6.2.4 Resistência ao Arrebatamento (Estouro)

As folhas de papel foram submetidas a uma pressão através de uma membrana de borracha com 30,5 mm de diâmetro em equipamento Mullentester, de acordo com a norma TAPPI T 403 om-97. Durante o ensaio, a membrana sofreu um aumento na pressão de maneira constante e foi inchando até o momento em que a

folha não resistiu e se rompeu. O índice de arrebentamento (IA) foi determinado pela equação:

$$\text{IA (kPa.m}^2\text{/g)} = \frac{98,022 \cdot L \cdot f}{G}$$

onde L é a leitura do arrebentamento (Kgf/cm²), f é o fator de correção de leitura e G é a gramatura da folha ou corpo de prova.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trabalhos com enzimas (hidrolases) provenientes de cepas recombinantes têm crescido muito nas últimas décadas, mas a compreensão de seus mecanismos de expressão e de seus modos de ação catalítica ainda não foi totalmente esclarecidas. (SUOMINEN et al., 1993; KARHUNEN et al., 1993). Portanto, os resultados relatados neste estudo tiveram o objetivo de elucidar o modo de ação de enzimas desta natureza. Preparações enzimáticas derivadas de cepas recombinantes de *Trichoderma reesei*, foram portanto investigadas com o objetivo de ter elucidados os seus modos de ação catalítica sobre substratos celulósicos de natureza variada, dados considerados críticos à avaliação de suas potencialidades para o emprego nas indústrias de papel e celulose. É importante ressaltar que os experimentos de manipulação genética e de fermentação para a produção das enzimas foram realizados pela Primalco Ltd Biotec (atualmente, Röhm Enzyme Finland Oy, Espoo, Finlândia), que gentilmente nos forneceu o material para o desenvolvimento do projeto.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS DERIVADAS DE CEPAS RECOMBINANTES DE *Trichoderma reesei*

As seções que se seguem apresentam os resultados obtidos com as preparações celulásicas a que denominamos de **PCTrR**, ou seja, Preparações Celulásicas de cepas de *T. reesei* Recombiantes.

5.1.1 Avaliação do Teor Protéico nas Preparações Enzimáticas

As análises da concentração de proteínas nas preparações celulásicas comerciais, e naquelas provenientes de *T. reesei* modificado geneticamente (**PCTrR**), foram realizadas segundo dois métodos distintos denominados de “Lowry” e “Bradford” (vide item 4.2.5.). No entanto, apesar de aceitos internacionalmente, estes

métodos foram inicialmente validados segundo as normas do “Environmental Protection Agency” (protocolo no. 821-B-93-001) para que não existissem dúvidas quanto a interferência de estabilizantes e/ou aditivos utilizados durante a produção dos complexos enzimáticos.

Uma amostra comercial das celulasas de *T. reesei* (Sigma) foi utilizada como padrão externo às metodologias de “Lowry” e “Bradford” e os resultados obtidos nas curvas de calibração apresentaram desvio padrão relativo menor que 0,3%, quando comparados à albumina de soro bovino padrão (BSA). Portanto, com base nestes resultados, optou-se pelo BSA para confecção das curvas de calibração nos ensaios de teor protéico. No entanto, deve-se salientar que os resultados obtidos nestas metodologias são comparativos e não absolutos porque a composição química estrutural dos aminoácidos do BSA, particularmente no que tange à presença de hidroxilas fenólicas, não é igual àquelas presentes nas PCTrR.

TABELA 16 – TEOR PROTÉICO SEGUNDO OS MÉTODOS DE LOWRY E DE BRADFORD DAS PCTrR E DAS FORMULAÇÕES ENZIMÁTICAS COMERCIAIS

Código	LOWRY		BRADFORD	
	Concentração, mg/ml	DPR	Concentração, mg/ml	DPR
A	21,00	1,35	20,60	7,51
B	27,00	1,42	27,40	5,34
C	127,00	0,96	126,30	6,61
D	41,00	0,57	45,10	3,57
E	67,00	1,45	67,60	4,58
F	47,00	1,02	49,00	6,42
G	37,00	0,98	36,60	5,81
H	41,00	0,65	42,30	2,50
Novozym 188 [®] (β-glucosidase)	39,60	0,23	38,90	5,73
Celluclast 1.5L [®]	168,50	0,34	167,30	2,94

DPR, desvio padrão relativo

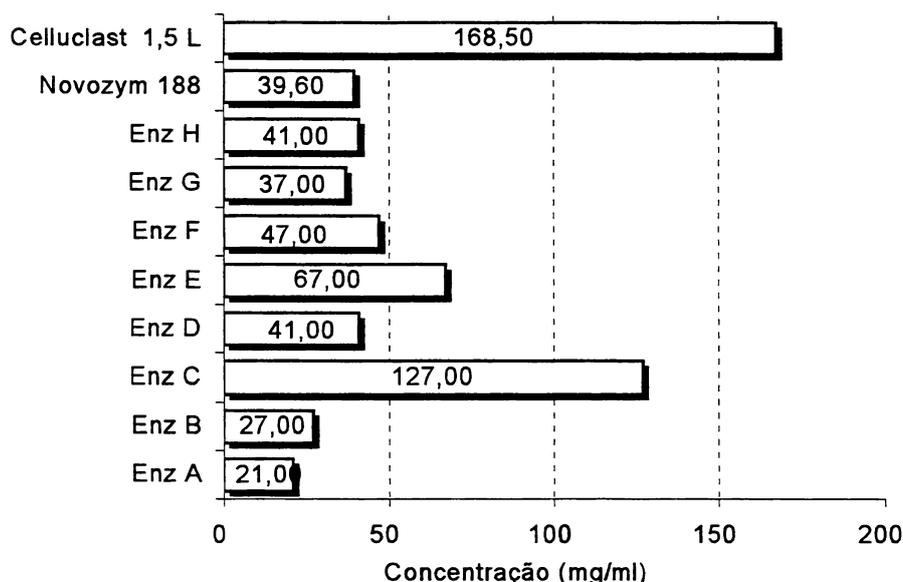
Uma vez estabelecido o padrão analítico primário (BSA) efetuou-se a validação das duas metodologias.

Na Tabela 16 encontram-se expressas as médias obtidas entre cinco análises que realizadas em momentos distintos e que apresentaram variações compatíveis com os limites estabelecidos na validação da metodologia. As variâncias aceitas para estes ensaios tiveram como base um desvio padrão relativo de $\pm 1,5\%$, sendo que quaisquer valores superiores a este limite não foram considerados válidos. Por esse motivo, o teor de proteínas neste estudo foi preferencialmente determinado pelo método de “Lowry”.

A concentração de proteínas nas **PCTrR** variou de 21,00 a 127,00 mg/ml, enquanto que as formulações comerciais Celluclast 1.5L[®] e Novozym 188[®] apresentaram teor protéico de 168,50 e 39,60 mg/ml, respectivamente. Afim de facilitar a visualização, estes valores encontram-se representados na Figura 29.

Celluclast 1.5L[®] apresentou o maior título de proteínas em relação às demais preparações celulásicas. O principal motivo desta superioridade no teor protéico reside no fato de que, no caso da cepa industrial, o processo de fermentação em larga escala é seguido por etapas sucessivas de concentração e estabilização a que as **PCTrR** não foram submetidas, com exceção da enzima **C**, segundo informações prestadas pelo fabricante. Assim, as **PCTrR**, por terem sido produzidas em processos fermentativos dissemelhantes, apresentam variações em seus respectivos níveis protéicos que não podem ser meramente interpretadas como decorrência direta da manipulação genética. Conforme DURÁND (1995), as modificações nas condições de fermentação de linhagens mutagênicas alteram o rendimento na produção de proteínas, sendo exemplo típico a secreção de quantidades superiores a 40 g/L sob condições otimizadas de cultivo.

FIGURA 29 – GRÁFICO COMPARATIVO DO TEOR DE PROTEÍNAS CONTIDO NAS PCTrR E NAS PREPARAÇÕES INDUSTRIAIS UTILIZADAS COMO REFERÊNCIA



Vale ressaltar que a principal finalidade destes ensaios foi a de estabelecer uma metodologia padrão, desde o início dos trabalhos, que representasse a concentração real das enzimas nas formulações originais e nas diluições requeridas para os tratamentos enzimáticos. A fidedignidade destes valores é obviamente limitante e fundamental para a avaliação das atividades específicas presentes nas preparações.

5.1.2 Estudo Comparativo Sobre Atividades Enzimáticas

Conforme descrito na literatura (FAN et al., 1987), o modo de ação de endo e exoglucanases depende da natureza e estrutura supramolecular do substrato, do sinergismo apresentado entre as enzimas e das condições experimentais utilizadas no processo de hidrólise. Portanto, através da investigação do modo de ação das PCTrR sobre substratos de propriedades químicas distintas, buscou-se esclarecer a importância relativa e o real modo de ação destas enzimas.

Os estudos iniciaram com a avaliação da ação hidrolítica das PCTrR sobre substratos modelo, com a finalidade de elucidar o modo de ação catalítica para então

compará-la com as informações existentes na literatura especializada. Dentre os substratos utilizados nesse estudo encontram-se a carboximetilcelulose (CMC), a hidroxietilcelulose (HEC), o papel de filtro Whatman no. 1 (UPF), a xilana de endoderma de aveia (XEA), dois tipos de celulose microcristalina comercial (Sigmacell[®] e Avicel[®]) e a xilana da madeira de vidoeiro (XMV), além de celobiose, azocaseína e derivados *p*-nitrofenílicos (PNF) e 4-metilumbeliferílicos (MUmb). A avaliação dos rendimentos de hidrólise sobre esses substratos foi também comparada com a preparação celulásica comercial denominada Celluclast 1.5L[®], utilizada neste caso como referência. Portanto, a análise do modo de ação endoglucanásica foi avaliada sobre os substratos celulósicos hidrossolúveis (CMC e HEC), a ação exoglucanásica sobre celulose microcristalina (Sigmacell[®] e Avicel[®]), a ação hemicelulásica sobre xilanas (XEA e XMV) e a ação celobiásica sobre celobiose e *p*-nitrofenil derivados. A análise da ação proteolítica nas **PCTrR** foi realizada porque estas formulações foram geradas em processos fermentativos não necessariamente otimizados para limitar a produção de proteases no meio. Vários autores relataram que baixos níveis de atividade proteolítica podem acarretar a separação dos domínios catalítico (DC) e de ligação ao substrato (DLC) presentes nas celulasas. Destituída de sua capacidade de adsorver sobre o substrato, enzimas como a celobiohidrolase I (CBH I) sofrem uma alteração considerável de suas propriedades catalíticas, reduzindo os índices de sacarificação que lhes são comumente atribuídos (BUCHERT et al., 1996). Como descrito na seção 5.2, estes resultados foram fundamentais para justificar alguns dos dados obtidos, em relação ao perfil de ação catalítica das **PCTrR**.

As Tabelas 17, 18 e Figura 30 trazem os resultados de atividade enzimática, expressos em Unidades Internacionais e obtidos através das metodologias descritas no capítulo 3.2.7.. Nos casos em que substratos de maior acessibilidade foram utilizados no ensaio, uma unidade internacional (UI) representa a liberação de 1,0 μmol de anidroglicose a cada minuto de reação, sendo que no caso específico das xilanas, este valor foi expresso em relação à massa molar de anidroxilose (GHOSE, 1987).

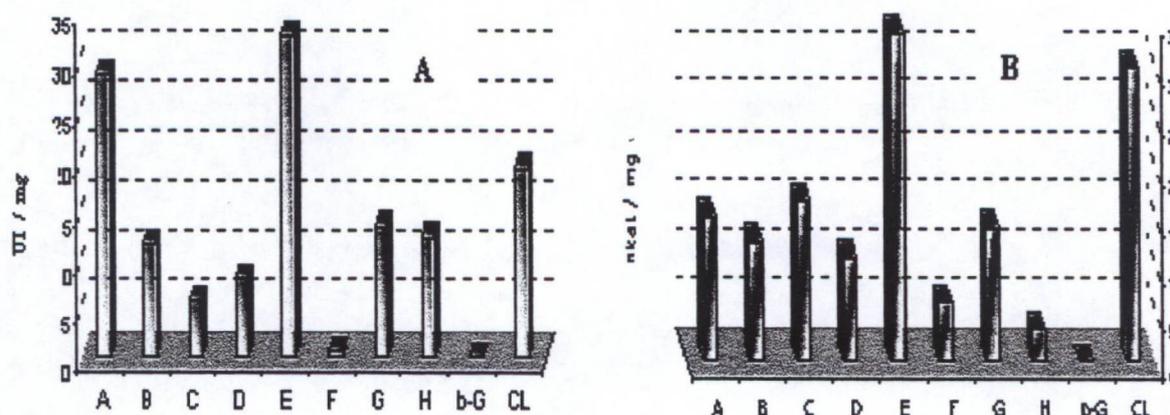
TABELA 17- ATIVIDADES ESPECÍFICAS PARA PF, CMC, HEC, XEA E XMV DAS PCTrR E DAS FORMULAÇÕES INDUSTRIAIS (GHOSE,1987)

CÓDIGO	PF UI/mg	CMC UI/mg	HEC nkat/mg	XEA UI/mg	XMV UI/mg
A	0,47	28,61	14,94	11,31	3,20
B	0,45	11,72	12,49	3,82	1,22
C	0,57	5,91	16,59	1,92	0,06
D	0,56	8,17	10,86	5,20	1,67
E	0,19	32,40	33,61	19,15	2,11
F	0,58	0,67	6,12	1,06	5,29
G	0,015	13,51	13,88	31,50	4,88
H	0,19	12,40	3,22	17,31	5,91
β -G	ild	ild	ild	ild	ild
CL	0,86	19,25	30,09	2,42	1,57

* ild – não detectado

As PCTrR, designadas como A, B, C, D, E, F, G e H, apresentaram diferenças fundamentais em suas atividades celulásicas, quando comparadas com a preparação comercial Celluclast 1.5L[®]. Por outro lado, como era de se esperar, a preparação comercial Novozym 188[®] (atividade celobiásica) não apresentou nenhuma atividade sobre PF, CMC, HEC, XEA e XMV.

FIGURA 30 - ATIVIDADE SOBRE CMC (A) E ATIVIDADE SOBRE HEC (B) DAS PREPARAÇÕES CELULÁSICAS



SUOMINEN et al. (1993), em publicação sobre enzimas geradas a partir da manipulação genética de CBH I e II e de EG I e II em *T. reesei*, indicaram que a ausência ou supressão de EG II causou uma redução de 60% na atividade sobre HEC quando comparada com as enzimas da cepa original, não ocorrendo o mesmo para a atividade sobre PF. Outro dado interessante foi que a supressão dupla de CBH I e II não causou decréscimo algum na atividade contra HEC, ao passo que inibiu totalmente a atividade sobre PF.

A determinação da atividade endoglucanásica presente nas PCTrR foi ensaiada contra dois tipos de substratos, a hidroxietilcelulose (HEC) e a carboximetilcelulose (CMC), ambas oriundas de modificação química da celulose que, dependendo de seu grau de substituição, confere solubilidade em meio aquoso ao derivado.

De um modo geral, diferenças foram observadas quanto ao modo de ação das enzimas sobre esses substratos. Quando utilizado o substrato mais solúvel (HEC), os índices de atividade específica, ou seja aquelas condições analíticas padronizadas por GHOSE (1987), foram numericamente superiores aos do CMC, sugerindo que as celulases apresentam uma maior acessibilidade e/ou seletividade estereoquímica sobre esse substrato (FRANZ & BLASCHEK, 1990). No entanto, um estudo comparativo entre os dados obtidos revela que as tendências observadas foram relativamente equivalentes em ambos os casos, ou seja, pouca atividade contra ambos foi observada naquelas preparações enzimáticas destituídas de atividade endoglucanásica, quando estas foram ensaiadas nas mesmas condições analíticas (EVALAINEN, 1993).

As preparações enzimáticas **A** (CBH I-) e **B** (CBH II-), em que todas as endoglucanases de *T. reesei* encontravam-se presentes, demonstraram uma atividade específica sobre CMC duas vezes maior do que aquela observada sobre HEC (Figura 30). Porém, em ambos os casos, a enzima **A** apresentou pelo menos o dobro da atividade detectada na enzima **B**. Por outro lado, a supressão dupla de ambas as celobiohidrolases acarretou uma perda irreversível da atividade contra HEC, fato

observado tanto na enzima **F** quanto na enzima **H**.

Em quase todos os casos, as atividades das **PCTrR** sobre HEC e CMC foram inferiores àquelas detectadas em Celluclast 1.5L[®]. Os maiores valores absolutos de atividade endoglucanásica foram registrados para a enzima **E** frente aos substratos HEC e CMC. Na literatura especializada encontram-se observações preliminares de que uma dupla supressão de CBHs em *T. reesei* acarreta um aumento considerável na expressão gênica de endoglucanases (KARHUNEN et al., 1993), porém os ensaios comprobatórios são realizados em condições analíticas distintas. Tal reação pode estar associada a uma tentativa do microrganismo em compensar a ausência das CBHs, o que ainda não foi comprovado (NEVALAINEN & PENTILLÄ, 1995). Sendo assim, a supressão do gene que codifica para a CBH I aparentemente parece ser mais crítica (pois representa 60% em preparações comerciais celulásicas). Nestes estudos a enzima **A** também apresentou atividade endoglucanásica superior àquela detectada nas outras enzimas, incluindo Celluclast 1.5L[®].

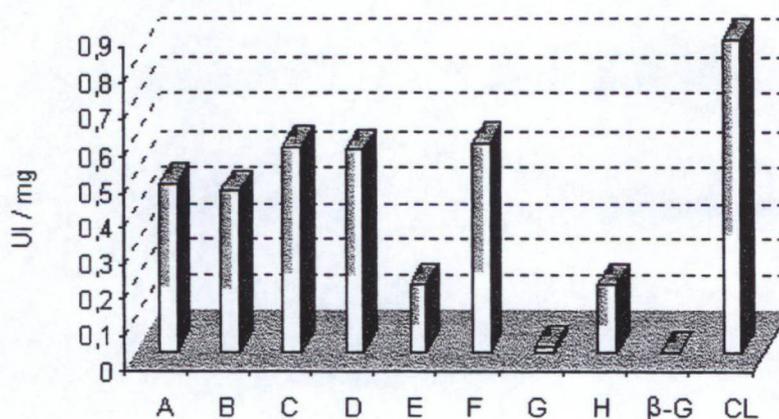
Comparadas as performances das preparações **A**, **E** e **G**, a ausência de CBH I causou um aumento relativo das atividades sobre CMC e HEC. Por outro lado, a supressão de EG I (enzimas **C** e **F**) acarretou uma redução significativa nos valores de hidrólise para CMC, sendo que o efeito causado pela sua remoção (enzimas **C**, **F** e **H**) foi superior ao observado quando a EG II estava ausente (enzimas **D**, **F** e **H**). Com relação à enzima **G**, os valores obtidos sobre CMC foram mais significativos do que aqueles obtidos sobre HEC, sendo que para este último, a comparação com Celluclast 1.5L[®] indicou uma redução na faixa de 35%. Aparentemente, a ação endoglucanásica da enzima **G** foi preferencial ao substrato mais solúvel, sugerindo que a endoglucanase EG I apresenta uma maior acessibilidade e/ou seletividade estereoquímica sobre este substrato (FRANZ & BLASCHEK, 1990). Esta afirmativa pode ter maior sustentação quando se observa a enzima **D**, cuja monossupressão em EG II reduz em 50% a sua atividade sobre HEC, em comparação à CMC.

A análise dos resultados de atividade sobre PF, em comparação com a

Celluclast 1.5L[®], demonstrou que as preparações destituídas das enzimas CBH I e CBH II (A e B) sofreram um decréscimo de atividade em torno 53%, enquanto que para a enzima E, a redução nos níveis de atividade atingiu em cerca de 99% (Figura 31). Por outro lado, a equivalência observada em relação à supressão isolada de CBH I (A) e CBH II (B) foi surpreendente pois atribui-se à CBH I uma importância maior do que aquela associada à CBH II na hidrólise de substratos como o PF (NEVALAINEN & PENTILLÄ,1995). Esta observação foi a primeira a sugerir que as celobiohidrolases destas preparações poderiam estar presentes na forma de seus domínios catalíticos livres (DC), uma decorrência direta dos níveis de atividade proteolítica detectados pelo método da azocaseína (vide tabela 18).

Ambas supressões isoladas de EGs (enzimas C e D), assim como a completa ausência de ambas (enzima F), resultou em valores semelhantes para atividade PFásica. A modo análogo ao parágrafo anterior, conclui-se que presença de atividade celobiohidrolásica nas preparações, ainda que na ausência das EGs I e II, garantem o sinergismo necessário para a hidrólise do papel de filtro. Estes dados, somados ao fato de que a enzima E (supressão dupla em CBH I e II) apresentou a menor atividade contra PF, corroboram as indicações da literatura de que as celobiohidrolases representam as principais enzimas para a sacarificação deste tipo de material celulósico (REINIKAINEN et al., 1995).

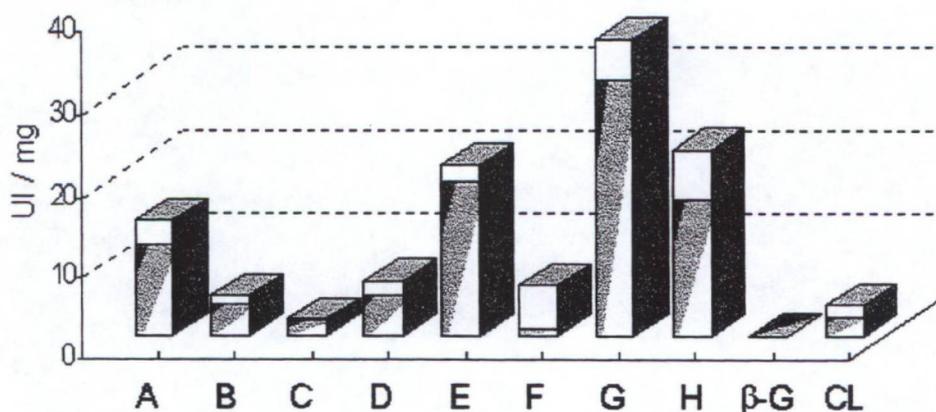
FIGURA 31 - ATIVIDADE DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS SOBRE PAPEL FILTRO (GHOSE,1987)



O estudo da atividade específica das **PCTrR** sobre xilanas comerciais pode ser visto na Figura 32. Em geral, foi detectada uma diferença considerável na habilidade das enzimas em hidrolisar xilanas de diferentes origens, como XEA e XMV, provavelmente devido à diferenças químicas e/ou estruturais existentes entre essas hemiceluloses. A xilana de videeiro (XMV) rende quase que exclusivamente xilose como produto de sua hidrólise ácida, enquanto que a xilana de endosperma de aveia (XEA) contém quantidades apreciáveis de outros monossacarídeos como glucose e arabinose. No entanto, a XEA apresenta maior solubilidade em água e/ou soluções ácidas diluídas, o que pode justificar uma maior acessibilidade apesar de sua grande heterogeneidade (ROBBERS et al., 1997).

A atividade xilanásica do complexo enzimático respondeu de maneira muito significativa à manipulação genética, principalmente quando da remoção do gene que codifica para CBH I. De acordo com a Tabela 17, a atividade da enzima **A** sobre XEA foi de 11,31 UI/mg, enquanto que a **B** apresentou uma atividade de apenas 3,82 UI/mg. Por outro lado, a enzima **E** apresentou uma atividade sobre XEA de 19,15 UI/mg, o que representa um aumento de atividade xilanásica da ordem de cinco a seis vezes em comparação com Celluclast 1.5L[®].

FIGURA 32 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE AS ATIVIDADES XILANÁSICAS DAS **PCTrR** E DE CELLUCLAST 1.5L[®]. XEA, REPRESENTADO POR CINZA CLARO E XMV, POR CINZA ESCURO



Considerando-se que endoglucanases como a EG I de *T. reesei* apresentam uma alta atividade β -(1-4)-xilanásica, estes dados confirmam o fato de que a supressão genômica de ambas as celobiohidrolases acarretou um aumento na expressão de endoglucanases, conforme demonstrado nos estudos de SUOMINEN et al. (1993).

Em continuação às observações descritas acima, ambas as PCTrR deficientes em EG I (enzimas C e F) apresentaram os menores índices de atividades sobre XEA, sendo que as enzimas B (CBH II-) e D (EG II-) recaíram sob um nível de atividade intermediário. Por outro lado, a maior atividade sobre XEA foi detectada na enzima G, que corresponde a uma supressão tripla em EG II, CBH I e CBH II. Portanto, este dado reitera o fato de que a EG I apresenta alta atividade xilanolítica. Por outro lado, a XMV não demonstrou ser um substrato adequado para EG I.

Apesar de mais ativas sobre XEA, as preparações A e B (supressões isoladas de CBH I e CBH II) apresentaram um decréscimo equivalente de atividade em função da mudança do substrato xilanásico. No entanto, este dado não foi confirmado pela atividade xilanásica da enzima H (supressão tripla em EG I, EG II e CBH II), que apresentou alto poder hidrolítico sobre xilanas nas condições experimentais utilizadas nestes ensaios.

É interessante observar que a enzima F (EG I e II-) foi a única a apresentar atividade contra XMV maior do que aquela apresentada sobre XEA, pois esta enzima contém atividade majoritariamente celobiohidrolásica e a eventual ocorrência de maiores índices de EG III nesta preparação não teriam causado maiores influências porque essa enzima não atua sobre substratos desta natureza (Matti Siika-Aho, comunicação pessoal).

Existe uma tendência a se acreditar que a enzima EG I possui uma afinidade maior ao substrato de aveia do que ao de vidoeiro, porém estudos mais específicos para confirmar precisariam ser realizados.

A determinação da atividade β -glucosidásica foi medida baseando-se no princípio da proporcionalidade estequiométrica da reação enzimática contra PNFG (*p*-

nitrofenilglucosídeo), com a subsequente liberação de PNF (*p*-nitrofenol) no meio de reação. Todas as enzimas apresentaram atividade sobre PNFG consideravelmente superior àquela observada para a Celluclast 1.5L[®] (Tabela 18), fato este provavelmente relacionado a um efeito complementar da manipulação genética sobre o complexo celulásico secretado por *T. reesei*. No entanto, a comparação direta com Celluclast 1.5L[®] deve ser feita com cautela porque os estudos genéticos não tiveram origem na cepa industrial correspondente. Infelizmente, a falta de uma amostra do complexo secretado pela cepa de origem não nos permitiu ensaiar um estudo comparativo mais realístico.

TABELA 18 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS SOBRE SUBSTRATOS CROMOFÓRICOS DEMONSTRADAS PELAS PCTrR E FORMULAÇÕES INDUSTRIAIS

CÓDIGO	PNFG UI/mg	PNFL UI/ mg	PNFLc UI/mg	AZC UT / mg
A	1, 25	1, 22	0, 94	0, 38
B	1, 33	0, 78	0, 61	0, 39
C	0, 41	0, 37	0, 14	0, 08
D	0, 79	0, 75	0, 74	0, 22
E	0, 79	1, 24	0, 95	0, 18
F	0, 70	0, 84	0, 37	0, 21
G	0, 83	0, 92	0, 77	0, 37
H	0, 85	0, 78	0, 38	0, 20
β-G	ild	ild	ild	0, 02
CP	ild	1, 39	0, 79	ild

ild – não detectado

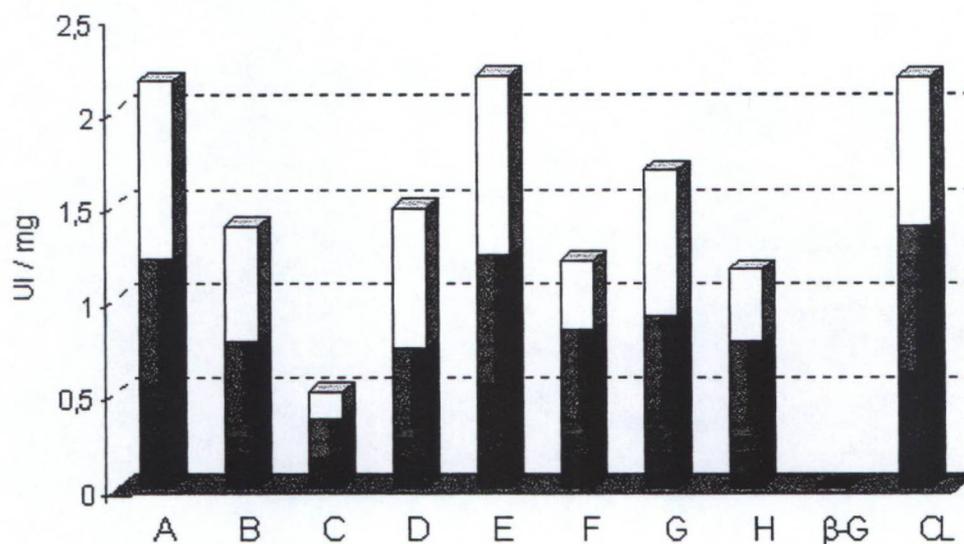
PNFL – ensaio sem a presença de D-glucono-1,5-β-lactona

PNFLc – ensaio na presença de D-glucono-1,5-β-lactona e celobiose

A atividade exoglucanásica (CBH) de cada PCTrR foi também medida comparando a atividade sobre PNFL na ausência e na presença de inibidores endoglucanásicos (celobiose) e β-glucosidásicos (D-glucono-1,5-β-lactona). Somente as preparações CL, F e H apresentaram diferenças significativas entre essas medidas, da ordem de 0,4 UI/mg. De fato, estas são as enzimas que apresentam a maior concentração de celobiohidrolases, cabendo valores apenas parciais de atividade

àquelas enzimas em que a atividade celobiohidrolásica não foi muito pronunciada (Figura 33).

FIGURA 33 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS ATIVIDADES SOBRE PNFL. A ATIVIDADE NA AUSÊNCIA DE CELOBIOSE ENCONTRA-SE REPRESENTADA EM BRANCO, ENQUANTO QUE A DETERMINADA NA SUA PRESENÇA FOI REGISTRADA EM CINZA ESCURO



Dois substratos microcristalinos também foram utilizados para determinar a atividade exoglucanásica das PCTrR: Avicel® e Sigmacell®.

Diferentemente dos ensaios realizados com substratos de alta acessibilidade às enzimas, a determinação da atividade sobre celulose microcristalina não permitiu com que os resultados fossem expressos em unidades internacionais porque os níveis de sacarificação obtidos foram muito inferiores ao requerido para os cálculos. A unidade internacional foi então prejudicada pela incapacidade de algumas enzimas em liberar quantidades apreciáveis de glicose e celobiose a partir de estruturas de maior organização estrutural. Nestes casos, o ensaio foi realizado a uma carga protéica constante e igual a 200 mg/g de substrato e a atividade hidrolítica foi descrita como o rendimento de hidrólise, expresso em equivalentes de glicose e obtido após 2 horas de incubação a 45°C e 150 rpm.

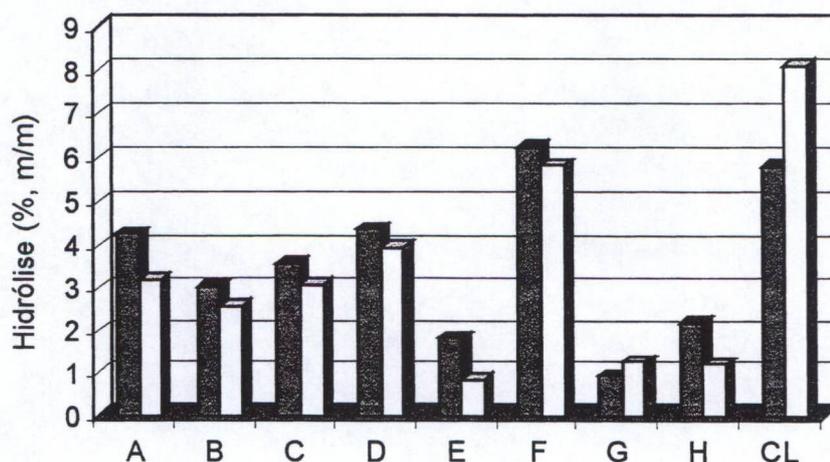
Os resultados indicaram que cada enzima apresentou um índice de

sacarificação característico, sugerindo diferenças em seus modos de ação sobre substratos de alta organização molecular.

De um modo geral, a supressão isolada de apenas um dos genes que codificam para as principais celulases de *T. reesei* acarretou um decréscimo considerável na atividade do complexo sobre Avicel[®] e Sigmacell[®] (vide Celluclast 1.5L[®]), mas a extensão da hidrólise em todos os casos não diferiu substancialmente quer entre os substratos, quer entre as enzimas ensaiadas. Das quatro monossupressões (enzimas **A**, **B**, **C** e **D**), a enzima **D** foi a que demonstrou a melhor performance, muito embora as diferenças possam ser interpretadas como inseridas no erro do procedimento experimental (Figura 34).

A enzima **F** foi a que apresentou maior atividade sobre celulose microcristalina, uma decorrência direta de seu alto teor em celobiohidrolases. Por outro lado, as preparações enzimáticas **G** e **H**, das quais foram suprimidos pelo menos três genes que codificam para as principais enzimas do complexo, apresentaram baixa eficiência hidrolítica contra ambas, Avicel[®] e Sigmacell[®]. Da mesma forma, a enzima **E** foi responsável por índices de sacarificação análogos às enzimas **G** e **H**.

FIGURA 34 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE AS ATIVIDADES DAS PCTrR E DE CELLUCLAST 1.5L[®] SOBRE DOIS TIPOS DE CELULOSE MICROCRISTALINA. AS BARRAS ESCURAS INDICAM A HIDRÓLISE DE AVICEL[®], ENQUANTO QUE AS BARRAS TRANSPARENTES, DE SIGMACELL[®]



O comportamento de ambas as preparações destituídas de CBH I e CBH II foi certamente congruente com a constatação de que substratos microcristalinos requerem este tipo de atividade para que sejam sacarificados a uma extensão mensurável. No entanto, a baixa atividade catalítica da enzima **H** foi relativamente surpreendente porque esta preparação contém CBH I em alto título. Portanto, duas possibilidades poderiam justificar este comportamento anômalo: ou a supressão tripla comprometeu radicalmente o sinergismo necessário para a sacarificação de celulose microcristalina, ou a CBH I não se encontra presente na preparação em sua forma íntegra, ou seja, com a capacidade de adsorver ao substrato e com isso exercer sua ação hidrolítica característica, via terminais redutores da cadeia. Na verdade, essa última hipótese estaria de acordo com a atividade proteolítica detectada em todas as preparações enzimáticas, conforme descrito abaixo.

Complementando este estudo, foram realizadas as medidas da atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína (AZC), sendo que os valores experimentais foram também representados em UT/mg (Tabela 18, Figura 35). Todas as preparações enzimáticas apresentaram uma atividade proteolítica residual, que variou de 0,38 UT/mg na enzima **B** a 0,02 UI/mg em Celluclast 1.5L[®]. Como o peptídeo de interligação entre os domínio catalítico (DC) e o domínio de ligação ao substrato (DLC) é suscetível à proteólise (TEERI et al., 1999), tais resultados sugerem que praticamente todas as PCTrR devem apresentar um teor variável de DC livre. Sendo este o caso, deve-se também reconhecer que quantidades proporcionais de DLC livre deverão estar presentes nestas preparações. Estudos de KUBICEK-PRANZ (1991) indicaram que uma proteólise parcial é um fenômeno comum nas celulasas de *Trichoderma*, não significando que este efeito altere a atividade celulásica do complexo.

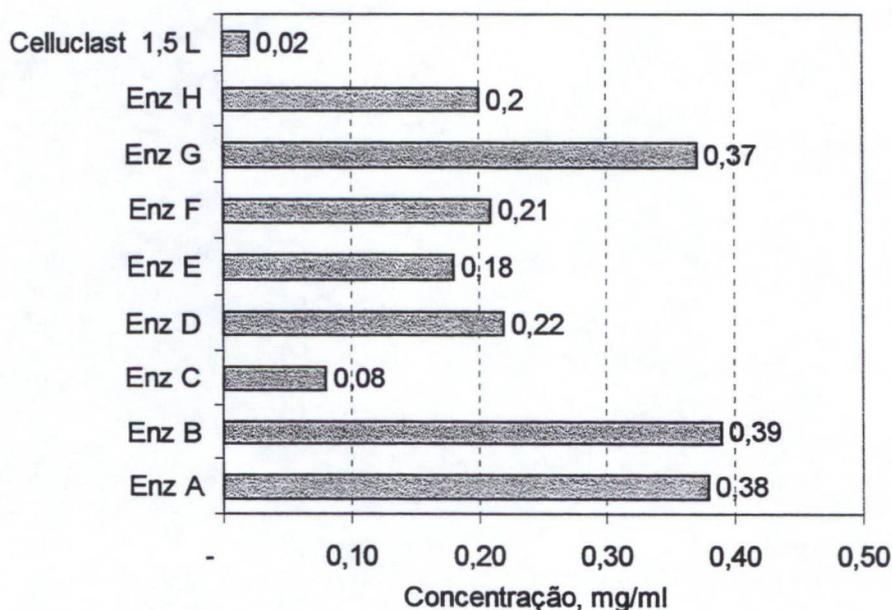
Em sua revisão bibliográfica Kubicek (1992) apresenta evidências muito fortes de que a atividade proteolítica de celulasas ocorre naturalmente. As proteases que estão envolvidas na degradação de celulasas são induzidas por um pH extracelular

inferior a 4 e uma baixa carga protéica ($\approx 0,1$ mg / ml). Diferentes celulases são atacadas de maneiras diferentes, por exemplo, enquanto o ataque a CBH I inicia pela remoção exclusivamente do domínio-AB , a CBH II é atacada simultaneamente nos seus dois terminais , dificultando a ação destas enzimas sobre celulose cristalina..

A proteólise pode causar efeitos adversos na qualidade das preparações celulásicas em escala piloto ou comercial.

Conforme declarado anteriormente, as condições de fermentação das PCTrR para produção de enzimas não foram otimizadas afim de minimizar a secreção de atividade proteolítica no meio. Desta forma, foi identificada em caráter prioritário a necessidade de estudos mais avançados para investigar a ocorrência de DC livres nas PCTrR, pois tal constatação poderia ter uma influência considerável sobre a interpretação de suas atividades específicas e eventuais aplicações no biopolimento e/ou modificação superficial de fibras celulósicas comerciais. Tal estratégia teve como base a análise das PCTrR por cromatografia de bioafinidade, conforme descrito na próxima seção deste trabalho.

FIGURA 35 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS PRESENTES NAS PCTrR E NA PREPARAÇÃO INDUSTRIAL UTILIZADA COMO REFERÊNCIA



5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PREPARAÇÕES CELULÁSICAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (FPLC)

Nesta seção encontram-se apresentados os dados referentes à padronização e validação da metodologia de FPLC. Esta análise cromatográfica foi utilizada como instrumento para fracionar os componentes protéicos constitutivos das PCTrR, sendo que a preparação comercial Celluclast 1.5L[®] foi utilizada com a finalidade de calibrar o sistema. Este procedimento, realizado *a posteriori* para analisar as frações protéicas constituintes das PCTrR, foi acompanhado por vários ensaios de atividade específica, conforme descrito abaixo.

5.2.1 Padronização do Sistema Cromatográfico Utilizando Celluclast 1.5L[®]

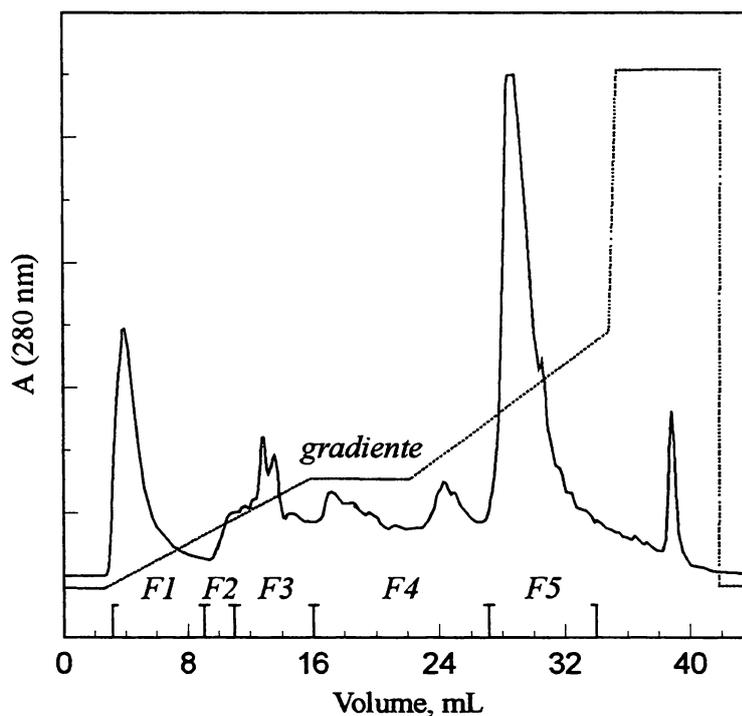
A padronização da metodologia de FPLC foi inicialmente validada com Celluclast 1.5L[®], quando a estratégia de fracionamento das alíquotas foi padronizada para o sistema cromatográfico. A cada alíquota fracionada foram dosadas a carga protéica, a atividade sobre HEC e a atividade monoclonal para CBH II. O sistema cromatográfico foi então otimizado afim de se obter a menor superposição possível entre os diversos grupos de celulasas, sendo que a validação da metodologia foi realizada através da repetição dos ensaios e da determinação de seus índices de reprodutibilidade (vide ítem 4.2.6). Atividades específicas complementares foram também realizadas em paralelo para melhor caracterizar o perfil de eluição do sistema cromatográfico. Finalmente, uma vez padronizada e validada a metodologia, as PCTrR foram cromatografadas.

Em um detalhamento maior do procedimento padrão estabelecido a partir da CL, as amostras foram inicialmente dessalinizadas em uma coluna ECONOPAC 10 G[®] e diluídas para uma concentração protéica final de 3-5 mg/ml de solução tampão. Cabe ressaltar que esta coluna é composta por um gel de poliacrilamida que proporciona elevados rendimentos no processo de dessalinização sem que haja

interferência na atividade biológica das enzimas, pois esta exclui somente moléculas com massa molecular menor que 6 kD e acredita-se que as proteínas constituintes das PCTrR possuem massa molecular mínima de 23 kD. No entanto, estudos recentes indicaram que a EG V ($pI = 2,8-3$) poderia ser parcialmente retida por esta coluna, mesmo possuindo uma MM na faixa de 23 kDa (Matti Siika-aho, comunicação pessoal).

Como resultado desta validação para CL, tivemos a elaboração de uma seqüência de eluição com a coleta de alíquotas de 2,0 ml a cada minuto, gerando um total de 44 alíquotas ($V_t = 88\text{mL}$) por ensaio que por sua vez continham separadamente os componentes protéicos. A distribuição das frações com relação aos grupos de enzimas estabelecidos nesse estudo estão representados na Figura 36.

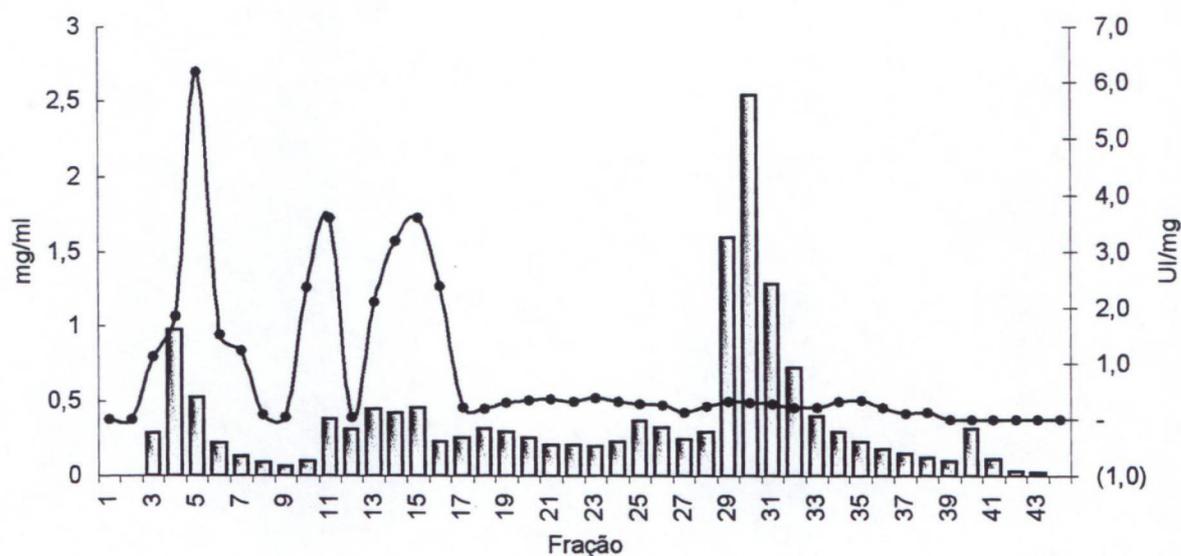
FIGURA 36 – CROMATOGRAMA DA PREPARAÇÃO COMERCIAL CELLUCLAST 1,5L[®] POR FPLC, COM A IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES FORMADAS A PARTIR DAS ALÍQUOTAS ELUÍDAS DA COLUNA



Inicialmente, foram dosadas em cada alíquota eluída o teor de proteínas pelo método de Lowry (vide ítem 4.2.5), a atividade sobre HEC (vide 4.2.6.3) e a reatividade contra anticorpos monoclonais desenvolvidos para CBH II (vide ítem 4.4.2). Alternativamente, a atividade das alíquotas que constituíram as frações endoglucanásicas foi determinada contra o substrato cromogênico 4-metilumbeliferil-celotriosídeo (MUmbG₃), visando a detecção seletiva de EG II na presença de quaisquer outros componentes do sistema celulásico de *T. reesei*.

Na Figura 37 encontram-se relacionadas a atividade sobre HEC e o teor de proteínas determinado em cada alíquota de 2 ml que constitui o perfil de eluição da enzima. O desvio padrão relativo a estas análises sugere que os valores entre 0,1 e 0,2 UI/ml não devem ser considerados absolutos pois estão fora do limite de confiabilidade do método.

FIGURA 37 - ANÁLISE DAS FRAÇÕES DE FPLC PARA A CELLUCLAST 1.5L®: COMPARAÇÃO ENTRE O TEOR DE PROTEÍNAS (BARRAS) E A ATIVIDADE SOBRE HEC (LINHA)



Foi observado que a concentração de proteínas varia ao longo da eluição, enquanto que a atividade específica sobre HEC (endoglucanases) limitou-se às primeiras frações coletadas. Portanto, a fração F1 foi a que apresentou maior atividade

sobre HEC, enquanto que as frações F2, F3 e F4 apresentaram atividade endoglucanásica em níveis bem inferiores. Finalmente, nenhuma atividade sobre HEC foi detectada na fração F5, sugerindo que esta corresponda à exoglucanase de menor pI em *T. reesei*, a CBH I.

Outra importante observação feita sobre o perfil de eluição da CL foi a de que as alíquotas que representam a enzima CBH I (fração F5) corresponderam a mais de 57% do teor protéico total da amostra, o que está perfeitamente de acordo com o trabalho publicado por TENKANEN et al. (1999). No entanto, é importante observar que este resultado diz respeito exclusivamente ao teor protéico, não havendo qualquer elemento para garantir que a banda de eluição da CBH I não pudesse estar parcialmente contaminada com outro componente protéico existente no complexo celulásico de *T. reesei*.

Na Tabela 19 estão listados os teores protéicos das cinco frações compostas a partir das alíquotas de 3 a 34, juntamente com suas respectivas atividades endoglucanásicas. As frações F1 e F3 foram aquelas que apresentaram os maiores quociente entre a atividades HEC e o teor proteico, caracterizando volumes de eluição majoritariamente endoglucanásicos.

TABELA 19 – PROTEÍNAS E ATIVIDADE HEC PARA CELLUCLAST 1.5L[®] NAS FRAÇÕES COLETADAS APÓS O FPLC

Alíquotas	Fração	Proteínas (mg/ml)	Atividade sobre HEC (UI/mg)
3-9	1	2,304	12,09
10-11	2	0,476	5,96
12-16	3	1,868	11,34
17-27	4	2,88	3,14
28-34	5	7,14	2,71

A presença de EG II nas frações F1, F2 e F3 foi determinada mediante ensaio contra o substrato cromogênico 4-metilumbeliferil-celotriosídeo (MUmbG₃). Segundo CLAEYSSSENS et al. (1990), o MUmbG₃ pode ser considerado específico

para EG II porque esta enzima é a única capaz de clivar sua ligação heterosídica, liberando a aglicona para análise espectrofotométrica. No entanto, β -glucosidases como as presentes no complexo enzimático de *T. reesei* também são capazes de exercer esta ação catalítica, razão pela qual o ensaio foi conduzido na presença de glucono-1,5-lactona, um forte inibidor de atividade β -glucosidásica. O ensaio, com CL, revelou uma atividade média de 1,35 nkat/ml na fração F1, 0,71 nkat/ml na fração F2 e valores inferiores a 0,09 nkat/ml nas demais alíquotas. Sendo assim, a EG II está restrita às duas primeiras frações do FPLC, sendo que a maior parte desta enzima encontra-se na fração F1.

Embora não tenha sido realizado nenhum ensaio específico, a enzima EG III deve ter apresentado uma baixa afinidade pela coluna Resource Q[®] e, por conseguinte, um baixo volume de retenção. Tal comportamento cromatográfico é justificável pela própria característica estrutural da enzima, que possui uma pequena massa molecular (25 kDa), um alto ponto isoelétrico (pI de 7,4) e pouca afinidade pela fase estacionária por ser destituída do DLC (Tabela 7). Por outro lado, estando ambas EG II e EG III restritas às frações F1 e F2 do perfil de eluição, a atividade endoglucanásica das frações F3 e F4 foi atribuída às várias formas isomórficas da enzima EG I. Esta hipótese é também justificável mediante uma análise das propriedades da enzima que, com massa molecular de 55 kDa e pI de 4,6 (Tabela 7), teria a tendência de eluir na região intermediária do gradiente de eluição. Outra observação importante é o fato de 40% do total da atividade endoglucanásica da enzima controle CL estar concentrada nestas frações.

Para confirmação dos dados referentes à separação cromatográfica dos componentes protéicos, foram também realizados ensaios de atividade monoclonal para a detecção de CBH II em todas as frações coletadas do FPLC. Estes ensaios indicaram a presença de CBH II nas alíquotas 8, 10, 12, 14, 16, 20 e 24, sendo que as alíquotas com maior intensidade foram as de 10 a 14. Na Figura 38 encontram-se os resultados da atividade monoclonal para cada alíquota de CL.

Como pode ser visto nas atribuições enzimáticas de cada fração isolada, a CBH II pode ser encontrada em pelo menos duas frações das seis isoladas e isto caracteriza a falta de resolução que o sistema apresenta para esta enzima em específico. Tal comportamento cromatográfico está associado: (a) à presença de várias formas isomórficas (ou isoenzimas) da CBH II dentre as celulasas secretadas por *T. reesei* e (b) à proximidade que a CBH II e a EG I apresentam em seus pontos isoeletricos, massa molecular e/ou raio hidrodinâmico (vide Tabela 7). De fato, não há qualquer registro na literatura de protocolo único de análise capaz de segregar a CBH II do restante do complexo enzimático de maneira inequívoca, o mesmo se aplicando para as enzimas EG II e EG III, encontradas principalmente na fração F1 do protocolo de análise (alíquotas de 3 a 9).

FIGURA 38 – REPRESENTAÇÃO DA QUANTIDADE DE CBH II EXISTENTE EM CADA ALÍQUOTA ELUÍDA POR FPLC A PARTIR DE CELLULAST 1.5L® CADA QUADRADO REPRESENTA UM INCREMENTO RELATIVO DE ANTICORPO SENSIBILIZADO



A análise das frações mostra que no volume final de eluição da corrida cromatográfica, as alíquotas de 28 a 34 (fração F5) não apresentaram qualquer indício de atividade endoglucanásica (HEC) ou presença de CBH II, embora uma quantidade considerável de proteínas tenha sido detectada. Tal observação, juntamente com a avaliação dos pI das enzimas, levou-nos a definir esta região como os volumes de

retenção que caracterizam a eluição da CBH I e, eventualmente, de seu respectivo domínio catalítico. Os ensaios de atividade específica para confirmar esta região como de ação específica de CBH I serão discutidos na próxima seção, juntamente com as **PCTrR**.

Segundo os resultados obtidos nesta etapa de validação do método, foi definido que: (a) a fração F1 é a região de maior probabilidade de se encontrar EG II e EG III; (b) a fração F2 representa a região de maior probabilidade de se encontrar EG II e CBH II; (c) a fração F3 concentra as enzimas EG I e CBH II; (d) a fração F4 é majoritariamente composta pela enzima EG I; e (e) a fração F5 encerra o principal componente do sistema celulásico, ou seja, a CBH I.

A etapa final da padronização do sistema cromatográfico foi a dosagem na F5 do teor de domínio catalítico livre de CBH I (vide ítem 4.4.3). Estas análises pretendiam confirmar se a CBH I estava completa ou se, por ação proteolítica do meio, havia sido parcialmente convertida em DC livre. Esta validação foi feita utilizando as alíquotas de 31 a 34 e, como na fase anterior, as primeiras medidas a serem efetuadas foram as determinações de teor protéico (vide ítem 4.2.5).

5.2.2 FPLC das **PCTrR** e Atividades Específicas Presentes nas Frações Coletadas

Nesta seção encontra-se avaliada a cromatografia de troca iônica (FPLC) das **PCTrR** e as atividades específicas de cada fração obtida, depois do procedimento de validação para a Celluclast 1.5L[®]. O procedimento de validação da metodologia foi descrito em 5.3.1 e suas condições cromatográficas, no ítem 4.4. Os trabalhos foram desenvolvidos em quatro etapas que envolveram: a obtenção inicial dos cromatogramas das **PCTrR**, usando a metodologia validada; a separação das frações onde a probabilidade era maior de se encontrar os distintos grupamentos celulásicos; a confirmação do perfil catalítico mediante a determinação das atividades específicas de cada fração; e a análise da fração F5 para confirmação da presença de DC livre da

CBH I nas preparações.

O processo inicial de preparação das amostras (dessalinização) foi acompanhado de medições condutivimétricas, feitas com as diluições das PCTrR antes destas serem cromatografadas. A média entre as leituras obtidas para cada diluição encontra-se expressa na Tabela 20.

TABELA 20 – VALORES DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA NAS DILUIÇÕES DAS ENZIMAS PARA O FPLC

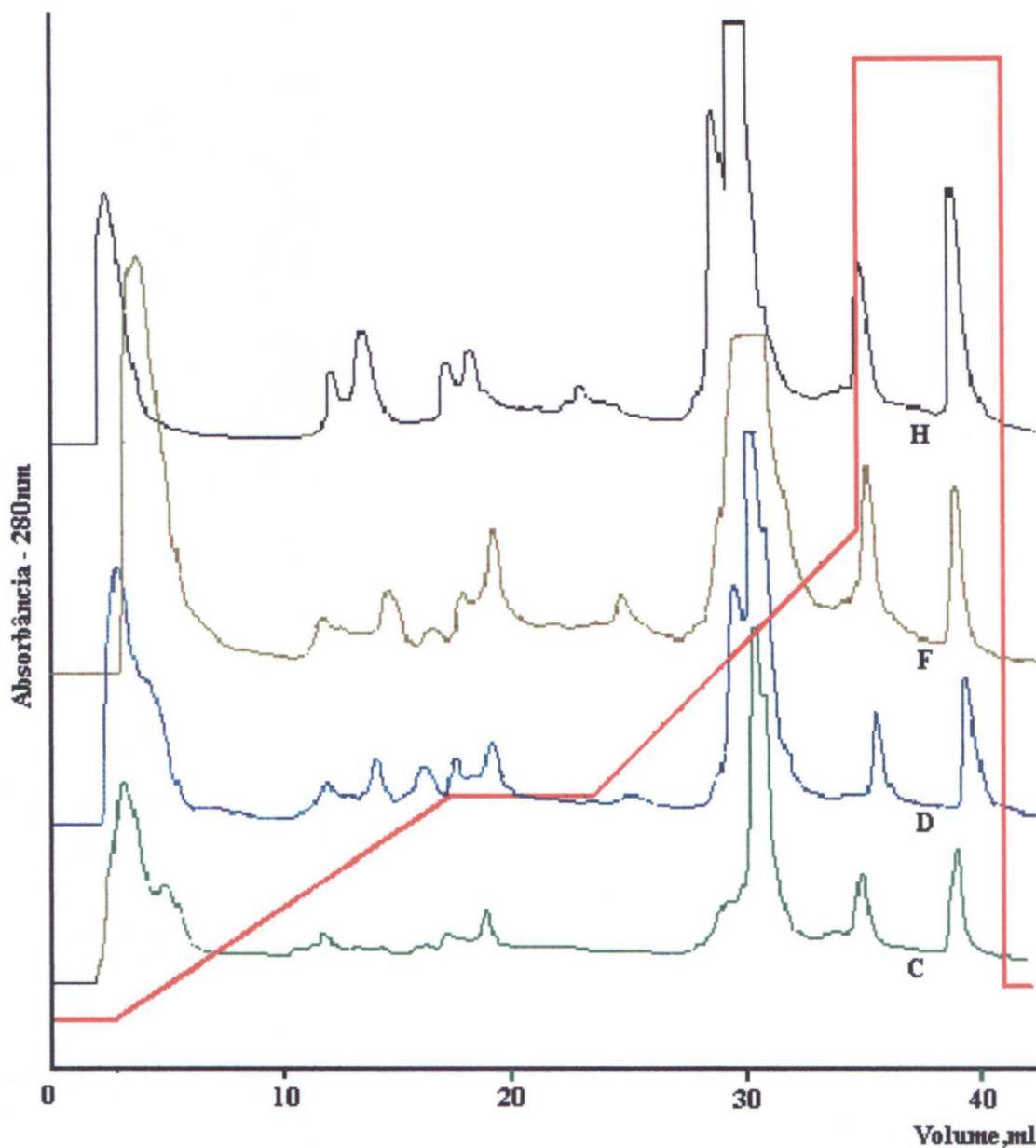
Enzima	Medida condutivimétrica (K μ S)	Enzima	Medida condutivimétrica (K μ S)
A	19,8	E	21,5
B	19,6	F	21,3
C	21,8	G	22,7
D	22,6	H	22,5

O resultado das leituras nas diluições das amostras ficou entre 19,6 e 22,2 K μ S, com um desvio padrão relativo de 5,37% em torno da média. Tais amostras foram consideradas apropriadas para a análise cromatográfica, pois os limites de aceitação do método foram de 17 e 24 K μ S para uma fase móvel com condutividade elétrica inicial de 22,0 K μ S.

As Figuras 39 e 40 apresentam os cromatogramas obtidos por FPLC para as PCTrR. Iniciando pela visualização do perfil protéico, é possível observar que existem diferenças significativas na composição das respectivas preparações. Estas variações representam o efeito da manipulação genética sobre o complexo celulásico de *T. reesei*, muito embora não tenha sido possível utilizar o controle mais adequado para estes ensaios.

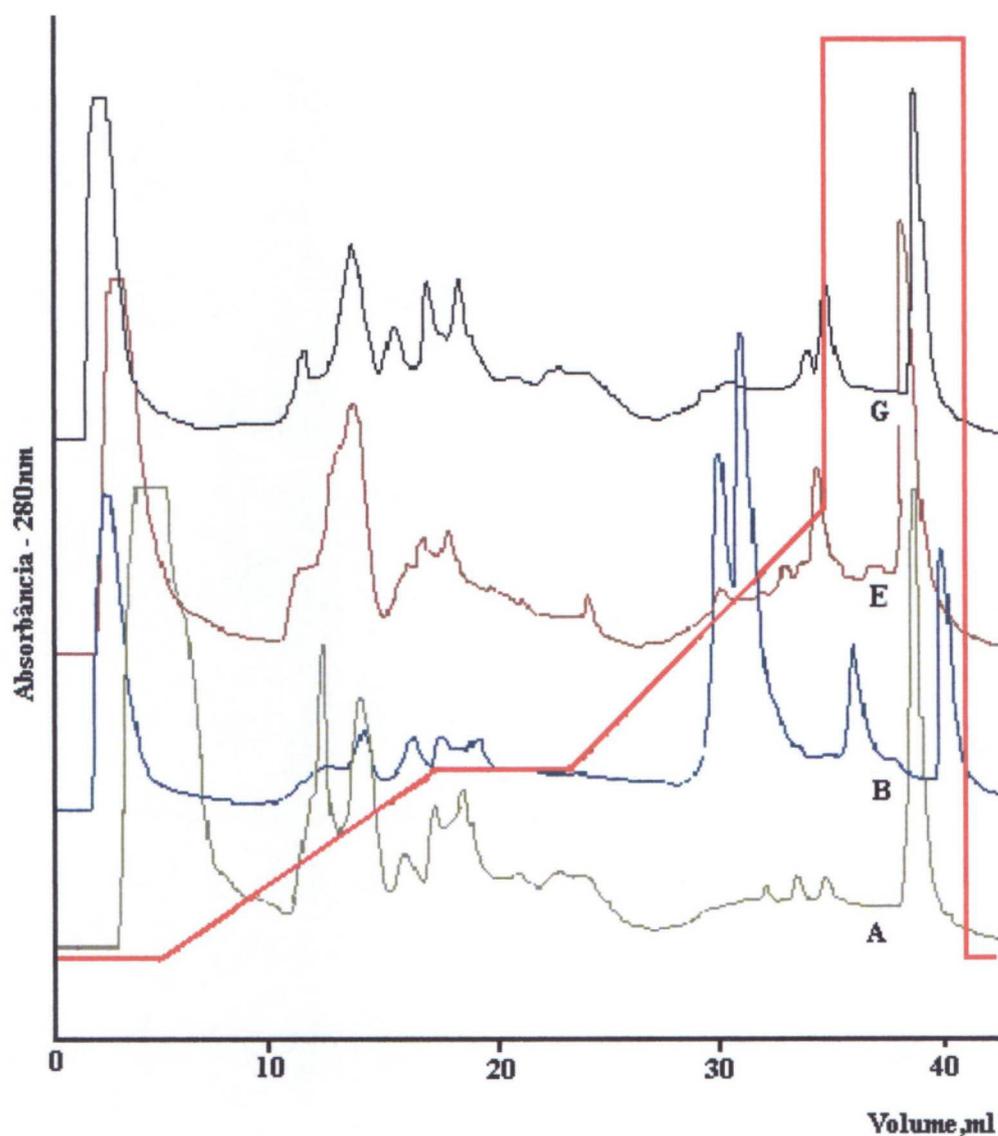
Dentre tantas observações experimentais que se podem fazer sobre os perfis obtidos, percebe-se que a enzima A apresenta claramente a ausência de CBH I (Figura 40), enquanto que a distribuição protéica nas outras frações eluídas apresentou uma correlação aceitável com a expectativa gerada pela estratégia de manipulação genética (Figuras 39 e 40).

FIGURA 39 - CROMATOGRAMAS DAS PCTRR QUE SOFRERAM SUPRESSÃO DE ENDOGLUCANASES



Obviamente, dados exclusivamente relacionados com proteínas precisam ser analisados com cuidado, pois os cromatogramas obtidos certamente revelam a presença de outras proteínas e/ou enzimas que não foram investigadas nesse estudo.

FIGURA 40 - CROMATOGRAMA DAS PCTRR QUE SOFRERAM SUPRESSÃO DE CELOBIOHIDROLASES



Para que as atividades em todas as frações pudessem ser expressas em termos de atividade específica (UI/mg ou nkat/mg), foram dosadas as suas respectivas concentrações em proteínas segundo o método de Lowry. A comparação entre as várias frações protéicas existentes nas **PCTrR** pode ser vista na Figura 41, onde os dados de proteínas encontram-se normalizados, enquanto que as respectivas atividades específicas sobre HEC encontram-se discriminadas na Tabela 21 e na Figura 42.

É interessante observar que a remoção de CBH I, sendo a principal enzima presente no complexo enzimático produzido pelo fungo, naturalmente acarreta um

aumento percentual na contribuição associada aos outros componentes enzimáticos como, por exemplo, as endoglucanases EG I, II e III. Enquanto que a fração F1 da enzima A respondeu por 56,5% de seu teor protéico, esta mesma fração foi responsável por apenas 19,9% do teor protéico da enzima B, justificando a expectativa de que a remoção de CBH I acarreta uma alteração significativa na composição protéica das preparações (Figura 41). No entanto, mesmo estando bem caracterizada a ausência de CBH I na enzima A (SUOMINEN et al., 1993), ainda houve detecção de alguma proteína residual na fração F5, evidenciando a ocorrência de outras proteínas de comportamento cromatográfico equivalente à CBH I nesta fração. Uma especulação sobre a natureza destas proteínas pode ser endereçada à EG V, uma endoglucanase minoritária que apresenta pI inferior à CBH I (Tabela 7), mesmo porque a atividade sobre HEC não foi monitorada nos volumes isolados a partir da alíquota 34. Obviamente, outros fragmentos protéicos podem ter igualmente contribuído para a composição destas frações, como domínios de ligação ao substrato e peptídeos de natureza desconhecida.

FIGURA 41 - RELAÇÃO PERCENTUAL DO TEOR DE PROTEÍNAS EM CADA FRAÇÃO DERIVADA DAS PCTRR E CELLUCLAST 1.5L® (CL) POR FPLC

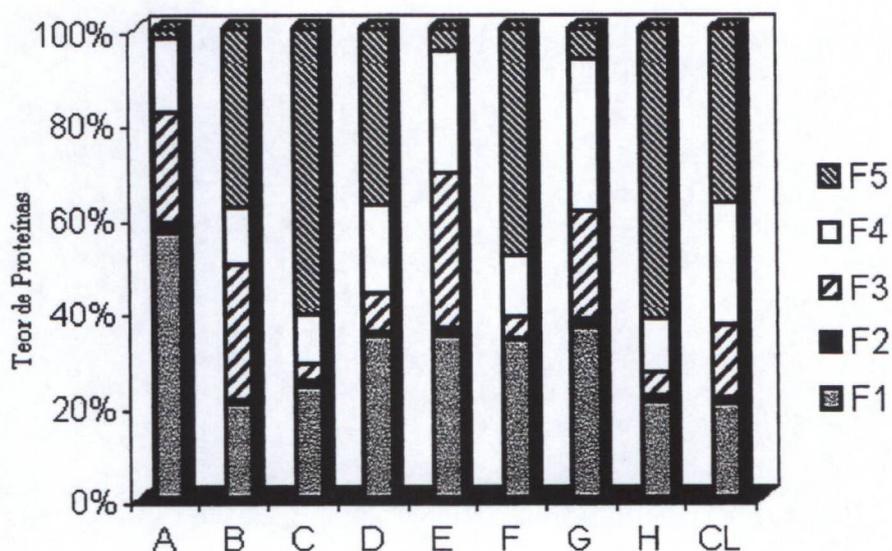
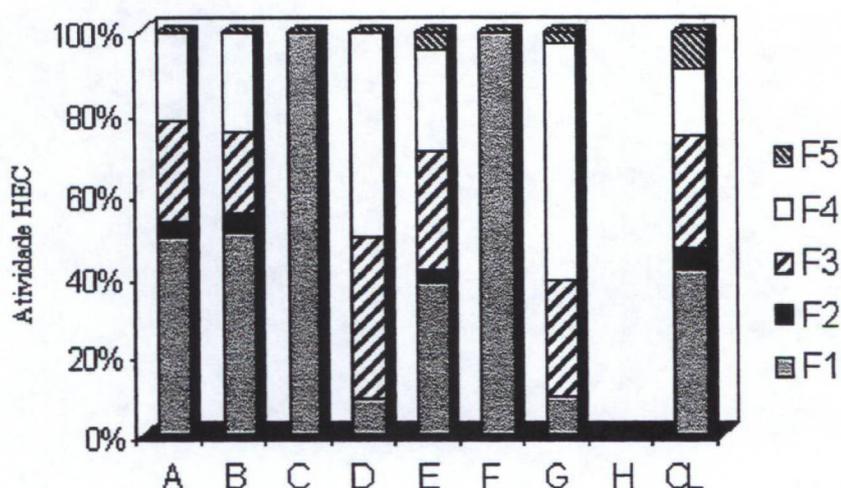


TABELA 21 - ATIVIDADE SOBRE HEC NAS FRAÇÕES COLETADAS APÓS O FPLC.

Fração	Atividade sobre HEC (nkat/ml)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	30,3	29,6	22,0	2,6	39,3	5,5	4,6	0
2	7,5	9,3	0	0	12,8	0	0	0
3	20,8	16,2	0	16,3	41,7	0	19,2	0
4	8,5	9,1	0	9,1	16,6	0	17,3	0
5	0	0	0	0	10	0	0	0

Comparando-se as enzimas A e B nas Tabela 21 e Figura 42, percebe-se que a monossupressão de apenas uma celobiohidrolase, seja CBH I ou CBH II, não interfere consideravelmente sobre a distribuição de atividade endoglucanásica nas frações isoladas por FPLC. Tal observação seria também aplicável à enzima E, não fosse a pequena atividade endoglucanásica detectada na fração correspondente à CBH I (fração F5). Interessantemente, este comportamento anômalo da fração F5 não foi exclusivo da enzima E, pois o controle CL (Celluclast 1.5L[®]) também apresentou atividade residual sobre HEC nesta fração. Portanto, como a atuação da CBH I sobre substratos solúveis é dificilmente detectável, pois se restringe às unidades de anidroglicose existentes a partir do terminal não redutor até a primeira unidade hidroxietílica substituída, a detecção de atividade sobre HEC na fração F5 deve estar relacionada à presença de alguma contaminação ainda não identificada nestas frações.

FIGURA 42 - ATIVIDADE SOBRE HEC DETERMINADA NAS FRAÇÕES DERIVADAS DAS PCTRR E CELLUCLAST 1.5L[®] (CL) POR FPLC (DADOS NORMALIZADOS)

Considerando-se as atribuições feitas sobre a eluição de Celluclast 1.5L[®], foi observado que a da enzima **F** (supressão dupla em EG I e EG II) apresentou atividade contra HEC apenas na fração F1 sugerindo que a EG III encontra-se majoritariamente restrita à esta fração. Por outro lado, a monossupressão de EG I na enzima **C** também aumentou o teor protéico e a atividade contra HEC na fração F1. Finalmente, a ausência de EG II na enzima **D** aumentou consideravelmente as medidas de atividade nas frações F3 e F4, donde conclui-se que estas frações contém a maior parte da EG I presente no sistema celulásico de *T. reesei*.

À despeito das diferenças marcantes em suas constituições protéicas, as duas enzimas em que **EG I** foi suprimida por manipulação genética apresentaram o mesmo perfil catalítico contra HEC. Tratando-se de uma supressão simples (enzima **C**) e de uma supressão dupla (enzima **F**), esta observação tem três decorrências imediatas:

(a) que a enzima EG III, constante na fração F1 do FPLC, é de grande importância nas preparações onde EG I foi eliminada, apesar de ser uma enzima destituída do domínio de ligação à celulose;

(b) ambas, EG II e III, estão definitivamente concentradas na fração FI do processo; e

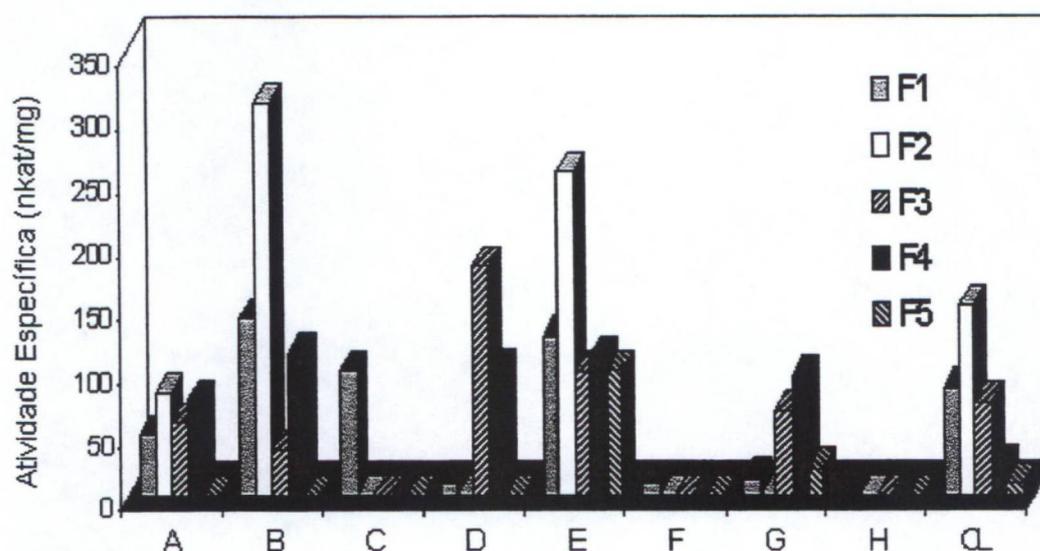
(c) os níveis de EG III ou de outro componente endoglucanásico do sistema aumentaram na enzima onde ambas, EG I e II, foram eliminadas.

Como discutido anteriormente, as observações feitas acima podem também ser deduzidas a partir do perfil de eluição da enzima **H** por FPLC pois, sendo uma supressão tripla em EG I, EG II e CBH II, todo o teor protéico registrado nas frações de F2 a F4 representam constituintes protéicos de natureza não celulásica, podendo inclusive envolver a presença de outras hidrolases como xilanases e mananases. Obviamente, a fração F1 não foi citada nesta análise porque contém a enzima EG III, enquanto que a fração F5, de natureza não endoglucanásica, contém quase que exclusivamente a CBH I.

A enzima **H** apresentou 28% de outras proteínas em sua constituição que não a CBH I, apesar de representar uma preparação que sofreu uma tríplice remoção de EG I, EG II e CBH II (Figura 41). Interessantemente, esta enzima não apresentou qualquer atividade contra **HEC** nas frações eluídas, mesmo naquelas tradicionalmente associadas à atividade endoglucanásica (Figura 42). Portanto, o perfil de eluição da enzima **H** dá o testemunho definitivo de que outras proteínas, enzimas ou não, poderão estar interferindo com o método.

A expressão da atividade endoglucanásica em relação ao teor protéico (ou nkat/mg), para cada uma das frações eluídas consecutivamente da coluna de FPLC, demonstrou que a fração F2 apresentou, particularmente para as enzimas **B** e **E**, a maior atividade específica sobre HEC (Figura 43). Desta forma, conclui-se que apenas a enzima EG II presente na fração F2 apresentou-se em maior índice de pureza, e que todas as outras frações continham outras proteínas e/ou enzimas que não apresentavam atividade sobre HEC. O único resultado contraditório a esta observação foi proporcionado pela enzima **C**, que contém EG II mas que não apresentou qualquer atividade específica como propriedade da fração F2.

FIGURA 43 - ATIVIDADE ESPECÍFICA RECUPERADA POR FRAÇÃO ELUÍDA DO FPLC



Os resultados confirmam, em todos os casos, as expectativas de que os experimentos de manipulação genética com *T. reesei* foram bem sucedidos.

5.2.3 Avaliação da Presença do Domínio Catalítico Livre no Intervalo de Eluição de CBH I

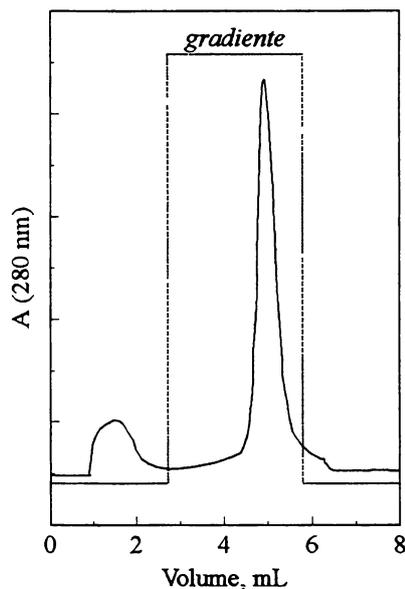
A ocorrência de DC livre na fração F5 do perfil de eluição cromatográfico foi determinada por análise cromatográfica complementar em Phenyl Sepharose[®], cujo princípio de separação baseia-se na interação hidrofóbica das proteínas com a fase polimérica de que a coluna é constituída (fase estacionária). Nesse caso, a detecção de CBH I e seu DC foi realizada através de medidas de teor protéico e de atividade exoglucanásica nas alíquotas coletadas a partir da estratégia de eluição, conforme descrito no item 4.2.6.7.

O comportamento equivalente entre a CBH I e seu domínio catalítico (DC) na coluna Resource Q[®] (FPLC) foi possível devido a equivalência existente entre os seus pontos isoelétricos e a proximidade que caracteriza as suas massas moleculares. No entanto, estes componentes protéicos apresentam volume de retenção diferenciado em Phenyl Sepharose[®] porque o domínio de ligação ao substrato (DLC) aumenta a afinidade da CBH I pela matriz. Portanto, a banda com menor volume de eluição corresponde ao DC da CBH I, enquanto que a segunda banda corresponde à presença de sua forma integral (Figura 44).

A análise do CBH I_{DC} foi realizado somente na F% do perfil cromatográfico obtido por FPLC.

Os resultados obtidos em Phenyl Sepharose[®] por interação hidrofóbica (vide item 4.4.3), indicaram a existência de níveis variáveis de CBH I_{DC} em todas as preparações enzimáticas, que continham CBH I.

FIGURA 44 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO F5 (CBH I) DA ENZIMA CELLUCLAST 1.5L[®] EM PHENYL SEPHAROSE[®]



Uma decorrência direta desta observação foi exatamente a constatação de que, na maioria das enzimas estudadas exceto na CL, a fração que continha o CBH I encontrava-se com altas cargas de DC livre, ou seja, da enzima desprovida de seu domínio de ligação ao substrato (DLC), o que certamente deve influenciar a interpretação dos dados de atividade enzimática obtidos a partir das preparações enzimáticas originais.

Os resultados para esta fração F5 permaneceram na mesma faixa de trabalho validada para os ensaios com a coluna Resource Q[®]. Estas frações de CBH I analisadas em uma nova corrida cromatográfica, porém, utilizam o conceito de interação hidrofóbica separando o domínio catalítico da enzima inteira. Muitas das dúvidas que surgiram no comportamento das PCTrR, como por exemplo a atividade quase que proporcional entre as enzimas A e B frente a papel filtro, puderam ser explicadas pelo teor de domínio catalítico presente no preparado enzimático.

A determinação da atividade exoglucanásica teve como princípio a hidrólise do 4-metilumbeliferil-lactosídeo (MUmbL) na presença e na ausência do principal inibidor das celobiohidrolases (celobiose). Desde que realizado sempre na presença de excesso de gluconolactona, que inibe a ação das β -glucosidases sobre o substrato, este

ensaio assegura a detecção da atividade residual de outros componentes enzimáticos não celobiohidrolásicos na fração F5 (*e.g.*, EG I), pois na presença de altas concentrações de celobiose, ambas CBH I e seu DC são incapazes de exercer qualquer atividade catalítica. Portanto, a diferença entre as atividades sobre MUmbL, na presença e na ausência de celobiose, fornece a leitura da atividade exoglucanásica presente na fração.

Todas as enzimas derivadas de cepas recombinantes de *T. reesei* (PCTrR) apresentaram altos teores de proteínas no volume de retenção tipicamente atribuído ao DC livre em Phenyl Sepharose[®], sendo que em dois casos a estrutura integral da CBH I não foi sequer detectada pelo método de Lowry. Porém, a mesma avaliação analítica, quando realizada em função da atividade específica das frações isoladas sobre MUmbL, demonstrou que a extensão da proteólise de CBH I foi ainda maior do que o índice previsto pelo método de Lowry. Por exemplo, a fração F5 da enzima B apresentou 100% de CP com base nos cálculos de atividade específica, ao passo que apenas 78,6% deste componente foram detectados mediante ensaios de teor protéico, conforme demonstrado na Tabela 22. No entanto, a curva de calibração estabelecida para o método enzimático revelou um limite de detecção (ou sensibilidade) mínimo de 0,6 nkat/mL, o que representa algo em torno de 10% a atividade exoglucanásica total estabelecida como referência no método. Assim, apesar de a fração F5 da enzima B apresentar 100% de DC com base na atividade diferencial sobre MUmbL, é possível que os níveis de atividade na banda de eluição de CBH I não tenham sido suficientemente altos para permitir detecção dentro dos limites de sensibilidade do método.

Um outro exemplo relativo à questão do limite de sensibilidade do método enzimático diz respeito ao controle CL, ou Celluclast 1.5L[®]. Com base no teor protéico, esta enzima comercial apresenta praticamente 22% de seu componente celobiohidrolásico CBH I como DC livre. No entanto, verificada a atividade enzimática sobre MUmbL das frações eluídas da coluna de Phenyl Sepharose[®],

conclui-se que não há qualquer evidência de proteólise nesta preparação, apesar de que os limites de detecção do método devam ser respeitados. Assim, apesar de ter apresentado uma atividade proteolítica residual, e de corresponder a uma preparação com pelo menos dez anos de sua data de fabricação, a amostra de Celluclast 1.5L[®] usada neste estudo não apresenta qualquer alteração de seu principal componente enzimático, o que reitera a sua apropriação para ensaios de sacarificação total de substratos celulósicos pré-tratados (RAMOS et al., 1997).

TABELA 22 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DOMÍNIO CATALÍTICO (DC) LIVRE NA FRAÇÃO F5 (CBH I) DAS PCTrR

Enzima	Método de Lowry	Atividade sobre MUmbL				% de DC livre em F5 ³
	% de CBHDC livre em F5 ¹	com celobiose (nkat/mL) ²		sem celobiose (nkat/mL)		
		F5.1	F5.2	F5.1	F5.2	
CL	78,61	ild ⁴	0,07	ild	0,48	100
B	99,99	ild	ild	0,31	ild	100
C	84,12	ild	ild	0,36	ild	85,96
D	94,22	0,03	ild	0,45	0,12	100
F	92,59	0,08	ild	0,54	ild	100
H	99,99	0,01	ild	0,38	ild	ild

¹ O teor de DC livre (%) corresponde à razão percentual entre os teores protéicos presentes nas bandas de eluição da CBH I e de seu DC;

² F5.1 corresponde à banda de eluição do DC da CBH I, enquanto que F5.2 representa a enzima integral;

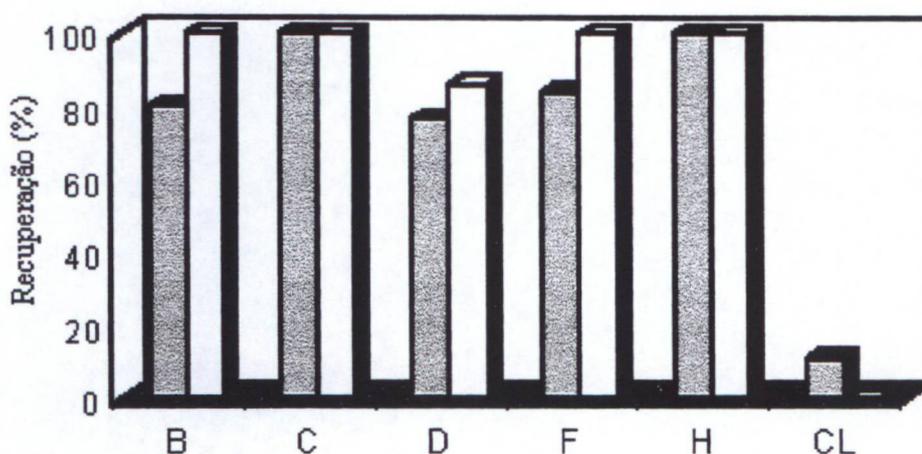
³ O teor de DC livre (%) corresponde à razão percentual das atividades diferenciais sobre MUmbL.

ild = abaixo do limite de detecção do método

Considerando-se que a CBH I encontrava-se majoritariamente como DC nas PCTrR, qual teria sido o efeito causado pela ação proteolítica sobre o modo de ação catalítica da enzima. Sabe-se que a adsorção, através do DLC, é uma propriedade essencial das celulasas e que a sua remoção por proteólise compromete a efetividade com que a enzima exerce a sua atividade sobre celulose microcristalina. No entanto, a proteólise não altera a estereoquímica do domínio catalítico (DC) e, portanto, não modifica o seu mecanismo de ação. Assim, o fato das enzimas B, C, D, F e H apresentarem a CBH I na forma de DC livre deve ter reduzido a eficiência com que exerceram as suas ações hidrolíticas e isto se justifica por terem sofrido redução e/ou

eliminação da capacidade de adsorção ao substrato de seu principal componente enzimático. Esta talvez tenha sido a razão para a equivalência observada entre a acessibilidade sobre papel de filtro e celulose microcristalina das monossupressões **A** e **B** (Figura 45).

FIGURA 45 - DOMÍNIO CATALÍTICO (DC) LIVRE RECUPERADO APÓS ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO F5, COM BASE EM PROTEÍNA TOTAL (BARRAS ACINZENTADAS) E NA ATIVIDADE DIFERENCIAL DA FRAÇÃO CONTRA MUmL (BARRAS TANSSPARENTES) NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE CELOBIOSE



5.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE HIDRÓLISE DAS PREPARAÇÕES CELULÁSICAS EM ESTUDO

Os primeiros ensaios de hidrólise utilizando as **PCTrR** sobre fibras celulósicas foram realizados utilizando título protéico de 40 mg de proteína por grama de substrato celulósico deslignificado. A definição da carga enzimática nestas hidrólises foi muitas vezes superior aos valores preconizados para processos industriais, que não excedem 1 mg de proteína por grama de substrato (PERE et al., 1999), porque esta condição de ensaio visava observar com maior precisão a ação sinérgica entre as endoglucanases e exocelobiohidrolases sobre a fibra kraft deslignificada. Nestes ensaios, foi também adicionado às preparações celulásicas um excesso de β -glucosidases (Novozym 188[®]) para que se pudesse obter a cinética da

reação sem a interferência inibitória da celobiose (RAMOS et al., 1992b).

A opção de se trabalhar com polpas kraft deslignificadas de pinus como substrato para os ensaios de sacarificação esteve relacionada com a grande acessibilidade desse material celulósico, seu teor em lignina virtualmente negligível e sua relativa homogeneidade, devida a uma constituição quase que exclusivamente formada por fibras longas. As preparações comerciais Celluclast 1.5L[®] e Novozym 188[®] foram utilizadas como referência aos ensaios realizados com as PCTrR, mas as enzimas G e H, que representam supressões triplas no genoma de *T. reesei*, não foram utilizadas porque não se encontravam disponíveis naquele momento.

A composição de carboidratos da polpa kraft de pinus foi investigada através da análise dos produtos de hidrólise ácida derivados do procedimento de determinação da lignina de Klason (vide item 4.2.3). Os resultados deste ensaio comprovaram que as polpas não continham qualquer lignina residual, e que os seus constituintes polissacarídicos eram basicamente compostos por 91% (m/m) de glucanas e por 8% de mananas (originalmente presentes como glucomananas).

Devido à alta atividade hemicelulásica presentes nas PCTrR (vide 4.1), algumas preparações foram capazes de remover quase toda a hemicelulose da polpa, pois, em alguns casos, a quantidade total de pentoses presentes nos hidrolisados de Klason correspondeu ao seu rendimento teórico integral. Entretanto, não foi possível identificar com clareza qual das PCTrR foi mais eficiente nesse processo, muito embora espere-se que preparações ricas em atividade endoglucanásica (particularmente, EG I) apresentem uma maior eficiência na hidrólise de hemiceluloses, em comparação com aquelas predominantemente exoglucanásicas ou celobiohidrolásicas (RAHKAMO et al., 1998b).

As condições de hidrólise enzimática foram de 4 (quatro) horas de incubação a uma temperatura de 45°C, agitação de 150 rpm, carga protéica de 40 mg/g de polpa kraft e consistência de 2% (p/v) em tampão acetato pH 4,8. A quantidade de Novozym 188[®] (4 mg de proteína/g de polpa) adicionada aos meios de reação aparentemente

evitou os efeitos inibitórios associados ao acúmulo de celobiose, porque em nenhum momento este açúcar foi detectado em uma concentração superior a 0,8 mg/ml (Tabela 23). A única enzima a apresentar altos níveis de celobiose no meio de reação foi a Celluclast 1.5L[®] e isso deve ter sido devido a sua elevada atividade exoglucanásica, representada neste caso pelo alto teor de CBH I que possui em sua constituição protéica.

Na Tabela 23 estão apresentados os resultados obtidos a partir da análise cromatográfica dos hidrolisados derivados de ensaios com 4 horas de duração. Por conveniência, os cálculos de rendimento de hidrólise foram efetuados utilizando o método de Somogyi-Nelson (vide ítem 4.2.4.1).

TABELA 23 – RENDIMENTOS DE HIDRÓLISE OBTIDOS A PARTIR DA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA POLPA KRAFT BRANQUEADA DE PINUS

Açúcares	Rendimentos de hidrólise (mg/ml)							
	A	B	C	D	E	F	CL	N188
(Glc) ₂	0,15	0,62	0,31	0,76	ild	0,58	2,05	0,16
Glc	0,91	2,18	1,62	2,32	0,32	1,99	2,92	0,35
Xyl	0,05	0,07	0,07	0,07	0,03	0,07	0,06	0,04
Man	0,05	0,06	0,03	0,05	0,05	0,04	0,05	0,01
<i>Teor de hidrólise</i>								
Glucose (%)	5,24	13,19	9,20	14,40	1,80	12,13	23,01	1,53

*Açúcares redutores totais foram calculados pelo método de Somogyi-Nelson e confirmados por CLAE, sempre expressando o total de hidrólise obtido em relação à massa seca da polpa. (Glc)₂ - celobiose; Glc - glucose; Xyl - xilose; Man - manose.

De um modo geral, a liberação de açúcares redutores totais (ART) pelas PCTrR foi sempre inferior ao observado para Celluclast 1.5L[®]. A remoção do gene que codifica para CBH I (enzima A) produziu um total de 1,17 mg/ml de açúcares redutores, sendo portanto 77,2% menos eficiente do que a Celluclast 1.5L[®] para a sacarificação do substrato. Por outro lado, a remoção de CBH II não foi tão crítica para o processo hidrolítico quanto a observada para CBH I, pois sua ausência decresceu a capacidade do preparado enzimático em liberar açúcares redutores totais (ART) em

aproximadamente 42,7% (dado equivalente a um total de 2,96 mg/ml em ART). Quando ambas CBH I e II foram removidas do sistema celulásico do fungo *T. reesei*, a produção correspondente de ART decresceu para apenas 1,53% (m/m) em relação ao peso seco do substrato, ou 93,4% menos eficiência hidrolítica do que a Celluclast 1.5L[®]. Isso correspondeu aproximadamente ao mesmo índice de hidrólise obtido quando a Novozym 188[®] foi utilizada como controle.

Comparando a enzima **A** (destituída de CBH I), a enzima **B** (destituída de CBH II) foi capaz de produzir duas vezes mais glucose a partir da polpa kraft a uma razão glucose:celobiose próxima àquela observada para a enzima destituída de EG II (enzima **D**).

A mais alta relação glucose:celobiose, de 6,07:1, foi observada como resultado da hidrólise da polpa com a enzima **A**, enquanto que a mais baixa das razões detectadas foi observada para a Celluclast 1.5L (1,42:1). Portanto, sempre que a capacidade da enzima em produzir celobiose decresceu, particularmente devido à ausência de exoglucanases (CBHs), o rendimento de hidrólise decresceu e a relação glucose:celobiose aumentou. Consequentemente, a supressão de ambos os genes que codificam para CBH I e CBH II do genoma do *T. reesei* (enzima **E**) resultou em uma preparação enzimática que não pode hidrolisar mais do que 2% (m/m) do substrato em um total de 4 horas de hidrólise. Nenhuma celobiose foi detectada no hidrolisado dessa enzima e isso não foi devido apenas ao fato de ser deficiente em CBHs, mas também por apresentar alta atividade contra celobiose, ou seja, altos índices de atividade β-glucosidásica.

A enzima **C**, que não apresentava EG I em sua composição, também levou a um alto índice de glucose:celobiose no meio, sendo de 5,22:1 a razão detectada por cromatografia líquida.

As maiores eficiências hidrolíticas foram derivadas das **PCTrR** em que ambas CBH I e EG I encontravam-se presentes. Assim, as enzimas destituídas de CBH II e EG II resultaram nos maiores índices de liberação de ART (13,2 e 14,4%,

respectivamente), enquanto que as enzimas destituídas de EG I puderam hidrolisar apenas 9,2% da massa seca do substrato em 4 horas de hidrólise. Portanto, a enzima EG I aparentemente apresentou um sinergismo com CBH I superior ao apresentado pela enzima EG II. Interessantemente, a enzima destituída de ambas EG I e EG II também foi capaz de hidrolisar mais de 12% do substrato. Ao invés de invalidar as interpretações anteriores, esse resultado leva à possibilidade de que o sinergismo entre CBH I e CBH II parcialmente compensa a ausência de atividade endoglucanásica no meio de reação.

Em um segundo experimento, foram determinadas as diferenças no modo de ação das enzimas com relação ao efeito que essas apresentam sobre o grau de polimerização (GP) da polpa de celulose. Para tanto, foi utilizado o método de carbamilação (vide item 4.2.7.1) das polpas parcialmente hidrolisadas seguido de análise por cromatografia de permeação em gel. Esse método, inicialmente proposto por KOSSLER et al. (1981) e posteriormente padronizado por RAMOS et al. (1993), apresenta a vantagem de revelar a distribuição em massas moleculares da celulose ao longo da condução do ensaio enzimático. Este dado, somado à investigação do efeito da hidrólise sobre o índice de cristalinidade da polpa, permite a avaliação direta do efeito das enzimas sobre a estrutura supramolecular da celulose (MILLER et al., 1991).

Como as condições experimentais incluíram a adição de um excesso de celobiase ao meio reacional, oligossacarídeos de menor massa molecular foram aparentemente convertidos à celobiose e glucose imediatamente após terem sido produzido pela ação sinérgica das endo e exoglucanases, particularmente pelo fato dessas não se encontrarem reprimidas no meio de reação. Essa foi uma das razões que justificaram a inexistência de polissacarídeos de baixa massa molecular nos perfis de eluição cromatográfica realizados por permeação em gel, assim como as análises efetuadas no hidrolisado enzimático por cromatografia líquida.

A efetiva carbamilação das polpas celulósicas parcialmente hidrolisadas foi comprovada através de análises espectrofotométricas com transformada de Fourier na

região do infravermelho (IVTF), onde o aumento da intensidade de absorção em regiões atribuídas aos grupamentos moleculares dos carbamatos caracterizaram a sua eficiência e seletividade. Exemplos das bandas utilizadas para avaliar a eficiência do processo de derivatização encontram-se representados na Tabela 24.

A intensidade de absorção na região de 3.350 cm^{-1} foi grandemente atenuada após o processo de carbamilação e isto foi atribuído ao fato de que a substituição dos grupos hidroxílicos presentes na cadeia de celulose reduziram consideravelmente a capacidade da macromolécula em formar ligações de hidrogênio quer intra ou intermoleculares.

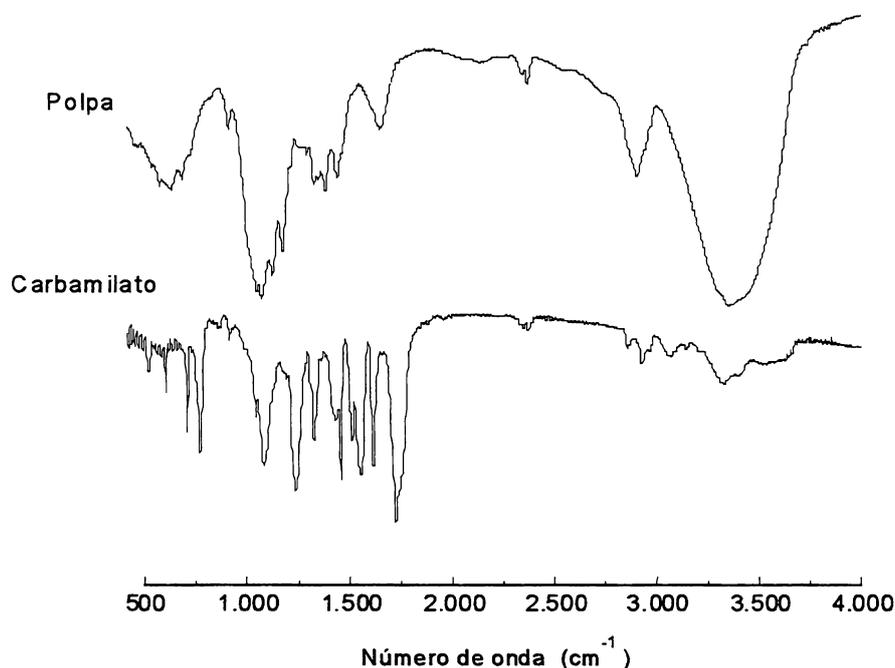
TABELA 24 - GRUPAMENTOS QUÍMICOS ALTERADOS NA CARBAMILAÇÃO E SUAS DEFORMAÇÕES ESPACIAS CAUSADAS POR ENERGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Grupamento Químico	Número de onda (cm^{-1})	Ação provocada
Aminas secundárias	3.325	deformações axiais da ligação N-H
Carbonilas presentes nas uretanias substituídas	1.700	deformações axiais de C=O
Uretana substituída ligada à anel aromático	1.650	deformações axiais da ligação N- ϕ
Uretanas substituídas ou carbamatos	1.330	deformações axiais da ligação C-N
Aromaticidade	1.420 1.505 1.600	vibrações esqueléticas em anéis aromáticos
Amidas	1.050	vibrações simétricas de C-O-C
	1.230	vibrações assimétricas de C-O-C
Anéis aromáticos substituídos	690	vibrações de C-H em anéis aromáticos monossustituídos
	760	

A região da impressão digital do polímero ($800\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$), que congrega a maioria dos sinais descritos na Tabela 24, sofreu um aumento considerável em suas intensidades de absorção, caracterizando particularmente a natureza aromática do substituinte ligado às hidroxilas primárias e secundárias da celulose. Portanto, a análise por espectrometria no infravermelho permitiu uma clara observação da eficiência obtida no processo de carbamilação, confirmado através do desaparecimento

da banda de absorção caracteristicamente atribuída à hidroxilas primárias e secundárias. Na Figura 46 estão apresentados os espectros da polpa kraft branqueada antes e após ter sofrido o processo de per-carbamilação.

FIGURA 46 – ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DA POLPA KRAFT BRANQUEADA DE PINUS (A) E DO DERIVADO CARBAMILADO OBTIDO A PARTIR DESTA MESMA POLPA



A análise por cromatografia de permeação em gel demonstrou que o GP da celulose foi afetado de diferentes formas pela ação da PCTrR (Tabela 25), havendo indícios do acúmulo de oligômeros de massa molecular inferior à 100 unidades de anidroglicose no meio de reação, independentemente das propriedades das enzimas ensaiadas (Figuras 47, 48 e 49).

A preparação Celluclast 1.5L[®] foi a mais ativa no processo hidrolítico, mas apresentou baixa capacidade de reduzir o GP médio da celulose presente no substrato em estudo (Tabela 25 e Figura 47). O GP médio decresceu em apenas 7% em resultado do processo hidrolítico, apesar de que 23% da massa seca do resíduo tenha sido hidrolisada à açúcares solúveis, enquanto que a polidispersidade foi pouco afetada pelo tratamento da polpa com Celluclast 1.5L[®]. Por outro lado, o tratamento da polpa com

Novozym 188[®] não demonstrou efeito algum sobre a distribuição de massas moleculares da celulose.

A polidispersidade decresceu em todos os tratamentos enzimáticos realizados com as PCTrR. Moléculas de alta massa molecular foram gradualmente consumidas pela ação sinérgica das enzimas e a distribuição da população original de moléculas gradativamente se deslocou em direção à menores massas molares, descrevendo um leve aumento da polidispersidade (Tabela 25).

TABELA 25 - EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO E CRISTALINIDADE DA POLPA KRAFT BRANQUEADA DE PINUS

Preparação	GP _m ± σ	GP _n ± σ	GP _m /GP _n	Cristalinidade(%)
<i>controle</i>	1597 ± 31	243 ± 4	6,57	82,2
Novozym 188 [®]	1605 ± 46	257 ± 9	6,24	82,3
Celluclast 1.5L [®]	1492 ± 56	224 ± 18	6,65	84,0
A	1108 ± 23	202 ± 6	5,48	84,3
B	1306 ± 21	228 ± 6	5,71	84,5
C	1260 ± 22	221 ± 6	5,68	84,5
D	1302 ± 23	224 ± 3	5,81	84,5
E	1108 ± 87	194 ± 11	5,69	84,0
F	1320 ± 20	221 ± 5	5,96	84,0

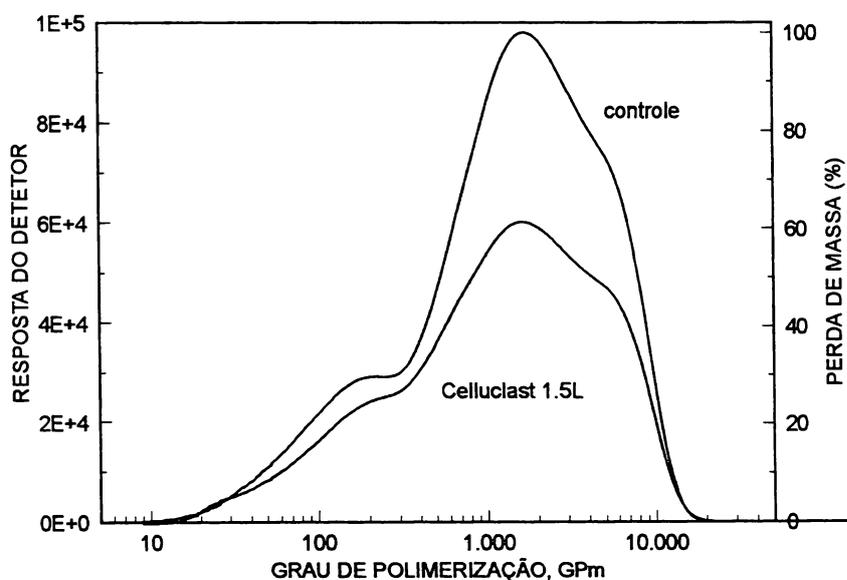
GP_m – média ponderada do grau de polimerização; GP_n – média aritmética do grau de polimerização; GP_m/GP_n – polidispersidade da amostra; σ - desvio padrão entre as amostras analisadas.

A ausência de uma das celobiohidrolases, quer seja CBH I (enzima **A**) ou CBH II (enzima **B**), causou efeito deletério menor sobre a hidrólise do que aquele verificado quando ambas as enzimas se encontravam ausentes (enzima **E**) (Tabela 23, Figura 48). Por outro lado, apesar de suas diferentes capacidades de liberar açúcares redutores do substrato, ambas as enzimas destituídas de CBH I (**A**) ou CBH I e II (**E**) resultaram em mudanças similares na distribuição em GP da celulose (Figura 48). Ambas decresceram o GP médio da população original em aproximadamente 31%. Em contraste, a enzima destituída de CBH II (**B**) não foi capaz de gerar a mesma alteração do perfil de distribuição de massas moleculares e a média do GP do substrato não pode ser reduzida em mais de 18%. Portanto, a presença de CBH I, assim como nas enzimas

B (CBH II-), **C** (EG I-), **D** (EG II-) e **F** (EG I/II-), aumentou a eficiência do sistema celulósico à produção ou liberação de açúcares redutores, enquanto que sua ausência causou um considerável acúmulo de moléculas de celulose de tamanho intermediário.

Polpas parcialmente hidrolisadas derivadas da ação catalítica da enzima **B** apresentaram um GP médio próximo aos observados para as enzimas deficientes de atividade endoglucanásicas (**C**, **D** e **F**) (Figuras 46 e 47). Esses resultados sugerem que a CBH II apresenta alguma atividade endoglucanásica sobre a polpa kraft deslignificada, razão pela qual o perfil de GP dos hidrolisados derivados de cada uma dessas enzimas apresentou-se muito equivalente e/ou similar. No entanto, em enzimas como a **F**, outros componentes minoritários de natureza endoglucanásica, como as endoglucanases EG III, IV e V, podem ter também contribuído para a atividade global do sistema celulósico, sendo portanto interferências cuja avaliação direta não foi possível nesse ensaio.

FIGURA 47 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES COMERCIAIS SOBRE O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA POLPA KRAFT. O CONTROLE CORRESPONDE À POLPA NÃO HIDROLISADA



Comparado com as enzimas destituídas de atividade celobiohidrolásica, o efeito da remoção de ambos os genes que codificam para as endoglucanases EG I e II

não afetou grandemente a capacidade das enzimas em reduzir o GP da celulose (Figura 49). No entanto, a enzima C destituída de EG I, acarretou uma alteração um pouco maior na distribuição em graus de polimerização do substrato e produziu uma quantidade menor de açúcares redutores, quando comparada com a enzima deficiente em EG II (enzima D).

FIGURA 48 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DEFICIENTES EM ATIVIDADE CELOBIOHIDROLÁSICA SOBRE O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA POLPA KRAFT. O CONTROLE CORRESPONDE À POLPA NÃO HIDROLISADA

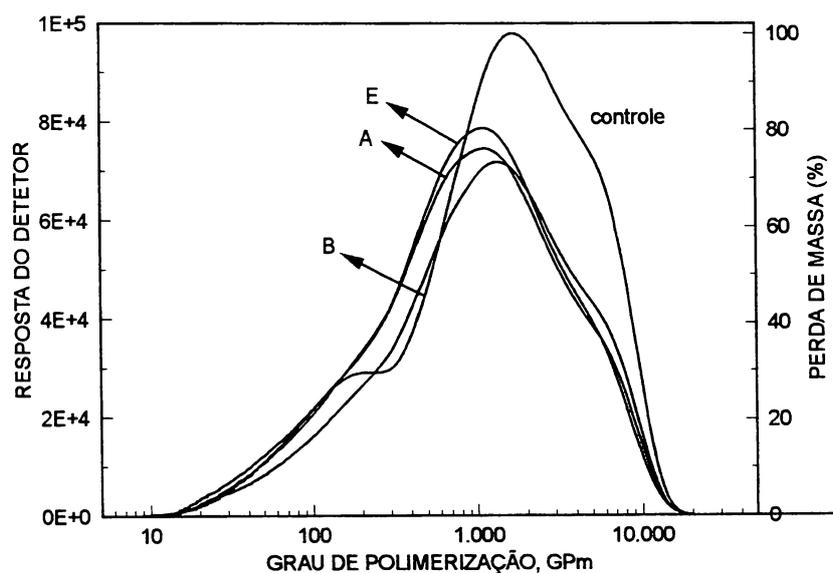
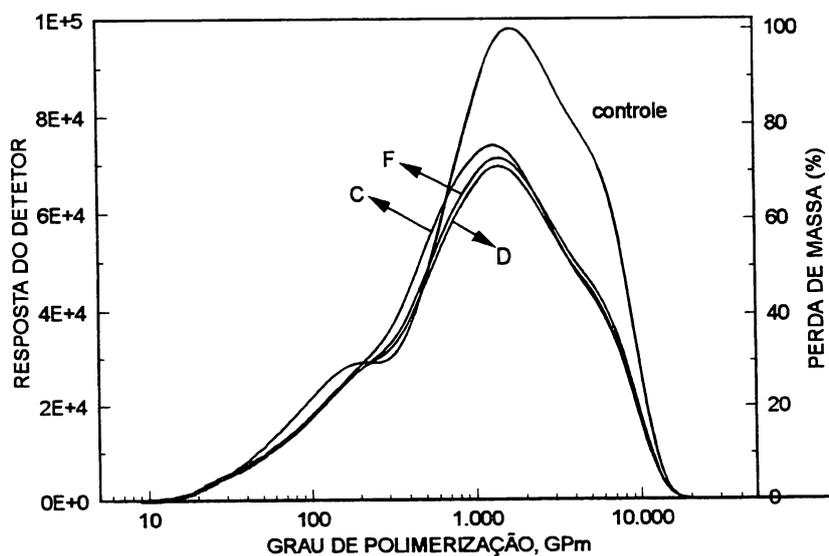


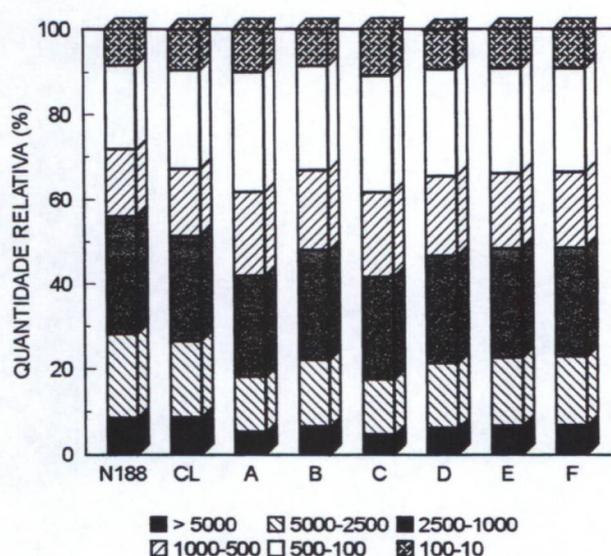
FIGURA 49 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DEFICIENTES EM ATIVIDADE ENDOGLUCANÁSICA SOBRE O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA POLPA KRAFT. O CONTROLE CORRESPONDE À POLPA NÃO HIDROLISADA



O efeito de cada preparação enzimática sobre o GP da celulose foi também avaliado em relação à faixas distintas de massas moleculares, distribuídas ao longo do histograma que descreve o perfil de análise cromatográfica por permeação em gel (Figuras 50). Para as faixas de GP definidas na Figura 47, não foram observadas diferenças consideráveis entre o perfil derivado dos tratamentos enzimáticos com as preparações C, D, F e B.

Apesar da enzima Celluclast 1.5L[®] ser capaz de hidrolisar mais de 23% do substrato, o tratamento enzimático aparentou pouco efeito sobre a contribuição de moléculas de alta massa molecular na distribuição, ou seja, aquelas que apresentam GP médio superior a 5.000 unidades de AnGlc (Figura 50). Como resultado do processo hidrolítico, houve um aumento de aproximadamente 12% na quantidade relativa de oligômeros dentro na faixa de 500 a 100 unidades de AnGlc e isso esteve aparentemente associado com um desaparecimento equivalente de moléculas de maior massa molecular, na faixa compreendida entre 2.500 a 1.000 unidades de AnGlc.

FIGURA 50 – DISTRIBUIÇÃO DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO (GP) DA CELULOSE EM POLPA KRAFT DE PINUS APÓS O TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM AS PCTRR E PREPARAÇÕES COMERCIAIS. OS VALORES DE GP ESTÃO REPRESENTADOS PELA MÉDIA PONDERADA EM RELAÇÃO ÀS MASSAS (GP_M)



Por outro lado, a enzima rica em atividade endoglucanásica (E) reduziu a contribuição relativa de moléculas de celulose com o GP superior a 2.500 em mais de 40%, sem resultar em um índice de hidrólise superior a 2%. Simultaneamente, oligômeros na faixa de 50 a 100 unidades de AnGlc acumularam a mais de 43% da população total de moléculas de celulose. Um comportamento similar foi observado quando a hidrólise foi realizada com as enzimas destituídas de CBH I. Portanto, a falta de CBH I resultou em acúmulos maiores de moléculas dentro de uma faixa de GP compreendida entre 1000-500 e 500-100 unidades de AnGlc, sendo que esta última tornou-se a fração preponderante em ambas as hidrólises realizadas com as enzimas CBH I- (A) e CBH I/II- (E).

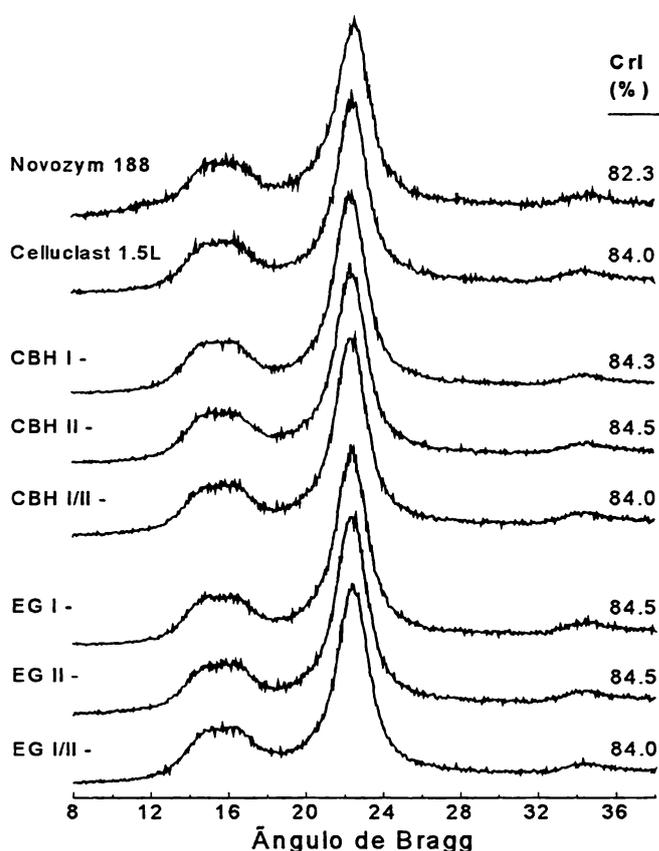
A análise por cromatografia de permeação em gel dos resíduos parcialmente hidrolisados apresentou muito pouca evidência do acúmulo de moléculas de celulose com GP inferior 100 unidades de AnGlc, sendo que a única exceção a essa regra foi a enzima E, em que o aumento de 1,5% foi demonstrado nesta população de moléculas (Figuras 47 a 49). Pequenos oligômeros com GP inferior a 10 unidades não foram detectados em nenhum dos casos, assim como oligômeros solúveis com GP inferiores a seis também não puderam ser detectadas por CLAE. Os produtos preponderantes nesses casos foram, portanto, glucose e celobiose.

A despolimerização da celulose é facilmente observada nos estágios iniciais de hidrólise de vários tipos de substratos celulósicos, o que tem sido primariamente atribuído ao ataque randômico de endoglucanases às regiões mais acessíveis do substrato. Esta ação catalítica é na verdade a base para o sinergismo que ocorre entre os componentes presentes em preparações celulásicas de diferentes origens (sinergismo endo/exo). Por outro lado, as exoglucanases apresentam uma maior eficiência na hidrólise contra substratos de alta disponibilidade de terminais redutores e não redutores. Portanto, exoglucanases geram um decréscimo apenas gradativo no GP do substrato e isso está associado à remoção de unidades terminais de celobiose (RAMOS et al., 1993). Alguns autores têm correlacionado essas mudanças com o

comprimento e a largura dos cristalitos de celulose, pois os planos de difração, particularmente aqueles que descrevem o seu comprimento, parecem ser afetados mais significativamente pelo tratamento enzimático.

Os tratamentos enzimáticos realizados nesse estudo também foram avaliados segundo seu efeito sobre o índice de cristalinidade (CrI) da celulose, conforme determinado por difração de raios-X de acordo como o método descrito por Segal et al. (1959) (Figura 51).

FIGURA 51 – EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE A CRISTALINIDADE DA CELULOSE, DETERMINADO POR DIFRATOMETRIA DE RAIO-X



O CrI do material não tratado apresentou-se em torno de 82,3%, enquanto que as polpas parcialmente hidrolisadas apresentaram índices um pouco superiores, da ordem de 84 a 85%. Assim, conclui-se que não houve qualquer diferença significativa entre os índices de cristalinidade de polpas parcialmente hidrolisadas, quaisquer que

tenham sido as enzimas utilizadas para a hidrólise. Da mesma forma, nenhum dos tratamentos enzimáticos ocasionou mudanças significativas no estado de organização estrutural da polpa original, sendo que os padrões de difração de raios-X foram coletivamente atribuídos à celulose do tipo I, provavelmente envolvendo a coexistência de ambas as sub-fases dessa forma cristalina (sub-fases I α e I β).

PERE et al. (1995) investigaram os efeitos do tratamento enzimático de fibras celulósicas com componentes purificados do sistema celulósico de *T. reesei*, sendo que as enzimas utilizadas corresponderam às CBH I, CBH II, EG I e EG II. Várias observações importantes foram feitas a partir de seus resultados experimentais: (a) comparado com as endoglucanases EG I e II, ambas as celobiohidrolases não foram eficientes em hidrolisar os carboidratos presentes na polpa; (b) a endoglucanase EG I foi mais efetiva na hidrólise da polpa do que a endoglucanase EG II, apesar da atividade específica da EG II ter sido superior àquela detectada na EG I; (c) ambas as endoglucanases causaram decréscimo na viscosidade da polpa e foram capazes de solubilizar praticamente todo o seu componente hemicelulósico; (d) a celobiohidrolase CBH II causou um decréscimo viscosidade da polpa mais significativo do que aquele observado com a celobiohidrolase CBH I; (e) a enzima EG II causou um decréscimo significativo nas propriedades mecânicas das fibras, mesmo quando utilizada em baixas relações enzima:substrato (baixas cargas protéicas); e (f) nem todos os componentes enzimáticos presentes em *T. reesei* apresentam ação deletéria sobre as propriedades mecânicas de polpas kraft.

De um modo geral as conclusões obtidas neste trabalho mostram-se equivalentes àquelas obtidas por PERE(1995), levando a uma interessante conclusão de que, apesar da diferença dos sistemas utilizados em cada uma dessas investigações, as interpretações mecanísticas apresentaram-se suficientemente congruentes. Destes resultados preliminares prevalece a observação de que a determinação do modo de ação catalítica de enzimas recombinantes pode ser uma etapa importante para comprovação da aplicabilidade desses biocatalisadores em processos industriais. Por

essa razão, ensaios foram programados para investigar o efeito de tratamentos enzimáticos análogos aos descritos até o momento sobre as propriedades de fibras kraft para a confecção do papel. Tais ensaios tiveram como objetivo a comprovação da validade de pelo menos alguns dos modelos envolvidos nesse estudo para aplicações diretamente associadas à melhoria das propriedades processuais de fibras kraft derivadas de pinus e eucalipto.

5.4 EFEITO DAS PREPARAÇÕES CELULÁSICAS SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FIBRAS KRAFT BRANQUEADAS

A determinação do modo de ação catalítica de enzimas modificadas pode ser uma etapa importante para comprovação da aplicabilidade desses biocatalisadores em processos industriais. Por essa razão, ensaios foram elaborados para avaliar as modificações causadas por tratamentos com as PCTrR sobre fibras kraft derivadas de *Eucalyptus grandis* e *Pinus taeda*, constituídos em corpos de prova, fornecidos pela Klabin do Paraná (Telêmaco Borba, PR).

As condições de hidrólise foram: tempo de 2 horas, temperatura de 45°C, agitação de 150 rpm, consistência de 5% (m/v) e carga protéica de 4 mg/g de polpa kraft deslignificada. A intenção foi a de se obter o mínimo de sacarificação e um ganho real sobre as propriedades mecânicas da folha produzida a partir da polpa ensaiada.

A análise dos açúcares liberados em função do tratamento enzimático das polpas, e o subsequente cálculo da perda de massa dele decorrente, foi realizada conforme descrito no item 4.2.5.2.2. Na Tabela 26 encontram-se expressos os resultados destes processos hidrolíticos, sendo que para as análises realizadas no sistema DIONEX, os açúcares arabinose, galactose, celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose foram detectados em índices inferiores ao limite de quantificação do método (0,004 mg/ml).

TABELA 26 – TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE POLPAS KRAFT BRANQUEADAS

Enzima	<i>Rendimentos de hidrólise</i>							
	<i>polpa de eucalipto</i>				<i>polpa de pinus</i>			
	(Glc) ₂ (mg/ml)	Glc (mg/ml)	Xyl (mg/ml)	Total* (%)	(Glc) ₂ (mg/ml)	Glc (mg/ml)	Xyl (mg/ml)	Total* (%)
A	0,004	0,115	0,125	2,17	0,018	0,15	0,105	2,44
B	0,01	0,11	0,09	1,88	0,037	0,175	0,091	2,73
C	0,015	0,051	0,047	1,01	0,054	0,082	0,054	1,72
D	0,031	0,105	0,079	1,93	0,07	0,145	0,078	2,65
E	nd	0,042	0,082	1,11	0,004	0,038	0,044	0,77
F	nd	0,041	0,15	1,7	0,056	0,17	0,095	0,29
G	nd	0,04	0,15	1,69	nd	0,074	0,155	2,04
H	nd	0,075	0,115	1,72	0,018	0,12	0,12	2,31
CL	0,2	0,62	0,21	9,32	0,84	0,73	0,15	15,85

* Rendimento de hidrólise, expresso em relação ao peso seco da polpa, foi baseado na determinação de açúcares redutores totais pelo método Somogyi-Nelson; (Glc)₂ - celobiose; Glc - glucose; Xyl - xilose; Man – manose; nd – inferior ao limite de detecção.

Os índices de sacarificação promovidos pelas PCTrR ficaram na ordem de 2% (intervalo entre 1,01 e 2,17 %) em relação à massa seca do substrato, atendendo à expectativa de que a carga protéica e o pequeno tempo de reação não provocariam uma perda de massa expressiva dentre as polpas kraft branqueadas.

Apesar desta observação, diferenças sutis puderam ser observadas dentre os rendimentos hidrolíticos obtidos sobre polpas de pinus e de eucalipto (Tabela 26). A média de hidrólise das PCTrR sobre a polpa de eucalipto foi de 1,65% com um desvio padrão de 0,40 unidades, enquanto que para a polpa de pinus, estes valores foram de 1,87±0,9% com desvio padrão de 0,90 unidades. Em geral, todas as enzimas apresentaram menor acessibilidade à polpa de eucalipto do que à polpa de pinus, incluindo o controle Celluclast 1.5L[®] (CL) que, conforme se poderia antecipar, sempre apresentou o maior poder de sacarificação sobre ambos os substratos.

Os índices de hidrólise apresentados na Tabela 26 demonstraram-se congruentes com a natureza das enzimas ensaiadas e com os resultados previamente obtidos sobre substratos modelo. Por exemplo, enzimas destituídas de atividade

celobiohidrolásica e, portanto, ricas em atividade endoglucanásica (enzima E), apresentaram acessibilidade restrita sobre as polpas celulósicas. No entanto, as pequenas diferenças entre os índices de sacarificação, decorrentes do baixo tempo de hidrólise utilizado no ensaio, acabaram por comprometer a realização de um estudo comparativo mais conclusivo acerca da acessibilidade das enzimas.

Na Tabela 27 encontram-se registrados os dados referentes ao efeito dos tratamentos enzimáticos sobre o grau de polimerização (GP) da celulose, sendo que o GP inicial das polpas de eucalipto e de pinus foi de 1677 e 1341 unidades de AnGlc, respectivamente.

TABELA 27 – AVALIAÇÃO DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS POLPAS KRAFT APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM AS PCTrR E CELLUCLAST 1.5L[®] (CL)

Tipo	<i>Eucalipto</i>			<i>Pinus</i>		
	DP _m	DP _n	P	DP _m	DP _n	P
Controle	1341	171	7.85	1677	306	5.47
A	1114	162	6.87	1472	232	6.34
B	1254	172	7.27	1484	202	7.34
C	1251	162	7.74	1474	198	7.43
D	1296	187	6.94	1546	236	6.56
E	1272	194	6.56	783	98	8.00
F	1247	180	6.93	1528	261	5.86
G	1212	185	6.54	1431	214	6.69
H	1307	203	6.42	1582	256	6.18
CL	1262	183	6.89	1608	241	6.68

Efeitos interessantes foram observados em relação a mudanças no GP da celulose, mesmo nos casos em que baixos índices de hidrólise foram detectados. Em contraste, muitas das enzimas foram capazes de hidrolisar consideravelmente o substrato sem que essa ocorrência estivesse necessariamente associada a um decréscimo equivalente do GP da celulose (Tabela 27). Este foi, por exemplo, o caso da Celluclast 1.5L[®], que hidrolisou 15,85% da polpa de pinus e 9,32% da polpa de eucalipto sem causar nenhum efeito expressivo sobre o GP médio e/ou polidispersidade da celulose presente nos substratos. RAMOS et al. (1993)

demonstraram efeito semelhante da Celluclast 1.5L[®] sobre polpas kraft deslignificadas de pinus, cuja interpretação foi devida à remoção rápida e eficiente de camadas superficiais da estrutura supramolecular da celulose, evitando assim o acúmulo de oligômeros de baixa massa molecular e mantendo o GP médio do substrato relativamente constante. Preparações enzimáticas completas, que apresentam alto grau de sinergismo entre as suas enzimas constituintes, geralmente apresentam este perfil de ação sobre substratos celulósicos fibrosos, sendo que a remoção eficiente de oligômeros exige a ação celobiohidrolásica de enzimas como a CBH I e a CBH II.

Apesar de ter hidrolisado apenas 1,1% do substrato, a enzima E (supressão dupla de CBH I e II) resultou em um efeito expressivo sobre o GP da celulose. Tal comportamento foi imediatamente atribuído à alta atividade endoglucanásica desta enzima que, juntamente com sua deficiência em celobiohidrolases, motivou o acúmulo de oligômeros de baixa massa molecular no meio de reação. Curiosamente, o efeito da enzima E sobre o GP da polpa de pinus foi menos significativo e isto é uma forte indicação que o GP da celulose não é o principal fator que define a acessibilidade da enzima ao substrato. Sabe-se que outros fatores estruturais relacionados ao substrato podem ter igual ou maior influência sobre a acessibilidade, como por exemplo o seu volume de poros, grau de cristalinidade e área superficial disponível para interações produtivas com as enzimas (SADDLER, 1986; WOOD, 1991; RAMOS et al., 1993).

Caracterizados os índices de sacarificação e graus de polimerização das polpas parcialmente hidrolisadas, folhas de papel ou corpos de prova, formados em condições padronizadas que definiram uma gramatura de 100 cm²/g e uma espessura de 0,22 mm, foram testados para com suas principais propriedades mecânicas, quais sejam, suas resistências ao rasgo, ao arrebentamento (ou estouro), à tração e à alongação. Destes dados, foram então calculados os índices que se encontram representados na Tabela 28, cujos controles foram sempre correspondentes às polpas não hidrolisadas, submetidas à condições experimentais absolutamente equivalentes.

Cabe ressaltar que os corpos de prova foram preparados sem que as polpas

tivessem passado por qualquer etapa preliminar de refino, opção esta tomada para evitar que os reais efeitos causados pelas enzimas pudessem ser eventualmente mascarados. Esta observação também justifica a baixa qualidade dos corpos de prova obtidos, mesmo para o caso das polpas originais, pois o desenvolvimento de propriedades adequadas à confecção de um papel de boa qualidade depende de uma etapa de refino para aumentar o grau de entrelaçamento entre as fibras.

TABELA 28 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CORPOS DE PROVA PREPARADOS A PARTIR DE POLPAS CELULÓSICAS SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM AS PCTrR E CELLUCLAST 1.5L®

Tipo	<i>Pinus</i>				<i>Eucalypto</i>			
	S	IT	IA	IR	S	IT	IA	IR
Controle	1,05	9,5	0,52	6,9	0,86	11,6	0,17	1,78
A	0,86	14,4	0,31	1,7	0,86	9,0	0,15	0,91
B	1,00	12,3	0,56	5,3	0,85	5,6	0,19	1,37
C	1,14	12,5	0,48	6,7	0,86	11,8	0,22	0,98
D	1,01	13,4	0,52	4,8	0,85	9,2	0,21	1,48
E	1,19	17,0	0,60	4,0	0,88	11,2	0,23	1,61
F	1,26	16,6	0,49	2,8	0,85	8,5	0,13	1,09
G	1,04	12,9	0,53	5,4	0,97	13,2	0,32	1,67
H	1,08	11,3	0,48	7,3	0,85	10,0	0,17	1,24
CL	0,98	14,4	0,43	2,9	0,86	6,3	0,09	0,92
N188	1,34	13,6	0,62	7,0	0,85	9,8	0,11	1,05

S, índice de resistência ao alongamento, expresso em percentagem (%); IT, índice de resistência à tração, expresso em (KN/m)/(m²/g); IA, índice de resistência ao arrebentamento, expresso em (kPa)/(m²/g); IR, índice de resistência ao rasgo, expresso em (mN)/(m²/g)

A ação das PCTrR sobre polpas kraft branqueadas indicaram que as propriedades de resistência à tração e ao rasgo foram as que mais se alteraram em decorrência do tratamento enzimático. Uma hipótese aventada para o efeito da redução do índice de rasgo é a gradativa redução da espessura da parede celular, muito embora o tempo utilizado para hidrólise não tenha sido aparentemente suficiente para exercer tal alteração morfológica na fibra. Por outro lado, estes índices também são influenciados por outros fatores, como o colapso das fibras, de forma que é muito difícil atribuir uma correlação direta entre as modificações observadas e o real efeito que as motivou. Por outro lado, o efeito das PCTrR sobre a resistência à tração está

relacionado à ação superficial exercida pelas enzimas sobre as fibras celulósicas, cujo resultado imediato é a fibrilação e o subsequente aumento do grau de interligação das fibras que constituem o papel.

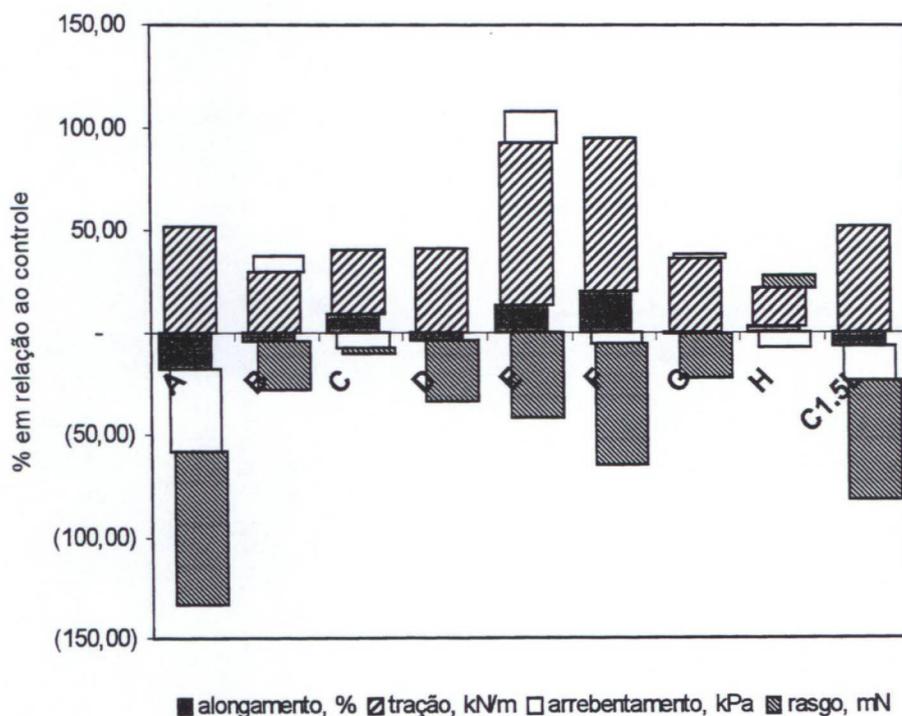
O tratamento das polpas com Celluclast 1.5L[®] gerou um comprometimento significativo de suas propriedades para a confecção dos corpos de prova. No caso das polpas de eucalipto, todas as propriedades mecânicas dos corpos de prova foram comprometidas em comparação com o controle, enquanto que, para o caso da polpa de pinus, apenas a resistência à tração apresentou algum efeito favorável. Estes resultados certamente estão associados aos maiores índices de sacarificação promovidos pela Celluclast 1.5L[®]. Porém, nenhuma correlação pode ser estabelecida entre estes efeitos e aqueles observados sobre o GP da polpa em decorrência do tratamento enzimático.

Algumas das PCTrR foram capazes de aprimorar as propriedades mecânicas dos corpos de prova, induzindo à consideração de que algumas delas poderão apresentar potencial para aplicação no tratamento de fibras kraft em processos industriais. Curiosamente, a enzima que resultou nas melhores propriedades dos corpos de prova de fibras de eucalipto não foi a mesma que apresentou o melhor efeito sobre fibras de pinus.

Nas Figuras 52 e 53 encontram-se representadas as variações causadas pelas PCTrR sobre as propriedades das polpas kraft para a fabricação do papel. Para facilitar a visualização dos dados, as polpas não tratadas foram utilizadas como referência e os deslocamentos do eixo das abcissas representam quanto a propriedade em questão foi alterada. Com base na Figura 40, observa-se que a enzima E gerou bons resultados sobre as propriedades da polpa de pinus, muito embora a extensão dessas mudanças não tenha sido tão pronunciada quanto aquelas decorrentes da ação da enzima G sobre a polpa de eucalipto (Figura 43). No entanto, todas as PCTrR, exceto a H, apresentaram um efeito negativo sobre a resistência ao rasgo dos corpos de prova, ao mesmo tempo em que todas, sem exceção, apresentaram um efeito positivo sobre a resistência à tração. Considerando-se o rasgo como uma das principais propriedades do

papel, a enzima **H** pode ser eleita como a de melhores resultados sobre a polpa de pinus. Por outro lado, os tratamentos enzimáticos apresentaram uma influências variáveis sobre a resistência ao arrebentamento (ou estouro) dos corpos de prova, assim como sobre as suas respectivas resistências ao alongamento.

FIGURA 52 – EFEITO DAS PCT_rR SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CORPOS DE PROVA PRODUZIDOS A PARTIR DE POLPAS KRAFT BRANQUEADAS DE PINUS

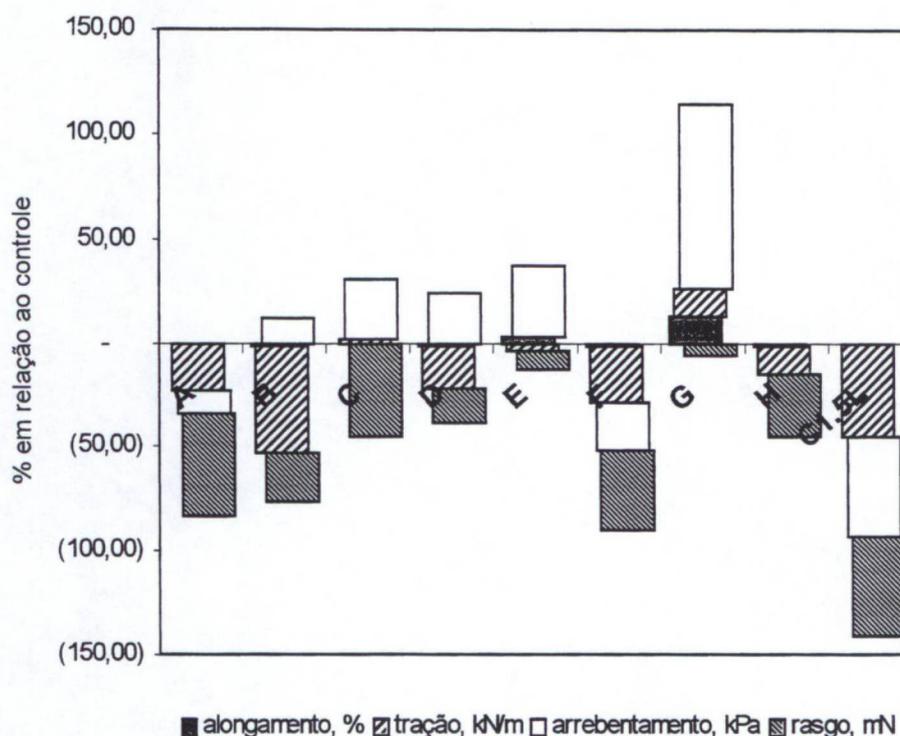


No caso dos corpos de prova derivados de polpa de eucalipto, os melhores resultados foram os derivados do tratamento com a enzima **G**, que representou ganhos em quase todas as propriedades medidas exceto a resistência ao rasgo (Figura 43). Curiosamente, esta foi a única enzima capaz de aumentar a resistência à tração em relação ao controle.

O amplo favorecimento gerado pela enzima **G** sobre a resistência ao arrebentamento dos corpos de prova não foi passível de uma justificação imediata. Assim, o efeito parece ter sido gerado por uma certa sinergia entre vários fatores que

influenciam, direta ou indiretamente, esta propriedade. Da mesma forma, não nos foi possível justificar o efeito deletério que as preparações A e F apresentaram sobre a resistência ao arrebentamento.

FIGURA 53 – EFEITO DAS PCTrR SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CORPOS DE PROVA PRODUZIDOS A PARTIR DE POLPAS KRAFT BRANQUEADAS DE EUCALIPTO



As enzimas E e F geraram efeitos equivalentes sobre a resistência à tração dos corpos de prova, significando que a ação superficial das enzimas proporciona um maior grau de interligação entre elas. Porém, a enzima F causou um efeito maior sobre o rasgo do que a enzima E, evidenciando a ação progressiva das endoglucanases sobre as cadeias de celulose que estão dispostas na superfície da fibra. Dado o devido tempo, espera-se que o resultado deste modo de ação catalítica acarrete uma diminuição na espessura da parede celular, diminuindo ainda mais a resistência ao rasgo em efeito já descrito por outros autores como “peeling” (BETRABET & PARALIKAR, 1977, 1978; RAMOS et al., 1993).

O tratamento de polpas celulósicas com preparações purificadas de EG I já foi estudado por outros autores e os resultados obtidos foram considerados promissores (PERE et al., 1999). Nesta ótica, o comportamento apresentado pela enzima G corrobora a hipótese de que esta enzima, juntamente com a EG III, possa apresentar a capacidade de modificar favoravelmente as propriedades das fibras e, por conseguinte, as propriedades do papel delas derivado. No entanto, dentre as duas endoglucanases, qual que efetivamente estava sendo responsável pelos efeitos decorrentes do tratamento de fibra de eucalipto com a enzima G? Para responder este questionamento, duas preparações purificadas de EG I (VTT Biotechnology) e EG III (IndiAge, Genencor) foram selecionadas e submetidas ao mesmo procedimento experimental anteriormente descrito para as PCTrR. Paralelamente, fruto da presença de considerável atividade proteolítica nestas preparações, uma amostra do domínio catalítico derivado da EG I também foi inserido no planejamento experimental, pois parte da EG I provavelmente se encontra, na enzima G e em todas as PCTrR que as contém, na forma de seu DC livre. Estes resultados encontram-se descritos na Tabela 29.

TABELA 29 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CORPOS DE PROVA PREPARADOS A PARTIR DE POLPAS DE EUCALIPTO, SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM ENDOGLUCANASES PURIFICADAS DE *T. reesei*

Enzima	S	IT	IA	IR	Total* (%)
<i>controle</i>	0,9	14,1	0,39	2,33	---
EG I	1,05	21,2	0,59	3,74	0,48
EG III	1,03	19,5	0,53	2,54	0,85
EG I _{DC}	0,95	16,9	0,42	2,46	1,17

S, índice de resistência ao alongamento, expresso em percentagem (%); IT, índice de resistência à tração, expresso em (KN/m)/(m²/g); IA, índice de resistência ao arrebentamento, expresso em (kPa)/(m²/g); IR, índice de resistência ao rasgo, expresso em (mN)/(m²/g); * Rendimento de hidrólise calculado com base nas análises por CLAE.

As três preparações enzimáticas purificadas, descritas na Tabela 29, resultaram em índices de sacarificação bastante reduzidos em relação ao controle.

Porém, a enzima EG III (IndiAge), que é destituída do domínio de ligação ao substrato (DLC), apresentou rendimentos de hidrólise superiores à EG I, enquanto que o EG I_{DC} forneceu rendimentos ainda maiores as duas anteriores. Ao invés de interpretar os dados registrados à luz do modo de ação catalítica destas enzimas, é provável que as variações observadas estejam ligeiramente fora dos limites de confiabilidade do método, não constituindo portanto diferenças estatisticamente significativas.

Comparada ao controle, a enzima EG I representou ganhos em todas as propriedades medidas a partir dos corpos de prova, inclusive a resistência ao rasgo (Tabela 29). Por outro lado, tanto a enzima EG III (IndiAge) quanto o domínio catalítico livre da EG I (EG I_{DC}) também resultaram em efeitos favoráveis sobre as propriedades mecânicas dos corpos de prova, em comparação com o controle. Portanto, o comportamento favorável da enzima G não foi um resultado exclusivo da enzima EG I, mas sim da ação sinérgica entre esta endoglucanase e outros componentes endoglucanásicos eventualmente presentes na preparação (EG III e EG I_{DC}). Porém, os ensaios descritos na Tabela 29 confirmaram que, dentre estas enzimas, a EG I é a que proporciona os melhores ganhos nas propriedades mecânicas dos corpos de prova de polpa de eucalipto.

6 CONCLUSÃO

As preparações enzimáticas derivadas de cepas recombinantes de *T. reesei* apresentaram propriedades que as qualificam como biocatalisadores diferenciados para processos de bioconversão.

O nocaute dos genes das **PCTrR** resultou em diferenças nos valores médios obtidos nas atividades específicas segundo GHOSE (1987). Em comparação com o controle (**CL**) a enzima **A** reduziu sua atividade em torno de 50% para os substratos HEC, UPF e XMV, sendo que o resultado mais significativo foi contra XEA. A enzima **B** manteve as mesmas tendências que a anterior diferindo nos substratos CMC e derivados de xilanas. As enzimas **C** e **D** também resultaram em valores decrescentes para endo e exo-glucanásicos, o destaque foi observado para o substrato xilanásico proveniente de aveia para a enzima **D**. As duplas e triplas supressões (Enz **E**, **F**, **G** e **H**) resultaram em valores antagonicos quando comparados entre si e o controle. Por exemplo, a ação sobre PF foi praticamente inexistente na Enz **G** enquanto para a Enz **H** este valor foi muitas vezes superior. Para **PF** o maior resultado foi observado para a Enz **F**. Os substratos modificados quimicamente resultaram valores numericamente superiores em CMC e HEC para a Enz **E**, para XEA foi a Enz **G** e para XMV foi a Enz **H**. Um importante destaque deve ser feito ao fato dos ensaios para CMC e HEC serem realizados em condições padrões de ensaio que neste caso em específico não são iguais, o que significa que os valores resultantes para as **PCTrR** não podem ser tomados como absolutos. Finalmente para os substratos cromofóricos os maiores valores numéricos foram aqueles obtidos nos ensaios com as Enz. **B** e **E**.

A supressão do gene que codifica para a enzima CBH I que corresponde a cerca de 60% da proteína secretada pelas cepas industriais de *T. reesei* acarretou um aumento proporcional nas atividades xilanásicas e endoglucanásicas do complexo enzimático. Efeitos semelhantes foram também observados quando da supressão de CBH II, somente que a um nível inferior quantificado para a CBH I.

O método cromatográfico de baixa pressão, desenvolvido para caracterização das PCTrR demonstrou ser eficiente na separação dos seus principais constituintes protéicos. Estes ensaios por FPLC, isolaram na fração 5 a CBH I, enquanto que a EG II foi purificada na fração 2. As demais enzimas tiveram suas concentrações variando ao longo da eluição, conforme seu ponto isoelétrico e estrutura isomórfica. Por outro lado, todas as preparações celulásicas derivadas de cepas recombinantes demonstraram, por cromatografia de interação hidrofóbica, conter a maior parte de seu principal componente celobiohidrolásico (CBH I) na forma de seu respectivo domínio catalítico (DC) livre. A ocorrência do CBH I_{DC} livre provavelmente decorreu da atividade proteolítica residual presente nas preparações.

Nos ensaios de hidrólise com polpas kraft foram observados efeitos interessantes em relação a mudanças no grau de polimerização da celulose, mesmo nos casos em que baixos índices de hidrólise foram detectados. Estes efeitos caracterizam de modo particular as preparações enriquecidas em atividade endoglucanásica. Em contraste, muitas das preparações foram capazes de gerar muitos terminais redutores ao meio sem que essa ocorrência estivesse necessariamente associada a um decréscimo equivalente do grau de polimerização da celulose. Neste caso, a presença de altos índices de sinergismo se mostraram necessários para facultar maior eficiência no processo de remoção progressiva das cadeias de celulose presentes na superfície das fibras. Todas as preparações celulásicas derivadas de cepas recombinantes apresentaram índices de sacarificação iguais ou inferiores a 2% (m/m), nas condições do ensaio. A ausência de CBH I reduziu drasticamente as propriedades hidrolíticas do sistema celulásico de *T. reesei*, pois tanto nas supressões duplas como nas supressões isoladas, resultou nos menores índices de liberação de glucose a partir de uma variedade de substratos celulósicos utilizados como modelo. Estas também demonstraram maior capacidade de acumular moléculas de grau de polimerização intermediário, significando que esta enzima tem uma função importante na remoção desses oligômeros do meio de reação.

Polpas kraft branqueadas de pinus e eucalipto foram selecionadas para estudos afim de analisar a viabilidade das PCTrR no biopolimento de fibras celulósicas comerciais. Estas apresentaram diferentes acessibilidades aos substratos testados, sugerindo que opções biotecnológicas neste âmbito deverão ser tomadas com cuidado para que o efeito desejado seja efetivamente observado no processo.

Os testes físico-mercâncos efetuados com polpas kraft branqueadas demonstraram que é possível alterar as propriedades das polpas para a confecção do papel sem maiores efeitos sobre o grau de polimerização e o índice de cristalinidade da celulose. Algumas das preparações celulásicas derivadas de cepas recombinantes foram capazes de aprimorar as propriedades mecânicas dos corpos de prova, induzindo à consideração de que estas poderão apresentar potencial para aplicação no tratamento de fibras kraft branqueadas em processos industriais. A Enz G apresentou um maior ganho nas propriedades de alongamento, tração e rasgo para as fibras de eucalipto, enquanto que para as fibras de pinus este efeito aconteceu somente para a tração. Curiosamente, a enzima que resultou nas melhores propriedades dos corpos de prova de fibras de eucalipto não foi a mesma que apresentou o melhor efeito sobre fibras de pinus.

O comportamento favorável da supressão tripla, designada como enzima G (destituída de EG II, CBH I e CBH II), não foi um resultado exclusivo da enzima EG I que a preparação contém, mas sim da ação sinérgica entre esta endoglucanase e outros componentes endoglucanásicos presentes na preparação (EG III e EG I_{DC}). Porém, dentre estas enzimas, a EG I é a que proporciona os melhores ganhos em propriedades mecânicas nos corpos de prova derivados de polpa de eucalipto.

7 REFERÊNCIAS

- AFONSO, E.T.; FONTES, T.C.; BARTOLOME, T.A. **Glossário de termos têxteis**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 48 p.
- ALTERTHUM, F.; CARVALHAL M.L.; TAKAHASHI D.F. Ethanol-Production from Pentoses and Hexoses by Recombinant *Escherichia-Coli* **Biotechnology Letters**, 16: (7) 747-750, 1994.
- ATTALA, R.H. The structure of native cellulose. In: PROCEEDINGS OF TRICEL SIMPOSIUM ON *Trichoderma reesei* CELLULASES AND OTHER HIDROLASES, 2., Helsinquia, 1993. **Anais...** Helsinquia: Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 1993. v.8, p. 281-290.
- ATTALA, R.V.; ELLIS, J.D.; SCHROEDER, L. R. Some effects of elevated temperatures on the structure of cellulose and its transformation. **J. Wood Chem. Technol.**, v. 4, p. 465-482, 1984.
- BAKER, J.O.; ADNEY, W.S.; THOMAS, S.R.; NIEVES, R.A.; CHOU, Y.-C.; VINZANT, T.B.; TUCKER, M.P.; LAYMON, R.A.; HIMMEL, M.E. Synergism between purified bacterial and fungal cellulases. In: SADDLER, J. N.; PENNER, M. H. (Eds.). **Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates**. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. p. 113-141.
- BANCO CENTRAL DO BRASIL. Publicações e Pesquisas Econômicas. **Resenha econômica**. Disponível em: <<http://www.bcb.gov.br>>. Acesso em 18 dez. 2000.
- BAUER, W.D.; TALMADGE, K.W.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-culture sycamore cells. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 174-187, 1973.
- BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J.; ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 31, p. 173-178, 1988.
- BOKER, A.A.; MILES, M.J. **Molecular imaging of cellulose: microscopy**. New York: BIOforum International, 1997. p. 96-100.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.

- BROWN, R. M. Cellulose microfibril assembly and orientation. **J. Cell Sci., Suppl.** n. 2, p. 13-32, 1985.
- BROWN, R.M.; SAXENA, I.M.; KUDLICKA, M. Cellulose biosynthesis in higher plants. Trends in Plant Sciences. **Elsevier Trends Journals**, v. 1, n. 5, p. 149-156, May 1996.
- BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia básica**. Zaragoza: Acribia, 1991.
- BUCHERT, J.; HEIKINHEIMO, L. New cellulase processes for the textile industry. **Carbohydrates in Europe**, v. 22, p. 32-34, 1998.
- BUCHERT, J.; PERE, J.; OIJUSLUOMA, L.; RAHKAMO, L.; VIKARI, L. Cellulases: tools for modification of cellulosic materials. In: PROCEEDINGS THE TEXTILE INSTITUTE'S WORLD CONFERENCE NICHES IN THE WORLD OF TEXTILES, 77., Tampere, 21-24 May 1996. **Anais...** Tampere, 1996. v. 1, p. 273-279.
- BUCHERT, J.; RANUA, M.; SIIKA-AHO, M.; PERE, J.; VIKARI, L. *Trichoderma reesei* cellulases in the bleaching of kraft pulp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 941-945, 1994.
- BUCHERT, J.; SIIKA-AHO, M.; BAILEY, M.; PULS, J.; VALKEAJARVA, A.; PERE, J.; VIKARI, L. Quantitative Determination of Wood-Derived Soluble Oligosaccharides by HPLC. **Biotechnology Techniques**, V. 7, n. 11, p. 785- 790, 1993.
- CARRARD, G.; LINDER, M.; TENKANEN, M. & VIKARI, L. Comparison of in vitro and in vivo tritium-labelling of cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases. In: OHMIYA, K. et al. (Eds). **Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation**. Tokyo: UNI Publishers, 1999.
- CAVACO-PAULO, Artur Manuel. **Influência da agitação mecânica e da composição enzimática no tratamento do algodão com celulasas**. Braga, 1995. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho.
- CAVACO-PAULO, A. Cellulases in textile processes. In: PROCEEDINGS OF BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 5., Curitiba, PR, Brazil, 1997. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1997. p. 404-412.
- CHAFE, S.C. The fine structure of the collenchyma cell wall. **Planta Berl**, v. 90, p. 12-21, 1970.

- CHANZY, H. Aspects of cellulose structure. In: KENNEDY, J.F. (Ed.) **Cellulose sources and exploitation: industrial utilization, biotechnology and physico-chemical properties**. New York: Ellis Horwood, 1990. p. 3-12.
- CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrates analysis: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1994.
- CLAEYSSSENS, M., TOMME, P.; BREHER, C. F.; HEHRE, E.J. Stereochemical course of hydrolysis and hydration reactions catalysed by cellobiohydrolases I and II from *Trichoderma reesei*. **FEBS Lett.**, v. 263, p. 89-92, 1990.
- CLAEYSSSENS, M.; AERTS, G. Characterization of cellulolytic activities in commercial *Trichoderma reesei* preparations: an approach using small, chromogenic substrates. **Biores. Technol.**, v. 39, p. 143-146, 1992.
- CLARKE, ANTHONY J. **Biodegradation of cellulose-enzimology and biotechnology**. Basel: Technomic Publishing, 1999.
- COLL, H.; GILDING, D.K. Universal calibration in GPC: a study of polystyrene, poly-a-methylstyrene, and polypropylene. **J. Poly. Sci.** v. A-2, n. 8, p. 89-103, 1970.
- COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnol. Gen. Eng. Rew.**, v. 3, p. 39-109, 1985.
- DANHELKA, J.; KOSSLER, I. Determination of molecular weight distribution of cellulose by conversion into tricarbonyl and fractionation. **J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.**, v. 14, p. 287-298, 1976.
- DELMER, D.P.; COOPER, G.; ALEXANDER, D.; COOPER, J.; HAYASHI, T., NITSCHKE, C.; THELEN, M. New approaches to the study of cellulose biosynthesis. **J. Cell Sci., Supp.** n. 2, p.23-50, 1985.
- DIVNE, C.; STÅHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; PETTERSSON, G.; KNOWLES, J.K.C.; TEERI, T.T.; JONES, A. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 265, p. 524-528, 1994.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E.; ARAUJO, J.S.N. **Enzimas de importância na indústria de polpa de celulose e papel**. São Paulo: Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel, 1995.
- ENARI, T.M.; NIKU-PAAVOLA, M.L. Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory valid? **CRC Crit. rev. Biotechnol.**, v. 5, p. 67-87, 1987.

- ERIK, J.B.; MARC, M.P.; BOLLIER, PETER F.; PLANK, DEBORAH S. Winetzky enzyme: their applications and biochemical characterization. **Biochem. J.**, v. 254, p. 793-797, 1988.
- ERIKSSON, K.E.L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. **Microbiological enzymatic degradation of wood and wood components**. Alemanha: Springer-Verlag, 1990. 560 p.
- EVALAINEN, H. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Effects of deletions of individual cellulase genes. **Mol. Gen. Genet.**, v. 241, p. 523-530, 1993.
- EVANS, C.S.; DUTTON, M.V.; GUILLÉN, F.; VENESS, R.G. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiol Reviews**, v. 13, p. 235-239, 1994.
- EVELEIGH, D.E.; DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N.A. **Trichoderma biology of industrial microorganisms**. [S.l.]: Cunnings, 1985. p. 487-509.
- FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.H. **Cellulose hydrolysis**. New York: Springer-Verlag, 1987. p. 5-120.
- FENGEL, D.; WEGNER, G. **Wood-chemistry, ultrastructure and reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.
- FINCH, P.; ROBERTS, J.C. **Cellulose chemistry and its applications**. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 312-343.
- FONTANA, J. D.; JOERKE, C.G.; BARON, M.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A.G.; TORRIANI, I.; SOUZA, A.M.; SOARES, M.B.; FONTANA, M. A.; GUIMARÃES, M. F. *Acetobacter* cellulosic biofilms search for new modulators of cellulogenesis and native membrane treatments. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 63, n. 65, p. 327-338, 1997.
- FRANZ, G.; BLASCHEK, W. Cellulose. In: DEY, P.M. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. Carbohydrates. Orlando: Academic Press, 1990. v.2, p. 291-322.
- FREUDENBERG, K.; NEISH, A.C. **Constitution and biosynthesis of lignin**. New York: Springer Verlag, 1968.
- FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 37, p. 165-185, 1986.

- GAMA, F.M.; TEIXEIRA, J.A.; MOTA, M. Cellulose Morphology and enzymatic reactivity: a modified solute exclusion technique. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, p. 381-387, 1994.
- GANDINI, A. Polymers from renewable resources. In: **COMPREHENSIVE POLYMER SCIENCE**. New York: Pergamon Press, 1992. p. 528-540.
- GAZETA MERCANTIL. **Rezenha econômica**. Disponível em:
<http://investnews.net/canal_gazeta/html>. Acesso em: 15 mar. 2001.
- GERHARD, J.; WOLFGANG, D. **Biotechnologia: introducción com experimentos modelo**. Zaragoza: Acribia, 1991.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Appl. Chem.**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GOMIDE, J.L.; DEMUNER, B.J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método klason modificado. **O Papel**, v. 47, n. 8, p. 36-38, 1986.
- GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 37-50, 1991.
- HEINER, A. P. & TELEMAN, O. On the Structure of Crystalline Cellulose I. In: **Carbohydrases from Trichoderma reesei and other Microorganisms**. Claeysens, M., Nerinckx, W. & Piens, K. (Eds). Proc. Tricel '97 Meet, Ghent, 28-31 Aug. 1997. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1998, 204.213.
- HENRIKSSON, K.; SUORTTI, T.; REINIKAINEN, T.; TELEMAN, K.; POUTANEN, K. Hydrolysis of cereal β -glucans by cellulases of *Trichoderma reesei*. In: MEUSER, F., MANNERS, D.J.; SEIBEL, W. (Eds.). **Progress in plant polymeric carbohydrate research**. Hamburg: Behr's Verlag, 1995. p. 203-206.
- HENRISSAT, B.; DRIGUEZ, H.; VIET, C.; SCHULEIN, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. **Bio/Technology**, v. 3, p. 722-726, 1985.
- HERTH, W. Arrays of plasma-membrane "rosettes" involved in cellulose microfibril formation of *Spirogyra*. **Planta (Berl.)**, v. 159, p. 347-356, 1983.
- HIGUCHI, T. **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. Orlando: Academic Press, 1985. 679 p.
- HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Word Sci. Technol.**, v. 24, p. 23-63, 1990.

- HORII, F. Transformation of native cellulose crystals induced by saturated steam at high temperatures. **Macromolecules**, v. 20, p. 2946-2949, 1987.
- JACKSON, M.A.; TALBURT, D.E. Mechanism for β -glucosidase release into cellulose-grown *Trichoderma reesei* culture supernatants, **Exp. Mycol.**, v. 12, p. 203-216, 1988.
- KANTELINEN, A.; JOKINEN, O.; PERE, J. The mechanism of cellulase/hemicellulase treatment for improved drainage. In: PROCEEDINGS TAPPI BIOLOGICAL SCIENCES SYMPOSIUM, San Francisco, CA., 20-23 Oct. 1997. **Anais...** San Francisco, CA, 1997. p. 267-269.
- KARHUNEN, T.; MÄNTYLÄ, A.; NEVALAINEN, H.; SUOMINEN, P.L. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. **Mol. Gen. Genet.**, v. 241, p. 515-522, 1993.
- KARR, A.L. Cell wall biogenesis. In: BONNER, J.; VARNER, J.E. (Eds). **Plant biochemistry**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1976. p. 405-426.
- KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K.W.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 188-196, 1973.
- KENNETH, BRITT W. **Handbook of pulp and paper technology**. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1970.
- KIERMAYER, O.; SLEYTR, U. B. Hexagonally ordered "rosettes" of particles in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* Breb. and their significance for microfibril formation and orientation. **Protoplasma**, v. 101, p. 133-138, 1979.
- KLEMAN-LEYER, K.; AGOSIN, E.; CONNER, A. H.; KIRK, T. K. Changes in molecular size distribution of cellulose during attack by white rot and brown rot fungi. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 58, p. 1266-1270, 1992.
- KLEMAN-LEYER, K. M.; GILKES, N. R.; MILLER JR, R.; KIRK, T. K. Changes in the molecular-size distribution of insoluble celluloses by the action of recombinant *Cellulomonas fimi* cellulases. **Biochem. J.**, v. 302, p. 463-469, 1994.
- KLEMAN-LEYER, K.; SIIKA-AHO, M.; TEERI, T.T.; KIRK, T.K. The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 8, p. 2883-2887, 1996.

- KLEYWEGT, G.J.; ZOU, J.Y.; DIVNE, C.; DAVIES, G.J.; SINNING, I.; STÅHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; SRISODSUK, M.; TEERI, T.T.; JONES, T.A. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. **J. Mol. Biol.**, v. 272, n. 3, p. 383-397, 1997.
- KOIVULA, A. Cellulose degradation by native and engineered fungal cellulases. In: INT. CONF. POLYSACCHARIDE ENGINEERING, 1., Trondheim, 6-8 June 1994. **Anais...** Trondheim, 1994.
- KOSSLER, I.; DANHELKA, J.; NETOPILIK, M. The carbanilate method for determination of the degree of polymerization of cellulose. **Svensk. Papperstidn. Research**, v. 18, p. R137-R140, 1981.
- KOTIRANTA, P.; KARLSSON, J.; SIIKA-AHO, M.; MEDVE, J.; VIKARI, L.; THERNELD, F.; TENKANEN, M. Adsorption and activity of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I endoglucanase II and the corresponding core proteins of steam pretreated willow. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 81, n. 2, p. 81-90, 1999.
- KUGA, S.; BROWN, R.M. Practical aspects of lattice imaging of cellulose. **J. Electr. Microsc. Tech.**, v. 6, p. 349-356, 1987.
- KUBICEK-PRANZ, E. M.; GSUR, A.; HAYN, M.A; KUBICEK, C.P. Characterization of Commercial *Trichoderma reesei* Cellulase Preparations by Denaturing Electrophoresis(SDS-PAGE) and Immunostaining Using Monoclonal Antibodies. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, n.14, p.317-324, 1991.
- KUBICEK, P. CHRISTIAN Mode of Action and Regulation. **Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 45, 1-17, 1992.
- LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **J. Mol. Biol.**, v. 76, p. 103-122, 1973.
- LINKO, M. *Trichoderma reesei* cellulases and other hidrolases: enzyme scrutures, biochemistry, genetics and applications. In: SUOMINEN,L.P.; REINIKAINEN,T (Eds.). **Fondation for biotechnical and industrial fermentation research**. Helsinki,v.8, 9-11, 1993.
- MACKENZIE, L.F.; SULZENBACHER, G.; DIVNE, C.; JONES, T. A.; WÖLDIKE, H. F.; SCHÜLEIN, M.; WITHERS, S. G.; DAVIES, G. J. *Humicola* endoglucanase I. **Biochem. J.**, v. 335, p. 409-416, 1998.

- MÄNTYLÄ, A.; PALOHEIMO, M.; SUOMINEN, P. **Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*: *Trichoderma* and *Gliocladium*.** UK, 1998. v. 2, p. 291-309.
- MARCHESSAULT, R.H.; SUNDARAJAN, P.R. Cellulose. In: ASPINALL, G. (Ed.). **The polysaccharides.** Orlando: Academic Press, 1983. v. 2, p. 11-95.
- MARRON, JR R.M. Biosynthesis of natural polymers. Symposium 3 rd Philip Morris, Richmond, Virginia, 1978, novembro 9, ed. Ellen M. Andar, New York. **Anais...** Philip Morris Incorporated. 1979. p. 51-123.
- MATA, I.; ESTRADA, P.; MACARRÓN, R.; DOMINGUES, J.M.; CASTLLÓN, M.P.; ACEBAL, C. Chemical mechanism of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414 **Biochem. J.**, v.283, p. 679-682, 1992.
- MATTINEN, M.-L.; LINDER, M.; TELEMAN, A.; ANNILA, A. Interaction between cellobiohexose and cellulose binding domains from *Trichoderma reesei* cellulases. **FEBS Lett.**, v. 407, p. 291-296, 1997.
- MIETTINEN-OINONEN, A.; HEIKINHEIMO, L.; MORGADO, J.; ALMEIDA, L.; OJAPALO, P.; CAVACO-PAULO, A.; BUCHERT, J. Biofinishing of cotton with *Trichoderma reesei* cellulases. In: CONGRESS IFATCC, 18., Copenhagen, 8-10 Sept. 1999. **Anais...** Copenhagen, 1999.
- MIETTINEN-OINONEN, A.; PERE, J.; ELOVAINIO, M.; ÖSTMAN, A.; PALOHEIMO, M.; SUOMINEN, P. Effects of cellulases on cotton fiber and fabric. In: PROCEEDINGS THE TEXTILE INSTITUTE'S WORLD CONFERENCE NICHES IN THE WORLD OF TEXTILES, 77., Tampere, 21-24 May 1996. **Anais...** Tampere, 1996. v. 1, p. 197-201.
- MILLER, D.; SENIOR, D.; SUTCLIFFE, R. Determination of the molecular weight distributions of xylanase-treated pulps. **J. Wood Chem. Technol.**, p. 11, 23-32, 1991.
- MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; BEATSON, R.; SADDLER, J. N. The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility of softwood substrates. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, p. 644-650, 1999.
- MUELLER, S. C. Cellulose microfibril assembly and orientation in higher plant cells with particular reference to seedlings of *Zea mays*. S. 87-104. In: BROWN, R.M. (Ed.). **Cellulose and other natural polymer systems.** New York: Plenum Press, 1982.

- MUELLER, S. C.; BROWN, R.M. The control of cellulose microfibril deposition in the cell wall of higher plants. **Planta (Berl.)**, v. 154, p. 501-515, 1982.
- NEVALAINEN, H.; PENTILLÄ, M. **Molecular biology of cellulolytic fungi**. Berlin: [s.n.], 1995. p. 303-319.
- NEVALAINEN, H.; PENTILLÄ, M.; HARKKI, A.; TERRY, T.; KNOWLES, J. **Molecular industrial mycology: systems and applications for filamentous fungi**. [New York]: Marcel Dekker, 1991.
- NEVELL, T.P. **Cellulose chemistry and its applications**. [New York]: John Wiley & Sons, 1985.
- NIDETZKY, B.; STEINER, W.; HAYN, M.; CLAEYSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. **Biochem. J.**, v. 298, p. 705-710, 1994.
- NIEVES, R. A.; ELLIS, R.P.; TODD, R.J.; JOHNSON, T.J.A.; GROHMANN, K.; HIMMEL, M.E. Visualization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I and endoglucanase I on aspen cellulose by using monoclonal antibody colloidal gold conjugates. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 57, p. 3163-3170, 1991.
- NULTSCH, W. **Botânica geral**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- NYSSÖNEN, E.; KERÄNEN, S. Multiple roles of the cellulase CBHI I enhancing production of fusion antibodies by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Curr. Genet.**, v. 28, p. 71-79, 1985.
- OFFORD, D.A.; LEE, N.E.; WOODWARD, J. Preparative Purification of *Trichoderma reesei* Native and "Core" Cellobiohydrolase I by Electrophoresis and Chromatofocusing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol.28/29, p. 377-386, 1991.
- OIJUSLUOMA, L.; CAVALO-PAULO, A.; SIIKA-AHO, M.; BUCHERT, J. Use of cellulases in treatment of cotton fabrics. In: PROCEEDINGS OF THE TEXTILE INSTITUTE'S WORLD CONFERENCE NICHES IN THE WORLD OF TEXTILES, 77., Tampere, 21-24 May 1996. **Anais...** Tampere, 1996. v. 2, p. 351-352.
- OKSANEN, T.; BUCHERT, J.; PERE, J.; VIKARI, L. Treatment of recycled kraft pulps with hemicellulases and cellulases. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 6., Vienna, 1996. **Biotechnology in the pulp and paper industry**. Vienna: Facultas Universitätsverlag, 1996. p. 177-180.

- OKSANEN, T.; PERE, J.; BUCHERT, J.; VIKARI, L. The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pulp. *Cellulose*, v. 4, n. 4, p. 329-339, 1997.
- PERE, J.; BUCHERT, J. Microscopy of *Trichoderma cellulases* on fibres. In: ACS NAT. MEET, 216., Boston, MA, 23-27 Aug. 1998. **Abstract...** Boston, 1998. (CELL 051).
- PERE, J.; ÖSTMAN, A.; PALOHEIMO, M.; VIKARI, L. Modification of cotton fibers by purified cellulases. In: PROCEEDINGS OF THE TEXTILE INSTITUTE'S WORLD CONFERENCE NICHES IN THE WORLD OF TEXTILES, 77., Tampere, 21-24 May 1996. **Anais...** Tampere, 1996. v. 2, p. 363-364.
- PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; BUCHERT, J.; VIKARI, L. Effects of purified *Trichoderma reesei* cellulases on the fiber properties of kraft pulp. **Tappi J.**, v. 78, n. 6, p. 71-78, 1995.
- PERE, J.; ELLMEN, J.; GULLICHSEN, J.; VIKARI, L. Cellulases in secondary refining of mechanical pulp. In: EUCEPA CONF. CROSSING THE MILLENNIUM FRONTIER EMERGING TECHNICAL AND SCIENTIFIC CHALLENGES, 27., Grenoble, 11-14 Oct. 1999. **Anais...** Grenoble: [s.n.], 1999. p. 39-42.
- PILZ, I.; SCHWARZ, E.; KILBURN, D.G.; MILLER JR, R.C.; WARREN, R.A.; GILKES, N.R. The tertiary structure of a bacterial cellulase determined by small-angle X-ray-scattering analysis. **Biochem. J.**, v. 271, p. 277-280, 1990.
- POLGLASE, W.J. Polysaccharides associated with wood cellulose. In: WOLFROM, M.L.; TIPSON, R.S. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, 1995. p. 283-333.
- POMMIER, J.-C.; FUENTES, J.-L.; GOMA, G. Using enzymes to improve the process and product quality in the recycled paper industry. Part I. The basic laboratory work. **Tappi J.**, v. 72, p. 187-191, 1989.
- POMMIER, J.-C.; GOMA, G.; FUENTES, J.-L.; ROUSSET, C.; JOKINEN, O. Using enzymes to improve the process and product quality in the recycled paper industry. Part II. Industrial applications. **Tappi J.**, 73, p. 197-202, 1990.
- PONER, R.A. **Handbook for textile chemistry**. Raleigh NC-USA: School of Textiles, NCSU, 1999.
- POUTANEN, K.; HÄRKÖNEN, H.; LAURIKAINEN, T.; SUORTTI, T.; AUTIO, K.; TENKANEN, M. Influences of hemicellulases in cereal processing. In: PROC.

NORDIC CEREAL CONGRESS THE NORDIC CEREAL INDUSTRY
TOWARDS YEAR 2000, 26., Haugesund, 12-15 May 1996. *Anais...*
Haugesund: [s.n.], 1996. p. 145-151.

PRESTON, R. D. **The physical biology of plant cell walls.** London: Chapman and Hall, 1974.

RAHKAMO, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L.; LEPPÄNEN, T.; BUCHERT, J.
Effects of cellulases and hemicellulases on the alkaline solubility of dissolving pulps. *Holzforschung*, v. 52, p. 630-634, 1998. (a)

RAHKAMO, L.; VEHVILÄINEN, M.; VIKARI, L.; NOUSIAINEN, P.; BUCHERT, J.
Modification of dissolving pulp by hydrolysis with cellulase enzymes. In:
ERIKSSON, K.-E.L.; CAVACO-PAULO, A. (Eds). **Enzyme applications in fiber processing.** Washington, DC: ACS, 1998. p. 318-327. (ACS Symp. Ser. 687).(b)

RAMOS, L. P. Determination of cellulose degree of polymerization using universal calibration and gel permeation chromatography. In: PROCEEDINGS OF THE VII BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 7, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2001. *Anais...* Belo Horizonte:[s.n],2001.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J.N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 34/35, p. 37-47, 1992a.

RAMOS, L.P. **Steam pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus viminalis* chips.** Ottawa, 1992b. Tese (Doutorado) – School of Graduate Studies and Research, University of Ottawa.

RAMOS, L.P., SADDLER, J.N. Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 45/46, 1994.

RAMOS, L.P., ZANDONÁ F°, A.; DESCHAMPS, F.C.; SADDLER, J.N. The effect of *Trichoderma cellulase* on the fine structure of a bleached softwood kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 24, p. 371-380, 1999.

RAMOS, L.P.; BREUIL, C.; KUSHNER, D.N.; SADDLER, J.N. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. *Holzforschung*, v. 46, p. 149-154, 1992b.

RAMOS, L.P.; NAZHAD, M.M.; SADDLER, J.N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, p. 821-831, 1993.

RAMOS, L.P.; RODRIGUES, C.; ZANDONÁ F^o, A.; MOONEY, C.; SADDLER, J.N. Characterization of the activity profile of several genetically modified *Trichoderma* cellulase preparations. In: PROCEEDINGS BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 5., Curitiba, PR, Brazil, 1997. **Anais...** Curitiba: [s.n.], 1997. p. 413-421.

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

REINIKAINEN, T. **The cellulose binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei***. Helsinki, Finland, 1994. Tese (Doutorado),University Helsinki, VTT Publications. Research Triangle Park, NC: American Association of Textile Chemists and Colorist, 70-76.

REINIKAINEN, T.; HENRIKSSON, K.; SIIKA-AHO, M.; TELEMAN, O.; POUTANEN, K. Low level endoglucanase contamination in a *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II preparation affects its enzymatic activity on β -glucan. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 17, p. 888-892, 1995.

ROLAND, J.C.; VIAN, B. The wall of the growing plant cell: its three-dimensional organization. **Int. Rev. Cytology**, v. 61, p. 129-166, 1979.

SADDLER, J.N. Factors limiting the efficiency of cellulase enzymes. **Microbiology Science**, v. 3, p. 84-87, 1986.

SADDLER, J.N.; BROWNELL, H.H.; CLERMONT, L.P.; LEVITIN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 24, p. 1389-1402, 1991.

SALOHEIMO, A.; ARO, N.; ILMÉN, M.; PENTTILÄ, M. **A yeast based cloning system for regulatory genes, applied for *Trichoderma cellulases***. Tricel 97, Ghent, 28-30 Aug. 1997. p. 47.(a)

SALOHEIMO, A.; HENRISSAT, B.; HOFFRÉN, A.-M.; TELEMAN, O.; PENTTILÄ, M. A novel, small endoglucanase gene, *EG15*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 219-228, 1994.

- SALOHEIMO, A.; HENRISSAT, B.; PENTILLA, M. *Trichoderma reesei* cellulases and other hidrolases: enzyme scrutures, biochemistry, genetics and applications. In: SUOMINEN, L.P.; REINIKAINEN, T (Eds.). **Fondation for biotechnical and industrial fermentation research**. Helsinki,v.8, 9-11, 1993. p. 139-146.
- SALOHEIMO, M.; NAKARI-SETÄLÄ, T.; TENKANEN, M.; PENTTILÄ, M. DNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v. 249, p. 584-591, 1997(b).
- SANTOS, C.A.; ANDRADE, M. A.; TSUCHIDA, S. Cozimentos contínuo e convencional modificado (MCC) e estendido (EMCC): a experiência da Bahia Sul Celulose S/A. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE DESLIGNIFICAÇÃO, Vitória, ES, 08-12 de agosto, 1994. **Anais...** São Paulo: ABTCP. p. 77-88.
- SARKO, A. Recent X-ray crystallographic studies of celluloses. In: YOUNG, R.A.; ROW, R.M. (Eds.). **Cellulose: structure, modification, and hydrolysis**. New York: Wiley Interscience, 1986. p. 29-66.
- SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN, A.E.; CONRAD, C.M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Text. Res. J.** , 29, 786-793, 1959.
- SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; HAUSALO, T.; PULS, J.; VIIKARI, L. Degradation of xylan by hemicellulases of *Trichoderma reesei*. In: INT. TRICHODERMA/GLIOCLADIUM WORKSHOP, AGRICULTURE RESEARCH SERVICE, 5., Beltsville, MD, USA 18-20 April 1995. **Anais...** Beltsville: [s.n.], 1995. p. 26.
- SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry, fundamentals and applications**. 2nd ed. California: Academic Press, 1993. 215p.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **J.Biol. Chem.**,v. 195, p. 19-23, 1952.
- SRISODSUK, M. **Mode of action of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose**. Espoo, Finland, , 1994, Tese (Doutorado)... University Helsinki.
- STÅHLBERG, J.; DIVNE, C.; KOIVULA, A.; RUOHONEN, L.; TEERI, T.; JONES, T.A. Engineering of cellulases in *Trichoderma reesei*. In: ESTRADA, M.P. et al. (Eds.). **Advances in mödern biotechnology**. Habana: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 1995. (Biotecnologia Habana'95, Habana, 13-18 Nov. 1995).

- STEPHEN, Y.L.; DENCE, C.W. **Methods in lignin chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- SUGIYAMA, J. High resolution observations of cellulose microfibrils. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 20, p. 98-99, 1994.
- SUGIYAMA, J. Morphology and structure of crystalline cellulose. In: SUOMINEN, L.P.; REINIKAINEN, T. (Eds.). **Fondation for biotechnical and industrial fermentation research**. Helsinki, v. 8, 9-11, 1993. p. 15-23.
- SUGIYAMA, J. Transformation of *Valonia* cellulose crystals by an alkaline hydrothermal treatment. **Macromolecules**, v. 23, p. 2461-2466, 1991.
- SUOMINEN, P.L.; MÄNTYLÄ, A.; KARHUNEN, T.; HAKOLA, S.; NEVALAINEN, H. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Effects of deletions of individual cellulase genes. **Mol. Gen. Genet.**, v. 241, p. 523-530, 1993.
- SUURNÄKKI, A. **Hemicellulases in the bleaching and characterisation of kraft pulps**. Espoo: [s.n.], 1996. 85 p. (VTT Publications 267).
- SUURNÄKKI, A.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; VIHKARI, L. Effects of *Trichoderma cellulases* and their structural domains on pulp properties. In: PROC. TAPPI BIOLOGICAL SCIENCES SYMP., San Francisco, CA, 20-23 Oct. 1997. **Anais...** San Francisco: [s.n.], 1997. p. 283-287.
- TAKAY, M.; HAYASHY, J.; NISIZAWA, K.; KANDA, T.J. The structure of polymers. **App. Poly. Sci. App. Poly Symp.**, v. 37, p. 345-361, 1983.
- TALMADGE, K.W.; KEEGSTR, K.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 158-173, 1973.
- TAPPI test methods. Atlanta, 1998.
- TEERI, T.T. ***Trichoderma reesei* cellulases: biochemistry, genetics, physiology and applications**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1990. p. 156-167.
- TEERI, T.T. **Cellulose-cellulase interactions as revealed by site-directed mutagenesis of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases**. Tricel 97: Carbohydrases from *Trichoderma reesei* and other microorganisms, Ghent, 28-30 Aug. 1997. L2.(a)

- TEERI, T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 160-167, 1997.(b)
- TEERI, T.T.; CULLEN, D.; DIVNE, C.; DENMAN, S.; JONES, T.A.; KOIVULA, A.; LINDER, M.; STÅHLBERG, J.; WOHLFAHRT, G.; ZOU, J.-Y. Fungal cellobiohydrolases and the degradation of crystalline cellulose. In: OHMIYA, K. et al. (Eds.). **Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation**. Tokyo: UNI, 1999. p. 35-41. (Proc. MIE Bioforum 98).
- TEERI, T.T.; KOIVULA, A. Cellulose degradation by native and engineered fungal cellulases. **Carbohydr. Eur.**, v. 12, p. 28-33, 1995.(a)
- TEERI, T.T.; KOIVULA, A.; LEHTIÖ, J.; LINDER, M.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; SRISODSUK, M.; CLAEYSSSENS, M.; JONES, T.A. Enzymatic degradation of crystalline cellulose: modes of action of two fungal cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*. In: INT. CONF. PERSPECTIVES ON PROTEIN ENGINEERING: FROM FOLDS TO FUNCTIONS, 5., Montpellier, 2-6 March 1996. **Anais...** Montpellier: [s.n.], 1996. p. 19.
- TEERI, T.T.; KOIVULA, A.; LINDER, M.; WOHLFAHRT, G.; DIVNE, C.; JONES, T.A.; *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? **Biochem. Soc. Transact.**, v. 26, p. 173-178, 1998.
- TEERI, T.T.; KOIVULA, A.; LINDER, M.; WOHLFAHRT, G.; RUOHONEN, L.; LEHTIÖ, J.; REINIKAINEN, T.; SRISODSUK, M.; KLEMAN-LEYER, K.; KIRK, T.K.; JONES, T.A. Cellulose-cellulase interactions of native and engineered cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*. In: CLAEYSSSENS, M.; NERINCKX, W.; PIENS, K. (Eds.). **Carbohydrases from *Trichoderma reesei* and other microorganisms**. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1998. p. 3-12. (Proc. Tricel '97 Meet., Ghent, 28-31 Aug. 1997).
- TEERI, T.T.; KOIVULA, A.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; SRISODSUK, M.; DIVNE, C.; ROUVINEN, J.; SZARDENINGS, M.; JONES, T.A. **Hydrolysis of crystalline cellulose by native and engineered *Trichoderma reesei* cellulases**. San Diego, 1994. (Abstract AGFD 21, 1994. 207th ACS Nat. Meet.).
- TEERI, T.T.; KOIVULA, A.; RUOHONEN, L.; REINIKAINEN, T.; SRISODSUK, M.; CLAEYSSSENS, M.; JONES, T.A. Modes of action of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*. In: CARBOHYDRATE BIOENGINEERING MEET., Elsinore, 23-26 April 1995. **Abstract...** Elsinore: [s.n.], 1995. S-23.(b)
- TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; RÄTTÖ, M.; SUURNÄKKI, A.; VIKARI, L. **Effect of binding of hemicellulases on the hydrolysis of lignocellulosics**. San Diego, 1994. (Abstract BTEC 150, 1994. 207th ACS Nat. Meet.).

- TENKANEN, M.; SIIKA-AHO, M. **Comparison of the cellulase and xylanase activities of the endoglucanase I from *Trichoderma reesei***. Tricel 97, Ghent, 28-30 Aug. 1997. p.19.
- TENKANEN, M.; SUURNÄKKI, A.; SIIKA-AHO, M.; PALONEN, H.; LINDER, M.; KOTIRANTA, P.; TJERNELD, F.; BUCHERT, J.; VIKARI, L. **Cellulase core proteins from *Trichoderma reesei*; binding properties and efficiency cellulose hydrolysis**. Anaheim, CA, 1999. (217th ACS Nat. Meet., Anaheim, CA, 21-25 March 1999, CELL-018).
- TOMAZ, C.T.; QUEIROZ, J.A. Studies on the chromatographic of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction. **J. Chromatography A**, v.. 865, p. 123-128, 1999.
- UMILE, C.; KUBICEK, C.P. A constitutive, plasma-membrane bound β -glucosidase in *Trichoderma reesei*. **FEM. Microbiol Lett.**, v. 34, p. 291-295, 1986.
- VALTASAARI, L.; SAARELA, K. Determination of chain length distribution of cellulose by gel permeation chromatography using the tricarbnilate derivative. **Paperi ja Puu**, v. 57, p. 5-10, 1975.
- VIAN, B.; REIS, D. Relationship of cellulose and other cell wall components: supramolecular organization. In: HAIGLER, C.H.; WEIMER, P.J. (Eds). **Biosynthesis and biodegradation of cellulose**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 25-30.
- VICENT, J.V. From cellulose to cell. **The Journal of Experimental Biology**, Great Britain, v. 202, p. 3263-3268, 1999.
- VICENTE, V. A. **Isolamento e seleção de fungos lignocelulolíticos**. Piracicaba, 1989. 173 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo.
- VIKARI, L.; TENKANEN, M.; POUTANEN, K. Hemicellulases. In: FLICKINGER, M.C.; DREW, S.W. (Eds). **Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation**. Chichester: John Wiley & Sons, 1999. p. 1383-1391.
- VIKARI, LIISA. **Enzymes in the pulp and paper industry**. Boston: TAPPI, 2000.
- WISEMAN, ALAN. **Princípios de biotecnologia**. Zaragoza: Acribia, 1986.
- WOHLFAHRT, G.; DIVNE, C.; ZOU, J.-Y.; TELEMAN, O.; JONES, T.A.; TEERI, T.T. **Molecular modelling of possible intermediates of the hydrolytic reaction**

- by the cellobiohydrolases CBHI and CBHII from *Trichoderma reesei*. Tricel 97, Ghent, 28-30 Aug. 1997. p. 21.
- WONG, K.K.Y.; DEVERELL, K.F.; MACKIE, K.L.; CLARK, T.A.; DONALDSON, L.A. The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam exploded *Pinus radiata*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 31, p. 447-456, 1988.
- WOOD, B.F.; CONNER, A. H.; HILL JR., C.G. The effect of precipitation on the molecular weight distribution of cellulose tricarbonylate. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 32, p. 3703-3712, 1986.
- WOOD, T. **Byosynthesis and biodegradation of cellulose**. [New York]: Marcel Dekker, 1991. p.491-534.
- WOOD, T. Mechanisms of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In: COUGHLAN, M.P. (Ed.). **Enzyme systems for lignocellulose degradation**. New York: Elsevier, 1989. p. 19-35.
- WOOD, T.M. et al. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. **Biochem. J.**, v. 171, p. 61-72, 1978.
- YAMASHIKI, T.; MATSUI, T.; SAITOH, M.; OKAJIMA, K.; KAMIDE, K.; SAWADA, T. Characterization of cellulose treated by the steam explosion method. Part 1: Influence of cellulose resources on changes in morphology, degree of polymerisation, solubility and solid structure. **British Polym. J.**, v. 22, p. 73-83, 1990.
- YAU, W.W.; KIRKLAND, J.J.; BLY, D.D. **Modern size-exclusion liquid chromatography**. New York: John Wiley & Sons, 1979. p. 7-12.