



MARINA LETICIA ALVES FERREIRA

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA O PROCESSO DE
PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

LAVRAS – MG

2019

MARINA LETICIA ALVES FERREIRA

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA O PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL
DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso, na forma de Monografia, apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Luciano Jacob Corrêa

Orientador

LAVRAS – MG

2019

MARINA LETICIA ALVES FERREIRA

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA O PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL
DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso, na forma de Monografia, apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 01 de julho de 2019.

| | |
|--|------|
| Profa. Dra. Isabele Cristina Bicalho | UFLA |
| Prof. Dra. José Guilherme Lembi Ferreira Alves | UFLA |
| Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa | UFLA |
| Dra. Pricila Maria Batista Chagas | UFLA |

Prof. Luciano Jacob Corrêa
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, resiliência e prover as condições necessárias para a realização deste trabalho.

A minha família, em especial meus pais e minha avó, por todo o apoio durante a graduação e em todos os momentos de minha vida.

Aos meus amigos, que tantas vezes me ajudaram para que este trabalho fosse concluído e estiveram presentes nos momentos em que mais precisei.

Ao meu orientador Luciano, pelo apoio constante e todo o conhecimento transmitido.

Ao corpo docente do curso de Engenharia Química pela formação que recebi durante minha graduação.

Aos Laboratórios do Departamento de Ciências dos Alimentos e do Departamento de Química, da Universidade Federal de Lavras, que forneceram material, estrutura e as condições necessárias para que esse trabalho fosse realizado.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta monografia.

O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais inteligência.
Henry Ford

RESUMO

O etanol de segunda geração é um potencial combustível pois possuiu uma queima mais limpa, liberando menos gases poluentes em relação aos combustíveis fósseis. Além disso, é produzido a partir de fontes renováveis, que são provenientes do resíduo da primeira geração do mesmo combustível, o que aumenta a capacidade produtiva, sem aumentar a área de cultivo da matéria-prima. Sua forma de produção mais usual demanda o uso de enzimas na etapa de hidrólise. Motivado pela redução de custos deste processo, este trabalho propõe dois métodos de imobilização enzimática: por encapsulamento em matriz de alginato de sódio e adsorção em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído. Foram avaliadas em cada método: a capacidade de imobilização, a resistência ao meio reacional e a quantidade de glicose produzida. Para avaliar a produção de glicose, os resultados das produções pelas enzimas imobilizadas foram comparados com a produção do açúcar pela enzima em sua forma livre, sendo que ambos passaram pelo processo de hidrólise sob as mesmas condições: pH 4,8, temperatura fixa em 50°C, agitação de 150 rpm e volume final de 50 mL. O método de encapsulamento não apresentou resistência ao meio já no primeiro uso, por isso precisou passar por adaptações que possibilitaram seu reuso. A produção de glicose apresentada por este método em dois usos foi 19,75% para enzimas imobilizadas em alginato 3%, e 36,85% para enzimas imobilizadas em alginato 4% em relação à quantidade de glicose produzida pela enzima em forma livre, e as esferas se romperam no segundo uso. O método de adsorção em esferas de quitosana ativadas por glutaraldeído apresentou resistência ao meio e apresentou uma produção de 38,69% da quantidade de glicose produzida pela enzima em forma livre em dois usos, porém, neste método as enzimas foram recuperadas ao final do segundo uso. Ao final do estudo os resultados do método de adsorção em esferas de quitosana foram reavaliados e concluiu-se que era viável economicamente pois apresentou resultados muito próximos aos da produção pela enzima livre. Com alguns aprimoramentos, o método de imobilização em esferas de quitosana tem potencial para apresentar ainda melhores resultados que podem vir a ser viáveis economicamente. Além disso, tais resultados podem ser importantes para o aprimoramento do processo de imobilização enzimática em trabalhos futuros.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração, Imobilização enzimática, Quitosana, Alginato, Hidrólise enzimática

ABSTRACT

The second generation ethanol is a potential fuel due to its cleaner combustion, releasing less pollutants gases compared to the fossil ones. Besides, the fuel is extracted from renewable sources, that comes from the residue of the same fuel from the first generation, raising the productivity capacity, without rising the cultivation area of the raw material. The most usual production method requires the use of some enzymes on the hydrolysis stage. Motivated by the reduction cost of the process, this work proposes two methods of enzymatic immobilization: by encapsulating in the sodium alginate matrix and absorption in chitosan spheres activated by glutaraldehyde. There was evaluated in each method: the immobilization capacity, the resistance of reactive medium and the amount of glucose produced. To evaluate the glucose production, the production result from the enzyme immobilization were compared to the sugar production of the enzyme in its free form, regarding that both has passed through the hydrolysis process under the same conditions: pH 4,8, temperature fixed on 50°C, mixing of 150rpm and the final volume of 50ml. The encapsulation method showed no resistance to the environment on first use, due to this fact it needed to go through adaptations that made possible the reuse. The glucose production showed by this method in couple uses has been 19,75%, to the alginate immobilized enzymes 3%, and 36,4% to the alginate immobilized enzymes 4% related to the glucose amount produces by the enzyme in its free form, and the spheres crashed on second use. The method of absorption in chitosan spheres activated by glutaraldehyde showed resistance to the environment and showed a production of 38,69% of the amount of glucose produced by the enzyme in its free form in a couple uses, although, on this method the enzymes were recovered in the end of the second use. At the end of the study the results of the adsorption method on chitosan spheres were reevaluated and it was concluded that it was economically viable because it presented results very close to those of the production by the free enzyme. With some improvements, the immobilization method in chitosan spheres has the potential to present even better results that may be economically feasible. Moreover, such results may be important for the improvement of the enzymatic immobilization process in future works.

Keywords: The second generation ethanol, enzymatic immobilization, chitosan, alginate, enzymatic hydrolysis

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 – Dados obtidos na plataforma digital da União da Indústria de Cana de Açúcar. | 13 |
| Figura 2.2 – Esquema simplificado do processo de produção do etanol de segunda geração. | 14 |
| Figura 2.3 – Estruturas parciais das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina. | 15 |
| Figura 2.4 – Esquema simplificado da ação do pré-tratamento sobre a biomassa. | 16 |
| Figura 2.5 – Esquema simplificado da reação entre enzima e substratos. | 18 |
| Figura 2.6 – Métodos de imobilização de biocatalisadores. | 20 |
| Figura 2.7 – Representação da cadeia molecular do alginato de sódio. | 22 |
| Figura 2.8 – Esquema simplificado da formação do gel de alginato para imobilização. | 23 |
| Figura 2.9 – Estrutura molecular parcial da quitosana. | 24 |
| Figura 2.10 – Exemplos de formação de hidrogéis. | 25 |
| Figura 2.11 – Esquema simplificado da ativação do gel de quitosana e posterior imobilização enzimática. | 26 |
| Figura 4.1 – Curva analítica de concentração de proteína. | 33 |
| Figura 4.2 – Esferas de alginato antes do primeiro uso | 34 |
| Figura 4.3 – Esferas de alginato imersas na solução de cura. | 35 |
| Figura 4.4 – Esferas de alginato após o primeiro uso. | 37 |
| Figura 4.5 – Curva analítica de concentração de glicose. | 38 |
| Figura 4.6 – Produção de glicose pela enzima livre. | 39 |
| Figura 4.7 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 2% alginato. | 40 |
| Figura 4.8 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 3% alginato. | 41 |
| Figura 4.9 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 4% alginato. | 42 |
| Figura 4.10 – Comparativo entre as produções de glicose com a enzima livre e imobilizadas. | 43 |
| Figura 4.11 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 3% alginato durante o primeiro uso. | 44 |
| Figura 4.12 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 3% alginato durante o segundo uso. | 45 |
| Figura 4.13 – Soma das produções de glicose pela enzima imobilizada 3% alginato durante os dois usos. | 46 |
| Figura 4.14 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 4% alginato durante o primeiro uso. | 47 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.15 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 4% alginato durante o segundo uso. | 48 |
| Figura 4.16 – Soma das produções de glicose pela enzima imobilizada 4% alginato durante os dois usos. | 49 |
| Figura 4.17 – Comparativo das produções de glicose pelas enzimas imobilizadas em alginato 3 e 4% e na forma livre. | 50 |
| Figura 4.18 – Dados da produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em esferas de quitosana durante o primeiro uso. | 51 |
| Figura 4.19 – Dados da produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em esferas de quitosana durante o segundo uso. | 52 |
| Figura 4.20 – Soma dos dados da produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em esferas de quitosana durante os dois usos. | 53 |
| Figura 4.21 – Comparativo entre as produções de glicose pelas enzimas: livre e imobilizada em esferas de quitosana. | 54 |
| Figura 4.22 – Comparação entre as produções totais de glicose pelas enzimas avaliadas nos experimentos. | 55 |
| Figura 4.23 – Comparação entre as curvas de produção de glicose pelas enzimas avaliadas nos experimentos. | 56 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 1 | Introdução | 10 |
| 2 | Referencial Teórico | 12 |
| 2.1 | O etanol como combustível | 12 |
| 2.2 | Etanol de segunda geração | 13 |
| 2.2.1 | Composição da biomassa lignocelulósica | 14 |
| 2.2.2 | Pré-tratamento | 15 |
| 2.2.3 | Hidrólise | 16 |
| 2.3 | Enzimas | 18 |
| 2.4 | Imobilização de biocatalisadores | 19 |
| 2.4.1 | Adsorção na superfície de um sólido | 20 |
| 2.4.2 | Aprisionamento em matriz porosa. | 21 |
| 2.4.3 | Floculação | 21 |
| 2.4.4 | Contenção da célula por barreiras | 21 |
| 2.4.5 | Suporte | 22 |
| 2.4.6 | Alginatos | 22 |
| 2.4.6.1 | Alginato de sódio utilizado em imobilização enzimática | 22 |
| 2.5 | Quitosana | 24 |
| 2.5.0.1 | Quitosana ativada com Glutaraldeído para imobilização enzimática | 24 |
| 3 | Materiais e Métodos | 28 |
| 3.1 | Material | 28 |
| 3.2 | Determinação de umidade | 28 |
| 3.3 | Imobilização enzimática | 29 |
| 3.3.1 | Método 1 – Imobilização por encapsulamento com Alginato de Sódio sem etapa de cura | 29 |
| 3.3.2 | Método 2 – Imobilização por encapsulamento com Alginato de Sódio com etapa de cura | 29 |
| 3.3.3 | Método 3 – Imobilização por adsorção usando Quitosana ativada com Glutaraldeído | 30 |
| 3.4 | Hidrólise enzimática da biomassa | 31 |
| 3.5 | Análises | 31 |
| 3.5.1 | Quantificação de açúcares | 31 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.5.2 | Quantificação de proteína | 32 |
| 4 | Resultados e Discussões | 33 |
| 4.1 | Umidade do material | 33 |
| 4.2 | Métodos de imobilização | 33 |
| 4.2.1 | Curva analítica de proteína | 33 |
| 4.2.2 | Método 1: Imobilização enzimática por aprisionamento em matriz porosa com Alginato de Sódio sem processo de cura | 34 |
| 4.2.3 | Método 2: Imobilização enzimática por aprisionamento em matriz porosa com Alginato de Sódio com processo de cura | 34 |
| 4.2.4 | Método 3: Imobilização por adsorção usando Quitosana ativada com Glutaraldeído | 35 |
| 4.3 | Hidrólise enzimática | 36 |
| 4.3.1 | Avaliação da resistência do processo de imobilização ao meio reacional . . | 36 |
| 4.3.2 | Curva analítica de glicose | 38 |
| 4.3.3 | Quantificação de glicose | 38 |
| 4.3.3.1 | Método 1: Imobilização enzimática por aprisionamento em matriz porosa com alginato de sódio sem processo de cura | 38 |
| 4.3.3.2 | Método 2: Imobilização enzimática por aprisionamento em matriz porosa com Alginato de Sódio com processo de cura | 43 |
| 4.3.3.3 | Método 3: Imobilização enzimática por adsorção em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído | 51 |
| 5 | Conclusão | 59 |
| | REFERÊNCIAS | 61 |

1 INTRODUÇÃO

Devido às constantes alterações nas condições climáticas causadas pelo aquecimento global, vem sendo desenvolvidos e estudados mundialmente, métodos para a redução destes efeitos maléficos que afetam o meio ambiente. A queima de combustíveis fósseis, com consequente emissão de carbono, é uma das principais causas agravantes do efeito estufa, e esta queima ocorre diariamente por milhões de veículos em todo o mundo. Por este motivo, a busca por um combustível substituto que seja renovável vem sendo amplamente estudada.

O uso de biocombustíveis representa uma das formas mais efetivas de reduzir as emissões de gases do efeito estufa associadas ao consumo energético no setor de transporte. No Brasil, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é o principal combustível substituto da gasolina, além de ser adicionado a ela em 27% (ANP, 2019) como exigência da legislação brasileira. No processo produtivo do etanol, é utilizado o caldo da cana, rico em açúcares, em especial a glicose, que ao passarem pelo processo de fermentação são convertidos em álcool. Neste processo existe um subproduto, o bagaço da cana, que poderia ser considerado um resíduo de produção. Na maioria dos casos, é queimado como fonte de combustível para aquecimento de equipamentos da própria usina, no entanto, este bagaço tem potencial para ser reaproveitado como matéria-prima do mesmo produto, pois o etanol também pode ser obtido a partir de materiais lignocelulósicos como ele, sendo denominado etanol de segunda geração.

Para produzir o etanol de segunda geração, são necessárias algumas etapas adicionais para possibilitar a conversão do bagaço-de-cana em etanol ao final do processo. Sabe-se que a biomassa é composta por celulose, hemicelulose e lignina, sendo que as duas primeiras podem ser convertidas em glicose e outros açúcares, que ao serem fermentados, se transformam em etanol. Inicialmente, o bagaço passa por um pré-tratamento que auxilia no processo de conversão da celulose e hemicelulose em glicose e outros açúcares, a hidrólise. Ela pode ocorrer por via química ou enzimática, sendo o segundo método o preferencial por diversos fatores vantajosos na comparação das rotas. No processo de hidrólise enzimática, as enzimas celulases são adicionadas ao processo, realizam a conversão, e permanecem no processo até o fim, não sendo recuperadas ou reutilizadas. Assim, em cada processo de hidrólise, uma nova carga de enzimas é adicionada.

O custo dessas enzimas é geralmente alto pois sua obtenção ocorre através de processos dispendiosos, e elas acabam sendo desperdiçadas pois são utilizadas uma única vez, sendo que ainda teriam capacidade para continuar sendo utilizadas em outras produções. Um dos

grandes desafios para tornar a produção de etanol de segunda geração economicamente viável é o custo, uma vez que as enzimas adicionadas ao processo se misturam com o meio, não sendo possível separá-las para seu reuso. Como alternativa para a viabilização e redução neste custo, vem sendo desenvolvidas algumas técnicas de imobilização de enzimas com o intuito de reutilizar esse biocatalisador em outros processos, pois com isso, torna-se possível coletá-las e reaproveitá-las em outros ciclos de hidrólise. Em sua tese, Souza (2018) realizou um estudo sobre a imobilização celular para reutilizá-las em processos fermentativos utilizando o método de aprisionamento em matriz porosa com alginato de sódio. Outros estudos como o de Pereira (2019) e Chagas (2014) testaram imobilização de enzimas pelo método de adsorção, utilizando quitosana como suporte, sendo no primeiro estudo a celulase a enzima utilizada. No trabalho de Raghu; Rajeshwara (2015) também foi estudada a imobilização enzimática através do aprisionamento em matriz porosa, porém utilizando alginato de sódio e outro tipo de enzima. Tais trabalhos serviram como inspiração para o desenvolvimento deste estudo e como auxílio para a elaboração das metodologias propostas. A imobilização enzimática é uma importante ferramenta para melhoria de processos industriais e especialmente, para redução de custos dos mesmos.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar dois métodos de imobilização enzimática: aprisionamento em matriz porosa por alginato de sódio e adsorção em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído. Além disso realizar a comparação entre a eficiência da enzima imobilizada e da enzima na forma livre durante o processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, quanto à conversão de biomassa em açúcares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O etanol como combustível

A cana-de-açúcar passou a ser cultivada no Brasil em 1532, nos grandes engenhos, com a finalidade de produção de açúcar e derivados alimentícios. Em 1908, Henry Ford lançou o Ford modelo T, o veículo era a novidade do momento por apresentar excelente custo em relação aos demais automóveis por ser produzido em série. Este veículo poderia ser movido a gasolina, querosene ou etanol. Ford defendia o uso do etanol, porém sua comercialização havia sido proibida nos Estados Unidos por volta de 1920 devido à Lei seca, que proibia o consumo e venda de bebidas alcoólicas no país, além disso, a gasolina era mais barata (UNICA, 2019). O primeiro estímulo ao etanol como aditivo se deu pelo Decreto 19.717 de 20 de fevereiro de 1931, que exigia a compra de etanol pelos importadores de gasolina com a intenção de adicionar 5% de etanol a ela (FARINA; RODRIGUES; SOUSA, 2013).

No século XX houve o início das preocupações com o meio ambiente e as tentativas de reduzir os impactos ambientais. A produção e utilização de etanol como combustível e fonte energética só passou a ter expressividade no Brasil a partir de 1970 (ROSA; GARCIA, 2009). Em 1973 o mundo viveu a primeira grande crise do petróleo em que houveram aumentos de 300% no valor do barril. Movido pela crise, o governo, através do Decreto nº 76.593/75, criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que incentivava a substituição dos derivados de petróleo nos combustíveis, como etanol anidro como substituto do chumbo tetraetila, um aditivo importado e altamente poluidor (SILVA et al., 2010). Em 1979, houve a segunda crise do petróleo, e no mesmo ano chegou ao Brasil o primeiro veículo movido a etanol, o Fiat 147, o que abriu as portas para a entrada de mais veículos que utilizavam este combustível. Em 2003 foram lançados os carros flex no Brasil, possibilitando o uso da mistura etanol e gasolina em qualquer proporção. Desde a sua introdução no país até meados de 2012, a redução das emissões de CO_2 na atmosfera foram reduzidas em mais de 160 milhões de toneladas. Com o aumento das temperaturas causado pelo aquecimento global, o etanol se tornou o principal combustível alternativo aos de origem fóssil, podendo reduzir em até 90% a emissão de carbono (UNICA, 2019).

A Figura 2.1 apresenta dados da produção de etanol das safras de 2000 a 2018.

Figura 2.1 – Dados obtidos na plataforma digital da União da Indústria de Cana de Açúcar.



Fonte: adaptada do site da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA)

A partir de tais dados é possível observar o crescimento na produção do etanol, pois com o lançamento dos carros flexíveis, a demanda pelo combustível cresceu bastante, uma vez que seu custo é menor e é uma fonte mais limpa.

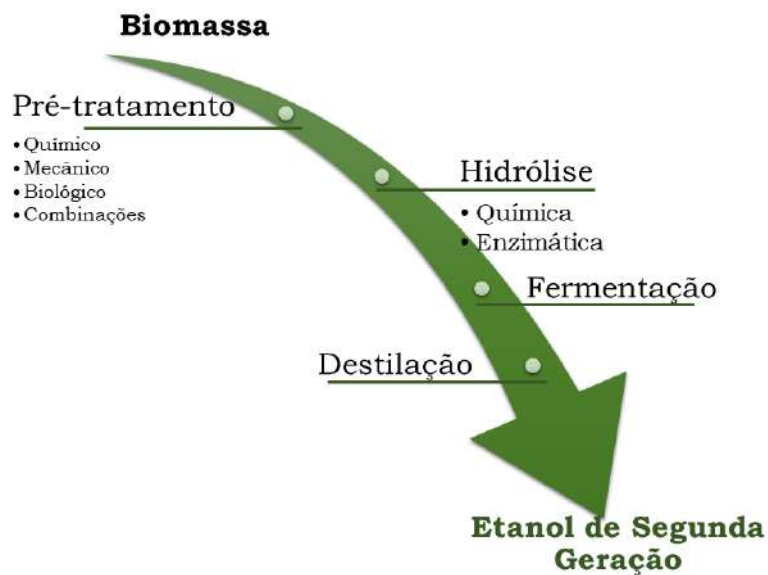
Apesar da grande redução na emissão de carbono obtida na substituição da gasolina pelo etanol como combustível veicular, é necessário avaliar outro parâmetro. No processo produtivo do etanol de primeira geração, é retirado o caldo da cana-de-açúcar que é fermentado e transformado em etanol. Deste processo, é gerado o resíduo bagaço de cana-de-açúcar. Na maioria das usinas, este bagaço é queimado como forma de geração de calor, sendo usado como combustível para equipamentos da própria usina. Como aproveitamento de energia, este processo é eficiente e de baixo custo, porém, promove a liberação de gases poluentes na atmosfera. Uma alternativa para aproveitar este resíduo de produção, é o etanol de segunda geração.

2.2 Etanol de segunda geração

O etanol pode ser obtido a partir de materiais lignocelulósicos, sendo denominado etanol de segunda geração (E2G). Dentre as vantagens da produção do E2G, podemos destacar: o aproveitamento completo da cana-de-açúcar e seus subprodutos; os insumos utilizados já estão disponíveis nas unidades produtivas, o que apresenta uma vantagem logística; é possível obter

um aumento da fabricação de etanol em até 50% sem ampliar a área de cultivo; o combustível pode ser produzido na entressafra da cana e ocorre a redução da emissão de carbono durante a produção, gerando um combustível mais limpo (RAÍZEN, 2019). O processo de produção do E2G a partir da biomassa é representado pela Figura 2.2.

Figura 2.2 – Esquema simplificado do processo de produção do etanol de segunda geração.



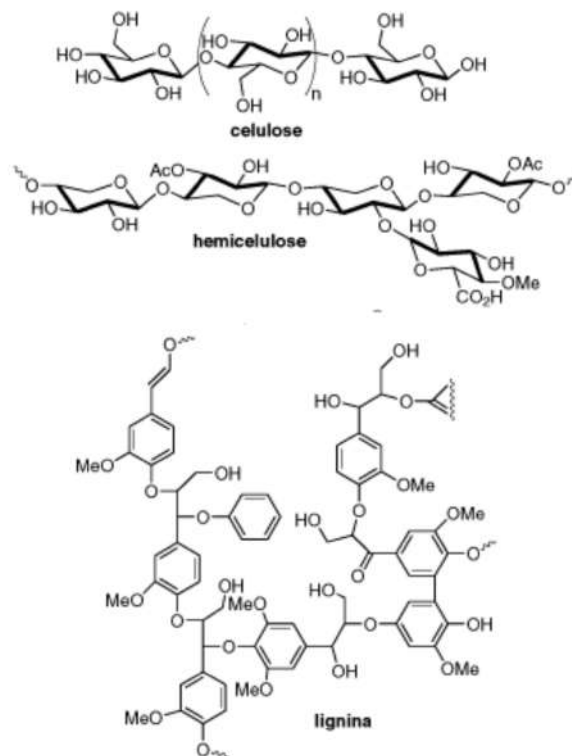
Fonte: Do autor

2.2.1 Composição da biomassa lignocelulósica

Presente em abundância na natureza, a biomassa lignocelulósica é uma potencial matéria prima para a produção de biocombustíveis. O material lignocelulósico é formado principalmente por três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, que se encontram associadas por pontes de hidrogênio ou ligação covalentes (PACHECO, 2011). A celulose é a matéria orgânica mais abundante sobre a Terra, e o principal componente da parede celular da fibra vegetal. Por ser um polímero de cadeia longa composto de um só monômero, a glicose, é classificado como homopolissacarídeo. As hemiceluloses são macromoléculas intimamente ligadas à celulose, com funções relacionadas à regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Estes polissacarídeos são formados por diferentes unidades de açúcares pertencentes aos grupos das pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxiexoses. Já a lignina é composta por uma rede de anéis aromáticos. É o último componente da parede celular e confere rigidez, impermeabilidade e resistência à fibra vegetal (SANTOS et al., 2012).

A rigidez da planta é promovida pela compactação das cadeias de celulose ligadas à lignina, responsável por agir como barreira física contra ataques de microorganismos, através da hemicelulose, formando uma rede fibrosa. Esta rede é extremamente resistente, e um fator dificultante para o processo de hidrólise, pois forma uma barreira contra o ataque enzimático (RABELO et al., 2010). A Figura 2.3 apresenta as estruturas moleculares parciais da celulose, hemicelulose e lignina.

Figura 2.3 – Estruturas parciais das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina.



Fonte: (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009) com modificações.

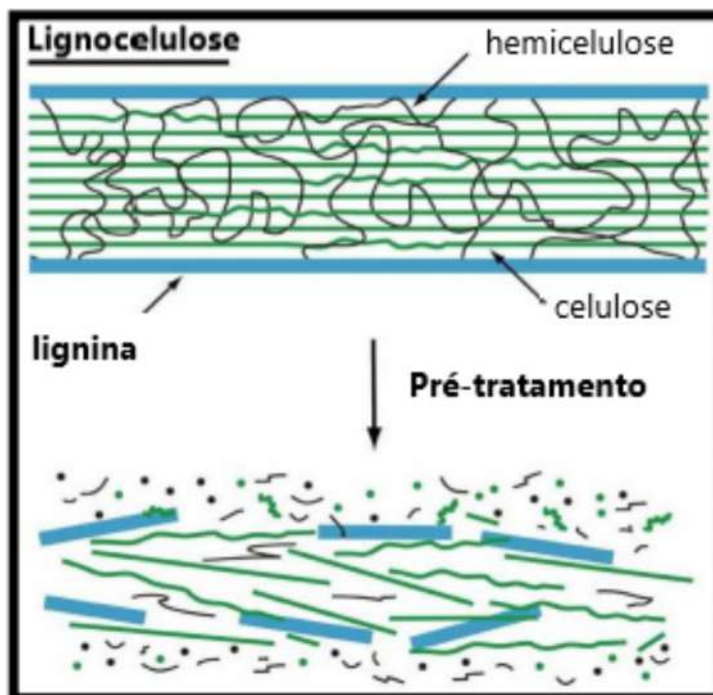
Para vencer esta resistência e promover a hidrólise, é necessário realizar um pré-tratamento do material lignocelulósico.

2.2.2 Pré-tratamento

O pré-tratamento tem por objetivos: reduzir o grau de cristalinidade da celulose, aumentar sua área superficial e a porosidade do material, além de reduzir ou evitar a formação de compostos inibidores na sequência do processo. Tal pré-tratamento aumenta de maneira significativa a eficiência da hidrólise enzimática, além de ser extremamente necessário pois algumas características de materiais lignocelulósicos, dificultam a degradação enzimática da celulose,

trazendo dificuldades para sua quebra em glicose ou outros açúcares fermentáveis (SANTOS et al., 2012). De modo geral, um pré-tratamento precisa ser seletivo, funcional, simples, higiênico, econômico e seguro. Seu princípio é o rompimento das barreiras para que a enzima possa penetrar e realizar a hidrólise (RABELO et al., 2010). A Figura 2.4 apresenta um esquema da ação do pré-tratamento sobre a biomassa, tornando o material lignocelulósico mais amorfo.

Figura 2.4 – Esquema simplificado da ação do pré-tratamento sobre a biomassa.



Fonte: (SANTOS et al., 2012) com modificações.

Os métodos do pré-tratamento podem ser físicos, químicos, biológicos ou uma combinação deles. Um exemplo é o pré-tratamento hidrotérmico que consiste em aplicar uma pressão que mantenha a água no estado líquido mesmo em temperaturas elevadas que variam entre 160 a 240°C. Tal processo faz com que ocorram modificações na estrutura do material lignocelulósico. Esse processo promove a solubilização da hemicelulose utilizando da água quente, e confere maior acessibilidade à celulose (CORRÊA, 2016).

2.2.3 Hidrólise

A etapa seguinte ao pré-tratamento é a hidrólise, que tem o objetivo de quebrar os polissacarídeos presentes na biomassa, formando a glicose. A hidrólise pode ser realizada pelas rotas química, utilizando ácidos, ou enzimática, utilizando enzimas. Na hidrólise química, utiliza-se ácidos diluídos ou concentrados, sendo realizada em dois estágios. No primeiro, a hemicelu-

lose é hidrolisada, e no segundo, é necessária a elevação da temperatura para melhor hidrólise da celulose, ambas presentes na biomassa pré-tratada. Neste processo existem desvantagens pontuais como: o custo com a manutenção devido aos problemas com corrosão nas tubulações e equipamentos, condições severas como tempo de reação, pH e temperatura, a separação da lignina após o pré-tratamento é necessária para a hidrólise ácida e também pode haver reação entre o reagente e o produto, reduzindo a conversão da reação (CORRÊA, 2016).

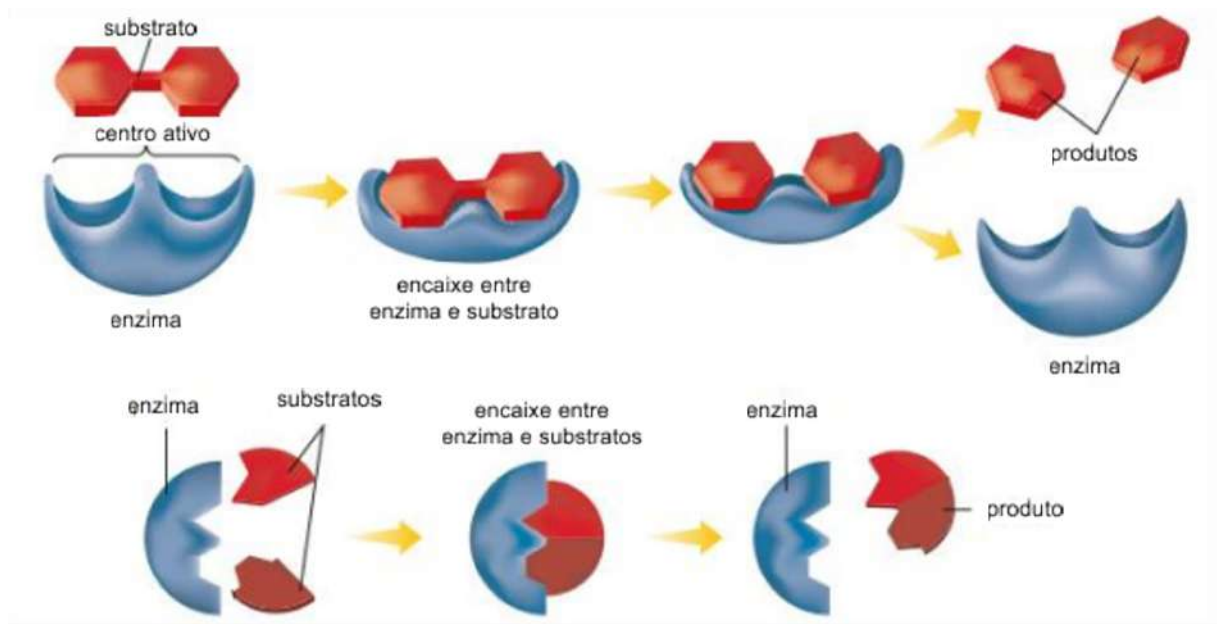
A hidrólise enzimática é uma etapa relativamente lenta pois no substrato estão presentes a lignina e a hemicelulose além da celulose, o que faz com que o processo seja mais complexo. Para que seja eficiente, é necessário escolher a enzima adequada, que consiga produzir glicose a partir do substrato, e não promova inibição do processo de fermentação (ROSA; GARCIA, 2009). As condições do processo de hidrólise enzimática são mais brandas em relação às do processo de hidrólise ácida, com pH entre 4,0 e 5,0, e temperaturas entre 40 e 50°C. O processo ocorre inicialmente pela adsorção da enzima à superfície do substrato, seguida pelo rompimento da ligação glicosídica por hidrólise, e posterior dessorção da superfície e retorno da enzima ao meio. O rendimento deste processo depende de inúmeros fatores relacionados às condições ótimas de reação da enzima, como pH, temperatura, concentração de substrato e produto. Cada enzima funciona bem em condições particulares, e devem ser respeitadas para que seu rendimento seja o melhor possível. As enzimas utilizadas em escala industrial geralmente são produzidas por micro-organismos tais como bactérias e fungos, e sua produção tem alto custo, sendo esta uma das principais dificuldades da viabilidade da hidrólise enzimática (ROSA; GARCIA, 2009).

Posteriormente à hidrólise, ocorrem as etapas comuns à produção do etanol de primeira e segunda geração, que são a fermentação da glicose e a destilação. No etanol de primeira geração, a glicose é obtida a partir do caldo da cana-de-açúcar, e na produção do etanol de segunda geração, é proveniente do hidrolisado. A fermentação ocorre pela ação de micro-organismos, principalmente leveduras, que atuam convertendo a glicose em álcool etílico através da sua oxidação anaeróbica (MACIEL, 2013). A destilação é a última etapa, que serve para separar o etanol da água, concentrando a solução para o teor alcoólico necessário para a comercialização do etanol hidratado como combustível ou etanol anidro, que é adicionado à gasolina.

2.3 Enzimas

As enzimas são biocatalisadores que estão sujeitos à inativação por diversos fatores, tendo assim restrições de seu uso em reações. Durante o uso ou a estocagem, devem ser observadas condições físicas, químicas e biológicas que podem favorecer a catálise, ou inativar a enzima (BEZERRA et al., 2008). As reações catalisadas por enzimas ocorrem no sítio ativo que se liga ao substrato, formando um complexo, representado pela Figura 2.5, e cada enzima se liga a um substrato. Devido a essa alta especificidade e seletividade, a enzima é vantajosa em relação aos catalisadores químicos convencionais, pois evita a formação de produtos indesejados e aumenta a pureza. Além disso, são catalisadores muito eficientes e trabalham em condições brandas de operação (PEREIRA et al., 2019).

Figura 2.5 – Esquema simplificado da reação entre enzima e substratos.



Fonte: (LINHARES S. GEWANDSZNAJDER, 2013)

As enzimas celulases são capazes de hidrolizar as ligações glicosídicas β 1,4 da celulose. Formam um complexo enzimático em que as enzimas presentes atuam em sinergia, ou seja, a atividade enzimática dessas espécies juntas, é maior do que sua soma, quando avaliadas separadamente (PEREIRA et al., 2019). Com este complexo enzimático é possível realizar a hidrólise da celulose envolvendo a ação principalmente das três classes de enzimas: endo-1,4- β -glucanases (responsáveis por atacar as cadeias de celulose, produzindo polissacarídeos de menor comprimento), Exo-1,4- β -glucanases (promovem a remoção da celobiose ao atacar os terminais não redutores dessas cadeias mais curtas de polissacarídeos) e β -glucosidases (res-

ponsáveis por hidrolisar a celobiose e outros oligômeros, convertendo-os em glicose) (CORREIA, 2016). Existem relatos da utilização de celulasas para a modificação de polpas celulósicas desde 1959. Porém, a produção dessas enzimas em escala industrial, teve início apenas na década de 80, para sua utilização como aditivo para ração animal. É produzida por fungos e bactérias para ser comercializada.

O custo das enzimas é geralmente alto devido à complexidade de sua produção, e na maior parte dos processos, ela é dispersa no meio e não é recuperada. Em alguns casos, não retirá-la do meio pode ser até prejudicial às etapas seguintes do processo, uma vez que ela pode reagir com algum reagente das etapas seguintes. Diante de tais problemas surgiram os estudos sobre métodos de imobilização enzimática para conferir maior estabilidade às enzimas, reduzir sua inativação por influência de pH, temperatura ou substâncias no meio reacional, além de possibilitar sua reutilização.

2.4 Imobilização de biocatalisadores

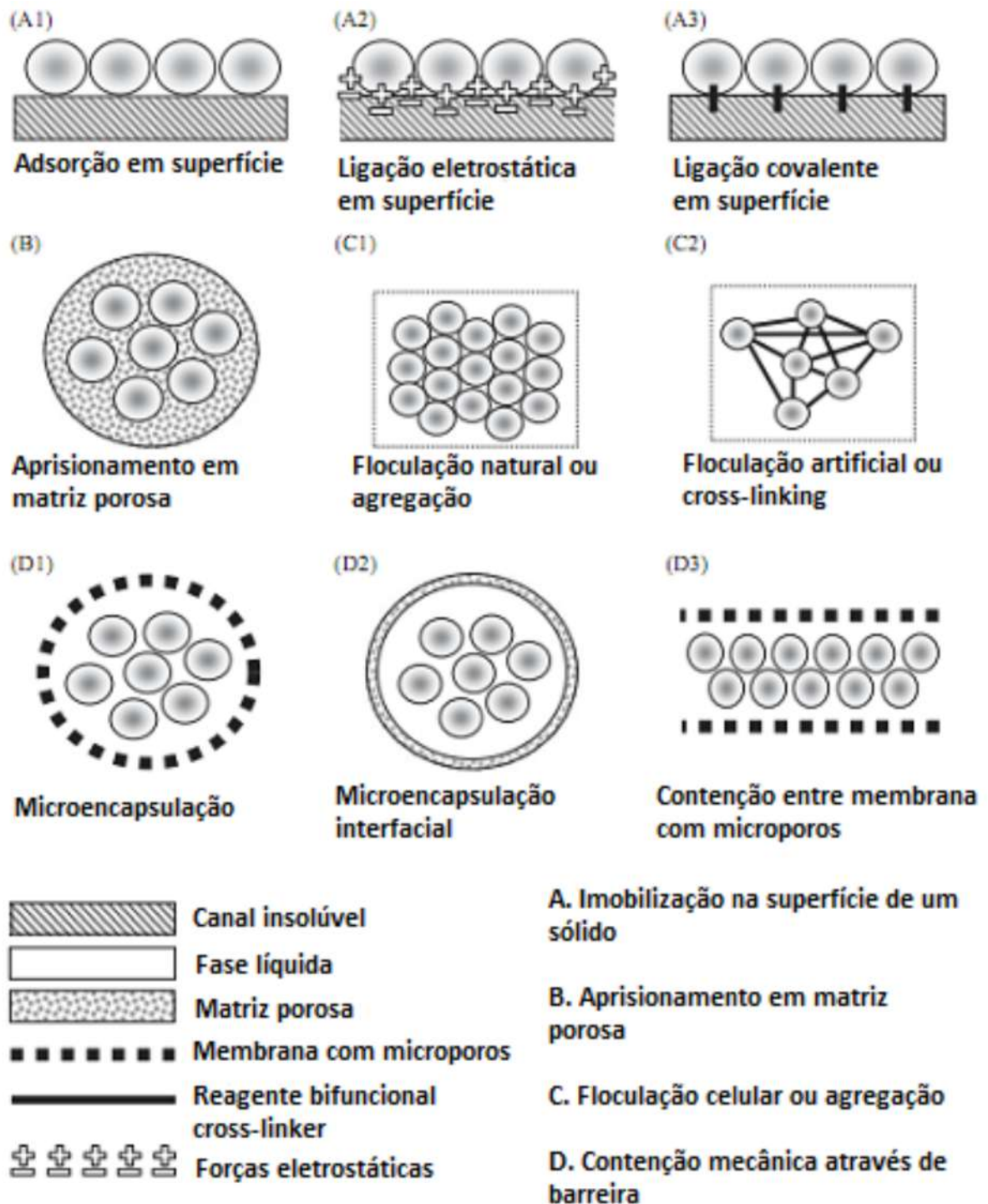
A imobilização de biocatalisadores é uma ferramenta essencial para estabilização e redução de problemas com inativação, o que é atrativo do ponto de vista industrial, trazendo melhorias no processo, além de economia com o reuso proporcionado (CHAGAS et al., 2014).

Na indústria, as técnicas de imobilização tiveram início no princípio do século XIX, com as pesquisas voltadas para o processo de produção de vinagre e filtros biológicos para o tratamento de resíduos. A partir da década de 60, surgiram as técnicas mais atuais para a imobilização de biocatalisadores (SOUZA, 2018). O processo de imobilização consiste em confinar a enzima, ou o biocatalisador em questão, a um material suporte que pode ser orgânico ou inorgânico, facilitando a separação do catalisador da solução, podendo melhorar sua estabilidade, reduzir sua inativação e até melhorando sua ação para realizar seu objetivo.

Para cada enzima, existe um método de imobilização ideal que trará melhores resultados para sua aplicação. É necessário escolher o método mais simples e barato, que possibilite melhor estabilidade operacional e mantenha a atividade enzimática (MENDES et al., 2011).

Segundo Kourkoutas et al. (2004), os métodos de imobilização de biocatalisadores podem ser classificados em quatro tipos, adsorção na superfície de um sólido, aprisionamento em uma matriz porosa, floculação celular ou agregação, e contenção mecânica através de barreiras, conforme ilustrado pela Figura 2.6.

Figura 2.6 – Métodos de imobilização de biocatalisadores.



Fonte: (DUARTE et al., 2011)

2.4.1 Adsorção na superfície de um sólido

No método da adsorção na superfície de um sólido, ocorre a adsorção física, em que a estabilização do biocatalisador é realizada por interações com o suporte, como forças de van der

Walls, ligações de hidrogênio e ligações iônicas. É comumente o método mais empregado para imobilizar enzimas por ser o mais simples e alterar muito pouco a estrutura conformacional da enzima. Em contrapartida, conforme variações de pH, pode ocorrer facilmente a dessorção da enzima (KOURKOUTAS et al., 2004).

2.4.2 Aprisionamento em matriz porosa.

A imobilização por aprisionamento em matriz porosa é uma encapsulação, onde ocorre uma retenção física das enzimas nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa, geralmente polimérica, pode ser composta por exemplo por gelatina, alginato ou poliacrilamida. Este método pode promover a imobilização de mais de um tipo de enzima em uma única etapa, além de permitir grande área superficial para o contato da enzima com o substrato. Entretanto, o processo só pode ser aplicado em biocatalisadores de baixa massa molecular, sendo necessária uma alta concentração de enzima para garantir a encapsulação, podendo ocorrer difusão na matriz porosa além de que durante o processo de imobilização, a enzima pode sofrer inativação (RAGHU; RAJESHWARA, 2015).

2.4.3 Floculação

A imobilização por floculação ocorre naturalmente ou com a adição de agentes artificiais de floculação. Ocorre a agregação das enzimas umas as outras e ao atingir determinado tamanho e peso, os flocos formados se sedimentam. A floculação depende de fatores como pH, teor de oxigênio dissolvido e temperatura. É uma das técnicas com melhor potencial para uso em reatores (SOUZA, 2018).

2.4.4 Contenção da célula por barreiras

A imobilização por contenção da célula por barreiras pode ser realizada por microencapsulação e por uso de membranas microporosas. Para a microencapsulação geralmente são utilizados polímeros e para o uso de membranas porosas diversos materiais são utilizados como vidro, inox, fibras e cerâmicas. Este método limita a transferência de massa, o que pode reduzir bastante o rendimento do biocatalisador, além de ser possível a ocorrência de incrustações e entupimentos do microfiltro causados pelo crescimento celular (KOURKOUTAS et al., 2004).

2.4.5 Suporte

A escolha do suporte ideal é essencial para o processo de imobilização em qualquer um dos métodos. A escolha bem-feita do suporte pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima, e a escolha errada pode fazer com que sua estabilidade e desempenho sejam afetados. Para a seleção, devem ser analisadas propriedades como permeabilidade, insolubilidade, resistência mecânica, área superficial, resistência a ataques microbianos, custo, capacidade de regeneração, entre outros. Cada uma dessas propriedades deve ser analisada na escolha do suporte para, com o método ideal, desenvolver o melhor biocatalisador suportado possível (MENDES et al., 2011).

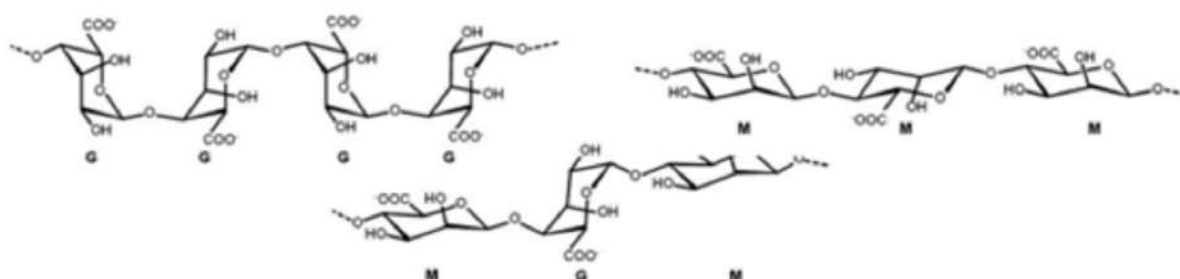
2.4.6 Alginatos

Os alginatos são polímeros polianiônicos obtidos geralmente através de sua extração de paredes celulares de algas (SILVA et al., 2010). Possui propriedades estabilizantes, gelificantes e espessantes e por isso, este biopolímero é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de papel, de cosméticos, dentre outras (MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011). Em solução aquosa, o alginato forma uma goma viscosa. O gel de alginato é uma técnica bastante utilizada na imobilização de biocatalisadores, principalmente para aplicações alimentícias e farmacêuticas, uma vez que é um polímero natural e atóxico (ANTUNES, 2015).

2.4.6.1 Alginato de sódio utilizado em imobilização enzimática

Segundo (MACIEL, 2013), o alginato de sódio é um polímero de cadeias lineares que se solubilizam em meio aquoso, constituído por várias unidades de sais de ácido β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G) que se unem através de ligações glicosídicas, representado pela Figura 2.7.

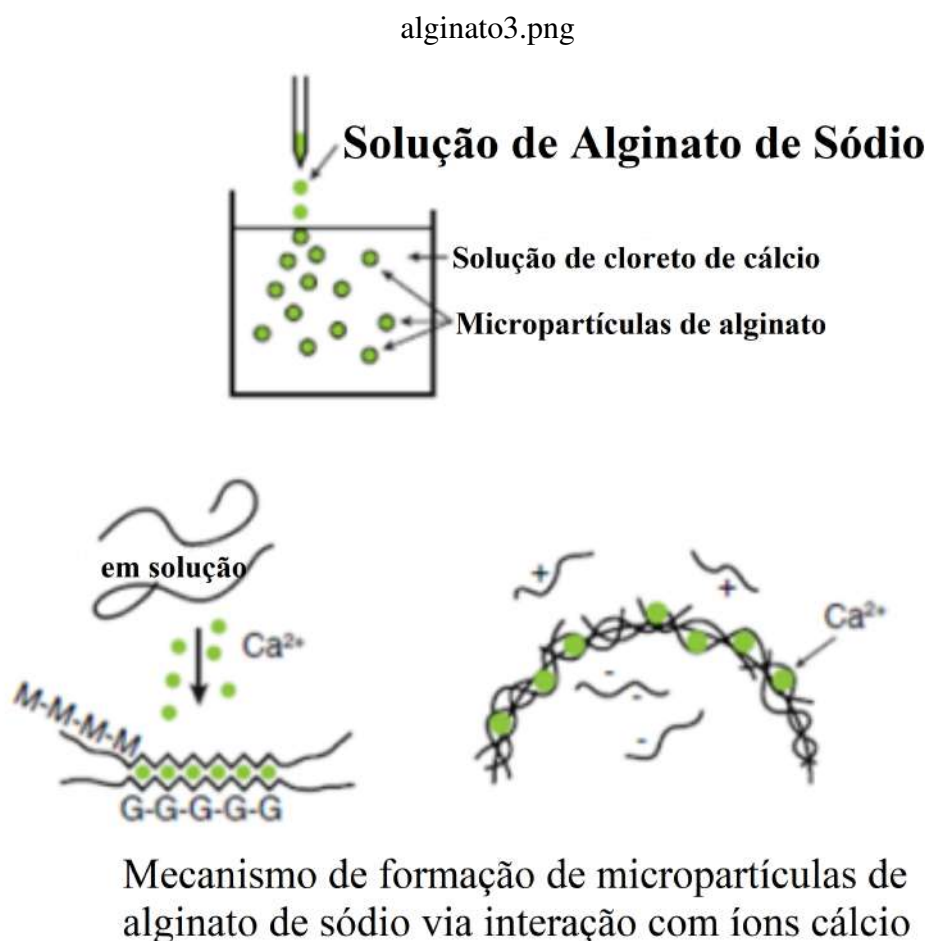
Figura 2.7 – Representação da cadeia molecular do alginato de sódio.



Fonte: (MACIEL, 2013)

Na presença de íons de cálcio, ocorre a gelificação do alginato de sódio. Os íons se ligam aos carbonos 1 e 4 destes monômeros (M ou G), liberando íons de sódio e o gel de alginato de cálcio (SOUZA, 2018), ocorrendo uma coagulação por diferença de carga, conforme é esquematizado pela Figura 2.8.

Figura 2.8 – Esquema simplificado da formação do gel de alginato para imobilização.



Fonte: (MACIEL, 2013)

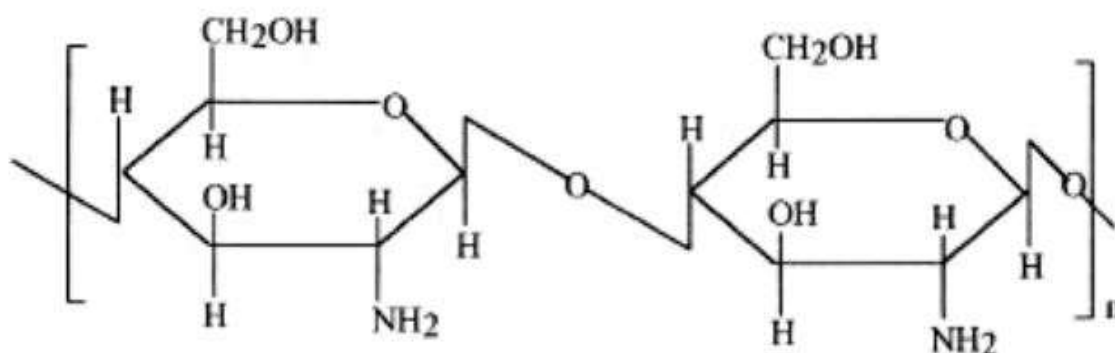
O gel de alginato de cálcio promove a imobilização de biocatalisadores através do método de aprisionamento em matriz porosa, onde são formadas pequenas esferas, com o biocatalisador imobilizado no gel, um meio poroso que irá reter o material imobilizado, mas permitir a transferência de massa do meio para a esfera, ou das enzimas imobilizadas na esfera para o meio, possibilitando a ocorrência da reação. Apesar de ser um dos suportes mais utilizados neste método de imobilização, devido a seu baixo custo e suas propriedades, ele apresenta algumas limitações quanto a estabilidade mecânica e química, e em relação à transferência de massa (SOUZA, 2018). Alguns processos como etapas de cura vêm sendo estudados para melhorar a estabilidade das esferas. A cura pode ser feita na própria solução com íons cálcio, deixando

as esferas submersas para que possam agregar mais íons de cálcio a sua estrutura, conferindo maior resistência a elas.

2.5 Quitosana

A Quitosana é um biopolímero proveniente da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose (MENDES et al., 2011). Ela pode ser obtida nas carapaças de crustáceos, que normalmente são rejeitos nas regiões de pesca podendo ser considerados poluentes, portanto, sua utilização promove redução deste impacto ambiental (CHAGAS et al., 2014). A Figura 2.9 apresenta a estrutura molecular da quitosana.

Figura 2.9 – Estrutura molecular parcial da quitosana.



Fonte: (AZEVEDO et al., 2007)

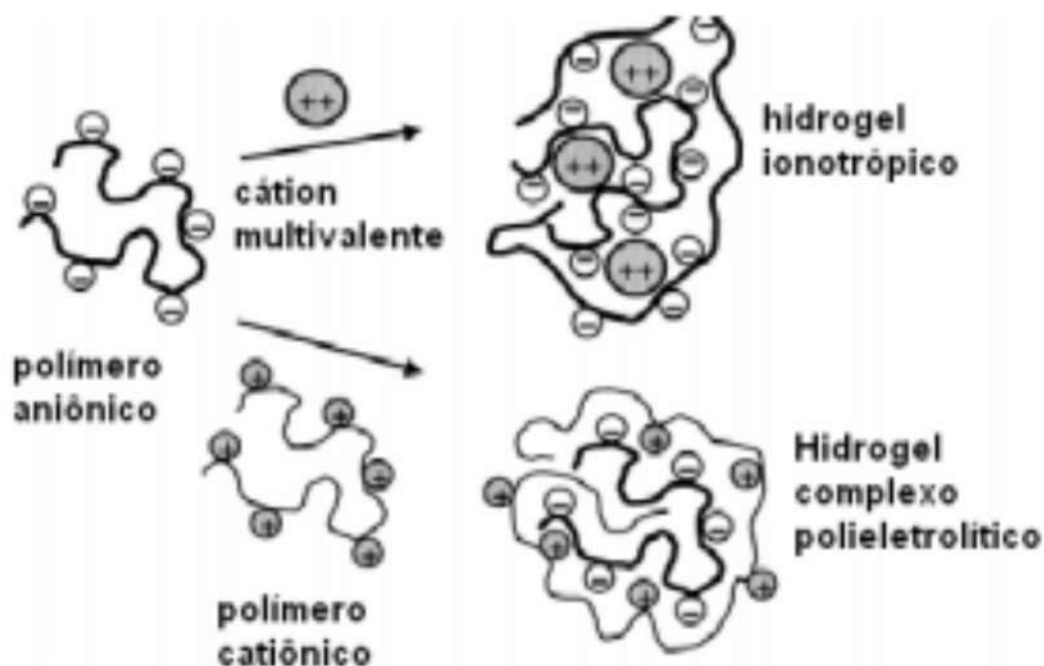
A quitosana é produto natural de baixo custo, pois é proveniente de um resíduo, renovável, biodegradável e importante econômica e ambientalmente. Além disso, se destaca por possuir alta afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos funcionais para reação direta com enzimas ou para modificação química, propriedades antimicrobianas, biocompatibilidade, hidrofiliabilidade, e resistência à degradação química (PEREIRA et al., 2019).

2.5.0.1 Quitosana ativada com Glutaraldeído para imobilização enzimática

Quitosana e quitina são materiais suportes para imobilização de enzimas, podendo ser utilizados sob a forma de pós, flocos e géis e em diversos formatos. A quitosana se dissolve facilmente na maioria dos ácidos orgânicos diluídos. Tal fato, torna mais fácil a preparação do seu gel, uma solução viscosa que forma precipitado sobre um aumento de pH. A precipitação se dá pela formação de complexos ionicamente reticulados com um íon contrário ou complexos polieletrólíticos, formados por um par de polímeros iônicos de cargas contrárias (ABREU,

2008). A Figura 2.10 apresenta um esquema simplificado com alguns exemplos de formação de hidrogéis. Desta forma, através de géis de quitosana podem ser formadas esferas, membranas, revestimentos e cápsulas (CHAGAS et al., 2014).

Figura 2.10 – Exemplos de formação de hidrogéis.



Fonte: (ABREU, 2008)

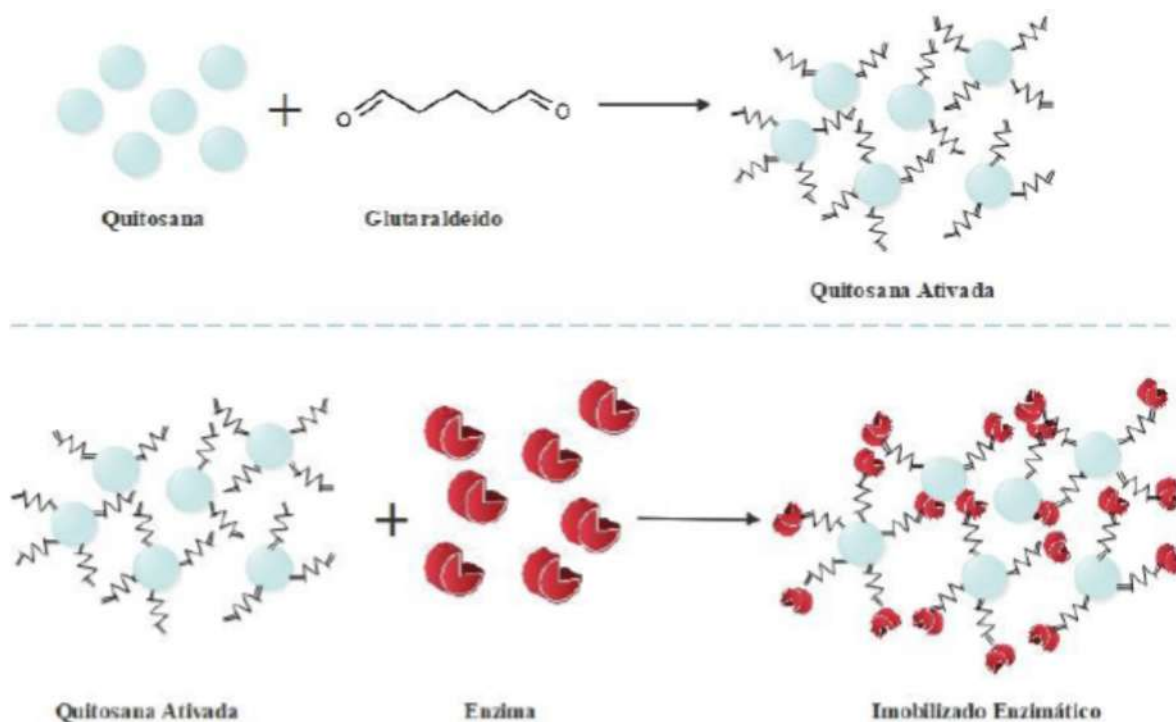
A quitosana no formato de esferas tem sua capacidade de adsorção melhorada, pois nesse formato, possui uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que se estivesse em flocos. Além disso, as esferas apresentam cinéticas de adsorção mais rápidas e maior facilidade de manuseio, operação, quantificação e separação do meio.

A utilização de quitosana no processo de imobilização enzimática, apresenta vantagens como o fato de ser um material de origem natural (biopolímero) e abundante, representando segurança e biocompatibilidade em comparação com materiais sintéticos. Além disso, possui grande quantidade de poros que se distribuem uniformemente desde sua superfície até seu interior, o que auxilia na distribuição uniforme do substrato. Sua estrutura possui muitos grupos amina e hidroxilas, que são altamente reativos, podendo assim, imobilizar enzimas por ligação covalente. Além destas qualidades, a quitosana, por si só, possui afinidade com algumas enzimas, o que pode otimizar o processo e promover a imobilização de uma grande diversidade de enzimas (CHAGAS et al., 2014).

Para aumentar a estabilidade química e física da quitosana e seus derivados, melhorar seu efeito como agente de imobilização de biocatalisadores na obtenção de um suporte com maior resistência ao meio ácido e menor capacidade de retenção de água, têm sido empregadas alternativas como a modificação química, também denominada de reticulação, com o emprego de alguns agentes de ativação (MENDES et al., 2011).

As reações envolvidas na reticulação por agentes bifuncionais ocorrem entre os grupos amino e hidroxilas da quitosana. Tal mudança pode ser realizada com o uso de diferentes agentes químicos como glutaraldeído, glicidol, formaldeído e genipina, ocasionando a formação de estruturas complexas. Na reação entre quitosana e glutaraldeído, os grupos carbonila do glutaraldeído sofrem ataque nucleofílico dos grupos amino da quitosana. A ligação covalente entre os grupos amino do biopolímero e aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a valores extremos de pH e temperatura (CHAGAS et al., 2014). O glutaraldeído pode ser adicionado ao gel de quitosana ou as esferas do biopolímero podem ser imersas em solução do agente reticulante (PEREIRA et al., 2019). A Figura 2.11 apresenta um esquema da ativação do gel de quitosana e da imobilização enzimática que pode ser promovida por adsorção na rede polimérica formada.

Figura 2.11 – Esquema simplificado da ativação do gel de quitosana e posterior imobilização enzimática.



Fonte: (PEREIRA et al., 2019)

Diante do exposto, neste trabalho serão realizados dois métodos de imobilização enzimática: por aprisionamento em matriz porosa de alginato de sódio, e por adsorção no suporte de quitosana ativado com glutaraldeído.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

A biomassa selecionada para este trabalho foi o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente de composição: 57,05% Celulose, 5,81% Hemicelulose, 35,42% Lignina/-Cinzas e 1,73% outros componentes (Fonte: (CORRÊA, 2016)), doado gentilmente pelo Laboratório de Automação e Desenvolvimento de Bioprocessos (LADABio) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

O pré-tratamento do material consistiu em misturar os materiais lignocelulósicos com água na proporção de 1:10 (m/m) em um reator de aço inoxidável (Parr Instruments Company, modelo 4584), com controle de temperatura e agitação. As condições de operação deste processo foram mantidas constantes em 195°C durante 10 minutos, agitação constante de 200 rpm e pressão máxima de aproximadamente 12 kgf.cm⁻². Os materiais foram previamente moídos em um micro-moinho de facas (Willye, modelo SP - 30), obtendo assim, uma granulometria média de 2 mm. No final do processo, a fração sólida foi separada através de um filtro e lavado com água para remover a hemicelulose residual até atingir o pH neutro. A fração sólida foi armazenada no freezer para posterior utilização na caracterização química das biomassas e no processo de hidrólise enzimática.

Utilizou-se também, o complexo enzimático Cellic CTec 2 (composto por enzimas celulase) nos ensaios de hidrólise, cedido pela Novozymes Latin America - Araucária, PR. A atividade enzimática deste complexo é de 272 FPU/mL (CORRÊA, 2016).

Ainda na etapa de hidrólise, foram utilizados os reagentes citrato de sódio e ácido cítrico para preparar a solução de tampão citrato, e hidróxido de sódio para interromper a reação. Para as etapas de imobilização foi utilizado alginato de sódio e hidróxido de potássio, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A quitosana, ácido acético (8%), glutaraldeído e o reagente de Bradford foram doados pelo Laboratório de Catálise e Novos Materiais do Departamento de Química (DQI) da UFLA.

3.2 Determinação de umidade

O teor de umidade presente na biomassa utilizada neste estudo foi obtido através de uma balança de determinação de umidade (Termo balança, modelo i-Thermo 163L) operada no

modo automático. Foi pesado aproximadamente 1,5 g da amostra, que foi seca até obtenção de peso constante, com uma precisão de $\pm 0,01$ (%umidade).

3.3 Imobilização enzimática

3.3.1 Método 1 – Imobilização por encapsulamento com Alginato de Sódio sem etapa de cura

A etapa de imobilização celular foi realizada seguindo o método utilizado por Souza (2018), com algumas modificações. Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas de alginato de sódio nas concentrações de 2, 3 e 4%. Em seguida, a enzima foi adicionada nas soluções de alginato de sódio, na proporção de 0,09 mL de enzima para 1 mL de solução. A quantidade de enzima utilizada foi definida através de cálculos relacionando sua atividade a quantidade de bagaço. Previamente, foi definido o volume final de solução como 50 mL, e padronizou-se que a quantidade de bagaço seco seria 2,5 g, garantindo que a concentração de sólidos fosse baixa e não interferisse no rendimento da reação de maneira negativa. Como o valor da atividade enzimática do complexo doado pela Novozymes Latin America é de 272 FPU/mL, e foi fixada a carga enzimática de 10 FPU para cada grama de bagaço seco a ser convertido em glicose, para 2,5 g de bagaço seriam necessários 25 FPU, que correspondem a 0,092 mL da enzima.

Após isso, a mistura foi adicionada a uma pipeta Pasteur 3 mL, e gotejada de forma manual a uma distância de 7 cm, em 100 mL de solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,25 M e pH 5, sob agitação e em temperatura ambiente. Por fim, as esferas formadas foram deixadas em repouso por 5 minutos, filtradas em funil com papel filtro e armazenadas em tubos Eppendorf na geladeira.

Para o ajuste do pH da solução de gotejamento foram utilizadas soluções de 0,1 M de ácido clorídrico (HCl) e 0,1 M de hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$).

3.3.2 Método 2 – Imobilização por encapsulamento com Alginato de Sódio com etapa de cura

Visto que as esferas se romperam em poucas horas no primeiro experimento, foi necessário testar alguma forma de reforçá-las. Para isso, o mesmo procedimento do método 1 foi realizado, com a alteração na concentração da solução de gotejamento para 1M e a quantidade utilizada foi mantida em 100 mL. Desta solução, foi retirada uma alíquota para quantificar

as proteínas presentes na solução por análise de Bradford (BRADFORD, 1976), e averiguar a eficiência do encapsulamento. Posteriormente ao gotejamento, as esferas foram filtradas e adicionadas à solução de $CaCl_2$ com a mesma concentração da solução de gotejamento, porém sem ajuste de pH, para a cura, onde permaneceram por 12h. Após o tempo de cura, as esferas formadas foram filtradas em uma peneira de nylon doméstica, onde permaneceram por 10 min para remoção do excesso de umidade. Todos procedimentos foram realizados em condições assépticas. Por fim, as esferas foram armazenadas em tubos Eppendorf na geladeira até seu uso na hidrólise. Os demais procedimentos permaneceram idênticos, mas apenas as concentrações de 3 e 4% de alginato foram testadas.

3.3.3 Método 3 – Imobilização por adsorção usando Quitosana ativada com Glutaraldeído

Esta metodologia de imobilização foi desenvolvida à partir das metodologias de Pereira (2019) e Chagas (2014). Inicialmente foram preparados os suportes de Quitosana. Dissolveu-se 3,5 g de Quitosana em 100 mL de Ácido Acético 8%, para a dissolução, a mistura foi aquecida em banho-maria a 50°C por 40 minutos até formação de um gel homogêneo. Em seguida foi preparada uma solução 2M de Hidróxido de Potássio que foi colocada sob agitação. Utilizando uma pipeta Pasteur 3 mL, foi gotejado a 7 cm de distância o gel de Quitosana na solução de Hidróxido de Potássio (KOH) sob agitação, formando 19 esferas, que foram mantidas sob agitação por 20 minutos. As esferas foram peneiradas e lavadas em abundância com água destilada.

Em seguida foi feita a ativação do suporte onde, as esferas foram imersas em 10 mL de solução 2,5% de Glutaraldeído por 40 minutos e ao fim do processo foram novamente peneiradas e lavadas com água destilada.

Por fim, foi preparada uma solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico (50 mM), a mesma utilizada como meio reacional da hidrólise, em que para 1 L de solução, utiliza-se 4,38 g de ácido cítrico e 8,56 g de citrato de sódio para obtenção de pH 4,8. Desta solução foram utilizados 18 mL e misturados a 2 mL de enzima Cellic Ctec 2, adicionados em um Erlenmeyer 250 mL, junto aos suportes esféricos de quitosana ativados com glutaraldeído. O recipiente foi colocado no agitador Shaker a 25°C e 150 rpm, por 4h. No início e no fim destas 4h, foram retiradas alíquotas desta solução para a quantificação do teor de proteína presente por análise de Bradford (BRADFORD, 1976). A variação de proteína encontrada, seria a quantidade de en-

zima adsorvida na superfície das esferas. Ao final do experimento, as esferas foram peneiradas, lavadas com água destilada e armazenadas em tubos Eppendorf na geladeira para sua utilização na hidrólise.

3.4 Hidrólise enzimática da biomassa

A etapa de hidrólise enzimática foi realizada em uma incubadora refrigerada Shaker de bancada, utilizando uma concentração de sólidos de 5% ($m \cdot v^{-1}$) (massa seca), carga enzimática de $10 \text{ FPU} \cdot g_{biomassa}^{-1}$, rotação de 150 rpm, solução tampão citrato (50mM, pH 4,8) e com uma temperatura controlada de $50,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ por um período de 48 horas. Para definir a quantidade de solução tampão utilizada, subtraiu-se do volume reacional fixado em 50 mL, a quantidade de água presente no bagaço e o volume utilizado de enzima. O restante do volume foi completado com a solução de tampão citrato.

Os experimentos de hidrólise foram realizados em duplicatas para todas as condições enzimáticas avaliadas. Foram retiradas amostras (1mL) para quantificação da concentração de glicose nos tempos de 1, 3, 5, 7, 9, 24, 32 e 48 horas. Cada amostra foi centrifugada (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R) por 5 minutos, com rotação de 10.000 rpm.

Após isto, foram coletados 0,3 mL do sobrenadante e misturado em 0,1 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) (1M) para inativação das enzimas. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -12°C até a realização da quantificação dos açúcares.

3.5 Análises

Após a realização das imobilizações, foram quantificados os teores de proteínas nas soluções por análises de Bradford (BRADFORD, 1976). Para quantificação dos açúcares produzidos durante os experimentos de hidrólise enzimática, utilizou-se a análise de açúcares redutores totais (Método de DNS) (MILLER, 1959). As metodologias referentes às análises estão descritas a seguir.

3.5.1 Quantificação de açúcares

O reagente DNS foi preparado conforme metodologia disponibilizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2013) seguindo o método proposto por Miller (1959): para um volume final de 1.000 mL, 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico foram

adicionados a 200 mL de uma solução 2 M de hidróxido de sódio recém-preparada (solução 1). Separadamente, 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos em 500 mL de água destilada (solução 2), sob aquecimento e agitação constantes. Ainda nessas condições, mistourou-se a solução 1 com a solução 2 até a completa dissolução do DNS. Após resfriamento, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 1.000 mL e completou-se o volume com água destilada.

Para a quantificação de açúcares, foi transferida uma alíquota de 1 mL de cada amostra para tubos de ensaio e foi adicionado volume igual do reagente DNS a cada tubo. Agitou-se a mistura. Os tubos foram levados para banho-maria com água em ebulição (100 °C) por 5 minutos. A reação foi interrompida imergindo os tubos em banho de água fria. Após isto, foi adicionado 10 mL de água destilada, homogeneizou-se a amostra e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, contra uma amostra de calibração, usualmente chamada de “branco” (PACHECO et al., 2014).

3.5.2 Quantificação de proteína

Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,05 mL de amostra e 2,5 mL de reagente de Bradford. Agitou-se a mistura vigorosamente e a leitura da intensidade da cor foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm, contra uma amostra de calibração, chamada de “branco”.

Para ambas as análises, foram construídas curvas analíticas, utilizando albumina para a quantificação proteica, e glicose para a quantificação glicosídica, onde são realizadas leituras de absorbância de amostras com concentrações conhecidas. Diante da equação da curva analítica, são calculadas as concentrações desconhecidas usando as absorbâncias lidas das soluções analisadas (BRADFORD, 1976).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Umidade do material

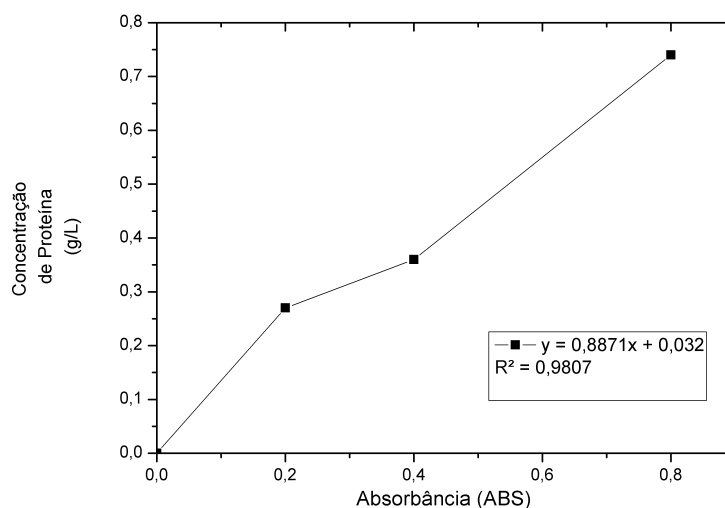
A umidade do bagaço obtida foi de $82,5\% \pm 2,5\%$. Com este teor de umidade no bagaço, para obtenção de 2,5 g de massa seca de bagaço (bagaço seco), foram necessários $14,28 \text{ g} \pm 1,78$ g de bagaço úmido.

4.2 Métodos de imobilização

4.2.1 Curva analítica de proteína

Para avaliação da eficiência dos processos de imobilização e quantificação da quantidade de enzima imobilizada, foram realizadas análises de Bradford (BRADFORD, 1976) nas soluções onde as imobilizações foram realizadas. Para quantificar a concentração de proteína, foi construída inicialmente uma curva analítica que foi a base para todos os experimentos deste trabalho e pode ser vista na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Curva analítica de concentração de proteína.



Fonte: Do autor

4.2.2 Método 1: Imobilização enzimática por aprisionamento em matriz porosa com Alginato de Sódio sem processo de cura

As pequenas esferas de alginato foram produzidas e na solução de gotejamento, a medida de absorvância foi zero, ou seja, não haviam enzimas na solução. Com toda a enzima presente nas soluções de alginato aprisionada, pode-se dizer que a imobilização foi eficiente.

4.2.3 Método 2: Imobilização enzimática por aprisionamento em matriz porosa com Alginato de Sódio com processo de cura

As esferas produzidas neste método apresentaram tamanhos maiores em relação ao método anterior e o formato apresentado por elas não foi perfeitamente esférico, se assemelham a gotas, pois tomam exatamente a forma que caem na solução de gotejamento. A Figura 4.2 apresenta as esferas de alginato.

Figura 4.2 – Esferas de alginato antes do primeiro uso



Fonte: Do autor

Este experimento teve o objetivo de reforçar o experimento anterior para conferir maior resistência às esferas. Para isso, foi aplicado o processo de cura. Este processo tem o objetivo de garantir uma completa gelificação das esferas, e conferir uma camada protetora a elas que pode minimizar os efeitos de inibição que a enzima imobilizada pode sofrer no processo, e aumentar a resistência das esferas ao meio reacional (ANTUNES, 2015). A concentração da solução de cura é um fator interferente na resistência conferida às esferas, tal como o tempo de imersão das esferas na solução. A Figura 4.3 apresenta as esferas imersas na solução de cura.

Figura 4.3 – Esferas de alginato imersas na solução de cura.



Fonte: Do autor

Ao final do gotejamento, foi avaliada a concentração de proteínas na solução de cura, e o resultado também foi inexistência de proteína na solução, ou seja, a imobilização foi eficiente e toda a enzima adicionada foi imobilizada.

4.2.4 Método 3: Imobilização por adsorção usando Quitosana ativada com Glutaraldeído

Inicialmente foram produzidas as esferas de quitosana, suportes que posteriormente foram ativados com glutaraldeído 2,5%. Os suportes ativados foram imersos em solução enzimática em agitação constante a 150 rpm para adsorção das enzimas ao suporte. Uma alíquota da solução foi retirada antes da adição dos suportes e outra ao fim das quatro horas de agitação.

Foram avaliadas as concentrações inicial e final de proteína na solução de adsorção, com estes dados, pode-se calcular a variação e considera-la a quantidade adsorvida nas esferas presentes na solução. Considerando que as esferas são praticamente idênticas pois foram produzidas nas mesmas condições, faz-se também a consideração de que as enzimas foram adsorvidas igualmente em todas elas. A variação entre as concentrações inicial e final da solução de adsorção foi de 0,395 g/L, o que representa 19,75% da quantidade adicionada. Sendo assim,

dividindo a quantidade adsorvida pela quantidade de esferas (19) em solução, é possível supor, que em cada esfera há uma quantidade aproximada de 0,021 g/L de enzimas. Com estes dados, foi possível calcular a quantidade de esferas que deveriam ser adicionadas ao processo de hidrólise enzimática de bagaço de cana para se assemelhar à quantidade de enzima livre utilizada no processo de hidrólise. Como a quantidade de enzima livre adicionada foi de 0,09 mL, (10 FPU/gsubstrato), adicionou-se ao processo cinco esferas, as quais deveriam conter aproximadamente 0,10 mL de enzima.

4.3 Hidrólise enzimática

Os processos de hidrólise foram realizados, e foi considerada a umidade do bagaço para calcular a quantidade de solução tampão adicionada. Foram adicionados aproximadamente 40 mL de tampão nos 50 mL de volume final em cada frasco, o que equivale a 80% do meio reacional.

4.3.1 Avaliação da resistência do processo de imobilização ao meio reacional

Para que um processo de imobilização seja eficiente, deve ser possível recuperar o imobilizado ao final do seu uso em um processo para que seja reutilizado. No primeiro método testado, a imobilização utilizando alginato de sódio sem etapa de cura, nas primeiras horas de experimento houve o rompimento das esferas de alginato, primeiro das esferas 2%, antes das 3h iniciais e em seguida das esferas 3 e 4%, por volta das 24h de experimento. Souza (2018), utilizou em seu trabalho o mesmo método de imobilização, porém para leveduras, com aplicação em processo de fermentação. Os resultados obtidos foram satisfatórios quanto à resistência, e a diferença entre os meios reacionais pode ter sido o fator determinante para o rompimento no processo de hidrólise. No meio hidrolítico, havia a presença de citrato de sódio, usado para realizar o rompimento do gel de alginato na etapa de plaqueamento no próprio trabalho de Souza (2018), além disso, temperatura e pH utilizados eram diferentes.

A partir do resultado da resistência no primeiro método, foram realizadas as modificações na metodologia que o transformaram no método dois, o aumento da concentração das soluções de cloreto de cálcio e o acréscimo da etapa de cura. Com estas modificações, as esferas se tornaram mais resistentes e foi possível recuperá-las ao final da primeira hidrólise. Notou-se que houveram modificações em sua estrutura, estavam menores e apresentavam formato mais próximo do esférico, como pode ser visualizado na Figura 4.4. As esferas foram reutilizadas e

antes das primeiras 3h de hidrólise, as esferas não eram mais visíveis, haviam se rompido. Com isso, foi possível avaliar que a etapa de cura realmente melhora a formação do gel de alginato e o confere resistência. Porém, devido à presença de citrato de sódio no meio reacional, as esferas de alginato não resistem por mais do que um uso. A cura confere às esferas maior tempo de uso, mas ainda assim, o citrato de sódio consegue romper o gel depois de um tempo. Além disso, outros fatores podem contribuir para o rompimento das esferas, tais como a temperatura, a agitação e o atrito provocado pelo contato entre as esferas e a biomassa. O tempo durante o qual as esferas resistiram neste processo foi de aproximadamente 50h, o que pode variar conforme a concentração da solução e o tempo de exposição à cura. Neste método, foram testadas as maiores concentrações de alginato, 3 e 4%, pois resistiram por mais tempo no experimento anterior. Com isso, foi possível observar que a concentração de alginato também melhora a resistência das esferas. Moraes (2002) afirma em seu trabalho que o tempo de gelificação afeta a estabilidade do gel em tampão citrato, por tanto, um maior tempo de cura poderia melhorar o tempo de resistência das esferas ao meio reacional de hidrólise enzimática.

Figura 4.4 – Esferas de alginato após o primeiro uso.



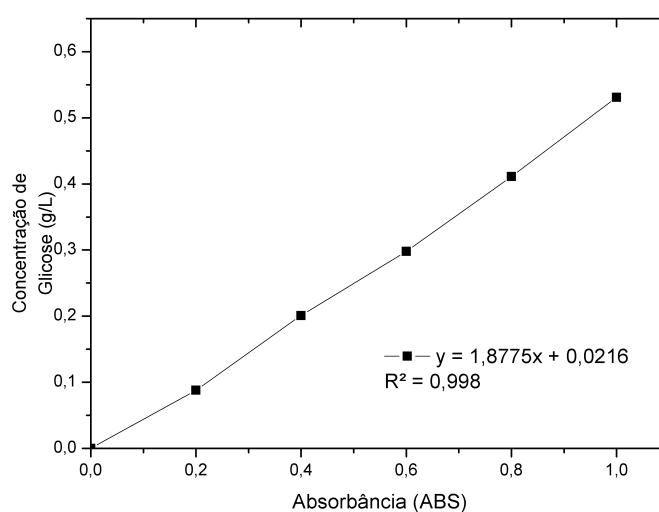
Fonte: Do autor

O terceiro método foi o que obteve os melhores resultados em relação à resistência do imobilizado. As esferas de quitosana foram recuperadas, visualmente, intactas no primeiro e no segundo uso, podendo ainda ser reutilizadas ao analisar o estado físico das esferas.

4.3.2 Curva analítica de glicose

Uma curva analítica de quantificação de glicose em função da absorbância foi construída utilizando o método DNS (MILLER, 1959) e pode ser visualizada na Figura 4.5. Esta curva serviu de base para a quantificação de glicose em todos os experimentos deste trabalho.

Figura 4.5 – Curva analítica de concentração de glicose.



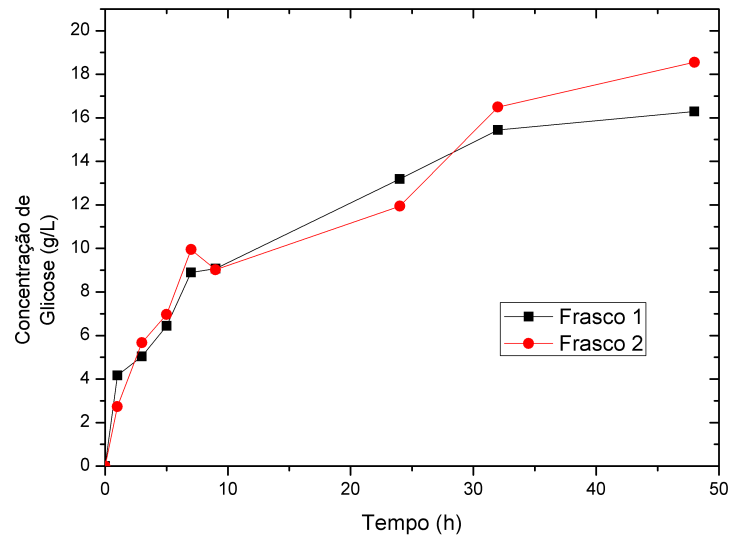
Fonte: Do autor

4.3.3 Quantificação de glicose

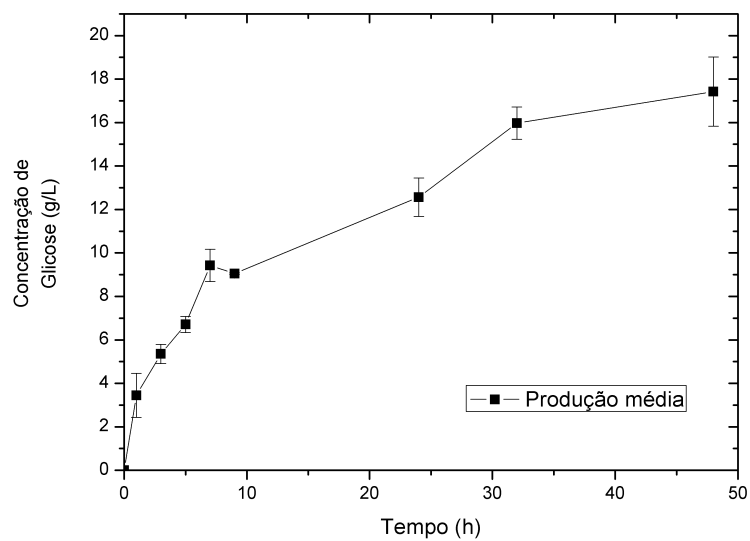
4.3.3.1 Método 1: Imobilização enzimática por aprisionamento em matriz porosa com alginato de sódio sem processo de cura

Para a determinação da concentração de glicose foram retiradas alíquotas ao longo do experimento e quantificou-se as amostras de acordo com o método DNS (MILLER, 1959). Através da equação da curva analítica (Figura 4.5), foram obtidas as concentrações de glicose em cada tempo. Foram testadas as enzimas: na forma livre e imobilizadas por alginato de sódio em soluções com concentração de 2, 3 e 4%. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A Figura 4.6 apresenta os resultados obtidos da produção de glicose pela enzima livre, as curvas do experimento em duplicata e sua média.

Figura 4.6 – Produção de glicose pela enzima livre.



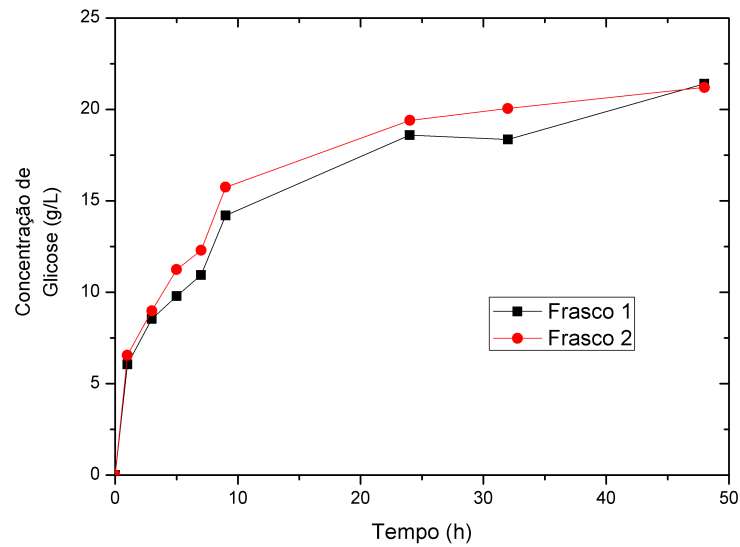
(a) Duplicata



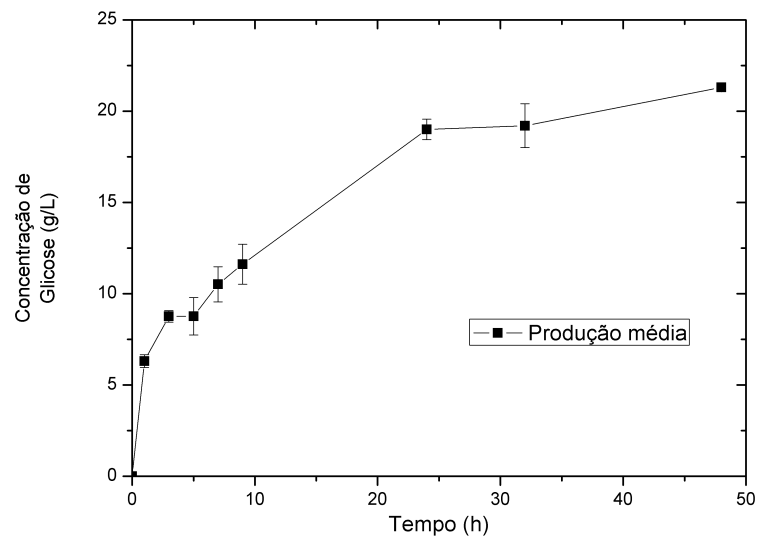
(b) Média

A Figura 4.7 apresenta os resultados obtidos da produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em alginato 2%.

Figura 4.7 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 2% alginato.



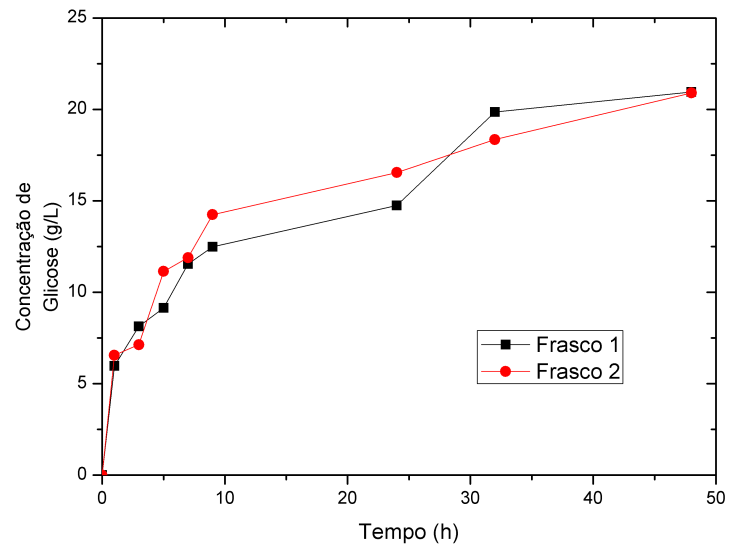
(a) Duplicata



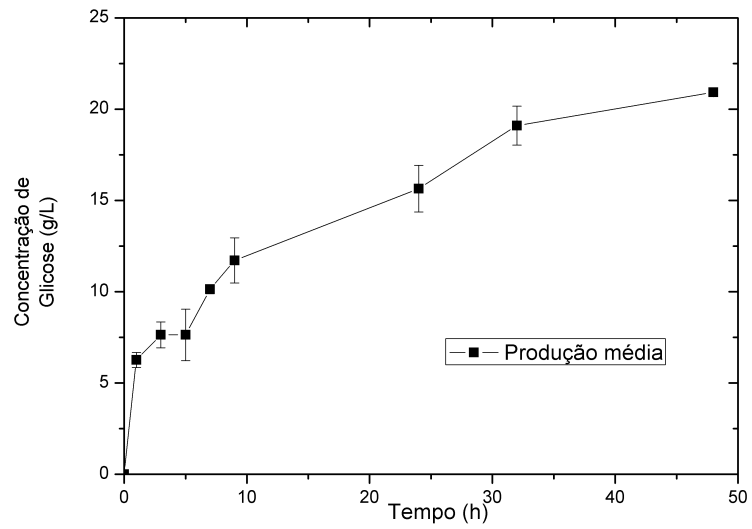
(b) Média

Os resultados da produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em alginato 3% são apresentados na Figura 4.8, e os resultados para a produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em alginato 4%, podem ser visualizados na Figura 4.9.

Figura 4.8 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 3% alginato.

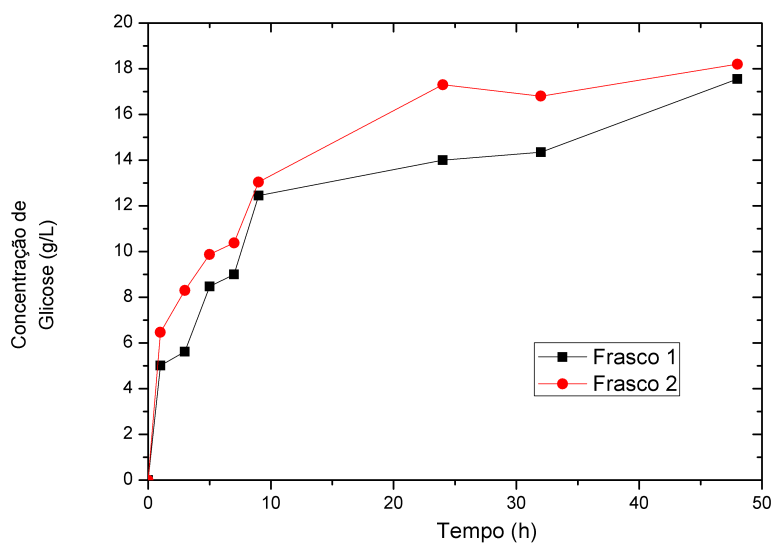


(a) Duplicata

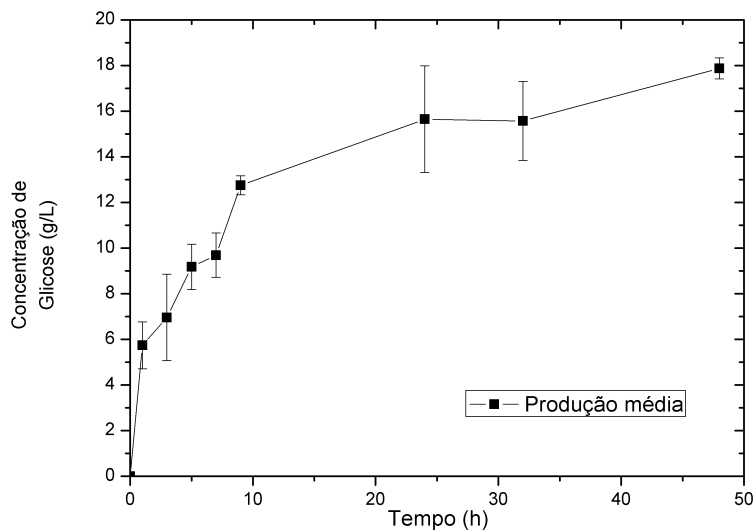


(b) Média

Figura 4.9 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 4% alginato.



(a) Duplicata



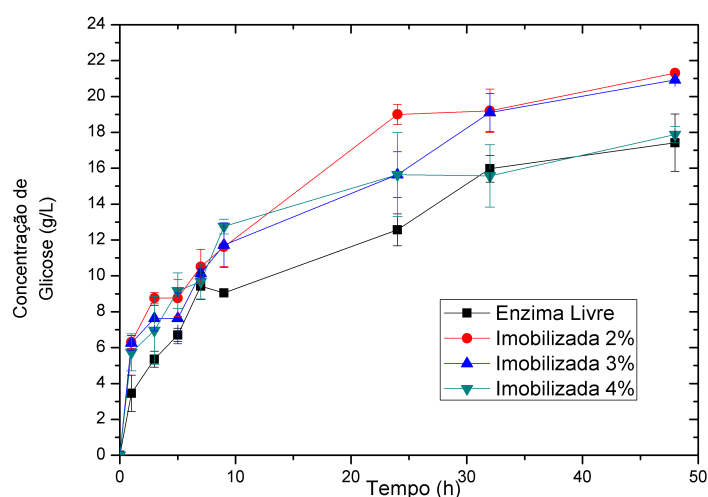
(b) Média

Ao analisar os resultados apresentados nas Figuras 4.6 à 4.9, notou-se que as enzimas inicialmente imobilizadas em alginato 2 e 3% apresentaram produções de glicose em torno de 20% maiores do que a produção apresentada pela enzima na forma livre. Tal fato pode ser explicado devido a que a enzima na forma livre reagiu com o substrato desde o início do processo. Por outro lado, as enzimas imobilizadas, como sofreram rompimento ao longo do tempo do processo, podem ter atuado no processo como em batelada alimentada, pois foram

sendo liberadas no processo ao longo do tempo conforme ocorria o rompimento. As enzimas imobilizadas por encapsulamento não têm contato direto com o substrato, pois estão distribuídas no interior das esferas, e muitas vezes o substrato não consegue se conectar para a formação do complexo Substrato-Enzima. Por isso, com o rompimento, é como se novas enzimas fossem adicionadas ao processo ao longo do tempo. Avaliando as curvas de produção de glicose (Figura 4.10), é possível notar que a curva da enzima livre mostra a velocidade inicial de produção de glicose menor do que as enzimas imobilizadas e uma taxa de produção inicial menor, pois essas reagiram exaustivamente com o substrato ao longo do processo.

Foi realizada uma comparação entre as produções de glicose em cada caso e os melhores resultados estão apresentados na Figura 4.10.

Figura 4.10 – Comparativo entre as produções de glicose com a enzima livre e imobilizadas.



Fonte: Do autor

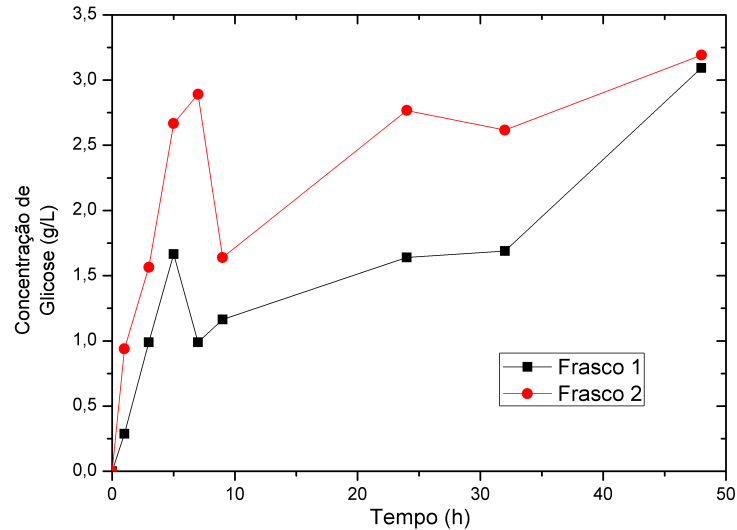
Os resultados deste estudo podem servir como impulso para avaliação do uso de um sistema de liberação controlada de enzimas para melhorar o rendimento da hidrólise enzimática, visto que com a liberação das enzimas ao longo do processo, o rendimento foi maior, em aproximadamente 20%, do que das enzimas na forma livre desde o início do processo.

4.3.3.2 Método 2: Imobilização enzimática por aprisionamento em matriz porosa com Alginato de Sódio com processo de cura

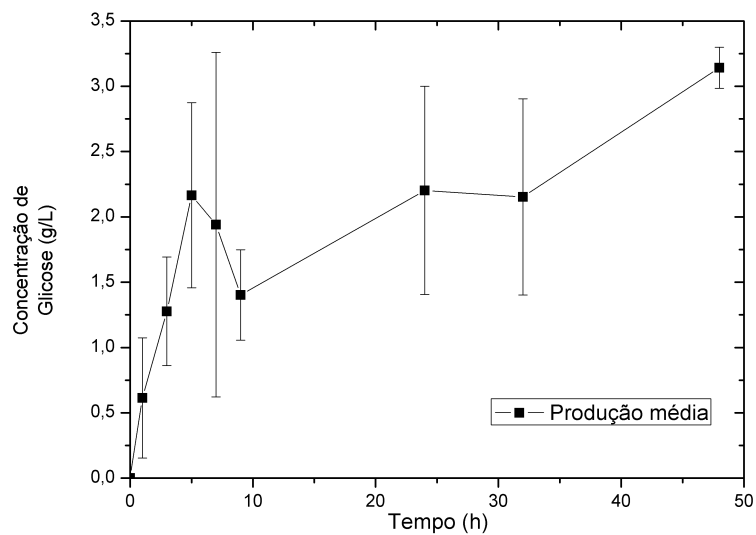
Neste experimento, as esferas resistiram ao primeiro uso. As amostras foram retiradas durante o experimento e analisadas pelo método DNS ((MILLER, 1959)). A Figura 4.11 apre-

sentando os resultados da concentração de glicose no primeiro uso das enzimas imobilizadas em alginato 3%.

Figura 4.11 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 3% alginato durante o primeiro uso.



(a) Duplicata

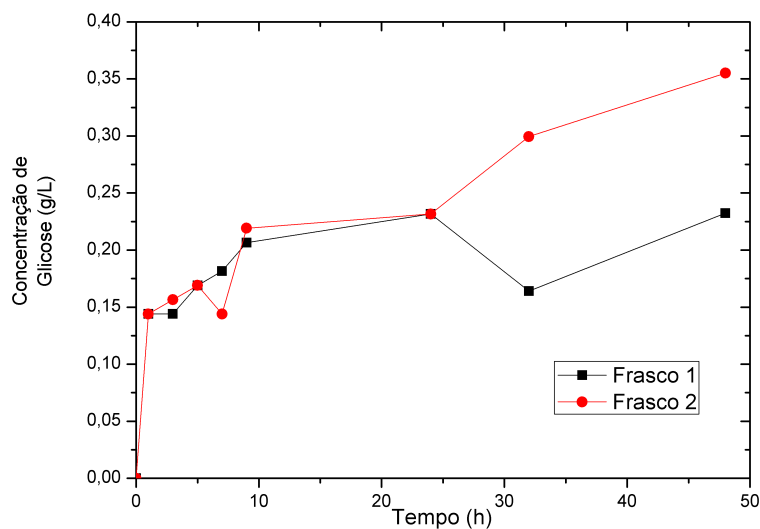


(b) Média

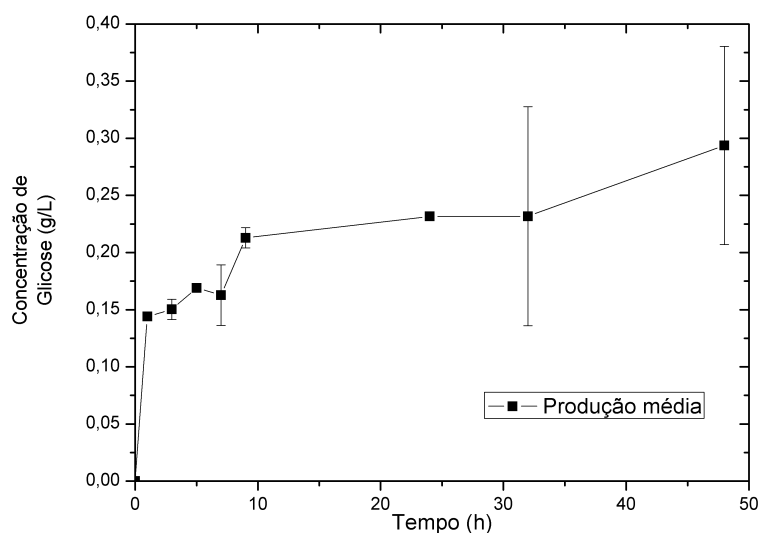
É possível perceber que a produção de glicose utilizando enzima imobilizada 3% foi menor do que a produção de glicose usando a enzima na sua forma livre em aproximadamente 82%.

Em seu segundo uso, o rendimento da enzima imobilizada em alginato 3% foi ainda mais baixo, reduziu aproximadamente 91% em relação ao primeiro uso, e foi aproximadamente 2% da produção da enzima em sua forma livre. As curvas desta produção são apresentadas na Figura 4.12.

Figura 4.12 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 3% alginato durante o segundo uso.



(a) Duplicata

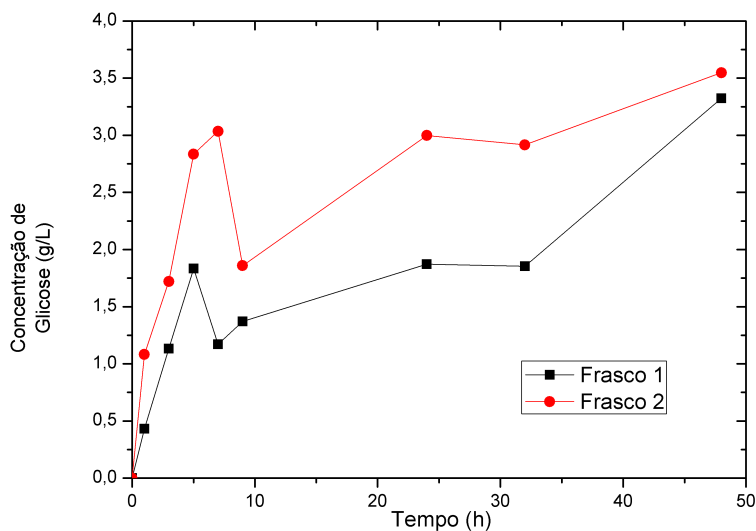


(b) Média

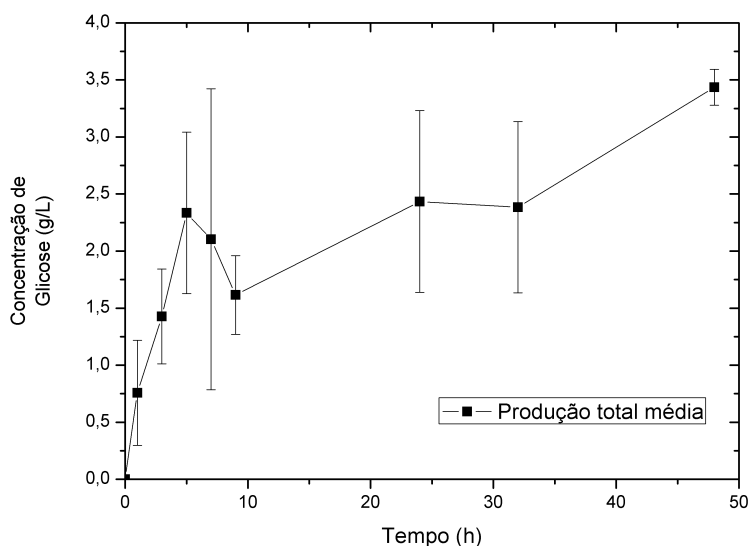
Ao somar as produções de glicose dos dois usos da enzima imobilizada em 3% alginato, obtém-se os resultados apresentados na Figura 4.13. Mesmo ao somar as produções, a quan-

tidade total de glicose produzida, 3,44 g/L, ainda é inferior à produzida pela enzima em sua forma livre, 17,42 g/L, em aproximadamente 80%.

Figura 4.13 – Soma das produções de glicose pela enzima imobilizada 3% alginato durante os dois usos.



(a) Duplicata

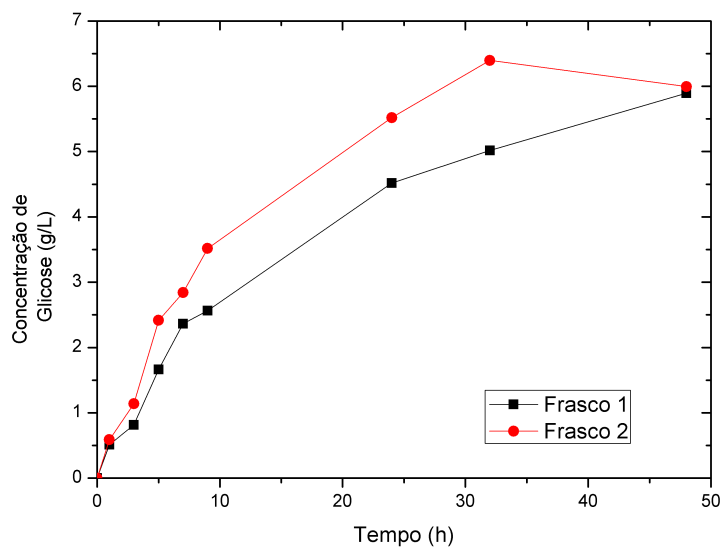


(b) Média

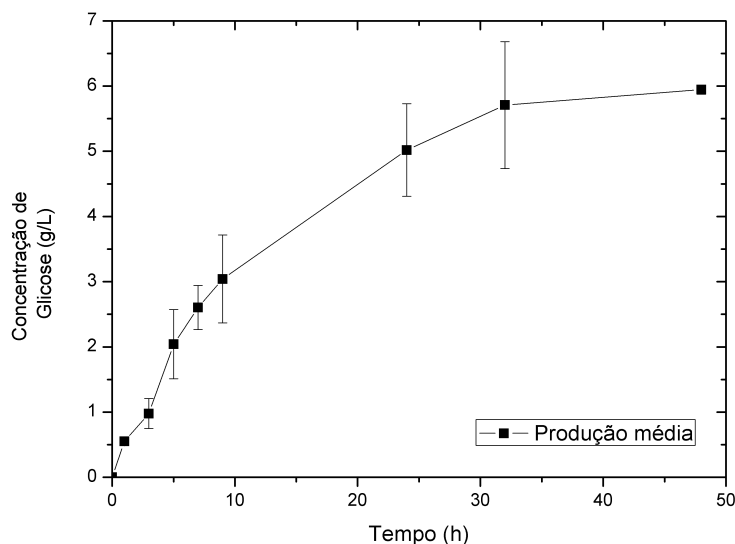
O comportamento das enzimas imobilizadas em alginato 4% foi semelhante. Durante o primeiro uso, a produção foi aproximadamente 53% maior em relação ao primeiro uso da enzima imobilizada em alginato 3%. Ainda assim, a produção foi menor quando comparada à enzima livre, uma vez que a enzima imobilizada em 4% alginato produziu 34% da glicose

produzida quando se utilizou a enzima em sua forma livre. Os resultados do primeiro uso são apresentados na Figura 4.14.

Figura 4.14 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 4% alginato durante o primeiro uso.



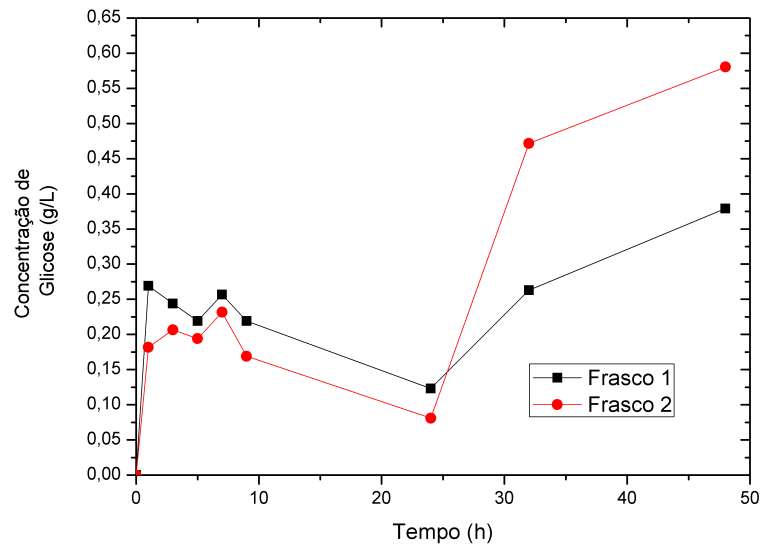
(a) Duplicata



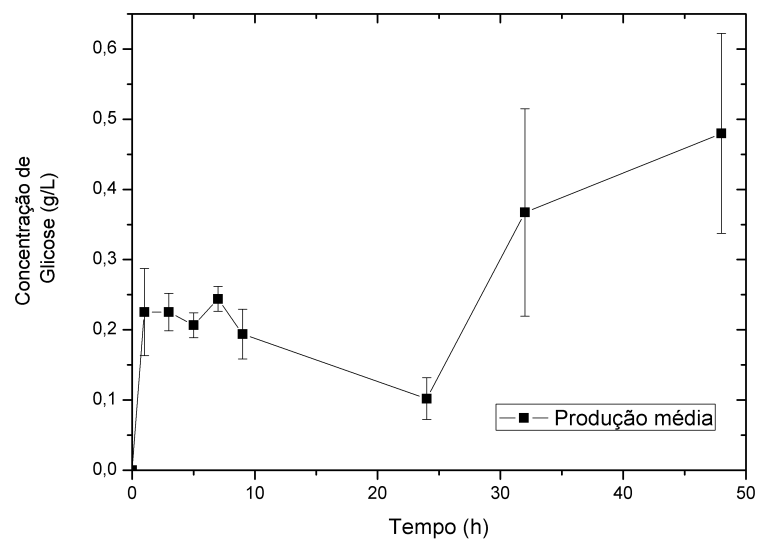
(b) Média

Durante o segundo uso, a produção foi reduzida em aproximadamente 92% em relação ao primeiro. A quantidade de glicose produzida no reuso foi 3% do que a enzima em sua forma livre produziu. Os resultados da produção de glicose no segundo uso podem ser visualizados na Figura 4.15.

Figura 4.15 – Produção de glicose pela enzima imobilizada 4% alginato durante o segundo uso.



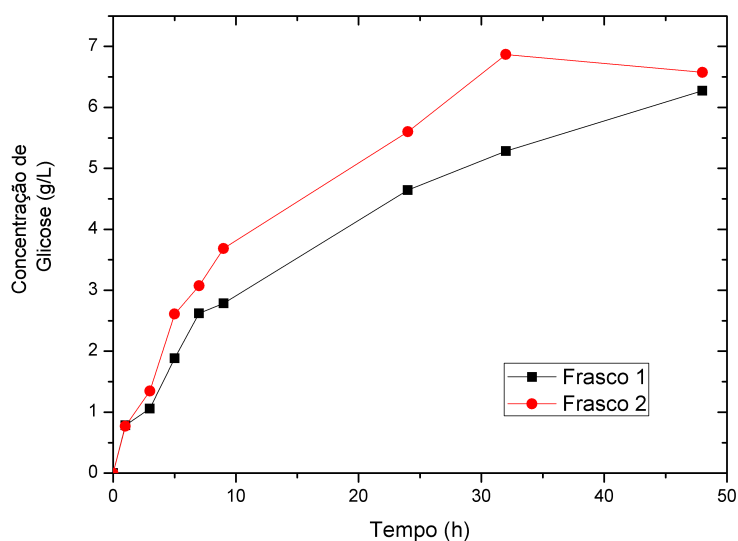
(a) Duplicata



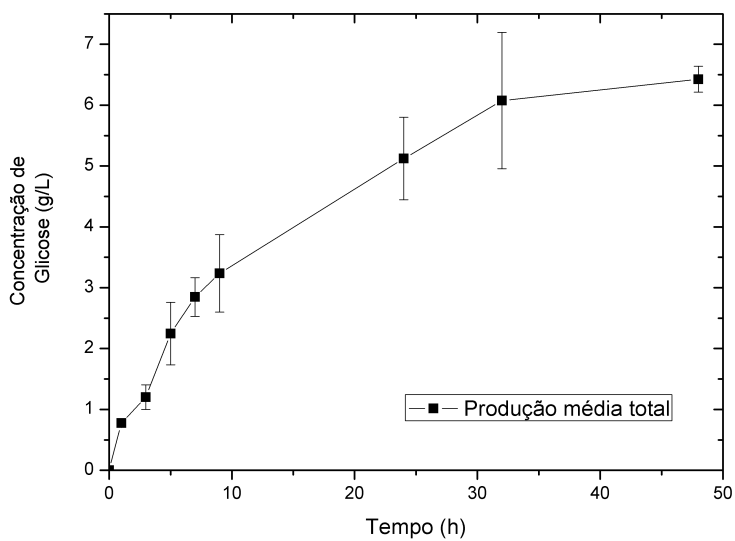
(b) Média

Ao somar as produções de glicose nos dois usos, foi obtida uma produção de 6,42 g/L, 46% maior pelas enzimas imobilizadas em 4% de alginato em relação à produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em 3% de alginato. Em relação à produção de glicose pelas enzimas em forma livre, as enzimas imobilizadas em 4% de alginato produziram aproximadamente 37%. A Figura 4.16 apresenta os resultados da soma das produções nos dois usos das enzimas imobilizadas em 4% de alginato.

Figura 4.16 – Soma das produções de glicose pela enzima imobilizada 4% alginato durante os dois usos.



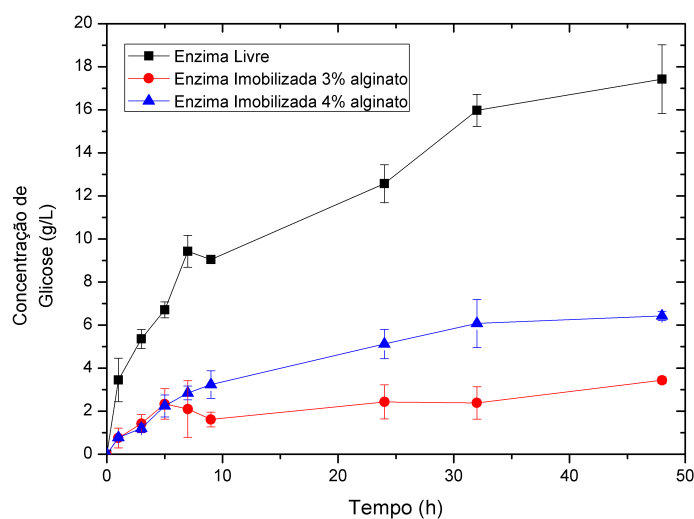
(a) Duplicata



(b) Média

Na Figura 4.17, são apresentados os dados das médias dos resultados obtidos neste experimento, da enzima livre, e das somas dos dois processos das enzimas imobilizadas em 3 e 4% de alginato de sódio.

Figura 4.17 – Comparativo das produções de glicose pelas enzimas imobilizadas em alginato 3 e 4% e na forma livre.



Fonte: Do autor

Ambas as curvas apresentaram o comportamento esperado. Existem alguns pontos de declínio, em ambos os processos, porém, em todos eles, pode-se afirmar que ocorreram devido a erros experimentais, uma vez que o ponto seguinte mantém o comportamento que a curva deveria apresentar. Tais erros podem ter ocorrido na coleta das amostras, na diluição durante a quantificação, equipamentos descalibrados ou durante a leitura no espectrofotômetro.

Era esperado também, que a produção de glicose utilizando uma enzima imobilizada fosse menor do que uma enzima livre devido à sua limitação difusional. Durante o processo de imobilização, pode ocorrer a inativação de parte das enzimas, o que faz com que o rendimento seja menor. De acordo com o trabalho de Antunes (2015), quando se utilizam altas concentrações de alginato, as esferas com enzimas imobilizadas apresentam problemas com transferência de massa e rompimento. A biomassa utilizada não tinha tamanho nem formato uniformes, possuía fibras longas, bem maiores do que os poros, e isto pode ter dificultado o processo difusional. Por tanto, maiores poros poderiam promover uma maior área para a transferência de massa pelo método difusional.

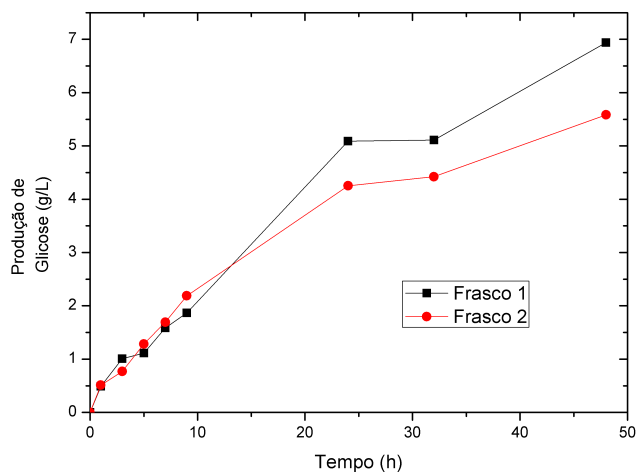
Foram possíveis apenas dois usos e na soma das suas concentrações foi obtido 40% do que foi produzido pela enzima livre. Assim, ao avaliar a menor concentração de glicose obtida com a enzima livre e a maior concentração de glicose utilizando a enzima imobilizada em 4% de alginato, este método pode ser avaliado como insuficiente e, neste caso, não viável.

Este método de imobilização se comportou como um sistema de liberação controlada de enzimas, pois com o rompimento, elas foram liberadas no meio hidrolisado ao longo do tempo de reação.

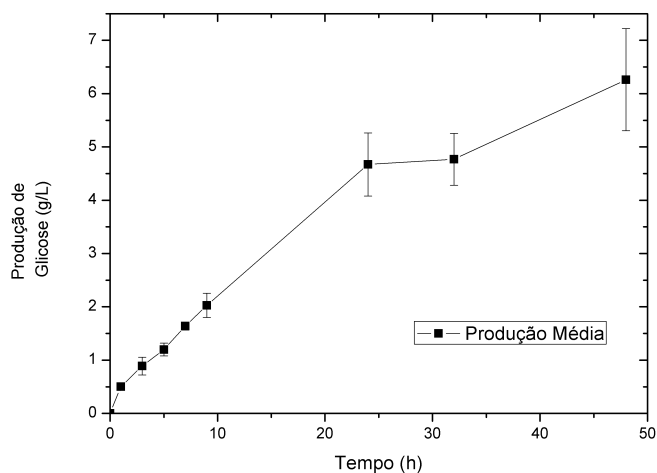
4.3.3.3 Método 3: Imobilização enzimática por adsorção em esferas de quitosana ativas com glutaraldeído

Com a realização da hidrólise enzimática no primeiro uso das esferas de quitosana, foram obtidas as concentrações de glicose, conforme mostra a Figura 4.18.

Figura 4.18 – Dados da produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em esferas de quitosana durante o primeiro uso.



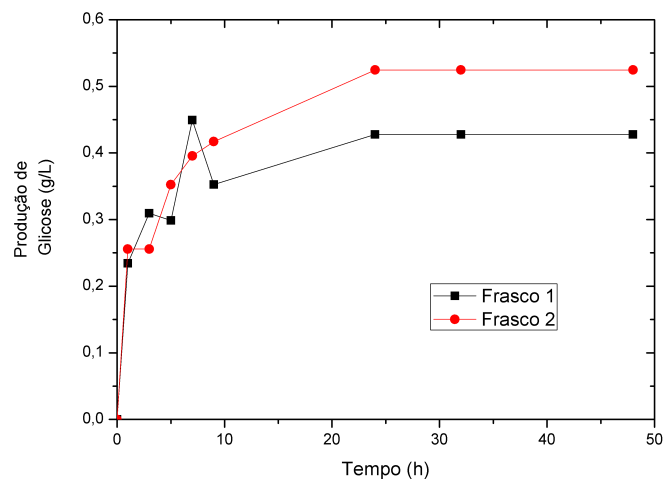
(a) Duplicata



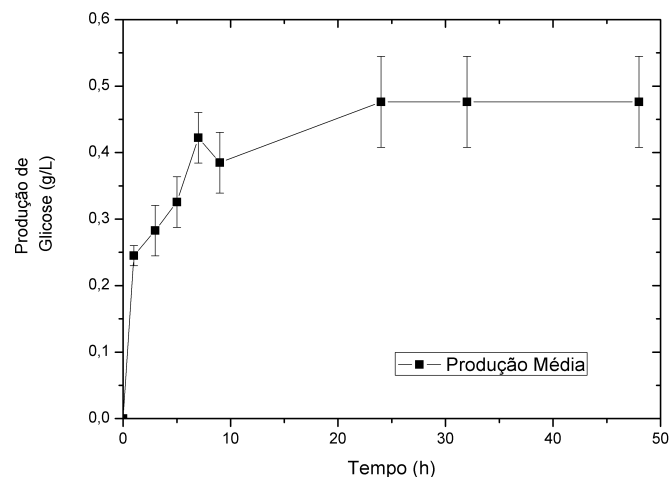
(b) Média

A produção de glicose no primeiro uso da enzima imobilizada em esferas de quitosana foi 36% da quantidade produzida pela enzima na forma livre. No segundo uso, a produção reduziu, e foi produzido no segundo uso apenas 7% do que foi produzido no primeiro. Ao comparar a produção no reuso com a quantidade de glicose produzida pela enzima livre, observa-se uma produção 97% menor. Os resultados obtidos no reuso são apresentados na Figura 4.19.

Figura 4.19 – Dados da produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em esferas de quitosana durante o segundo uso.



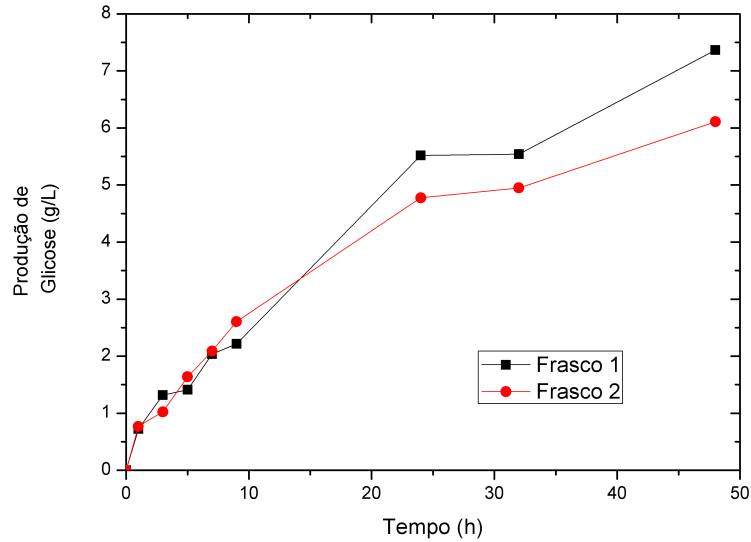
(a) Duplicata



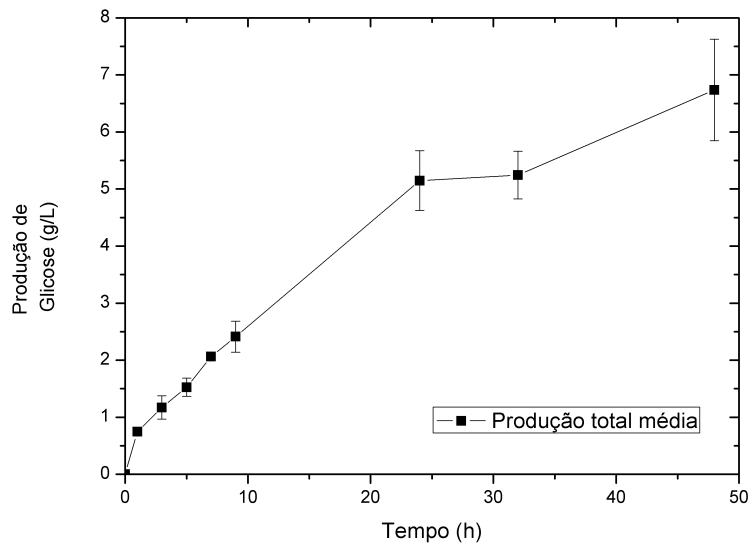
(b) Média

A Figura 4.20 apresenta a soma dos resultados de produção de glicose do primeiro e segundo uso.

Figura 4.20 – Soma dos dados da produção de glicose pelas enzimas imobilizadas em esferas de quitosana durante os dois usos.



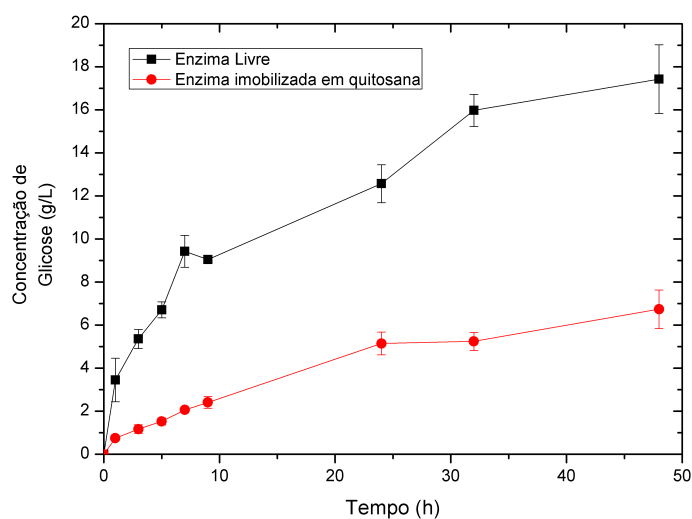
(a) Duplicata



(b) Média

A produção total de glicose pelas enzimas imobilizadas foi aproximadamente 40% da quantidade produzida pela enzima livre. A razão para uma menor produção pode ser a inativação das enzimas durante o processo de imobilização, o cisalhamento provocado pelo atrito com a biomassa, ou uma combinação deles. A Figura 4.21 apresenta a comparação das curvas de produção de glicose pelas enzimas: livre e imobilizada em esferas de quitosana.

Figura 4.21 – Comparativo entre as produções de glicose pelas enzimas: livre e imobilizada em esferas de quitosana.



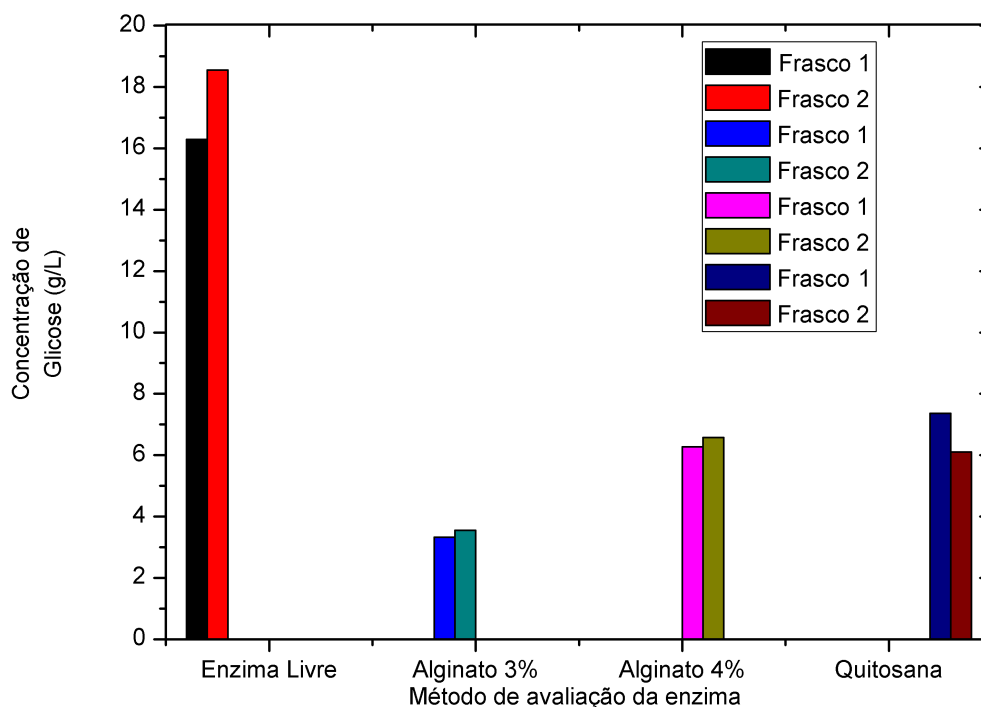
Fonte: Do autor

Neste método, as esferas de quitosana resistiram todo o tempo de reação e puderam ser recuperadas. Não foi realizado outro processo de hidrólise para avaliar qual seria o comportamento das esferas em um próximo reuso. A produção poderia se estabilizar e ser igual para todos os reusos seguintes, ou poderia decair proporcionalmente, e até mesmo não produzir nada em um próximo reuso. Portanto, não é possível prever, com certeza, qual seria o rendimento em outros usos e quantos reusos estas enzimas poderiam suportar. Seria interessante descobrir a perda enzimática no processo para prever a possibilidade de um próximo reuso. Uma forma de quantificar a perda de enzimas pelo suporte no processo seria realizar a análise de quantificação proteica (BRADFORD, 1976) do sobrenadante ao final da hidrólise, o que não foi realizado neste trabalho.

Nos gráficos dos resultados das curvas de produção de glicose apresentadas através dos dados das médias de produção, é possível visualizar o desvio padrão. Ele representa o quanto os dados coletados se destoam da média. Em grande parte dos resultados, alguns pontos, apresentaram alto valor para o desvio padrão, o que pode ser explicado por erros no momento da coleta da amostra ou de análise, o que pode ser confirmado ao visualizar o gráfico da duplicata, onde um ponto não estará seguindo a tendência dos outros. Em alguns casos o erro foi apenas em um dos frascos da duplicata, em outros, o erro esteve presente nos dois pontos coletados no mesmo horário.

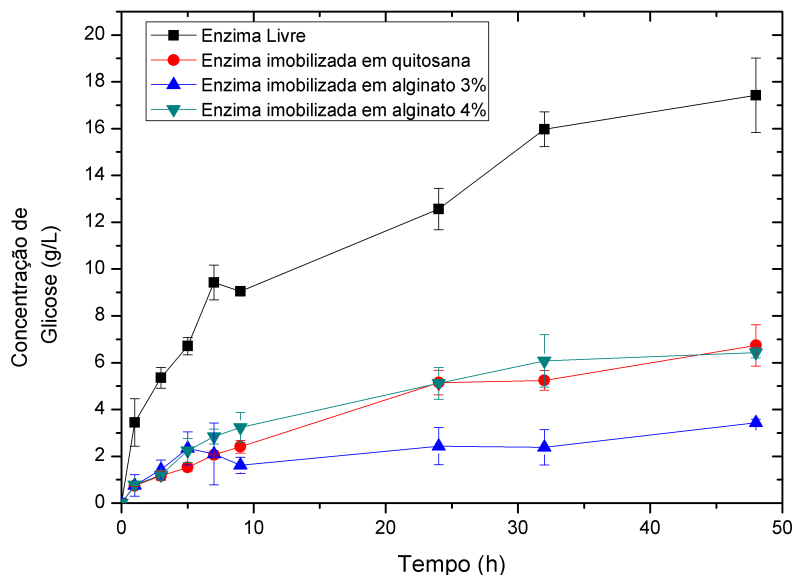
Diante do exposto, os resultados dos três experimentos, pode-se comparar as concentrações de glicose produzidas com uso da enzima na forma livre com a reação usando a enzima na forma imobilizada pelos dois métodos. A Figura 4.22, apresenta os resultados finais das produções em duplicada dos experimentos realizados para fins de comparação da concentração de glicose total, e a Figura 4.23, apresenta as curvas de produção de glicose por todos os métodos de imobilização e pela enzima na forma livre.

Figura 4.22 – Comparação entre as produções totais de glicose pelas enzimas avaliadas nos experimentos.



Fonte: Do autor

Figura 4.23 – Comparação entre as curvas de produção de glicose pelas enzimas avaliadas nos experimentos.



Fonte: Do autor

A concentração de glicose média ao final da hidrólise, analisando os dados das Figuras 4.22 e 4.23 foi de:

- Enzima livre: $17,42 \pm 0,73$ g/L;
- Enzima immobilizada em alginato 3%: $3,44 \pm 0,62$ g/L;
- Enzima immobilizada em alginato 4%: $6,42 \pm 0,46$ g/L;
- Enzima immobilizada em quitosana: $6,74 \pm 0,32$ g/L.

Com estes dados é possível avaliar que a enzima immobilizada com alginato 3% produziu 19,75% em relação à produção de glicose pela enzima livre. A enzima immobilizada com alginato 4%, produziu 36,85% da glicose produzida pela enzima livre e a enzima immobilizada em quitosana, produziu 38,69% da quantidade produzida pela enzima livre. Para uma visão otimista, pode-se comparar a melhor produção de enzima immobilizada, que foi da enzima immobilizada em quitosana, 7,37 g/L, com a pior produção da enzima livre, 16,30 g/L. Ainda assim, a enzima immobilizada produziu 45,21% da produção da enzima livre e para manter a mesma produção, seria necessário utilizar pouco mais que o dobro de enzima immobilizada.

Posteriormente à análise dos resultados expostos, foi reavaliada a eficiência de imobilização do método 3, e notou-se que houve um equívoco nos cálculos e a quantidade de enzima imobilizada adicionada ao processo, foi menor do que a necessária para manter a carga enzimática de 10 $FPU/g_{substrato}$. Para calcular a eficiência de imobilização devem ser relacionadas as concentrações inicial C_0 e final C_f da solução de adsorção das enzimas no suporte, através da equação 4.1:

$$E(\%) = \frac{C_0 - C_f}{C_0} * 100 \quad (4.1)$$

Sendo o valor da C_0 5,47 g/L e C_f 5,08 g/L a eficiência de imobilização foi de 7,22%. Como a quantidade de enzima adicionada na solução foi de 2 mL, a quantidade total de enzimas adsorvidas na 19 esferas foi de 0,1443 mL, 0,0076 mL por esfera. Para manter a carga enzimática fixada, com 0,09 mL de enzima, seriam necessárias aproximadamente 12 esferas, porém so foram adicionadas 5 e o volume de enzimas imobilizadas utilizadas foi de aproximadamente 0,038 mL. Sendo assim, os resultados obtidos não podem ser comparados exatamente com os resultados de produção da enzima livre, uma vez que além de livre no meio, ela estava em maior quantidade.

Para fins comparativos seria interessante realizar novamente a hidrólise com a quantidade correta, porém, como não é possível, pode ser feita uma estimativa da produção proporcional. Utilizando os dados obtidos nos experimentos e calculando proporcionalmente a variação de produção com a variação da carga enzimática, obtém-se os dados a seguir:

- Produção glicosídica total pela enzima imobilizada em quitosana no frasco 1: 17,46 g/L;
- Produção glicosídica total pela enzima imobilizada em quitosana no frasco 2: 14,45 g/L;
- Produção glicosídica total pela enzima imobilizada em quitosana média: 15,96 g/L;

Considerando a produção média de glicose pela enzima 17,42 g/L, variando entre 16,30 g/L e 18,55 g/L, os resultados foram muito próximos, sendo que o melhor resultado da enzima imobilizada superou pior resultado da enzima livre e se igualou à média de produção desta. Estes resultados foram excelentes e podem viabilizar o processo de imobilização, especialmente porque o suporte ainda apresentava possibilidade de um novo reuso.

Além destes pontos já citados, existe a possibilidade de haver adsorção da glicose nos suportes, o que seria uma hipótese de ter ocorrido uma produção ainda melhor.

Como foi visto, houve uma redução considerável na produção de glicose durante o reuso em relação à produção no primeiro uso. Além da possibilidade de o atrito com a biomassa ter

provocado cisalhamento e desorção das enzimas do suporte, é necessário avaliar a interferência do tempo de hidrólise na inativação das enzimas. A produção em geral atingia ou se aproximava do seu máximo por volta de 24h de hidrólise. Nas 24h restantes, não havia produção expressiva, porém havia exposição ao meio e ao atrito, o que pode ter provocado a inativação das enzimas, além de sua perda para o meio. É possível que menores ciclos produzissem uma maior quantidade de glicose pois a enzima não seria exposta por tanto tempo, e poderia agir melhor no início das hidrólises, quando há maior quantidade de substrato e menor concentração de produto.

5 CONCLUSÃO

Ao avaliar todos os processos realizados neste trabalho, foi possível concluir que não é viável imobilizar a enzima celulase CELIC CETEC2 com alginato de sódio para a sua utilização no processo de hidrólise para produção de etanol de segunda geração. É possível fazer esta afirmação caso o tampão utilizado como meio reacional contenha citrato de sódio, uma vez que a imobilização não é resistente e só permite um reuso. Além disso, as condições de pH e temperatura podem ter afetado na resistência da matriz de imobilização ao meio. Neste trabalho, com a soma das concentrações dos usos da enzima imobilizada, a concentração de glicose é cerca de 63% inferior à concentração obtida utilizando a enzima na sua forma livre, valor insuficiente para a viabilização do processo. Em contrapartida, os dados obtidos nestes resultados impulsionam o estudo de um sistema de liberação controlada de enzimas para a melhoria na produção de glicose.

Os resultados da imobilização em quitosana inicialmente não foram satisfatórios em relação à concentração de glicose obtida. Porém, neste método de imobilização as matrizes imobilizadas resistiram ao meio hidrolisado, o que mostra que este método pode ser potencialmente viável. Posteriormente foi reavaliada a quantidade adsorvida no suporte e feita uma projeção dos resultados com a carga enzimática correta, que apresentaram-se excelentes e viáveis economicamente. Algumas adaptações no método ainda poderiam ser realizadas, como por exemplo a avaliação ao longo do tempo em que o suporte ativado está imerso na solução enzimática da variação da concentração de proteína na solução, para que a máxima adsorção seja realizada, e o processo seja interrompido quando a concentração proteica estiver constante com a variação do tempo. Fatores que também podem ser variados durante esse processo são a temperatura, pH e agitação. É possível que a variação destas condições operacionais altere a adsorção das enzimas no suporte. Na produção do suporte, a concentração da solução de quitosana pode ser variada para avaliação e a concentração da solução de gotejamento de KOH também pode ser variada para avaliar o efeito. A concentração de glutaraldeído para ativação do suporte e o tempo de imersão deste na solução podem melhorar a capacidade do suporte de adsorver as enzimas.

Para ambos os métodos, é interessante avaliar o efeito da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na hidrólise com enzimas imobilizadas, pois este parâmetro pode ser um fator determinante para a formação do complexo Substrato-Enzima, uma vez que ela não está livre, e o contato entre enzima e substrato é o que garante que a reação de hidrólise ocorra. No mé-

todo de aprisionamento em matriz porosa, a granulometria do bagaço influencia diretamente na formação do complexo Substrato-Enzima, pois ocorre a difusão através dos poros, e conforme o tamanho e forma da biomassa, não é possível a transferência de massa através dos poros.

Também em ambos os processos de hidrólise, poderia ser interessante reduzir o tempo de duração para tentar reduzir a inativação enzimática ao longo das últimas horas do processo. Durante elas há baixa produção de glicose e alta exposição da enzima a condições que podem vir a promover sua inativação.

Os resultados com a enzima imobilizada por adsorção foram melhores. Tal fato pode ser explicado pelo fato de a enzima ter maior contato com o substrato, em relação à enzima aprisionada em matriz porosa, uma vez que está nas paredes da esfera. Com isso, possui maior área de contato para formar o complexo Substrato-Enzima, e garantir a reação de conversão da celulose em glicose.

Para que um processo de imobilização seja viável, é necessário que a soma das produções pela enzima imobilizada seja maior em relação à produção pela enzima livre, e apresente resistência ao meio, possibilitando sua recuperação e reuso. Os resultados dos métodos 1 e 2 não são viáveis economicamente, pois, a produção das enzimas imobilizadas é bem inferior à sua produção livre (menor que 50%) e não apresentaram resistência suficiente ao meio deste estudo. Já o método 3 apresentou resultados viáveis na projeção, e tem potencial para realizar produções ainda melhores. O processo de imobilização enzimática merece ser estudado pois tem potencial econômico na redução de custos de processos em várias áreas da indústria. Por isso, devem ser buscadas melhorias nos métodos existentes, tal como a descoberta de novos métodos que tornem o processo economicamente viável.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. M. d. S. Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos. 2008.
- ANP. **Gasolina**. 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/petroleo-derivados/155-combustiveis/1855-gasolina>>. Acesso em: 09/04/2019.
- ANTUNES, F. A. F. **Imobilização celular de Scheffersomyces shehatae UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2015.
- AZEVEDO, V. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27–34, 2007.
- BEZERRA, R. L. d. F. O. et al. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 3, p. 642–648, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, Elsevier, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- CHAGAS, P. M. B. et al. Catalytic stability of turnip peroxidase in free and immobilized form on chitosan beads. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Excellent Publishers, v. 3, n. 11, p. 576–595, 2014.
- CORRÊA, L. J. **Estudos de melhorias no processo de hidrólise enzimática de biomassas para produção de etanol**. Tese (Doutorado), 2016.
- DUARTE, J. C. et al. Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes no processo de fermentação alcoólica. [sn], 2011.
- FARINA, E.; RODRIGUES, L.; SOUSA, E. d. A política de petróleo e a indústria de etanol no Brasil. **Interess. Nac**, v. 6, p. 64–75, 2013.
- FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. d.; SILVA, F. d. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623–638, 2009.
- KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food microbiology**, Elsevier, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.
- LINHARES S. GEWANDSZNAJDER, F. **Biologia hoje: Biologia - primeiro ano do Ensino Médio**. [S.l.]: Editora Ática, SP, 2013. v. 2. 52–61 p.
- MACIEL, Á. d. N. Influência do íon Ca^{2+} no desenvolvimento de micropartículas de alginato de sódio preparadas por gelatinização iônica. 2013.
- MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

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

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L. d.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, SciELO Brasil, v. 21, n. 4, p. 305–310, 2011.

PACHECO, T. et al. Aplicação de celulases imobilizadas na hidrólise de brachiaria brizantha. In: IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA-COBEQ, 20.; ENCONTRO **Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. [S.l.], 2014.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: primeira ou segunda geração? **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011., 2011.

PEREIRA, M. B. et al. Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Universidade Federal de Goiás, 2019.

RABELO, S. C. et al. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. [sn], 2010.

RAGHU, H.; RAJESHWARA, N. Immobilization of [alpha]-amylase (1, 4-[alpha]-d-glucanglucanohydrolase) by calcium alginate encapsulation. **International Food Research Journal**, Universiti Putra Malaysia, Faculty of Food Science & Technology, v. 22, n. 2, p. 869, 2015.

RAÍZEN. **Tecnologia em energia renovável - Etanol de segunda geração**. 2019. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/pt/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao>>. Acesso em: 10/04/2019.

ROSA, S. E. S. d.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2009.

SANTOS, F. A. et al. Potential of sugarcane straw for ethanol production. **Química Nova**, SciELO Brasil, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SILVA, M. d. S. et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, Sociedade Brasileira de Química, p. 1868–1873, 2010.

SOUZA, L. C. d. **DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA DE CANA (Saccharum Officinarum L.) USANDO DIFERENTES ESTIRPES DE Saccharomyces cerevisiae E ESTUDO DE IMOBILIZAÇÃO COM ALGINATO E BAGAÇO**. Tese (Doutorado), 2018.

UNICA. **Histórico do setor**. 2019. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/linhadotempo/index.html>>. Acesso em: 21/05/2019.