



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tecnologia de Bioadsorventes à Base de Carboidratos para Recuperação e Purificação de Enzima Celulase

Raíssa Vasconcelos C.Figueira¹, Ana Letícia C. Oliveira¹, Isabela Maria Lima¹, Maria Mariana S. Rocha², Júlia Feijó Barros³, Gilcenara de Oliveira⁴

¹Universidade de Fortaleza – Eng. Ambiental e Sanitária - CCT

²Universidade de Fortaleza – Eng.Civil - CCT

³Universidade de Fortaleza – Eng.Produção - CCT

⁴Universidade de Fortaleza – Centro de Ciências Tecnológicas- CCT
Av.Washington Soares, 1321 – 60.811-905- gilcenara.oliveira@ unifor.br

RESUMO

*A utilização de biopolímeros para a redução dos impactos ambientais tem estado na vanguarda das inovações tecnológicas. Neste contexto, esta pesquisa tem por objetivo utilizar resíduos da agroindústria e da carcinicultura. Realizou-se experimentos, onde a galactomanana foi extraída de sementes de *Caesalpinia pulcherrima* para servir de cobertura de microesferas de alginato e quitosana no intuito de produzir adsorventes baratos e de tecnologia sustentável, à base de carboidratos para recuperação de enzimas com alto valor agregado, neste caso a celulase. O aproveitamento de resíduos lignocelulósico através de hidrólise dos biopolímeros constituintes da biomassa é uma das formas de sustentabilidade ambiental. A conversão destes a bioetanol tem merecido atenção especial, e ainda baratear o custo desses adsorventes. As metodologias utilizadas indicaram que a preparação de esferas de quitosana, adicionando agentes reticulantes, produzem materiais com significativa eficiência de adsorção, ou seja, que os adsorventes obtidos apresentam um elevado potencial de recuperação da enzima celulase.*

Palavras-chave: Adsorção. Alginato. Galactomanana. Quitosana.

INTRODUÇÃO

Galactomanana é a denominação dada a polissacarídeos neutros, que atuam como reserva de energia e são extraídos do endosperma de sementes de certas leguminosas. Uma série de fatores contribui para a utilização industrial da galactomanana, tais como massa molar, solubilidade em água e a distribuição sequencial dos resíduos galactopiranosila, ao longo da cadeia principal.

A quitina, por sua vez, é um polissacarídeo de cadeia longa, amplamente distribuída na natureza, presente na carapaça de crustáceos, moluscos e insetos, constituindo o segundo mais abundante biopolímero depois da celulose. Com a desacetilação dos grupos acetil ($-\text{COCH}_3$), com solução concentrada de NaOH, a quitina é transformada em quitosana. (GOOSEN, 1997). Este biopolímero possui três grupos reativos funcionais, um grupo amino na posição C-2, e duas hidroxilas, nas posições C-3 e C-6, respectivamente (FURUSAKI et al., 1996). O grupo amino é o responsável por sua natureza policatiónica, com a sua protonação quando em contato com soluções ácidas. A quitosana pode tornar-se quimicamente mais inerte e resistente ao meio ácido. Assim, bloqueam-se os grupos amino com um agente bifuncional, ou agente reticulante como o glutaraldeído ou 1,5 pentanodial ($\text{HOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COH}$). A ligação



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

covalente entre o grupo amino e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a pH extremos e temperatura. Outro agente reticulante é a epícloridrina (1-cloro-2,3-epoxipropano), onde a reticulação envolve o bloqueio preferencial, dos grupos OH.

O alginato é um biopolímero de alto peso molecular, da família de copolímeros binários, formado por ligações 1-4 de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), apresenta grande variação, tanto na composição quanto na estrutura seqüencial. (HAUG; LARSEN; SMIDSRÖD, 1967; KING, 1983).

A adsorção é um fenômeno de superfície em que uma quantidade finita de moléculas de um fluido (adsorbato), se concentra na superfície de um sólido (adsorvente). Este trabalho apresenta um estudo de adsorventes alternativos com diferentes propriedades de adsorção-desadsorção, fazendo uso de carboidratos e alterações químicas proporcionadas pelo emprego de agentes reticulantes. A reticulação influencia na capacidade de entumescimento e porosidade, na capacidade de troca de cargas, na difusividade interna do adsorbato, na facilidade ou não de regeneração desse adsorvente após uso em processos de adsorção, no acesso de íons dos grupos funcionais do adsorbato aos sítios de adsorção do adsorvente e, finalmente, nas estabilidades térmica, mecânica e química (FRANCISCHETTI *et al.*, 2004), o uso de microesferas é uma estratégia para otimizar a capacidade de adsorção. Diante disso, esta pesquisa tem por objetivo utilizar resíduos da agroindústria e da carcinicultura. Assim, realizou-se experimentos, onde a galactomanana foi a cobertura de microesferas de alginato e quitosana no intuito de produzir adsorventes baratos e de tecnologia sustentável, à base de carboidratos para recuperação de enzimas celulase.

MATERIAL E MÉTODOS

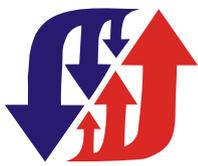
Os materiais e reagentes foram: quitosana (Polymar S/A), com densidade 0,60 g/mL, Ácido acético glacial, hidróxido de sódio, acetato de sódio, ácido fosfórico 85%, etanol 95%, cloreto de cálcio e glutaraldeído 25% de grau analítico (Vetec, São Paulo), epícloridrina (Sigma Aldrich); enzima celulase Cellutex 20 (Novozyme), alginato (Merck). Galactomanana extraída de sementes de *Caesalpinia pulcherrima* (CERQUEIRA *et al.*, 2009).

Inicialmente, foram feitos os géis de alginato 1% e quitosana 4% segundo Queiroz *et al.* (2008). Utilizando uma bomba peristáltica as esferas foram sintetizadas nas soluções coagulantes de CaCl_2 dissolvido em água destilada e NaOH dissolvida em ácido acético, respectivamente.

Houve a imersão das esferas em um gel de galactomanana 1%, no período de 12h, e a lavagem das mesmas com água destilada até que atingissem pH neutro no intuito de realizar a cobertura das esferas. Em seguida, as esferas foram reticuladas com soluções de glutaraldeído 1% que seguiu protocolo de Oliveira (2011) adaptado de Torres (2006) e reticulada com epícloridrina (OLIVEIRA, 2011) adaptado de Braga *et al.* (2007).

Foram realizados ensaios de adsorção em tanque agitado para a obtenção de análises de superfície-resposta. Após a preparação das colunas seguiu-se às cromatografias. Na primeira utilizou-se esferas de alginato, coberta com galactomanana. Já na segunda, utilizou-se esferas de quitosana com a mesma cobertura. A coluna foi alimentada com uma solução enzima celulase para obtenção do pico I, NaCl 1M para o pico II e NaCl 0,15M como tampão conforme protocolo de Moreira (1998).

Posteriormente, foram feitos as análises dos picos I e II de ambas as colunas, e a análise de FPA com os picos I (não apreados) e II da coluna de quitosana 4%, com

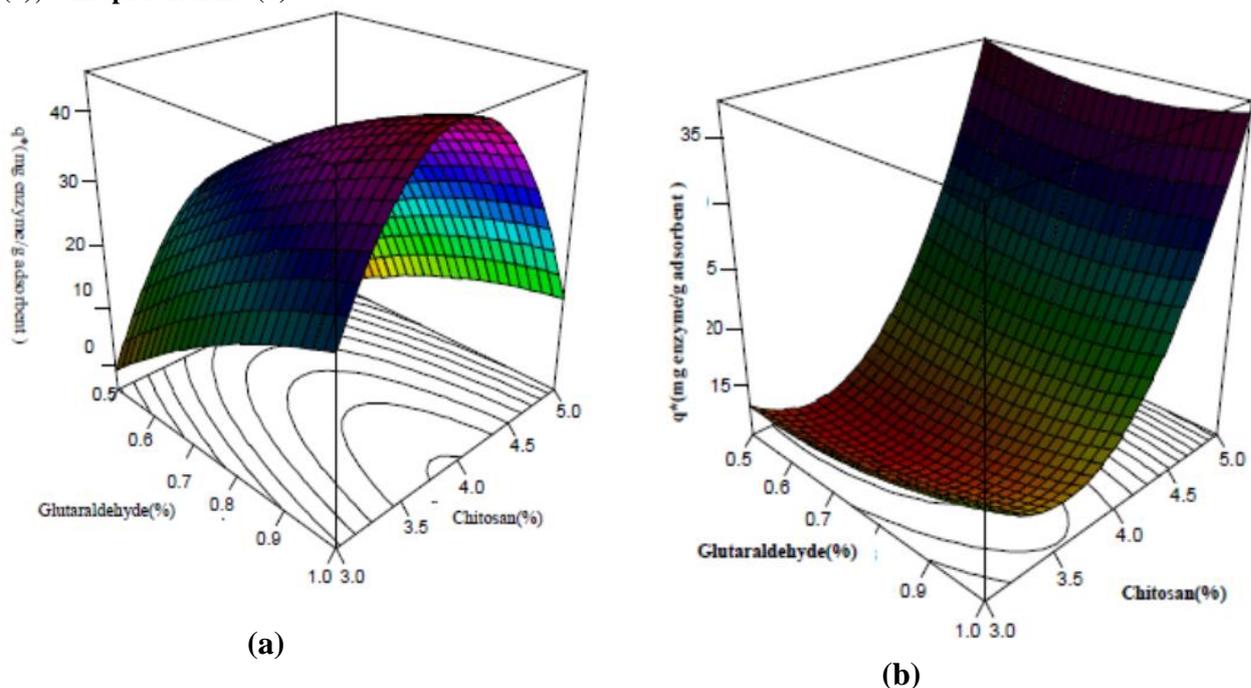


XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

galactomanana 1% apenas, e as leituras no espectrofotômetro com $\lambda=540\text{nm}$. Os resultados dessa leitura foram plotados da curva de glicose entre as concentrações 0,1 e 1,5mg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em trabalhos anteriores, a preparação das esferas de quitosana, com e sem a presença de agentes reticulantes, foram obtidos valores de adsorção (q^*), e constatou-se que a presença de ambos agentes reticulantes potencializava a adsorção da enzima pelo adsorvente (TORRES *et al.*,2007). Com o planejamento de experimental obteve-se uma matriz com Metodologia de Superfície-Resposta. As superfícies de resposta com as variáveis dependentes e independentes estudadas são mostradas na **Figura 1a e 1b**. Segundo Osifo et al. (2008) em estudos com altas concentrações de glutaraldeído houve uma redução na capacidade de adsorção. Por outro lado, a **Figura 1b**, sem epicloridrina, está mostrando que um aumento na percentagem de quitosana indica uma mudança conformacional e os desdobramentos da enzima adsorvida. **Figura 1. Superfície de resposta para as capacidades de adsorção, q^* , massa de enzima adsorvida por grama de adsorvente, em função de concentração do glutaraldeído (%) e quitosana (%), com epicloridrina (a); sem epicloridrina (b).**



As esferas foram sintetizadas e os resultados da cobertura e das reticulações foram satisfatórios.

O processo de adsorção em colunas de leito fixo é geralmente o mais empregado, pois oferece como vantagens o pequeno espaço, a operação simples, a possibilidade de tratamento de grandes volumes de efluentes de forma contínua, rendimento considerável e a capacidade de acomodar variações na concentração de íons na alimentação, além de favorecer a ampliação da escala de laboratório para a escala industrial (VALDMAN et al., 2001).

A coluna de alginato não apresentou o resultado esperado. Entretanto, a coluna de quitosana apresentou picos bem definidos, com um pico II elevado (Fig. 2). A análise de FPA



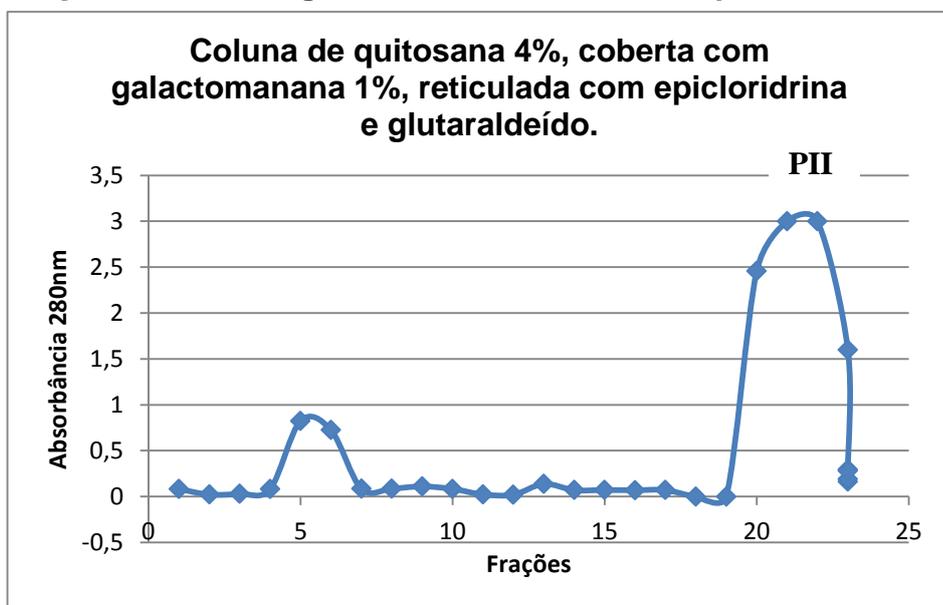
XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

das frações deste pico mostrou bons resultados, o que indica que as esferas adsorveram bem a enzima celulase (Tabela1). A enzima celulase permaneceu íntegra, ou seja, manteve sua atividade de hidrolisar o papel filtro em glicose, segundo Gossen (1997) e Miller (1944).

Tabela 1- FPA do Pico II

Frações	FPA(U/mL)
20	0,37
25	0,94
28	0,95
29	0,49
31	0,73
33	0,80
34	0,53
35	0,49
37	0,53
38	0,48
40	0,38

Figura2- Cromatografia com a coluna de quitosana



CONCLUSÕES

As esferas de quitosana 4% com galactomanana 1% em presença de epiclorigidrina e glutaraldeído apresentaram os melhores resultados. O número de sítios de adsorção foi otimizado em presença de agentes reticulantes, com maior eficiência quando utilizada a epiclorigidrina. Tanto na cromatografia de leito fixo como na análise de FPA pode-se constatar a adsorção da celulase nas esferas, a metodologia de esferas recobertas com carboidratos pode ser uma satisfatória tecnologia para recuperação de enzimas celulase e de forma sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braga, R.C.;Teixeira-Sá, D.M.A.; Ribeiro, A.F.; Miranda,R.L.; Almeida,L.M.; Horta, A.C.G.; Moreira, R.A. 2011. Evaluation of Caesalpinia Pulcherrima Endospermic Gum as Affinity Matrices for Galactose-Binding Lectins Interaction Brazilian Archives of Biology And Technology Vol.54, N. 2: Pp. 283-292.
- Goosen, M.F.A. 1997.Applications of Chitin and Chitosan. Technomic Publishing Company, Pennsylvania, U.S.A., 336 p.
- Haug, A.; Larsen. B.; Smidsrod, O. 1967.Correlation between chemical structure and physical properties of alginates. Acta Chemica Scandinavica, v. 21, p. 691 – 704.
- Moreira, R.A.2011. Evaluation of Caesalpinia Pulcherrima Endospermic Gum as Affinity Matrices for Galactose-Binding Lectins Interaction Brazilian Archives of Biology And Technology Vol.54, N.2: Pp. 283-292.
- Oliveira, G. 2011. Estudos de Adsorventes Preparados à Base de Quitosana para Recuperação e Purificação de Celulases. Tese de Doutorado. RENORBIO-Fortaleza-CE.
- Torres, M. A. 2006. Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima. Tese de Doutorado. UNICAMP-SP. 146p.
- Valdman, E.; Erijman, L.; Pessoa, F. L. P.; leite, S. G. F. 2001. Continuous Biosorption of Cu and Zn by Immobilized waste biomass Sargassum sp. Process Biochemistry, v. 36, p. 869-873.