



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

MARCELO WIGG PERFETO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA CELULASE NO
BIOPOLIMENTO DE SUBTRATO DE ALGODÃO**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

Marcelo Wigg Perfeto

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA CELULASE NO
BIOPOLIMENTO DE SUBTRATO DE ALGODÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Coorientadora: Prof. Dra. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza

**Florianópolis - SC
2012**

AValiação DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA CELULASE NO BIOPOLIMENTO DE SUBTRATO DE ALGODÃO

Marcelo Wigg Perfeto

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 30 de março de 2012.

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
Orientador

Prof^a. Dr^a. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza
Coorientador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campos

Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira

Prof. Dr. José Antônio Ribeiro de Souza

*“‘cause I’m a man of the past
and I’m living in the present
and I’m walking in the future”*

*Mystic Man
Peter Tosh*

Aos meus pais pelo amor incondicional, pelo incentivo a lutar sempre pelos meus ideais e por um futuro melhor. Ao meu irmão, meu grande amigo, pelo carinho, momentos de descontração e paciência. A minha amável noiva pela sabedoria e acalanto nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e as oportunidades de crescimento pessoal, intelectual e profissional.

Aos professores Antônio Augusto Ulson de Souza e Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza pela orientação deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido à realização desta pesquisa.

A Universidade Federal de Santa Catarina pela disponibilização dos espaços físicos para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos Diego Mendonça, Ingrid Dittert, Fabiola Vignola, Maria Fernanda Sonesso, Crisleine Zottis, Franciélle Girardi e Juçara Hobold, pelos momentos agradáveis e pelo incentivo e ajuda.

A todos que fizeram parte da minha vida neste período, mesmo que por muitas vezes distantes, agradeço aos ensinamentos de vida, compreensão e carinho.

RESUMO

As enzimas celulásicas vêm sendo amplamente utilizadas em substituição aos produtos químicos nas indústrias têxteis em etapas de biopolimento, conferindo aos artigos têxteis maior maciez e melhor acabamento superficial através de um processo ambientalmente correto. Neste contexto, o foco deste trabalho foi avaliar a etapa de biopolimento sob diferentes condições reacionais. Os processos enzimáticos, e em particular a aplicação de celulase investigada neste trabalho, apresentam limitantes como a inibição proporcionada pelos produtos solúveis da reação, afetando diretamente a cinética enzimática. Além disso, a aplicação de celulase na etapa de biopolimento forma como subproduto microfibrilas insolúveis de algodão, que após secas geram um fino pó que acompanham principalmente os artigos felpudos acabados, dando um aspecto indesejável ao produto final. Neste trabalho, aplicou-se celulase comercial sobre tecido felpudo na presença dos inibidores glicose e celobiose, com o objetivo de avaliar o grau de redução da atividade enzimática, a adsorção da celulase sobre o substrato, perda de massa da amostra e geração do pó resultante da clivagem das fibras de algodão pela celulase e posterior análise de suas características físicas. Inicialmente, em escala de bancada, o processo de biopolimento foi simulado utilizando-se concentrações enzimáticas de 5,0 a 50,0 $\mu\text{L}/\text{g}_{\text{substrato}}$ e agitação orbital branda, através de *shaker* em banho termostático, na presença de concentrações iniciais dos inibidores glicose e celobiose. Nesta etapa avaliou-se o efeito dos inibidores (a) em tratamento com diferentes concentrações de celulase após 1 h de hidrólise e (b) através de cinética enzimática a uma concentração de 50,0 $\mu\text{L}/\text{g}_{\text{substrato}}$, onde amostras foram coletadas ao longo do período de reação. Por meio destes experimentos foi possível observar uma maior ação inibitória da glicose sobre as enzimas que compõem o complexo celulásico. Já para a celobiose não se observou um grande inibidor nas condições de teste. No processo com sobrecarga enzimática (342,5 $\mu\text{L}/\text{g}_{\text{substrato}}$), 3 h de tratamento e agitação mecânica intensa através de equipamento laboratorial de tingimento e testes de solidez à lavagem, os resultados foram similares ao processo anterior, contudo o efeito de inibição da celobiose tornou-se mais pronunciado após 1 h de tratamento. Além disso, observou-se ao longo do processo um aumento na adsorção da celulase sobre o substrato quando aplicado glicose e celobiose, obtendo-se uma adsorção ao fim de 180 min de 3,84 e 3,54 $\text{mg}/\text{g}_{\text{substrato}}$, respectivamente. Já na ausência de concentrações iniciais

dos inibidores, a adsorção foi de 2,91 mg/g_{substrato}. Foi possível, através da utilização de sobrecarga enzimática, a obtenção e quantificação do pó de algodão. Este pó, após tratamento de lavagem, secagem e pesagem, foi submetido à análise de difração de raio X para avaliação do grau de cristalinidade e imagens superficiais através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados de cristalinidade e análise superficial dos fragmentos de algodão não apresentaram diferenças expressivas para os tratamentos na ausência e na presença de concentrações iniciais dos inibidores glicose e celobiose. Os resultados deste trabalho são importantes para balizar a aplicação do biopolimento de tecidos felpudos de algodão na indústria têxtil, evitando as condições que favoreçam a geração de pó no produto final.

Palavras chaves: Biopolimento, celulase, inibição enzimática, pó de algodão.

ABSTRACT

The cellulase enzymes are being largely used substituting the chemicals agents in textile industry in bio-polishing process, giving to the textile fabrics softness and superficial finishing through an environmental correct process. Over this context, the focus of this work is to evaluate the bio-polishing process with different reaction conditions. The enzymatic processes, through the cellulase application, have limitations as an inhibition proportionate by the soluble products of the reaction, directly affecting the enzymatic kinetics. Moreover, the cellulase application in the bio-polishing step makes insoluble microfibrils of cotton as byproduct, generating a fine powder that, after dried, accompany the terry towels until the consumer, making an unwanted aspect to the final product. In this work, commercial cellulase was applied on terry cloth in the presence of inhibitors glucose and cellobiose, in order to evaluate the reduction of enzymatic activity degree, the cellulase adsorption on the substrate, weight losses of the sample and obtainment of cotton powder followed by analysis of their physical characteristics. Initially in bench scale, the bio-polishing process was simulated under conditions of enzyme concentration ranging from 5,0 to 50,0 $\mu\text{L}/\text{g}_{\text{substrate}}$ and mild orbital agitation, through shaker in thermostated bath, in the presence of inhibitors glucose and cellobiose. In this stage the inhibitors' effects was evaluated (a) in treatment with different celulase concentrations after 1 hour of hydrolysis and (b) through enzyme kinetics at a concentration of 50,0 $\mu\text{L}/\text{g}_{\text{substrate}}$, on which samples were collected throughout the period of reaction. Through these experiments it was possible to observe a greater glucose inhibitory action over the enzymes that compose the celulasic complex. Yet the cellobiose was not observed as a great inhibitor in the test conditions. In the process with enzymatic overload (342,5 $\mu\text{L}/\text{g}$), 3 hour treatment and intense mechanical agitation through the laboratory equipment of dyeing and wash fastness test, obtained similar results comparing to the previous process, however the cellobiose's inhibitory effect became more pronounced after 1 hour treatment. Furthermore, it was observed through the process a raise in the cellulase adsorption over the substrate when applied glucose and cellobiose, yielding an adsorption of 3,84 and 3,54 $\text{mg}/\text{g}_{\text{substrate}}$ at the end of 180 minutes, respectively. Yet in the absence of initial inhibitors concentration, the adsorption was 2,91 $\text{mg}/\text{g}_{\text{substrate}}$. It was possible, through the use of enzymatic overload, to obtain and quantificate the cotton powder. This

powder, after washing, drying and weighing treatment, was subjected to x-ray diffraction analysis to evaluate the crystallinity index and superficial images by Scanning Electron Microscope (SEM). The results of crystallinity and superficial analysis of cotton's fragments didn't show expressive differences to the treatments in the absence and presence of initial concentrations of inhibitors glucose and cellobiose. The results of this issue are important to guide the application of bio-polishing of cotton terry fabrics in the textily industry, avoiding the conditions that foment the beget of powder in the final product.

Keywords: Bio-polishing, cellulase, enzyme inhibition, cotton powder.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema da estrutura da fibra de algodão. | 31 |
| Figura 2. Representação do hemiacetal (a) e do aldeído (b) do grupo terminal redutor. R é a cadeia de polímero de celulose. | 34 |
| Figura 3. Estrutura da celulose com extremidade não redutora, unidade de celobiose e extremidade redutora..... | 35 |
| Figura 4. Projeção da cadeia de celulose: Vista ao longo do eixo central da cadeia, borda lateral e vistas frontais, em sua máxima largura, da cadeia polimérica..... | 36 |
| Figura 5. Representação da conformação plana da celulose com a distância das interações intramoleculares de hidrogênio..... | 37 |
| Figura 6. Planos cristalinos da celulose I, paralela ao eixo das microfibrilas e da celulose II com orientação antiparalela. O ângulo monoclinico β e as dimensões a e c para a celulose I são de 83,5°, 8,20 e 7,78 Å, respectivamente. Já para a celulose II estes valores são de 62,9°, 9,03 e 8,10 Å, respectivamente..... | 39 |
| Figura 7. Mecanismo de hidrólise da celulose (TEERI, 1997): C representa a região cristalina, R os grupos terminais redutores e NR os grupos terminais não redutores. | 40 |
| Figura 8. Mecanismo proposto da "amorfogênese" e hidrólise da celulose. "Amorfogênese" (A) ao nível macromolecular por um agente não hidrolítico. | 42 |
| Figura 9. Sítios ativos das celulasas: a - fenda (endoglucanase), b - túnel (celobiohidrolase)..... | 44 |
| Figura 10. Esquema representativo do modo de ação das celobiohidrolases de <i>Trichoderma reesei</i> (CBH I e CBH II). | 45 |
| Figura 11. Ação do complexo celulásico <i>Trichoderma reesei</i> | 46 |
| Figura 12. Representação esquemática da "amorfogênese" nas fibras celulósicas através da ação do domínio de fixação (CBD) das celobiohidrolases (CBH). | 48 |
| Figura 13. A figura apresenta microfibrilas tratadas com solução tampão, BSA e Swollenina. Na presença de Swollenina observa-se uma dispersão da superfície fibrilar. | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Inibição da Celulase: Principais etapas da hidrólise enzimática e efeito inibidor dos produtos sobre a celulase. Reações principais (1, 2), inibição gerada pela glicose (3, 4), inibição pela celobiose (5), inibição pelos substratos (6, 7) e transglicosilação (8, 9)..... | 52 |
| Figura 15. Estrutura molecular do corante “Coomassie Brilliant Blue” G-250..... | 56 |
| Figura 16. Esquema reacional de ART com ácido 3,5 -dinitrosalicílico..... | 57 |
| Figura 17. Exemplo de difratograma da celulose de algodão, representando os picos I_{101} , $I_{10\bar{1}}$ e I_{002} | 61 |
| Figura 18. Produção de ART em função da Concentração enzimática. O gráfico apresenta o efeito da produção de ART sem presença inicial de inibidor (◇ - S/Inib, linha tracejada), na presença de 0,30 mg/mL de Glicose (■ - Glic, linha clara) e na presença de 0,57 mg/mL de Celobiose (▲ - Celob, linha escura), após 60 min de tratamento. | 67 |
| Figura 19. Produção de ART em função do tempo de hidrólise enzimática. O gráfico apresenta o efeito da produção de ART sem presença inicial de inibidor (◇ - S/Inib, linha tracejada), na presença de 0,30 mg/mL de Glicose (■ - Glic, linha clara) e na presença de 0,57 mg/mL de Celobiose (▲ - Celob, linha escura), a uma concentração de 50 µL por grama de substrato seco..... | 68 |
| Figura 20. Perda de massa após tratamento de uma hora a 100 rpm com diferentes concentrações enzimáticas. O gráfico apresenta a perda de massa do tecido felpudo 100% celulose após hidrólise com celulase comercial..... | 70 |
| Figura 21. Produção de ART em função do tempo de hidrólise enzimática. O gráfico apresenta o efeito da produção de ART sem a presença inicial de inibidor (◆ - S/Inib, linha tracejada), na presença de 2,05 mg/mL de Glicose (■ - Glic, linha clara) e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose (▲ - Celob, linha escura), a uma concentração de 5 mg de proteína por grama de substrato seco. | 72 |
| Figura 22. Adsorção da enzima sobre substrato têxtil em função do tempo. O gráfico apresenta o efeito da adsorção da celulase, a uma concentração de 5 mg de proteína por grama de substrato seco, na ausência de inibidor (◇ - S/Inib, linha tracejada), na presença de 2,05 mg/mL de Glicose (■ - Glic, linha clara) e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose (▲ - Celob, linha escura)..... | 73 |

| | |
|--|----|
| Figura 23. Perda de massa após tratamento de 3 h a 100 rpm na ausência de inibidor, na presença de 2,05 mg/mL de Glicose e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose..... | 74 |
| Figura 24. Massa de pó de algodão obtido após tratamento de 3 h a 100 rpm na ausência de inibidor, na presença de 2,05 mg/mL de Glicose e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose. | 75 |
| Figura 25. Massa total (massa final do tecido, pó de algodão e Açúcares Redutores Totais) após tratamento de 3 h a 100 rpm na ausência de inibidor, na presença de 2,05 mg/mL de Glicose e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose..... | 75 |
| Figura 26. Análise de MEV de pó de algodão após tratamento enzimático na ausência de inibidor a uma ampliação de 200X..... | 78 |
| Figura 27. Imagens de MEV após tratamento na presença de concentrações iniciais de glicose (A) e celobiose (B) a uma ampliação de 70X..... | 79 |
| Figura 28. Imagens de MEV para amostras de fragmentos de algodão na ausência de concentrações iniciais de inibidores (A), na presença de concentração inicial de glicose (B), de celobiose (C) e de amostra sem tratamento enzimático (D) a uma ampliação de 2240X..... | 80 |
| Figura 29. Difratoograma de DRX apresentando os picos cristalinos 101, 10 $\bar{1}$ e 002 característicos da celulose I, após tratamento (A) sem inibidor, (B) com glicose [2,0 mg/mL], (C) com celobiose [3,9 mg/mL] e (D) tecido felpudo sem tratamento. | 83 |
| Figura 30. Diferentes picos no plano cristalino (002) observado através de difratograma de DRX da amostra de pó de algodão após tratamento enzimático nas deferentes condições e amostra de tecido felpudo sem tratamento. | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Composição típica do algodão bruto..... | 33 |
| Tabela 2: Composição química dos fragmentos da semente de algodão..... | 34 |
| Tabela 3: Atividade Enzimática sobre diferentes substratos..... | 41 |
| Tabela 4: Propriedades e organização estrutural das celulases produzidas pelo <i>T. reesei</i> | 47 |
| Tabela 5: Atividade enzimática total e por unidade de proteína. | 66 |
| Tabela 6: Índice de cristalinidade (ICr (%)) obtido a partir da razão entre as intensidades do halo amorfo (I_{am}) e do pico correspondente ao plano cristalino 002 (I_{002}) da celulose I. | 84 |

SIMBOLOGIA

| | |
|-----------|--|
| ART | Açúcar redutor total |
| Avicelase | Atividade exoglucanase |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CBD | Domínio de fixação (<i>cellulose binding domain</i>) |
| CBHs | Celobiohidrolases |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CMCase | Atividade endoglucanase |
| DNS | Ácido 3,5-dinitro-salicílico |
| DRX | Difração de raio X |
| EGs | Endoglucanases |
| FPU | Unidade papel filtro |
| GHs | Glucano-hidrolases |
| GP | Grau de Polimerização |
| I_{002} | Intensidade máxima de difração correspondente ao plano (002) dos cristais de celulose I |
| I_{AM} | Intensidade de difração devido à porção amorfa referente ao ponto de intensidade mínima entre os picos ($10\bar{1}$) e (002) |
| ICr | Índice de Cristalinidade |
| IUBMB | <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| LCM | Laboratório de Caracterização Microestrutural |
| LABMASSA | Laboratório de Transferência de Massa |
| m_i | Massa do tecido felpudo antes do tratamento enzimático |
| m_f | Massa do tecido felpudo após tratamento enzimático |
| $m_{pó}$ | Massa do pó de algodão obtido após tratamento enzimático |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |

| | |
|-----------|---|
| NANOTEC | Laboratório de Aplicação de Nanotecnologia em Construção Civil |
| pI | Ponto Isoelétrico |
| UI | Unidades Internacionais |
| β G | β -Glucosidases (Celobiase) |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 27 |
| 2 OBJETIVO | 29 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 31 |
| 3.1 ALGODÃO..... | 31 |
| 3.1.1 Estrutura do algodão | 31 |
| 3.1.2 Constituintes não celulósicos do algodão..... | 32 |
| 3.1.3 Estrutura química da celulose | 34 |
| 3.2 ENZIMA CELULASE..... | 39 |
| 3.2.1 Degradação enzimática da celulose | 39 |
| 3.2.2 Endoglucanases..... | 43 |
| 3.2.3 Exoglucanases..... | 44 |
| 3.2.4 β -glucosidase | 46 |
| 3.2.5 Domínio de Fixação (CBD) | 47 |
| 3.2.6 Proteínas auxiliares na hidrólise enzimática | 49 |
| 3.2.7 Inibição enzimática | 51 |
| 3.3 BIOPOLIMENTO | 53 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 55 |
| 4.1 ENZIMA..... | 55 |
| 4.2 SUBSTRATOS CELULÓSICOS | 55 |
| 4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA | 55 |
| 4.4 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES | 57 |
| 4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA..... | 57 |
| 4.5.1 Determinação da atividade total (FPU)..... | 58 |
| 4.5.2 Determinação da atividade endoglucanase (CMCase)..... | 58 |
| 4.5.3 Determinação da atividade exoglucanase (Avicelase) | 59 |
| 4.6 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA TOTAL..... | 59 |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DA MASSA DE PÓ DE ALGODÃO | 60 |
| 4.8 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X..... | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 4.9 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... | 62 |
| 4.10 ANÁLISE DA ETAPA DE BIOPOLIMENTO..... | 62 |
| 4.11 ESTUDO DE ADSORÇÃO E OBTENÇÃO DE PÓ DE ALGODÃO | 63 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 65 |
| 5.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA | 65 |
| 5.2 SIMULAÇÃO EM ESCALA DE BANCADA DA ETAPA DE BIOPOLIMENTO | 67 |
| 5.2.1 Inibidores enzimáticos na etapa de biopolimento | 67 |
| 5.2.2 Perda de massa após tratamento enzimático | 69 |
| 5.3 TRATAMENTO COM SOBRECARGA ENZIMÁTICA | 71 |
| 5.3.1 Avaliação da cinética e adsorção enzimática | 71 |
| 5.3.2 Efeito dos inibidores na perda de massa do substrato têxtil e formação de pó de algodão | 74 |
| 5.3.3 Caracterização do pó de algodão após hidrólise enzimática | 76 |
| 5.3.3.1 Características superficiais da fibra de algodão após tratamento enzimático | 77 |
| 5.3.3.2 Índice de Cristalinidade através da análise de Difração de Raio X (DRX)..... | 81 |
| 6 CONCLUSÃO | 87 |
| 6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 88 |
| REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA | 91 |

1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas vem sendo muito aplicada na indústria têxtil, sendo este um dos setores industriais em que a biocatálise cresce mais rapidamente. A aplicação das enzimas tem seu início nos processos têxteis por volta de 1857, quando artigos têxteis contendo gomas amiláceas foram embebidos em licor de cevada. Mas somente em 1912, com a utilização de amilase de origem animal e bacteriana, o processo de desengomagem enzimática foi introduzido nas indústrias têxteis (NIERSTRASZ e WARMOESKERKEN, 2003; ALY, MOUSTAFA e HEBEISH, 2004). Atualmente uma grande variedade de aplicação das enzimas nos processos industriais têxteis vem ganhando lugar em substituição aos produtos químicos normalmente utilizados. Uma das principais razões para estas mudanças é a redução considerável dos impactos ambientais, bem como os danos causados às fibras (CUNHA, PEREIRA JR e ANDRADE, 1996).

A celulase é uma enzima que vem sendo utilizada nos últimos anos tanto no processo Stone-wash, ou bioestonagem quanto no biopolimento. Celulase também é utilizada em formulação de detergentes para promover detergência, para melhorar o brilho e remover microfibrilas. A adição da celulase junto aos artigos denim no processo a úmido, juntamente com o atrito gerado pelo movimento do tecido, gera um desgaste desejável e uma maciez maior à peça. No processo de biopolimento, a redução do “*pilling*” através da remoção das fibras soltas gera um aspecto mais homogêneo à superfície do tecido, bem como maior maciez ao toque e brilho aos artigos de algodão (CAVACO-PAULO e GÜBITZ, 2003; MIETTINEN-OINONEN, PALOHEIMO, *et al.*, 2005; JASIŃSKA, 2009).

Contudo, a hidrólise enzimática produz como produto final açúcares solúveis que se apresentam como inibidores diretos da celulase, diminuindo a taxa hidrolítica. Esses açúcares, principalmente glicose e celobiose, atuam diferentemente nas enzimas que compõem o complexo celulásico (endoglucanases, celobiohidrolases e β -glucosidase), alterando a taxa de hidrólise devido ao acúmulo destes produtos no meio reacional (ANDRIĆ, MEYER, *et al.*, 2010a).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi determinar o efeito inibitório dos sacarídeos comumente produzidos durante a hidrólise enzimática das celulases na etapa de biopolimento de substratos 100% algodão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação de celulase comercial de *Trichoderma reesei* no processo de biopolimento na presença de concentrações iniciais de glicose e celobiose;
- Determinar o efeito dos inibidores sobre a adsorção das celulases nos substratos têxteis;
- Analisar a perda de massa e formação de pó de algodão durante hidrólise enzimática;
- Avaliar as características do pó de algodão formado após longo período de hidrólise enzimática na presença de inibidores glicose e celobiose, com o intuito de visualizar o tamanho das partículas e características superficiais, bem como a sua cristalinidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão da literatura sobre a composição típica do algodão, bem como a estrutura química da celulose, além de serem abordadas as características gerais da enzima celulase aplicada no processo de biopolimento.

3.1 ALGODÃO

3.1.1 Estrutura do algodão

O algodão é a matéria prima mais importante e mais utilizada entre as fibras têxteis. Caracteriza-se por ser uma fibra unicelular de origem vegetal, constituindo o revestimento piloso do fruto do algodoeiro (*Gossypium*). Seu cultivo tem como base a obtenção das fibras, mas também é uma cultura alimentar, obtendo-se óleo vegetal para consumo humano a partir da semente do algodão, e ração animal (WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007).

A fibra do algodão possui uma estrutura fibrilar, apresentando várias camadas na forma de uma fita, variando sua largura entre 12 a 20 μm (Figura 1). As diferentes variedades de algodão estão relacionadas com a origem geográfica e o grau de maturação da fibra (WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007).

Figura 1. Esquema da estrutura da fibra de algodão.



Fonte: (WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007)

A fibra de algodão madura possui uma fina camada não celulósica chamada de cutícula. É constituída por ceras, gorduras, proteínas e pectinas e, no seu estado natural, é responsável pelas propriedades hidrófobas das fibras e algodão. A remoção da cutícula é necessária para que o algodão possa ser utilizado como fibra têxtil a fim de que a absorção das soluções de corante e dos outros reagentes durante os processos têxteis seja possível (GUILLÉN e GARRIDO, 1987).

A parede primária possui uma espessura de 0,5 a 1 μm e contém aproximadamente 50% de celulose. A porção não celulósica é constituída por pectinas, gorduras, ceras, proteínas e corantes naturais. As fibrilas exteriores dessa camada são paralelas ao eixo da fibra e formam, com as interiores, uma rede aproximadamente ortogonal. A parede secundária contém aproximadamente 92 a 95% de celulose; é constituída de camadas concêntricas, S1 interna e S2 externa, alternadas em torções na forma S e Z. É a camada mais espessa e cristalina; é organizada em microfibrilas e macrofibrilas, que são mantidas unidas por fortes interações pontes de hidrogênio. A parede terciária, S3, ou parede de lúmen, constitui a parte mais interna das fibras de algodão; é composta por ceras, pectina e restos de protoplasma. Esta camada só é observada em fibras de algodão muito maduras e a disposição do feixe de fibras é similar a S1, distinguindo-se desta forma da camada S2 (GUILLÉN e GARRIDO, 1987; BUSCHLE-DILLER, 2003).

3.1.2 Constituintes não celulósicos do algodão

A fibra de algodão crua, após a limpeza mecânica, contém aproximadamente 90 a 95% de celulose (Tabela 1). Os constituintes não celulósicos estão localizados principalmente na cutícula, na parede primária e no lúmen. Estes incluem proteínas, aminoácidos, outros componentes nitrogenados, ceras, substâncias pécticas, ácidos orgânicos, açúcares, sais inorgânicos e uma pequena quantidade de pigmentos (BROADBENT, 2001; WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007).

O teor de água no algodão é de 7 a 10%, a 20 °C, a uma umidade relativa de 65%. As quantidades exatas destes componentes estão relacionadas com a origem do algodão, com a maturidade das fibras e condições de crescimento. Após o tratamento para a remoção do material não celulósico com solução alcalina diluída, em ebulição, a fibra adquire uma composição de celulose superior a 99% (CAVACO-PAULO, 1995; WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007).

Tabela 1: Composição típica do algodão bruto.

| <i>Constituintes</i> | <i>Localização Principal</i> | <i>Quantidades Relativas (%)</i> |
|----------------------|------------------------------|----------------------------------|
| Celulose | Camada secundária | 86,8 |
| Óleos, ceras | Cutícula | 0,7 |
| Pectinas | Camada primária | 1,0 |
| Carboidratos | Camada primária | 0,5 |
| Proteínas | Lúmen | 1,2 |
| Sais | Lúmen | 1,0 |
| Água | | 6,8 |
| Outros | | 2,0 |

Fonte: (BROADBENT, 2001)

A presença de fragmentos da casca de sementes representa as impurezas mais resistentes presentes junto às fibras de algodão. Estes fragmentos são normalmente pretos ou marrons escuros e fazem parte da camada mais externa das sementes de algodão e são formados a partir de sementes maduras ou imaturas durante o processamento mecânico do algodão. Os fragmentos de sementes possuem em sua composição química dois componentes em maior quantidade: lignina e holocelulose (constitui toda a fração de carboidratos do material celulósico após a remoção da lignina) (Tabela 2). O conteúdo inorgânico é significativo, possui potássio, cálcio e magnésio em grande escala (LOSONCZI, 2004).

Tabela 2: Composição química dos fragmentos da semente de algodão.

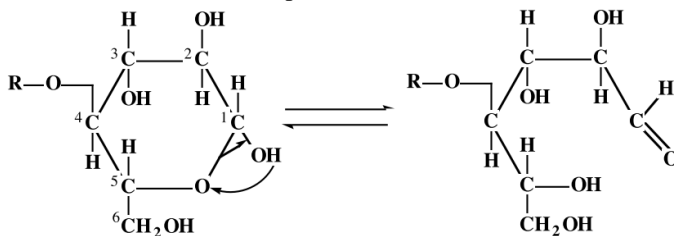
| <i>Componentes</i> | <i>Quantidades [%]</i> |
|-------------------------|------------------------|
| Ceras | 5,6 |
| Lignina | 28,3 |
| Holocelulose, incluindo | 41,3 |
| α -celulose | 23,0 |
| Pentosanas | 7,2 |
| Cinzas | 12,8 |
| Umidade | 8,3 |
| Outros | 3,7 |

Fonte: (LOSONCZI, 2004)

3.1.3 Estrutura química da celulose

Celulose é um homopolissacarídeo que ocorre naturalmente na parede celular de vegetais. É um polímero linear constituído de glicose (D-anidroglicopiranosose) unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4)-D-glucana. A cadeia linear da D-glicose possui liberdade rotacional, o que permite a ligação intramolecular entre o carbono 1 e 5, formando a estrutural hemiacetal (Figura 2).

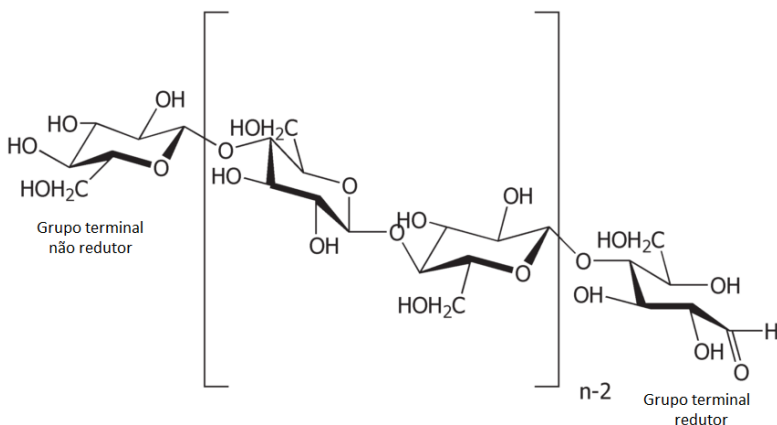
Figura 2. Representação do hemiacetal (a) e do aldeído (b) do grupo terminal redutor. R é a cadeia de polímero de celulose.



Fonte: (CAVACO-PAULO, 1995)

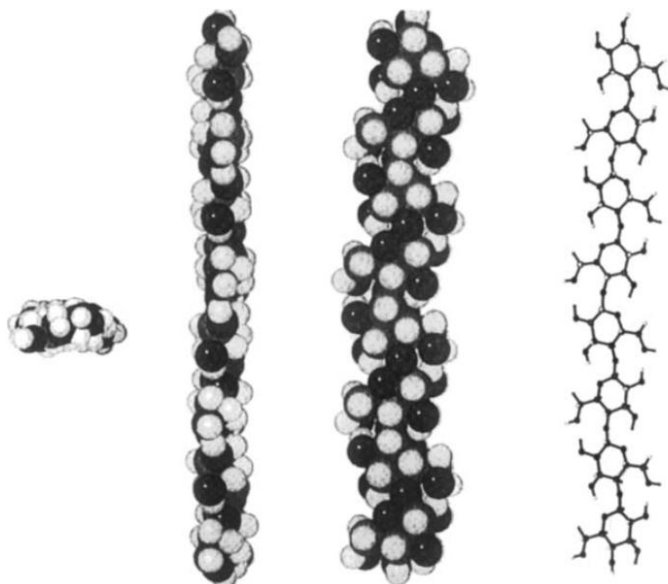
As duas extremidades da cadeia são grupos hidroxilas, porém o carbono C1 terminal é um aldeído hidratado instável, que pela ligação hemiacetal forma o anel piranose, formando grupo terminal redutor. Diferentemente deste, o grupo alcoólico C4 terminal é não redutor (Figura 3).

Figura 3. Estrutura da celulose com extremidade não redutora, unidade de celobiose e extremidade redutora.



As sucessivas unidades de glicose apresentam uma rotação de 180° em torno do eixo da molécula, o que torna a cadeia polimérica linear (Figura 4). A unidade conformacional mínima é representada pela celobiose, enquanto a glicose representa apenas a unidade fundamental das cadeias poliméricas (MEDVE, 1997).

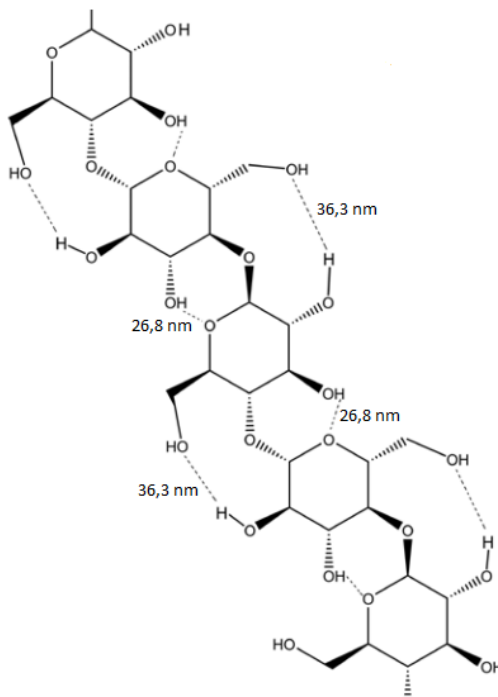
Figura 4. Projeção da cadeia de celulose: Vista ao longo do eixo central da cadeia, borda lateral e vistas frontais, em sua máxima largura, da cadeia polimérica.



Fonte: (WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007)

A estrutura química da celulose possui três grupos hidroxila (OH) livre em C2, C3 e C6 por unidades de anidroglicose que se apresentam como regiões potenciais de reações químicas que ocorrem com alcoóis. Essas reações formam a união de cadeias de celulose através de fortes ligações intramoleculares de hidrogênio e forças de Van der Waals, mantendo a coesão da celulose. Acredita-se que as interações de hidrogênio ocorram entre os grupos hidroxila do carbono 3 (C3) através de ligações de hidrogênio com o oxigênio do anel, tal qual o que ocorre com a hidroxila dos C2 e C6, embora neste último caso com menor intensidade devido a maior distância entre estes (Figura 5). Já as interações intermoleculares ocorrem entre C3 e C6. Essas ligações formam as microfibrilas, composta por aproximadamente 30-36 cadeias de celulose, que são organizadas em macrofibrilas, e essas unidas formam as fibras (WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007; BUSCHLE-DILLER, 2003).

Figura 5. Representação da conformação plana da celulose com a distância das interações intramoleculares de hidrogênio.



Fonte: (OGEDA e PETRI, 2010)

As fortes ligações de hidrogênio e de Van der Waals entre moléculas de celulose formam áreas altamente ordenadas (cristalinas) alternando com áreas menos ordenadas (amorfas) onde as cadeias apresentam ligações de hidrogênio de forma randômica. O grau de cristalinidade depende da origem e processo de obtenção da celulose, podendo ser expresso em porcentagem através da análise de índice de cristalinidade (ICr), obtido por difração de raio X, ou de forma indireta, através de tecnologia utilizando espectroscopia de infravermelho (TOMAZ, BITTENCOURT, *et al.*, 1994). O nível de organização das microfibrilas afeta fortemente as propriedades físicas e químicas das fibras de algodão, desta forma, quanto maior a cristalinidade, maior será a densidade, rigidez e resistência à tração das fibras, contudo menor a reatividade e a capacidade de absorção de solventes. A celulose microcristalina apresenta duas fases cristalinas, I α e I β distintas.

Contudo, progressivos estudos estão sendo realizados para elucidar a estrutura cristalina da celulose, que ainda não está muito bem entendida (ARANTES e SADDLER, 2010).

A celulose pode ser hidrolisada pelo ácido clorídrico, reduzindo rapidamente seu peso molecular. Isto ocorre devido ao rápido ataque à região amorfa, mantendo o material remanescente mais cristalino que nas condições iniciais (WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007). Soluções concentradas de hidróxido de sódio são capazes de penetrar nas regiões cristalinas das fibras celulósicas, alterando a estrutura nativa, permitindo uma maior acessibilidade à hidrólise e formação de regiões mais porosas (BUSCHLE-DILLER, 2003).

Estudos sugerem que a hidrólise enzimática é mais eficaz sobre o substrato amorfo devido à maior área superficial. Porém, dependendo do micro-organismo provedor do complexo enzimático, tanto a região cristalina como a amorfa são capazes de sofrer hidrólise, produzindo açúcares solúveis de baixo peso molecular, alterando o grau de cristalinidade do material celulósico.

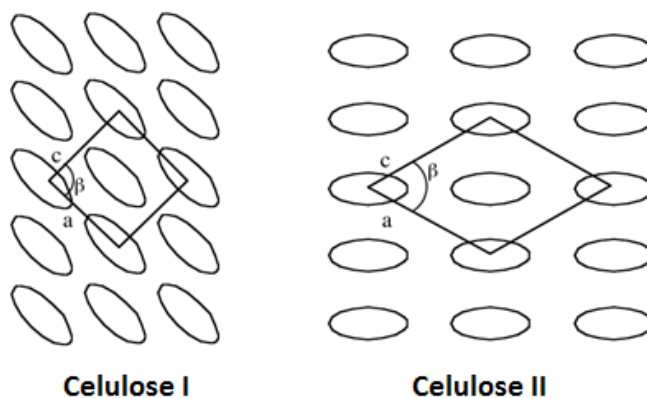
A extensão da cadeia celulósica é medida através do grau de polimerização (GP), representada pelo número de glicose que forma a cadeia polimérica. A determinação pode ser realizada pelos métodos químicos, viscosimétrico e cromatografia de permeação em gel (PALA, MOTA e GAMA, 2007). Similar ao que ocorre com a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização varia dependendo da origem, processo de obtenção da celulose e grau de maturação da parede celular. Para a celulose nativa do algodão, o grau de polimerização é de aproximadamente 20.000 unidades de glicose, já para a madeira esse valor decai para cerca de 2.500 unidades.

A celulose pode ser encontrada sob cinco formas polimórficas, porém apenas as celulosas I e II são as de maior interesse. A celulose II é a que apresenta a forma cristalina de maior importância. Essa forma pode ser obtida do tratamento alcalino da celulose nativa (celulose I) em um processo conhecido como mercerização, sendo esta uma das mais importantes aplicações industriais de inchamento intracristalino. Após o tratamento do algodão observa-se um aumento da resistência à tração e afinidade aos corantes (CAVACO-PAULO, 1995).

A modificação da celulose I em II, com inversão da polaridade das moléculas, ocorre em fase sólida (Figura 6). A conversão da celulose I, que apresenta as cadeias de celulose organizadas em uma orientação paralela ao eixo da microfibrilas, em uma estrutura com orientação antiparalela característica da celulose II é desejável, pois

pode ocorrer sem perda na estrutura fibrosa (WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007).

Figura 6. Planos cristalinos da celulose I, paralela ao eixo das microfibrilas e da celulose II com orientação antiparalela. O ângulo monoclinico β e as dimensões a e c para a celulose I são de $83,5^\circ$, 8,20 e 7,78 Å, respectivamente. Já para a celulose II estes valores são de $62,9^\circ$, 9,03 e 8,10 Å, respectivamente.



Fonte: (WAKELYN, BERTONIERE, *et al.*, 2007)

3.2 ENZIMA CELULASE

3.2.1 Degradação enzimática da celulose

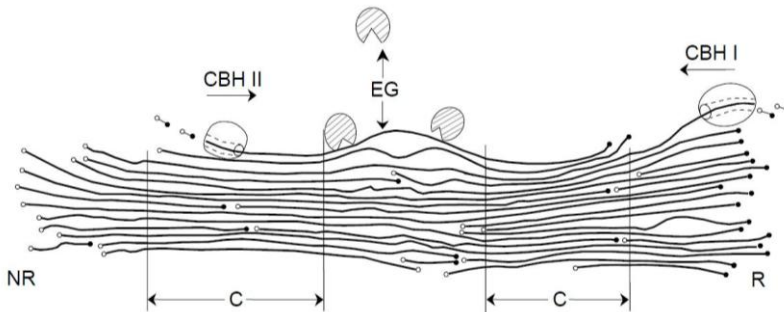
Na natureza a celulose é degradada tanto por fungos como por bactérias. Estes micro-organismos produzem e secretam a celulase a fim de hidrolisar a cadeia celulósica obtendo glicose e oligossacarídeos de cadeias menores, sendo assim assimilados pelo micro-organismo, gerando energia e fonte de carbono (MIETTINEN-OINONEN, 2007).

A hidrólise enzimática da celulose é uma reação de múltiplas etapas que ocorrem em um sistema heterogêneo, onde celulose insolúvel é rompida em oligossacarídeos de pequenos pesos moleculares, através de uma interface sólido-líquido.

As celulases disponíveis comercialmente, utilizadas nos processos têxteis, são as produzidas principalmente a partir do fungo

Trichoderma reesei. Este micro-organismo produz um sistema multicomponente de enzimas, composto basicamente por endoglucanases (EGs, EC 3.2.1.4), exoglucanases, que incluem as celobiohidrolases (CBHs, EC 3.2.1.91) e glucano-hidrolases (GHs, EC 3.2.1.74), e β -glucosidase ou celobiase (EC 3.2.1.21) que são capazes de romper as ligações glicosídicas 1,4- β -D-glucan, porém somente as duas primeiras, que atuando em sinergismo, degradam de forma efetiva a porção cristalina da celulose (WOOD, MCCRAE e BHAT, 1989; CAVACO-PAULO, ALMEIDA e DAVID, 1996; TEERI, 1997; LENTING e WARMOESKERKEN, 2001b; AL-ZUHAIR, 2008).

Figura 7. Mecanismo de hidrólise da celulose (TEERI, 1997): C representa a região cristalina, R os grupos terminais redutores e NR os grupos terminais não redutores.



As endoglucanases e as celobiohidrolases apresentam ações enzimáticas sobre diferentes substratos, conforme apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade Enzimática sobre diferentes substratos.

| <i>Substrato</i> | <i>Componentes da Celulase</i> | | | |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------|------------|-------------|
| | <i>CBHI</i> | <i>CBHII</i> | <i>EGI</i> | <i>EGII</i> |
| β -glucano | - | ++++ | +++++ | +++ |
| Hidroximetil celulose | - | + | ++++ | ++ |
| Carboximetil celulose | + | ++ | ++++ | +++++ |
| P-nitrofenil- α -glicosídeo | - | - | - | + |
| Celobiose | - | - | - | + |
| Celulose Cristalina | ++++ | +++ | + | + |
| Celulose Amorfa | + | +++ | +++++ | +++ |

Atividade Relativa: Sem atividade (-), Atividade máxima (+++++)

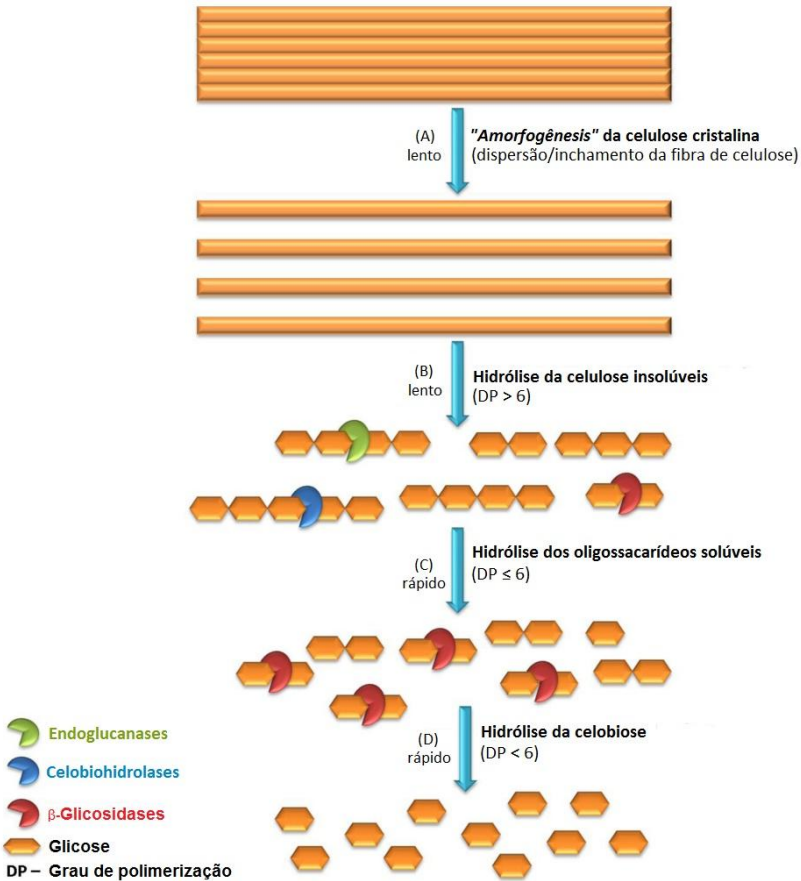
Fonte: (TOLAN e FOODY, 1999)

As endoglucanases são as enzimas que apresentam a maior atividade contra oligômeros solúveis, tais como β -glucano ou celuloses quimicamente substituídas e celulose amorfa. Celobiohidrolase possui maior atividade sobre celulose cristalina, porém CBHI apresenta pequena atividade contra carboximetilcelulose e celulose amorfa. EGI é a enzima que possui a menor especificidade entre as enzimas. Nenhuma das endoglucanases e celobiohidrolases apresentam-se ativas na hidrólise da P-nitrofenil- α -glicosídeo e da celobiose (TOLAN e FOODY, 1999).

A celulase produzida por muitos fungos possui ainda um pequeno domínio de fixação ao substrato (*cellulose binding domain* - CBD), estando unido ao centro ativo da enzima através de uma cadeia peptídica glicosilada. A presença do CBD é importante, pois aproxima o centro ativo da enzima ao substrato (TOMME, DRIVER, *et al.*, 1995).

Além disso, em 1985 foi sugerido por Coughlan um possível mecanismo que possui a capacidade de dispersar, inchar ou delaminar a celulose resultando na redução do grau de cristalinidade e/ou da interação intermolecular das fibrilas. Esse mecanismo chamado de “amorfogênese” aumenta a capacidade reacional do substrato celulósico devido ao aumento de regiões facilmente acessíveis pela celulase, gerado pela criação de novas áreas superficiais (Figura 8) (ARANTES e SADDLER, 2010).

Figura 8. Mecanismo proposto da "amorfogênese" e hidrólise da celulose. "Amorfogênese" (A) ao nível macromolecular por um agente não hidrolítico.



Fonte: (ARANTES e SADDLER, 2010)

É proposto que a celulase necessita estar adsorvida sobre o substrato insolúvel para se dar início a hidrólise enzimática. A estrutura ordenada do substrato, região cristalina, é perdida aumentando a desordem molecular das regiões compactas, expondo as cadeias celulósicas do interior das microfibrilas. Uma vez exposto às cadeias de celulose dá-se início à ação enzimática, que por sinergismo as

endoglucanases e as exoglucanases promovem o rompimento das ligações β -(1 \rightarrow 4)-D-glicosídicas em oligossacarídeos solúveis com grau de polimerização menor que 6 unidades (GP<6). Esses oligossacarídeos solúveis são rapidamente hidrolisados, formando em sua maioria celobiose. Pela ação das β -glucosidasases as celobioses são convertidas a glicose, porém devido à pequena quantidade encontrada na maioria dos complexos enzimáticos comerciais de *Trichoderma reesei*, muitas vezes é necessário o complemento deste por fontes como *Aspergillus niger* (ARANTES e SADDLER, 2010).

3.2.2 Endoglucanases

A Endoglucanase possui como nome sistemático, segundo IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 4- β -D-glucan-4-glucanohidrolase (Technische Universität Braunschweig). É a enzima do complexo celulásico responsável pela iniciação da hidrólise, clivando as ligações glicosídicas da cadeia celulósica de forma randômica. Atuam no meio das regiões amorfas, liberando oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização (GP), produzindo novas cadeias terminais (WOOD, MCCRAE e BHAT, 1989; LYND, WEIMER, *et al.*, 2002).

Sabe-se que o complexo celulásico de *T. reesei* possui pelo menos cinco enzimas com atividade endoglucanásica (EG I, II, III, IV e V, ou Cel7B, Cel5A, Cel12A, Cel61A e Cel45A). A EG I é a endoglucanase produzida em maior quantidade pelo *T. reesei*, chegando a cerca de 5% do total de proteínas liberadas no meio de cultivo, enquanto a EG II chega a 0,5% e as endoglucanases restantes (EG III, IV e V) apresentam-se como componentes minoritários (CAVACO-PAULO, ALMEIDA e BISHOP, 1998).

A disposição do sítio ativo das endoglucanases, que apresenta a forma de uma fenda (Figura 9), possibilita o ataque da enzima ao longo da cadeia de celulose permitindo uma redução no grau de polimerização de forma considerável. Isso ocorre devido à maior exposição das ligações glicosídicas na região amorfa que são mais facilmente atacadas, pois as interações de hidrogênio que ocorrem entre as cadeias são mais fracas (PINTO, 2006; SCHÜLEIN, 2000; CAVACO-PAULO, ALMEIDA e BISHOP, 1998).

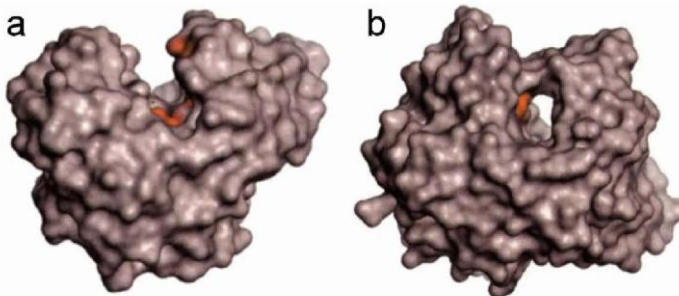
3.2.3 Exoglucanases

Entre as exoglucanases, a 1,4- β -D-glucan-glucanohidrolases (glucano-hidrolases - GHs), é pouco citada na literatura, não sendo encontrada em todos complexos celulásicos. Contudo, a hidrólise realizada sobre a fibra celulósica é de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente da molécula polimérica (LYND, WEIMER, *et al.*, 2002).

A celobiohidrolase (CBH) possui o nome sistemático 1,4- β -D-glucan-celobiohidrolase e participa da hidrólise primária da fibra celulósica. Atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose e oligossacarídeos com GP>3 (Figura 10). Existem citações que apresentam a CBH como responsável pela amorfogênese, fenômeno ainda não totalmente elucidado, porém sabe-se que é capaz de proporcionar uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras através do aumento das regiões intersticiais. Esse fenômeno transforma as regiões cristalinas em amorfas, tornando-a mais suscetível à ação da celulase, aumentando a taxa de hidrólise (LYND, WEIMER, *et al.*, 2002).

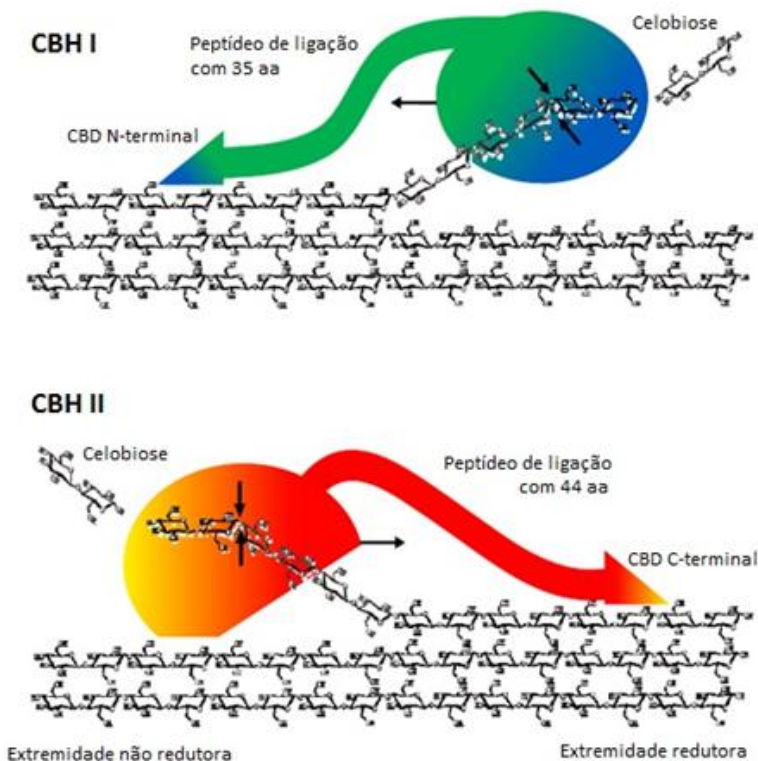
O sítio ativo da celobiohidrolase se apresenta na forma de um túnel (Figura 9), por onde a cadeia celulósica penetra, hidrolisando as ligações terminais. A enzima é responsável pelo ataque à parte cristalina de forma mais eficaz, produzindo majoritariamente celobiose, além de glicose e celotriose (MIETTINEN-OINONEN, 2007; PINTO, MOREIRA, *et al.*, 2004; PINTO, 2006; SCHÜLEIN, 2000; CAVACO-PAULO, ALMEIDA e BISHOP, 1998).

Figura 9. Sítios ativos das celulases: a - fenda (endoglucanase), b - túnel (celobiohidrolase).



Pelo menos dois tipos de celobiohidrolases (CBH I ou Cel7A e CBH II ou Cel6A) já foram identificados no complexo celulásico secretado por *T. reesei*. Estas exoglucanases são produzidas em maior quantidade do que as outras enzimas celulásicas do complexo. A CBH I responde por cerca de 60% do total de proteínas liberadas no meio de cultura, hidrolisando a celulose a partir da extremidade redutora, enquanto que a CBH II chega a 20%, atuando na extremidade não-redutora da cadeia celulósica (TEERI, 1997).

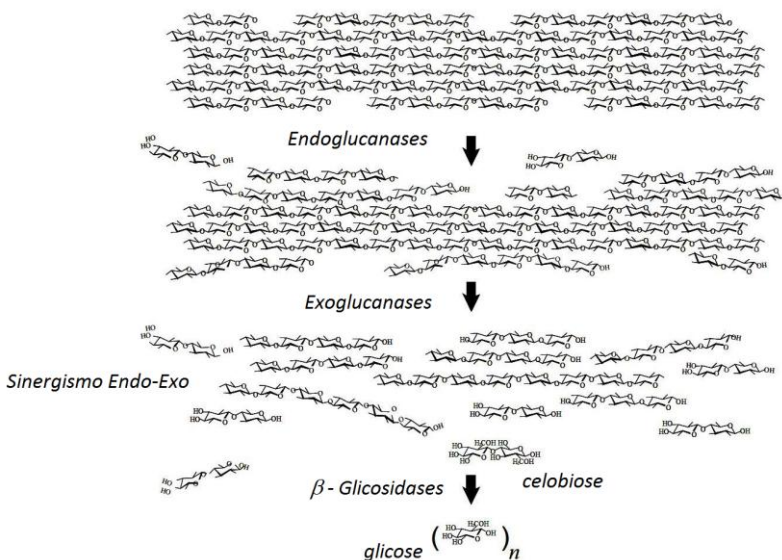
Figura 10. Esquema representativo do modo de ação das celobiohidrolases de *Trichoderma reesei* (CBH I e CBH II).



3.2.4 β -glucosidase

As β -glucosidases, também denominadas celobiasas, possuem a função de hidrolisar a celobiose gerada pelas CBHs e EGs em glicose. Estas enzimas não são consideradas como celulases legítimas, pois não atuam diretamente na cadeia celulósica, apenas sobre o substrato solúvel. Porém sua presença é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose, pois remove da mistura a celobiose formada, que se caracteriza por ser um inibidor competitivo das celobiohidrolases (Figura 11) (MEDVE, 1997; MIETTINEN-OINONEN, 2007).

Figura 11. Ação do complexo celulásico *Trichoderma reesei*.


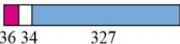


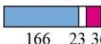




Observa-se atividade de β -glucosidase nas celulases produzidas pelo fungo *T. reesei*, porém grande parte dessa enzima encontra-se fixada nos micélios, não sendo recuperadas eficientemente durante a produção industrial da celulase de *T. reesei*. Um grande número de produções bibliográficas que utilizam a celulase de *T. reesei* vem utilizando como suplemento β -glucosidase de origem *Aspergillus niger* a fim de aumentar a atividade enzimática sobre a celobiose (MARTINS, KOLLINH, *et al.*, 2008; ANDRIĆ, MEYER, *et al.*, 2010b).

3.2.5 Domínio de Fixação (CBD)

As enzimas CBH e EG produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*, com exceção da EG III, possuem dois domínios que apresentam propriedades distintas. Um domínio catalítico, onde se encontra o centro ativo da enzima, e um domínio responsável pela ligação da enzima ao substrato, domínio de fixação - “*celulose binding domain*” (CBD), que possui dimensões menores. Estes dois domínios estão ligados através de uma cadeia polipeptídica altamente glicosilada denominada “*linker*”.

Tabela 4: Propriedades e organização estrutural das celulasas produzidas pelo *T. reesei*.

| Enzima | Família | Amino-ácidos | Massa Molecular (kDa) | Ponto Isoelétrico (pI) | Organização estrutural ^b |
|--------|---------|--------------|-----------------------|------------------------|--|
| EG I | 7 | 437 | 50 - 55 | 4,6 |  |
| EG II | 5 | 397 | 48 | 5,5 |  |
| EG III | 12 | 218 | 25 | 7,4 |  |
| EG IV | 61 | 326 | 37 ^a | -- |  |
| EG V | 45 | 225 | 23 ^a | 2,8 - 3 |  |
| CBH I | 7 | 497 | 59 - 68 | 3,5 - 4,2 |  |
| CBH II | 6 | 447 | 50 - 58 | 5,1 - 6,3 |  |

a) Massa molecular calculada a partir da sequência de Aminoácidos;

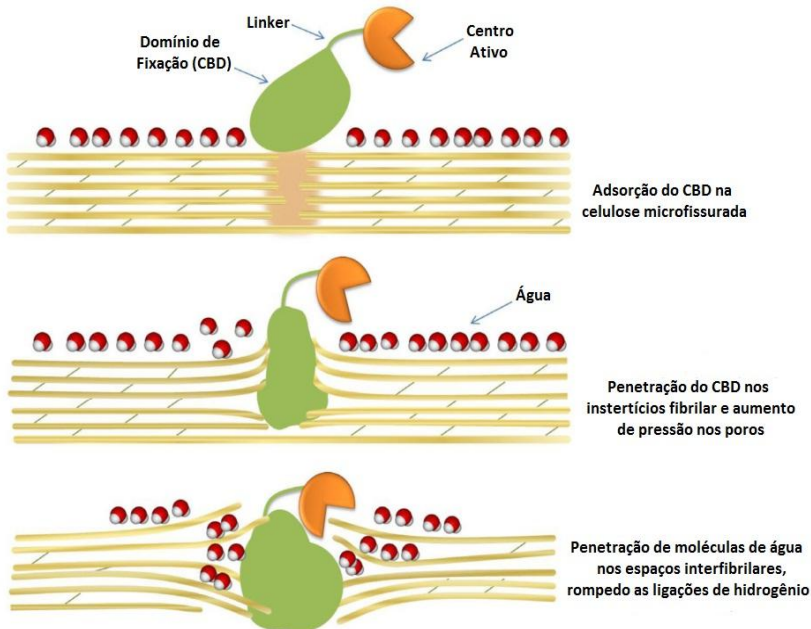
b)  , domínio catalítico;  , *linker*;  , CBD

O CBD produzido por fungos está normalmente localizado no C ou N terminal da enzima, e é constituído por aproximadamente 30 a 40 aminoácidos. Até agora, mais de 180 diferentes CBDs foram identificados e classificados em treze diferentes famílias de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos (TOMME, DRIVER, *et al.*, 1995). Possui a importante função de adsorver a enzima na superfície da cadeia celulósica, o que confere estabilidade e mantém mais próximo o sítio ativo da enzima ao substrato (TEERI, 1997). Trabalhos recentes propõem que além de fixar a fibra, os CBDs penetram nas regiões descontínuas da estrutura das fibrilas, liberando porções fracamente

associada às fibrilas subjacentes. Essa penetração do CBD esfolia a estrutura da fibra, liberando as extremidades das cadeias de celulose, contudo mantendo-as vinculadas à fibra, gerando uma rugosidade em sua superfície (ARANTES e SADDLER, 2010).

Klyosov e Rabinoch, citados por Arantes e Saddler (2010), propuseram um mecanismo para explicar a dispersão da celulose. Foi proposto que a celulase é adsorvida nas regiões cristalinas com microfissuras, por onde penetram nas regiões intersticiais. A presença das enzimas nos interstícios causa um aumento da pressão nas cavidades, inchando a estrutura fibrilar, deixando-a acessível às moléculas de água, hidratando-a. A presença da água nos espaços intersticiais gerado pelo CBD causa uma ruptura nas ligações de hidrogênio, resultando na separação das microfibrilas (Figura 12).

Figura 12. Representação esquemática da "amorfogênese" nas fibras celulósicas através da ação do domínio de fixação (CBD) das celobiohidrolases (CBH).



A presença do CBD é essencial na hidrólise da celulose cristalina. Alguns trabalhos mostram que a remoção de CBD das celulasas reduz significativamente a atividade sobre o substrato insolúvel, não alterando ou podendo mesmo aumentar a atividade sobre a celulose amorfa ou solúvel (TOMME, DRIVER, *et al.*, 1995; LINDER e TEERI, 1997).

O estudo da importância do CBD, e do domínio catalítico, na hidrólise da cadeia celulósica é possível através da proteólise do *linker*, e posterior separação cromatográfica. Não somente a remoção, mas também o encurtamento de 1/3 do *linker* da CBH I da *T. reesei*, provoca a redução da afinidade da enzima pela celulose (CAVACO-PAULO, 1995).

A dessorção do CBD a partir do pó de algodão formado durante a hidrólise enzimática foi estudada por Avezedo *et al.* (2001). Foi possível recuperar 80% do total de proteínas usadas inicialmente, após seis etapas de lavagem do pó de algodão com solução tampão. Obteve-se com este processo de lavagem uma solução diluída de enzimas, porém podendo ser concentrados utilizando-se processos apropriados, como ultrafiltração com membrana (AZEVEDO, RAMOS e CAVACO-PAULO, 2001).

3.2.6 Proteínas auxiliares na hidrólise enzimática

Durante muitos anos, diferentes mecanismos foram propostos para explicar a ação da celulase sobre os substratos insolúveis. Em 1950, já havia sido proposto por Reese *et al.* que a conversão da celulose em açúcares se dá em duas etapas (C_1 e C_x). A primeira (C_1), “ativa” as cadeias de celulose, anteriormente à hidrólise polimérica. Já o rompimento das ligações glicosídicas 1,4- β -D-glucan se dá na etapa C_x , conforme apresentado a seguir (REESE, SIU e LEVINSON, 1950).



Nos últimos anos, uma classe especial de proteínas vem sendo identificadas em diferentes espécies de plantas. Essas proteínas denominadas expansinas, possuem a capacidade de romper as interações de hidrogênio entre microfibrilas ou entre celulosas, porém sem apresentar atividade hidrolítica. Desta forma, permitem a separação das fibras e o inchamento da estrutura fibrilar auxiliando na hidrólise da celulase na porção cristalina da celulose (ARANTES e SADDLER,

2010; SALOHEIMO, PALOHEIMO, *et al.*, 2002). Este mecanismo possivelmente explica a primeira etapa C₁, apresentada anteriormente por Reese *et al.* (1950).

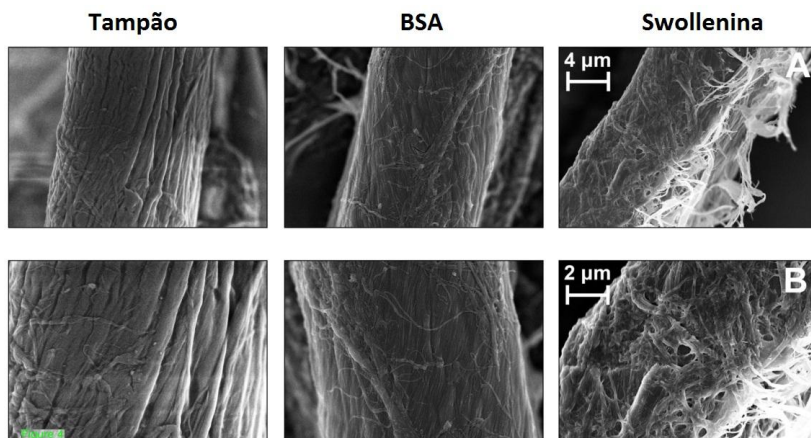
As expansinas possuem dois domínios (D1 e D2) unidos por uma cadeia peptídica glicosilada. D1 possui uma estrutura e sequência similar ao encontrado no sítio ativo das endoglucanases, porém sem atividade hidrolítica propriamente dita. Já D2 vem sendo caracterizado como um Domínio de Fixação (CBD), com aromáticos e resíduos polares na superfície das proteínas (ARANTES e SADDLER, 2010).

Uma proteína isolada da cultura celulásica de *T. reesei* apresenta características semelhantes à expansina de vegetais. Essa proteína é denominada Swollenina, pois apresenta a característica de dilatar (do inglês *swell*) as fibras de algodão. Saloheimo *et al.* (2002) determinaram que as Swollenina apresenta a capacidade de romper a estrutura das fibras de algodão e enfraquecer a estrutura dos papéis filtro, porém diferentemente dos resultados obtidos com a hidrólise enzimática, não se observa a liberação de açúcares redutores. Isto indica que a proteína não possui capacidade de romper as ligações β -1-4-glucosidase das cadeias de celulose, demonstrando a similaridade com as expansinas.

A Swollenina apresenta estrutura com dois domínios, similar as expansinas. Diferentemente das celulases, as Swollenina de *T. reesei* apresentam-se em quantidades relativamente baixas (1mg/L), porém de grande importância na hidrólise da porção cristalina da celulose. (SALOHEIMO, PALOHEIMO, *et al.*, 2002; BROTMAN, BRIFF, *et al.*, 2008; JÄGER, GIRFOGLIO, *et al.*, 2011)

Para determinar o efeito da proteína Swollenina sobre a celulose, Jäger *et al.* pré-trataram papel filtro com solução tampão, albumina (BSA) e Swollenina. Através de análise de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar as mudanças superficiais geradas nos tratamentos. Após tratamento com solução tampão ou BSA, as microfibrilas não apresentaram dispersão, porém como resultado obteve-se uma maior maciez e uma superfície uniforme em todas as fibras. Já no tratamento com Swollenina, observou-se uma dispersão das microfibrilas, criando uma superfície áspera e amorfa sobre as fibras de celulose (JÄGER, GIRFOGLIO, *et al.*, 2011).

Figura 13. A figura apresenta microfibrilas tratadas com solução tampão, BSA e Swollenina. Na presença de Swollenina observa-se uma dispersão da superfície fibrilar.



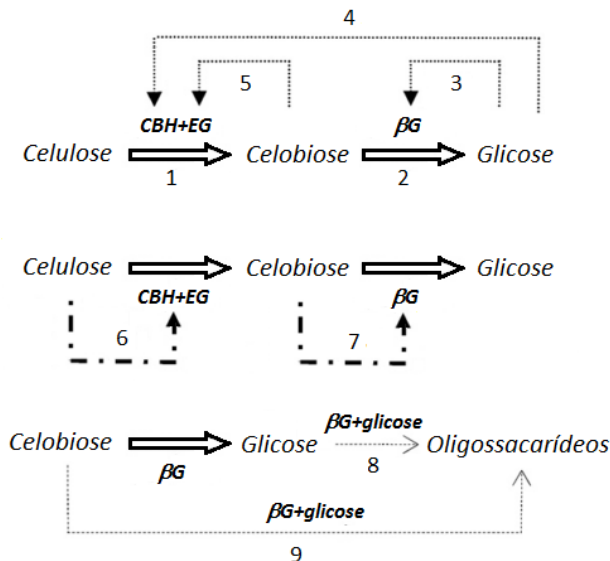
Fonte: (JÄGER, GIRFOGLIO, *et al.*, 2011)

3.2.7 Inibição enzimática

A inibição da celulase desempenha um papel importante na taxa de hidrólise e rendimento na formação de glicose. Sabe-se que a glicose e celobiose reduzem significativamente a taxa reacional bem como o rendimento de formação destes produtos, onde ambas são consideradas inibidores das enzimas celulolíticas.

Celobiose, produto da ação das celobiohidrolases e em parte das endoglucanases, é inibidor direto dessas enzimas. Já a glicose é inibidora direta da atividade β -glucosidase. Esta também inibe a ação das celobiohidrolases e endoglucanases. Na prática, a glicose é um inibidor indireto, pois a ação sobre a β -glucosidase gera um acúmulo de celobiose, vindo a intensificar a inibição sobre as celobiohidrolases e as endoglucanases (ANDRIĆ, MEYER, *et al.*, 2010a).

Figura 14. Inibição da Celulase: Principais etapas da hidrólise enzimática e efeito inibidor dos produtos sobre a celulase. Reações principais (1, 2), inibição gerada pela glicose (3, 4), inibição pela celobiose (5), inibição pelos substratos (6, 7) e transglicosilação (8, 9).



Fonte: (ANDRIĆ, MEYER, *et al.*, 2010a)

Além disso, celulose apresenta a capacidade de exercer inibição sobre as celobiohidrolases e endoglucanases, já a celobiose apresenta-se como inibidor das β-glucosidases, mesmo ambos sendo substratos destas enzimas. Algumas β-glucosidases apresentam ainda a capacidade de catalisar uma reação reversível, onde as moléculas de glicose e celobiose interagem através de um fenômeno conhecido como transglicosilação, gerando diferentes oligossacarídeos (ANDRIĆ, MEYER, *et al.*, 2010a).

Xiao *et al.* (2004) analisaram o efeito de diferentes concentrações iniciais de glicose sobre a ação da celulase. Os resultados obtidos indicam que a glicose possui efeito inibitório direto sobre a celulase e não apenas sobre as β-glucosidases. Foi também considerado que o alto teor de glicose no meio reacional leva ao acúmulo de celobiose, que então age como um inibidor secundário. Portanto, os efeitos inibitórios combinados, têm um impacto maior sobre a atividade da celulase (XIAO, ZHANG, *et al.*, 2004).

3.3 BIOPOLIMENTO

O bioacabamento ou biopolimento é um tratamento aplicado aos artigos têxteis a fim de obter-se um produto com características estéticas e propriedades funcionais necessárias para seu uso, obtendo-se um maior valor agregado de mercado (CAVACO-PAULO e GÜBITZ, 2003). Os principais parâmetros para um biopolimento efetivo são o tipo de enzima presente na mistura enzimática, o tipo de fibra a ser tratada e o maquinário utilizado para esta finalidade.

No “*depilling*” ou biopolimento é aplicada a enzima celulase, onde se tem por objetivo a remoção de microfibrilas que emergem da superfície dos tecidos de algodão, geralmente após tratamentos mais drásticos. O biopolimento é geralmente aplicado após o branqueamento dos tecidos, mas pode ser realizado após qualquer etapa de pré-tratamento a úmido. O tratamento enzimático após o tingimento pode resultar na remoção parcial da cor dependendo do tipo de corante utilizado (NIERSTRASZ e WARMOESKERKEN, 2003).

Os resultados obtidos no biopolimento, além da remoção das microfibrilas soltas na superfície dos tecidos que resultam em artigos mais macios e superfícies mais uniformes, melhoram a estabilidade dimensional do tecido, bem como a absorção da umidade e maior brilho (MIETTINEN-OINONEN, PALOHEIMO, *et al.*, 2005; JASÍŃSKA, 2009).

Foi demonstrado que a agitação mecânica é um fator importante no biopolimento. O atrito gerado entre as fibras do algodão auxilia na remoção das fibrilas já enfraquecidas pela ação da enzima (CAVACO-PAULO e ALMEIDA, 1994; CAVACO-PAULO, 1995). Cortez *et al.* (2001) determinaram a influência da agitação mecânica em diferentes equipamentos industriais, atribuindo os resultados obtidos à ação das enzimas EG e CBH contidas na mistura celulósica bruta devido à diferença de agitação mecânica.

Não somente a agitação mecânica é importante para se obter os resultados desejados, mas também a concentração da celulase utilizada no processo, a temperatura e o pH do meio. Tradicionalmente, a celulose utilizada na indústria têxtil é uma mistura contendo EG, CBH e celobiase. As concentrações enzimáticas recomendadas para a utilização da enzima bruta variam de 0,05 a 6% do peso do tecido, dependendo da atividade enzimática, do resultado desejado e do método a ser empregado (HEIKINHEIMO, MIETTINEN-OINONEN, *et al.*, 2003). Nos processos em que a celulase do fungo *T. reesei* é utilizada, a temperatura para a máxima atividade da enzima é de 50 °C, sendo o pH

do banho igual a 5. A presença de um tampão é essencial para manter o pH do meio constante ao longo do processo, já que a glicose e celobiose, produtos da reação, podem alterar o pH do meio (CAVACO-PAULO, 1995).

Alguns problemas podem ser observados durante a aplicação da celulase no processo de biopolimento. Atrição mecânica intensa entre os rolos que compõem o maquinário industrial e o tecido, tanto quanto dosagens elevadas de celulase favorecem a perda de massa e resistência do tecido. Um efeito de biopolimento adequado, sem perda excessiva da resistência, é geralmente obtido com uma perda de massa do tecido de 3 a 5% (LENTING e WARMOESKERKEN, 2001a).

Focado nestes problemas, alguns autores vêm pesquisando a ação individual das celulases CBHs e EGs, através da purificação destas enzimas, a fim de obter maior entendimento sobre a hidrólise do algodão. Lenting & Warmoeskerken (2001b) forneceram orientações para prevenir a perda de resistência dos artigos de algodão. Segundo estes autores esta perda se dá devido à degradação da porção cristalina da celulose.

A eficiência da ação da celulase sobre o substrato está relacionada com a área superficial específica. Logo, é de se esperar que a acessibilidade da enzima sobre o algodão é maior nas fibras, depois em fios e por último nos tecidos. Pere *et al.* (2001) avaliaram o tratamento de fios e tecidos de algodão com as enzimas CBHs e EGs purificadas. Após o tratamento dos fios, foi feita a tecelagem destes e testou-se a resistência à abrasão, e uma redução na tendência de formação do “*pilling*” foi observada. A remoção das microfibrilas utilizando EG é mais eficaz quando aplicado aos tecidos, porém o tratamento realizado nos fios apresenta uma vantagem, onde não se observa a formação de pó de algodão, característico no tratamento de tecidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir todas as metodologias empregadas para a caracterização da celulase e dos produtos da reação enzimática, bem como os procedimentos utilizados para avaliação do processo de biopolimento serão apresentadas. Os ensaios foram realizados na Universidade Federal de Santa Catarina, no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Também foram utilizadas as infraestruturas do Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do Departamento de Engenharia Mecânica e do Laboratório de Aplicação de Nanotecnologia em Construção Civil (NANOTEC) do Departamento de Engenharia Civil.

4.1 ENZIMA

Neste estudo foi utilizado um preparado enzimático produzido industrialmente, derivado do fungo *Trichoderma reesei*. A Quimilase BP (EC 3.2.1.4.) (Quimisa S/A) é um produto utilizado nos processos de biopolimento de tecidos de celulose, sendo recomendada sua aplicação, sem causar um ataque excessivo à fibra, em concentrações de 0,5 a 3,0 %, dependendo do tempo de aplicação (de 30 a 60 min).

4.2 SUBSTRATOS CELULÓSICOS

Foi utilizado como substrato no tratamento enzimático de biopolimento tecido felpudo 100% algodão (350 g/m²). Este provém de um tratamento de alvejamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, sem aplicação de branco óptico. Nenhum tratamento adicional foi dado às amostras.

Para a caracterização da enzima celulase, alguns substratos celulósicos comerciais foram utilizados, tais como papel filtro Whatman n° 1, Carboximetilcelulose (CMC), e celulose microcristalina (Avicel®).

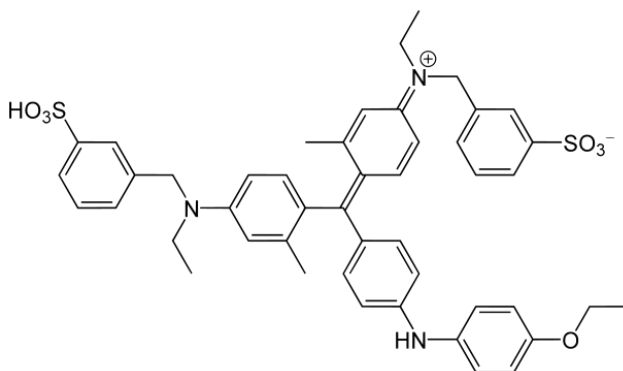
4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Para a determinação da concentração de proteínas, dois métodos são amplamente aplicados, Método de Lowry (GHOSE, 1987) e Método de Bradford (BRADFORD, 1976). Neste trabalho foi utilizado o

Método de Bradford, devido a sua simplicidade de aplicação, reprodutibilidade e por este sofrer muito pouca ou nenhuma interferência por cátions como sódio e potássio e por carboidratos (BRADFORD, 1976).

Este método baseia-se na aplicação do corante “Coomassie Brilliant Blue” G-250 (Figura 15), gerando alteração de cor quando este se encontra ligado a uma proteína. A reação de interação entre o corante G-250 e a proteína provoca o deslocamento do equilíbrio do corante, absorvendo fortemente em 595 nm.

Figura 15. Estrutura molecular do corante “Coomassie Brilliant Blue” G-250.



Para a preparação do reagente de Bradford dissolve-se 100 mg do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol, e em seguida são adicionados 100 mL de ácido *o*-fosfórico (85%) e dilui-se a mistura com água destilada para um volume de 1000 mL.

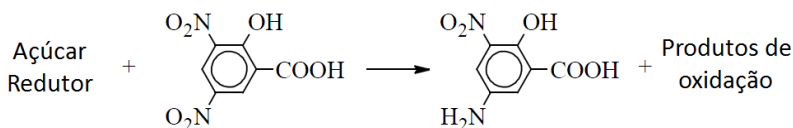
A determinação da proteína dá-se adicionando 1 mL do reagente de Bradford a 100 μ L da solução protéica. Após agitação, a absorbância da solução é medida a 595 nm. As amostras foram analisadas em triplicata, onde a concentração das proteínas foi determinada contra uma curva de calibração utilizando a Albumina Sérica de Bovino (BSA) como padrão. Utilizou-se para a análise espectrofotômetro Pró-Análise modelo V-1200.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES

Para a quantificação dos açúcares redutores totais (ART) foi utilizado o método recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987) de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS).

Segundo este método, o DNS ao reagir com carboidratos sofre redução de um dos seus grupos nitro, formando um composto que sofre forte absorvância em 540 nm.

Figura 16. Esquema reacional de ART com ácido 3,5 -dinitro-salicílico.



Para o preparo do reagente DNS pesa-se 75 g de tartarato de sódio e potássio (Sal de Rochelle) e dissolve-se em 100 mL de água destilada, sob agitação, adiciona-se 4 g de hidróxido de sódio. Acrescenta-se de forma lenta 2,5 g de ácido 3,5-dinitro-salicílico. A solução foi armazenada em frasco envolto de papel alumínio para proteger da presença da luz.

Para a determinação, adiciona-se 1 mL da amostra em tubo de ensaio e acrescenta-se 1,5 mL de DNS. Mantêm-se por exatamente 5 min os tubos em água fervente, logo após resfria-os em banho de água à temperatura ambiente. As amostras devem ser homogeneizadas através de inversão dos tubos, havendo a necessidade, uma alíquota deve ser retirada e diluída em água destilada para leitura de absorvância. Quantifica-se as amostras por meio de uma curva de calibração, utilizando glicose como padrão através da leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra.

4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em tampão acetato 50 mM, pH 4,8 e temperatura de 50 °C, conforme recomendação da IUPAC e descrito por Ghose (1987).

4.5.1 Determinação da atividade total (FPU)

Para a determinação da atividade celulásica total, a IUPAC recomenda a utilização de papel filtro Whatman nº 1 como substrato desta análise. Foi aplicado o método segundo Ghose (1987).

Adiciona-se tiras de papel filtro Whatman nº 1 de aproximadamente 1,0 x 6,0 cm (≈ 50 mg) a tubos de ensaio pré-incubados a 50 °C contendo 1 mL de tampão acetato e 0,5 mL de solução enzimática em diferentes diluições capazes de produzir em torno de 2 mg/mL de açúcar redutor. Recomenda-se utilizar de cinco a seis diluições. A reação é interrompida após 1 h pela adição de 3 mL de DNS. Para a leitura das amostras, segue-se a quantificação conforme apresentado no item 4.4. As amostras devem ser diluídas com água destilada para posterior medição em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm.

Ghose apresenta uma forma simples de se obter o valor de atividade enzimática total. O valor de 0,37 no numerador é derivado de um fator de conversão de 2,0 mg de “equivalente de glicose” gerado no ensaio em μmol de glicose ($2,0 \text{ mg}/0,18016 \text{ mg}/\mu\text{mol}$) a partir do volume a ser utilizado no ensaio (0,5 mL), e do tempo de incubação (60 min) (GHOSE, 1987).

$$\frac{(2,0 \text{ mg glicose}/0,18016 \text{ mg}/\mu\text{mol})}{(0,5 \text{ mL enzima diluída} \cdot 60 \text{ min})} = 0,37 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$$

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{conc. da enzima capaz de produzir } 2,0 \text{ mg/mL}} \text{ unidades} \cdot \text{mL}^{-1}$$

4.5.2 Determinação da atividade endoglucanase (CMCase)

A atividade endoglucanase foi determinada utilizando como substrato carboximetilcelulose (CMC), segundo metodologia descrita por Ghose (1987), recomendada pela IUPAC com algumas alterações.

Neste procedimento, preparam-se diferentes diluições em tampão acetato da enzima, sendo estas suficientes para produzir em torno de 0,5 mg/mL de açúcares redutores. Adiciona-se a tubos de ensaio incubados a 50 °C alíquotas de 0,5 mL das amostras de enzima e inicia-se a reação com a adição de 0,5 mL de uma solução de 1% de CMC em tampão acetato. Após 30 min, a reação é interrompida com a adição de 3 mL de DNS. As amostras devem ser quantificadas conforme apresentado no

item 4.4. Faz-se necessidade de diluição para posterior medição no comprimento de onda de 540 nm e para isso, adiciona-se 20 mL de água destilada nos tubos de ensaio e mistura-se a solução para perfeita homogeneidade.

A atividade CMC_{ase} é calculada conforme equação abaixo, apresentado por Ghose (1987).

$$CMCase = \frac{0,185}{\text{conc. da enzima capaz de produzir } 0,5 \text{ mg/mL}} \text{ unidades. mL}^{-1}$$

4.5.3 Determinação da atividade exoglucanase (Avicelase)

A atividade Avicelase foi determinada conforme descrito para atividade endoglucanase (CMCase) no item 4.5.2. Nesta determinação utilizou-se uma solução 1% de celulose microcristalina (Avicel[®]) em substituição ao carboximetilcelulose (CMC).

Calcula-se a atividade Avicelase conforme apresentado abaixo:

$$Avicelase = \frac{0,185}{\text{conc. da enzima capaz de produzir } 0,5 \text{ mg/mL}} \text{ unidades. mL}^{-1}$$

4.6 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA TOTAL

A perda de massa do tecido felpudo foi determinada pela diferença de peso das amostras antes e após os tratamentos enzimáticos. Para esta determinação, as amostras foram acondicionadas em estufa por um período de uma hora a uma temperatura de 110 °C. Após secas, estas foram armazenadas em potes hermeticamente fechados para que não houvesse a absorção de umidade, e então colocadas em dessecador. Depois de resfriada foi feita a pesagem das amostras.

A perda de massa é calculada de acordo com a expressão abaixo:

$$\text{Perda de Massa (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \cdot 100$$

Onde:

m_i : massa do tecido felpudo antes do tratamento enzimático;

m_f : massa do tecido felpudo após tratamento enzimático.

4.7 DETERMINAÇÃO DA MASSA DE PÓ DE ALGODÃO

A determinação da massa de pó de algodão gerado durante a hidrólise enzimática deu-se através da filtragem da solução após tratamento enzimático e da água de lavagem dos tecidos. O filtrado foi lavado com água destilada para remover todos os açúcares presentes na solução. Após, a amostra foi seca em estufa por uma hora a 110 °C, colocada em potes hermeticamente fechados e então depositada em dessecador para posterior pesagem.

A massa do pó de algodão formado durante a hidrólise enzimática foi calculado conforme apresentado abaixo:

$$\text{Pó de Algodão (\%)} = \frac{m_{\text{Pó}}}{m_i} \cdot 100$$

Onde:

m_i : massa do tecido felpudo antes do tratamento enzimático;

$m_{\text{Pó}}$: massa do pó de algodão obtido após tratamento enzimático.

4.8 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os raios X, quando incidem em um material, são parcialmente absorvidos, difratados e transmitidos, podendo ser utilizados para análise de pequenas quantidades de amostras, seja na forma de pó ou líquido, dentro de capilares de vidro, bem como análise de amostras compactas. Pela difração de raios X é possível determinar facilmente a presença de fases cristalinas e amorfas, em alguns casos é possível quantificar ou até mesmo propor uma estrutura de curto-alcance para a fase amorfa de um material. Quanto maior o número de cristais em uma estrutura, mais intenso, pontiagudo e estreito serão os picos de difração de raio X, já as porções amorfas geram picos mais largos e menores.

Além dos minerais e compostos inorgânicos, macromoléculas e polímeros podem apresentar cristais. A porção cristalina de um polímero deve-se ao alto nível de organização das unidades monoméricas, podendo ser detectada pela análise de difração de raio X, DRX (SANTOS, 2009). A cristalinidade do algodão não é perfeita, sendo alterada pelas variações estruturais, onde o perfil de difração obtido consiste na sobreposição dos perfis correspondentes às zonas cristalinas e amorfas.

O perfil de difração e a cristalinidade das amostras de pó de algodão após tratamento enzimático foram determinados utilizando

difratômetro de raio X Rigaku (modelo Miniflex II) localizado no Laboratório de Aplicação de Nanotecnologia em Construção Civil (NANOTEC) do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Santa Catarina. A análise de DRX do tecido felpudo sem tratamento, “branco”, também foi realizado como forma de comparação dos resultados obtidos. O equipamento foi operado com filtro monocromático, com uma tensão e corrente de filamento de 30 kV e 15 mA, respectivamente. O comprimento de onda da radiação $K\alpha$ de cobre utilizada foi de 0,154 nm. As análises foram realizadas entre 10° e 30° (2θ), a uma velocidade de varredura de $0,025^\circ/s$. Os valores de índice de cristalinidade (ICr) foram obtidos através do método empírico proposto por Segal *et al.* (1959), conforme equação abaixo (PALA, 2002; KALANTZI, MAMMA, *et al.*, 2008; TOMAZ, BITTENCOURT, *et al.*, 1994).

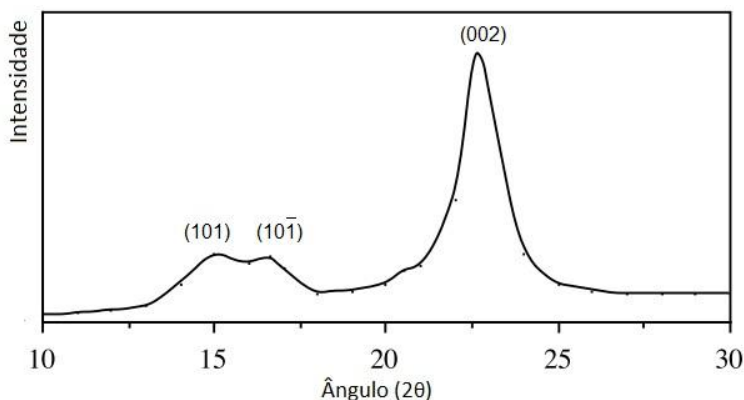
$$ICr (\%) = \frac{I_{002} - I_{AM}}{I_{002}} \cdot 100$$

Onde:

I_{002} : intensidade máxima de difração correspondente ao plano 002 dos cristais de celulose, referente à região cristalina da amostra a um ângulo de $2\theta = 22^\circ$;

I_{AM} : intensidade de difração devido à porção amorfa referente ao ponto de intensidade mínima entre os picos $(10\bar{1})$ e (002) .

Figura 17. Exemplo de difratograma da celulose de algodão, representando os picos I_{101} , $I_{10\bar{1}}$ e I_{002}



4.9 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise microscópica mais utilizada para avaliar a microestrutura das fibrilas de algodão é a microscopia eletrônica de varredura. Para a avaliação da estrutura fibrilar após tratamento enzimático nas diferentes condições foram obtidas microfotografias das amostras de pó de algodão. A análise de um “branco”, tecido felpudo sem tratamento, também foi realizado. As alterações superficiais das fibrilas de algodão foram detectadas utilizando ampliações de 70 a 200 vezes.

Para a análise de MEV utilizou-se microscópio eletrônico de varredura Philips, modelo XL-30, localizado no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras em pó foram secas e preparadas sobre uma superfície metálica fixada através de uma fita adesiva dupla-face e recobertas com ouro por um *sputter coating* (metalizador) durante 60 s.

4.10 ANÁLISE DA ETAPA DE BIOPOLIMENTO

O tratamento de biopolimento foi realizado simulando, em bancada, as condições aplicadas industrialmente. Com o objetivo de conhecer o efeito inibitório dos produtos de reação enzimática, glicose e celobiose, utilizou-se na solução de biopolimento as concentrações iniciais de 1,67 $\mu\text{mol/L}$ (0,3 mg/mL Glicose e 0,57 mg/mL Celobiose) separadamente.

Os experimentos foram realizados com amostras de $6 \pm 0,01$ g de tecido felpudo 100% algodão (350 g/m²) em erlenmeyer (250 mL) em banho termostático de agitação orbital a 100 rpm durante 60 min a uma temperatura de 50 °C. A reação ocorreu em tampão acetato 50 mM pH 4,8 e uma razão tampão/substrato de 25:1. As dosagens enzimáticas utilizadas foram de 5,0, 12,5, 20,0, 27,5, 35,0 e 50,0 μL por grama de substrato, conforme ficha técnica para biopolimento com tratamento de 20 a 40 min de duração.

Para o estudo cinético, utilizou-se 50,0 μL de enzima por grama de substrato, seguindo-se as condições citadas anteriormente. Os ensaios foram realizados em duplicata para os dois tratamentos. Em ambos os casos, a solução contendo o tecido submerso em tampão acetato foi ambientada para posteriormente adicionar as dosagens enzimáticas. A

reação foi interrompida adicionando as amostras por 10 min em banho de água fervente.

4.11 ESTUDO DE ADSORÇÃO E OBTENÇÃO DE PÓ DE ALGODÃO

Para a obtenção do pó de algodão, foi necessário submeter os tecidos a um tratamento mais drástico, com concentrações enzimáticas mais elevadas, tempo de reação maior e agitação mecânica intensa. Isso se deu, pois nas condições normais de biopolimento simuladas neste trabalho, a formação de pó foi detectada, porém devido ao pequeno volume do sistema reacional (150 mL) esta não pôde ser mensurada.

Para este estudo utilizou-se amostras de $6 \pm 0,01$ g de tecido felpudo 100% algodão (350 g/m^2) em potes de aço inoxidável (300 mL) em equipamento laboratorial de tingimento e testes de solidez à lavagem modelo ALT, Mathis. Aplicou-se rotação de 100 rpm durante 180 min e temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

A dosagem enzimática aplicada foi de 5 mg de proteína por grama de substrato seco ($0,342 \text{ mL enzima/g substrato}$) a um volume total de 150 mL com tampão acetato 50 mM pH 4,8. Adicionou-se uma concentração de $11,41 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ($2,05 \text{ mg/mL}$ glicose e $3,90 \text{ mg/mL}$ celobiose), separadamente.

Prepararam-se inicialmente as soluções tampão acetato, nas três condições de estudo, sem inibidor, na presença de glicose e na presença de celobiose. O tecido felpudo foi adicionado à solução tampão, na ausência de enzima, e aquecido até a temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Atingida a temperatura de reação a enzima foi adicionada ao meio reacional por intermédio de injeção através do septo dos potes de aço inoxidável, neste momento deu-se início à reação.

Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. Periodicamente foram retiradas amostras com o auxílio de uma seringa, através do septo dos potes, e então cessada a reação adicionando uma alíquota da amostra em banho de água fervente por 10 min e outra em 0,3 mL de solução de Na_2CO_3 2%. A primeira alíquota foi utilizada para análise de ART, já a segunda na determinação de proteína para perfil de adsorção enzimática, segundo procedimentos experimentais citados anteriormente. Após o término do tempo de reação, os potes foram retirados do equipamento e adicionados por 10 min em banho de água fervente para desnaturação das enzimas. O pó de algodão foi obtido, através de filtragem, do líquido de reação e da lavagem com água destilada das amostras de tecido após hidrólise, conforme item 4.7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados obtidos a partir dos ensaios de caracterização da enzima celulase, bem como avaliação do efeito inibitório na perda de massa do substrato têxtil, adsorção, cinética enzimática e formação de pó de algodão após processo de biopolimento. Além disso, foi analisada a estrutura do pó de algodão e do tecido felpudo quanto a suas características superficiais e cristalinas.

5.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A determinação da concentração protéica presente no complexo enzimático é uma fator importante na interpretação dos resultados de atividade enzimática específica. Alta quantidade protéica em celulases comerciais não está diretamente associada à alta atividade celulásica, pois este pode apresentar quantidades significantes de proteínas não celulásicas ou sem atividade enzimática gerada por desnaturação.

O procedimento aplicado neste trabalho para a determinação de proteína foi o método de Bradford (BRADFORD, 1976), conforme item 4.3. Este foi escolhido devido a sua praticidade e rapidez na obtenção dos resultados, fatores fundamentais na aplicação industrial. O resultado obtido foi de $14,601 \pm 0,633$ mg/mL, apresentando pequeno desvio padrão, demonstrando ser um procedimento simples e de boa reprodutibilidade.

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se três substratos diferentes: carboximetilcelulose (CMC) - derivado de celulose solúvel; Avicel® - celulose microcristalina; papel filtro. As atividades CMCase, Avicelase e FPU são expressas em unidades.mL⁻¹ e em unidades.mg⁻¹, conforme mencionado no item 4.5 e apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Atividade enzimática total e por unidade de proteína.

| <i>Substrato</i> | <i>Atividade Total (Unidades.mL⁻¹)</i> | <i>Atividade Específica (Unidades.mg⁻¹)</i> |
|---|---|--|
| Papel Filtro (FPU) | 35,872 ± 0,499 | 2,457 ± 0,039 |
| Carboximetilcelulose (CMCase) | 115,461 ± 2,848 | 7,907 ± 0,195 |
| Celulose microcristalina (Avicelase) | 4,387 ± 0,085 | 0,300 ± 0,006 |

Comumente, utiliza-se como substrato na determinação de atividade celobiohidrolase celulose microcristalina. Este substrato é aplicado nesta determinação, pois apresenta alta organização estrutural, baixo grau de polimerização e grande disponibilidade de grupos terminais redutores e não redutores, tornando-se ideal para tal avaliação.

A determinação contra Avicel® (celulose microcristalina) apresenta valores bem inferiores aos encontrados para atividade papel filtro e carboximetilcelulose, demonstrando baixa atividade exoglucanase no complexo enzimático.

Na determinação da atividade endoglucanase, usualmente utiliza-se celulose solúvel, carboximetilcelulose (CMC), como substrato. A partir desta análise, é visível a elevada atividade específica das endoglucanases presentes no complexo enzimático utilizado neste trabalho. Em alguns trabalhos que utilizam celulase comercial de *Trichoderma reesei*, é comum encontrar apenas a determinação de atividade CMC e papel filtro devido à superior ação das endoglucanases em vista às outras enzimas presentes nos complexos enzimáticos proveniente deste fungo (SREENATH, SHAH, *et al.*, 1996; CORTEZ, ELLIS e BISHOP, 2001; CSISZÁR, URBÁNSZKI e SZAKÁCS, 2001; MCCLOSKEY e JUMP, 2005).

Martins *et al.* (2008) demonstraram que as atividades específicas para enzima comercial produzida pelo fungo *Trichoderma reesei*, com base na determinação de proteína pelo método de Bradford, foram de 1,83, 12,76 e 0,67 unidades.mg⁻¹ aplicando-se papel filtro, carboximetilcelulose e celulose microcristalina como substratos, respectivamente. Neste trabalho obteve-se valores de 2,46, 7,91 e 0,30 unidades.mg⁻¹, apresentando um valor superior de papel filtro, porém inferiores na hidrólise de carboximetilcelulose e celulose

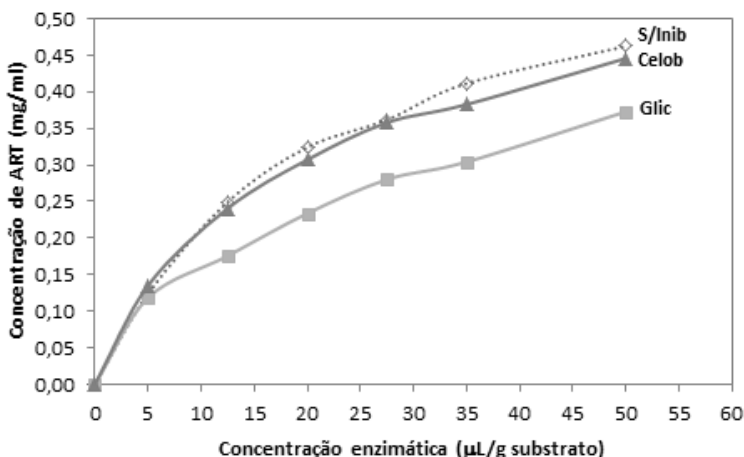
microcristalina, quando comparado com os resultados obtidos por Martins e colaboradores.

5.2 SIMULAÇÃO EM ESCALA DE BANCADA DA ETAPA DE BIOPOLIMENTO

5.2.1 Inibidores enzimáticos na etapa de biopolimento

O biopolimento de tecido felpudo 100% algodão aplicando enzima comercial de origem *Trichoderma reesei* foi realizado utilizando-se diferentes concentrações enzimáticas de 5,0, 12,5, 20,0, 27,5, 35,0 e 50,0 μL por grama de substrato. A concentração dos açúcares redutores totais (ART) foi determinada utilizando o método de DNS, conforme descrito no item 4.4. Os experimentos foram realizados sem a adição de inibidor e com iguais concentrações molares de glicose e celobiose, nas mesmas condições de temperatura, nível de agitação e tempo de reação de 60 min. As curvas (Figura 18) apresentam o efeito da glicose e celobiose como inibidores sobre a hidrólise enzimática, na obtenção de açúcares redutores totais.

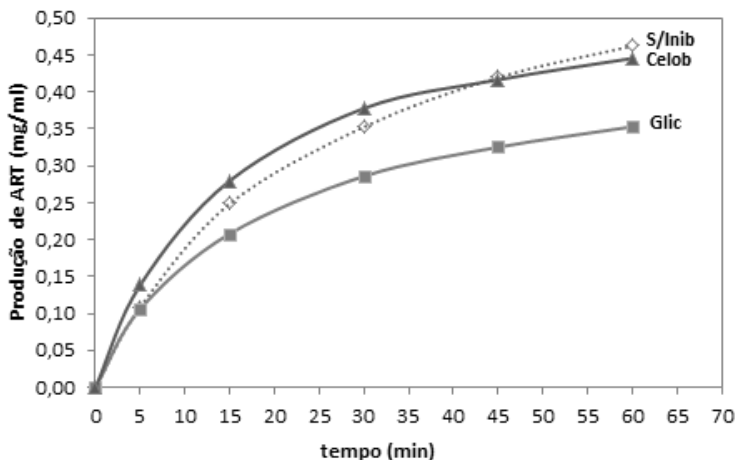
Figura 18. Produção de ART em função da Concentração enzimática. O gráfico apresenta o efeito da produção de ART sem presença inicial de inibidor (\diamond - S/Inib, linha tracejada), na presença de 0,30 mg/mL de Glicose (\blacksquare - Glic, linha clara) e na presença de 0,57 mg/mL de Celobiose (\blacktriangle - Celob, linha escura), após 60 min de tratamento.



Após 60 min de tratamento para as diferentes concentrações enzimáticas, nota-se um pequeno efeito do poder de inibição da celobiose comparando-se ao tratamento da celulose na ausência de inibidores. Pode-se observar uma maior ação inibitória da glicose sobre a celulase, quando comparada ao tratamento na presença de celobiose nos mesmos níveis de concentração molar. Contudo a baixos níveis de concentração enzimática, a ação dos inibidores torna-se desprezível.

Na Figura 19 obtém-se o efeito dos inibidores, glicose e celobiose, na taxa de hidrólise. Para uma concentração inicial de glicose de 0,30 mg/mL (1,67 $\mu\text{mol/L}$), observa-se uma redução na produção de açúcares redutores, demonstrando o efeito inibitório deste açúcar. Contudo, a uma concentração inicial de 0,57 mg/mL (1,67 $\mu\text{mol/L}$) de celobiose não observa-se acentuado efeito inibitório, mas sim uma pequena redução na capacidade de hidrólise. Observa-se, no experimento realizado sem a presença de inibidores, uma tendência ascendente na produção de açúcares redutores, já as com inibidores a tendência é de redução da taxa de hidrólise. Após 60 min de reação, possivelmente o efeito de inibição pela celobiose torne-se mais acentuada, reduzindo a capacidade da enzima de hidrolisar o substrato.

Figura 19. Produção de ART em função do tempo de hidrólise enzimática. O gráfico apresenta o efeito da produção de ART sem presença inicial de inibidor (\diamond - S/Inib, linha tracejada), na presença de 0,30 mg/mL de Glicose (\blacksquare - Glic, linha clara) e na presença de 0,57 mg/mL de Celobiose (\blacktriangle - Celob, linha escura), a uma concentração de 50 μL por grama de substrato seco.



Alguns autores (ANDRIĆ, MEYER, *et al.*, 2010a; AL-ZUHAIR, 2008; GAN, ALLEN e TAYLOR, 2003) reconhecem os efeitos que a glicose e a celobiose geram sobre a hidrólise enzimática, porém este modo de inibição ainda não está totalmente esclarecido. Gan *et al.* (2003) propõe que quando glicose é adicionada à mistura reacional no início da hidrólise, a taxa e a extensão de hidrólise diminui, porém diferentemente do que foi obtido neste trabalho, na presença de celobiose a taxa inicial de produção de ART reduz substancialmente. Ghose & Das (1971), citados por Gan *et al.* (2003), apresentam informações que afirmam o maior efeito inibidor da celobiose sobre a hidrólise gerada por *T. viride*, mesmo em baixas concentrações.

Andrić *et al.* (2010a) confirmam que a inibição exercida pela glicose sobre a ação da celulase varia significativamente para diferentes sistemas (diferentes substratos, níveis de dosagem de enzima em relação ao substrato, níveis de glicose, entre outros). Contudo, conclusões definitivas não podem ser feitas devido à grande variedade de resultados obtidos principalmente para celulase de *T. viride*, porém sabe-se que esta parece ser mais sensível à ação inibitória da glicose do que a celulase de *T. reesei*.

Conforme já citado por alguns autores (MIETTINEN-OINONEN, 2007; PINTO, 2006; SCHÜLEIN, 2000; CAVACO-PAULO, ALMEIDA e BISHOP, 1998), a celobiohidrolase é responsável pela hidrólise da porção cristalina da celulose, produzindo na sua maioria celobiose. O efeito de hidrólise gerado pela celobiohidrolase depende do grau de cristalinidade do substrato, possuindo maior atividade aparente sobre este. O impacto da inibição da celobiose sobre a celobiohidrolase varia dependendo do grau de cristalinidade do substrato, estando estes diretamente ligados (ANDRIĆ, MEYER, *et al.*, 2010a).

5.2.2 Perda de massa após tratamento enzimático

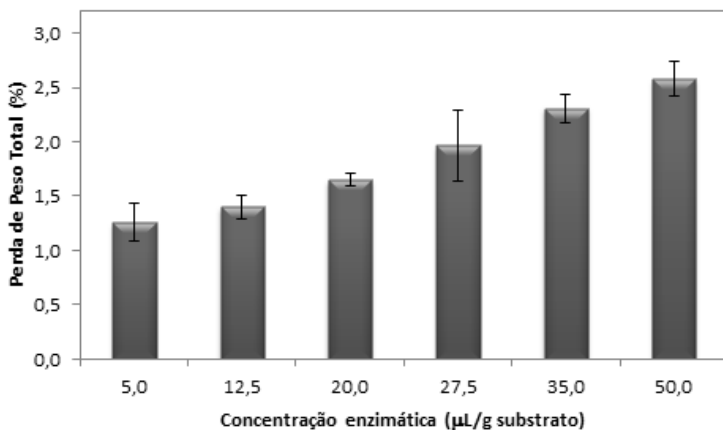
As amostras de tecido felpudo submetidas à ação enzimática com diferentes concentrações foram tratadas em erlenmeyer de 250 mL em banho termostático a 50 °C e agitação orbital de 100 rpm por uma hora. Para a determinação da perda de massa após o tratamento, as amostras foram secas durante 60 min a uma temperatura de 110 °C e então pesadas.

A perda de massa do tecido felpudo tratado com diferentes concentrações de enzima pode ser observada na Figura 20. Para uma concentração de 5,0 µL/g de substrato a perda de massa foi de 1,26%, já

para uma concentração dez vezes superior, 50,0 $\mu\text{L/g}$, a perda de massa foi de 2,58%, aproximadamente o dobro do anterior.

Neste teste de simulação do tratamento utilizado industrialmente observa-se uma perda de massa bem abaixo dos parâmetros utilizados para o biopolimento. Segundo Lenting & Warmoeskerken (2001a), perdas de massa do tecido tratado com celulase a fim de se obter um efeito aceitável de biopolimento estão entre 3 a 5%. Para estes valores, considera-se um biopolimento efetivo sem perda excessiva de resistência dos tecidos. Porém, observa-se neste trabalho que para as dosagens enzimáticas nas condições indicadas, a perda de massa não passou de 2,6% para o tratamento com um pequeno excesso de enzima, 50,0 $\mu\text{L/g}$.

Figura 20. Perda de massa após tratamento de uma hora a 100 rpm com diferentes concentrações enzimáticas. O gráfico apresenta a perda de massa do tecido felpudo 100% celulose após hidrólise com celulase comercial.



Alguns autores (CAVACO-PAULO e ALMEIDA, 1994; CORTEZ, ELLIS e BISHOP, 2001) mencionaram a importância da agitação mecânica na efetividade do biopolimento. A agitação mecânica colabora na hidrólise enzimática, favorecendo a aproximação da enzima aos polímeros de celulose, quebrando estas cadeias, além disso, auxilia na remoção das microfibrilas já enfraquecidas pela ação enzimática.

Observa-se, a partir dos resultados obtidos, que neste trabalho foi aplicada uma condição branda de agitação mecânica. Apesar das

condições enzimáticas adequadas, a perda de massa ficou abaixo dos parâmetros aceitáveis para um bom biopolimento, comprovando a necessidade de uma maior agitação mecânica para este processo.

5.3 TRATAMENTO COM SOBRECARGA ENZIMÁTICA

Nesta condição de ensaio o tratamento enzimático foi realizado com enzima comercial utilizando a concentração de 5 mg de proteína/g de substrato (342,5 μL por grama de substrato). Utilizou-se agitação mecânica intensa em equipamento laboratorial de tingimento e testes de solidez à lavagem com rotação de 100 rpm durante 180 min a uma temperatura de 50 °C. Para determinar o efeito dos inibidores glicose e celobiose, foram utilizadas concentrações iniciais de 2,055 e 3,904 mg/mL, respectivamente (11,41 $\mu\text{mol/L}$).

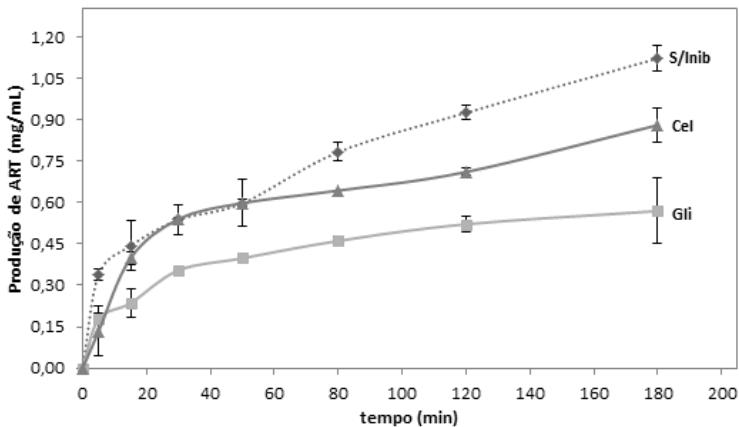
5.3.1 Avaliação da cinética e adsorção enzimática

A produção de açúcares redutores na presença e ausência de inibidores apresenta diferenças significativas, conforme apresentado na Figura 21. Conforme esperado, a hidrólise sem inibidor apresenta-se superior aos demais experimentos. Ao fim de 180 min de reação obteve-se a formação de 1,121, 0,880 e 0,569 mg/mL de ART nos testes sem inibidor, na presença de celobiose e na presença de glicose, respectivamente. Os efeitos inibitórios da celobiose e glicose foram de 21,5 e 49,24 %, respectivamente.

Conforme discutido anteriormente, nos sessenta primeiros minutos de reação, a solução contendo celobiose não apresenta um efeito inibitório acentuado, ficando muito próximo da curva do ensaio sem inibidor. Contudo para este último observa-se um pequeno desvio da tendência da curva, possivelmente causado durante a coleta das amostras. Os resultados obtidos nesta etapa estão de acordo com o observado no item 5.2.1, onde a glicose possui um maior caráter inibitório liberando ao meio reacional uma menor quantidade de açúcares redutores.

Nos testes contendo glicose e celobiose, observa-se após 50 min de reação, uma redução na taxa de hidrólise, enquanto que na ausência de inibidor, a curva apresenta uma taxa constante e ascendente de produção de açúcares redutores totais, observando-se a capacidade hidrolítica das enzimas após 180 min de tratamento.

Figura 21. Produção de ART em função do tempo de hidrólise enzimática. O gráfico apresenta o efeito da produção de ART sem a presença inicial de inibidor (◆ - S/Inib, linha tracejada), na presença de 2,05 mg/mL de Glicose (■ - Glic, linha clara) e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose (▲ - Celob, linha escura), a uma concentração de 5 mg de proteína por grama de substrato seco.



Em um estudo visando avaliar o efeito de altas concentrações iniciais de glicose na hidrólise enzimática, Andrić *et al.* (2010b) aplicaram celulase de *Trichoderma reesei* complementada por β -glucosidase contra substrato lignocelulósico. Neste trabalho, os autores observaram uma redução significativa na produção de glicose quando aplicadas concentrações iniciais de 10 e 20 g/L de solução de glicose como inibidor. Já na adição de 40 g/L de glicose, obteve-se uma taxa de formação de glicose negativa durante as 6 primeiras horas de reação, representando consumo deste monossacarídeo. Este fato deu-se possivelmente devido à capacidade das β -glucosidases, na presença de glicose, de formarem oligossacarídeos, em um fenômeno chamado de transglicosilação (ANDRIĆ, MEYER, *et al.*, 2010b).

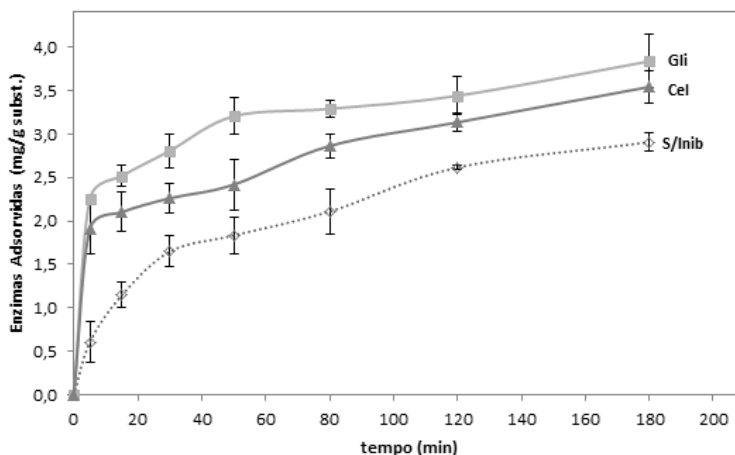
A capacidade de adsorção da celulase no substrato 100% algodão, em diferentes condições de tratamento, pode ser observada na Figura 22. Neste experimento observa-se uma maior capacidade adsorptiva da celulase na presença dos sacarídeos. Além disso, nota-se que a adsorção é quase que instantânea nos primeiros 5 min para os experimentos contendo inibidor, enquanto que na ausência destes a curva apresenta-se em uma ascendência mais estável até os 180 min de reação. Tomme *et*

al. (1995) obtiveram em seus experimentos uma adsorção quase instantânea utilizando três diferentes enzimas a baixas concentrações, sobre celulose microcristalina.

Andrić *et al.* (2010b) apresentaram uma revisão detalhada sobre o efeito da glicose e celobiose na adsorção da celulase em diferentes substratos celulósicos, porém relataram não haver um consenso claro sobre este efeito.

A influência da adsorção das enzimas CBH I e EG II purificadas na presença do sal cloreto de sódio foi analisado por Gerber *et al.* (1997) sobre polpas Kraft branqueadas. Segundo estes autores, o cloreto de sódio aumenta a afinidade de adsorção da CBH I sobre a fibra a baixas concentrações enzimáticas, porém reduz o tempo de adsorção. Já a EG II apresentou uma maior adsorção com o aumento da concentração salina.

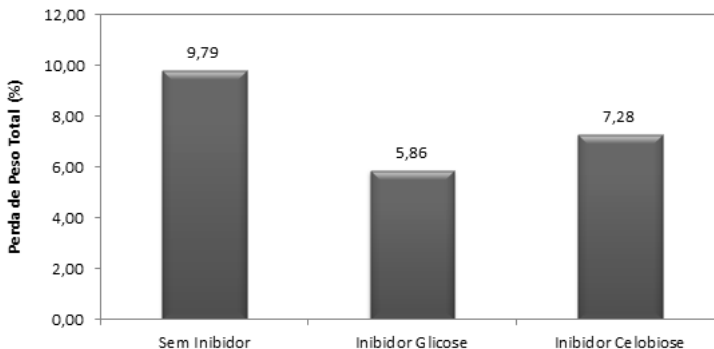
Figura 22. Adsorção da enzima sobre substrato têxtil em função do tempo. O gráfico apresenta o efeito da adsorção da celulase, a uma concentração de 5 mg de proteína por grama de substrato seco, na ausência de inibidor (\diamond - S/Inib, linha tracejada), na presença de 2,05 mg/mL de Glicose (\blacksquare - Glic, linha clara) e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose (\blacktriangle - Celob, linha escura).



5.3.2 Efeito dos inibidores na perda de massa do substrato têxtil e formação de pó de algodão

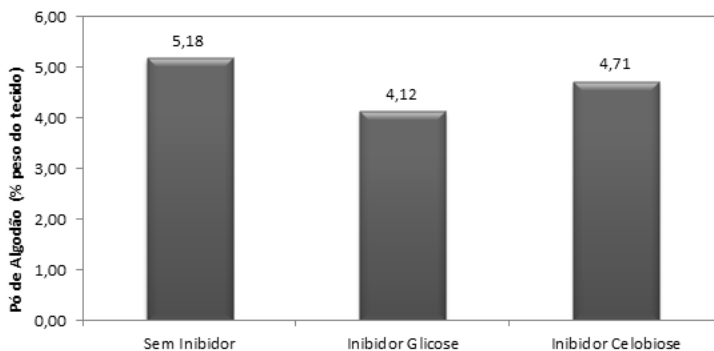
A perda de massa do tecido felpudo, após tratamento com elevada agitação mecânica e concentração de 5 mg de proteína/g de substrato pode ser observado na Figura 23, para tratamentos com glicose, celobiose e na ausência de inibidor. Os resultados mostram que a perda de massa após tratamento foi de 9,79% para o tecido tratado sem a adição de inibidor, sendo superior aos demais tratamentos, conforme esperado. O experimento realizado na presença de 2,055 mg/mL de glicose a perda de massa é menor que o teste realizado com 3,904 mg/mL de celobiose obtendo-se valores de 5,86 e 7,28%, respectivamente. A perda de massa com os inibidores glicose e celobiose é 40,14 e 25,64% inferior ao valor observado sem inibidor, respectivamente.

Figura 23. Perda de massa após tratamento de 3 h a 100 rpm na ausência de inibidor, na presença de 2,05 mg/mL de Glicose e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose.



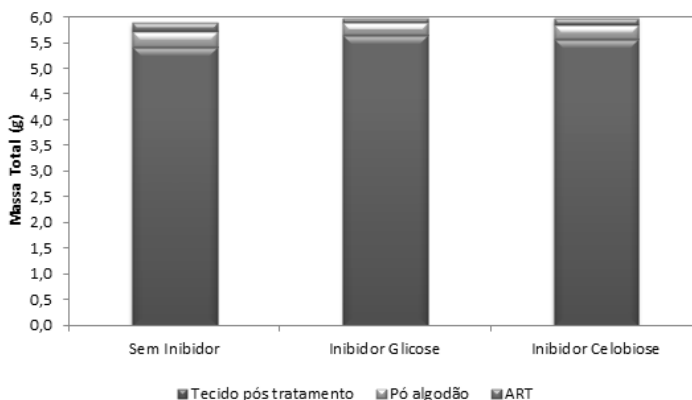
A formação de pó de algodão observado na Figura 24 está em conformidade com os resultados obtidos para perda de massa de tecido e açúcares redutores formados na hidrólise enzimática. No tratamento sem inibidor obteve-se 0,311 g de pó de algodão, já para os experimentos com glicose e celobiose as massas obtidas foram de 0,247 g e 0,283 g, respectivamente.

Figura 24. Massa de pó de algodão obtido após tratamento de 3 h a 100 rpm na ausência de inibidor, na presença de 2,05 mg/mL de Glicose e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose.



Uma análise mais detalhada referente à conformidade dos valores obtidos da massa remanescente do tecido tratado, do pó de algodão formado e açúcares redutores totais após o tratamento enzimático pode ser observada na Figura 25. Nesta figura, os somatórios dos resultados residuais apresentam-se muito próximos aos das massas iniciais das amostras de tecido felpudo (6 g). Os valores obtidos são de 5,891, 5,981 e 5,978 g para os tratamentos sem inibidor, com 11,41 $\mu\text{mol/L}$ de glicose e celobiose, respectivamente.

Figura 25. Massa total (massa final do tecido, pó de algodão e Açúcares Redutores Totais) após tratamento de 3 h a 100 rpm na ausência de inibidor, na presença de 2,05 mg/mL de Glicose e na presença de 3,90 mg/mL de Celobiose.



A partir da Figura 25, observa-se que nos três experimentos existem perdas de massa, valores não quantificados pelas análises realizadas. Estes valores de perdas, valores quase desprezíveis, chegam a 1,81% para o ensaio sem inibidor, 0,32% na presença de glicose e 0,37% na presença de celobiose.

Heikinheimo e colaboradores (2003) analisaram o efeito da celulase de *Trichoderma reesei* purificada na obtenção de pó de algodão a partir de tecido de algodão. Neste estudo observou-se uma perda de massa do tecido tratado com EG I e EG II muito superior ao tratado com CBH I e CBHIII. De forma semelhante, a obtenção de pó de algodão foi superior para o tratamento com EG I e II.

Segundo Andrić *et al.* (2010) a celobiose é responsável pela redução da atividade das celobiohidrolases (CBH), já a glicose tem capacidade de inibir tanto as endoglucanases (EG) quanto as β -glucosidases (β G). Neste trabalho, com a aplicação de inibidores, os resultados para perda de massa e formação de pó de algodão apresentam resultados semelhantes aos obtidos por Heikinheimo *et al.* (2003). Na presença de celobiose, há uma redução na ação das CBHs mantendo o poder hidrolítico das EGs, gerando uma maior perda de massa do tecido felpudo tratado, e consequentemente, uma maior quantidade de pó de algodão obtido.

5.3.3 Caracterização do pó de algodão após hidrólise enzimática

A análise do material celulósico, sua caracterização e a avaliação das modificações estruturais sofridas após tratamento enzimático é importante para o conhecimento do efeito hidrolítico da celulase sobre o substrato 100% algodão em diferentes condições de inibição. Foram avaliados, nesta etapa, os aspectos estruturais do pó de algodão e o grau de cristalinidade das amostras.

Com esses resultados pretende-se compreender as modificações sofridas pelas fibrilas após o tratamento enzimático na presença de produtos potencialmente inibidores, como a glicose e a celobiose. Na literatura comumente encontra-se relatos das alterações estruturais em tratamentos na presença de celulase purificada, aplicadas individualmente (CAVACO-PAULO, ALMEIDA e BISHOP, 1998; PERE, PUOLAKKA, *et al.*, 2001; HEIKINHEIMO, 2002). O conhecimento estrutural das partículas oriundas da hidrólise enzimática é fator importante para a avaliação das possíveis aplicações em diferentes setores da indústria, tendo em vista suas características e pequenas dimensões.

5.3.3.1 Características superficiais da fibra de algodão após tratamento enzimático

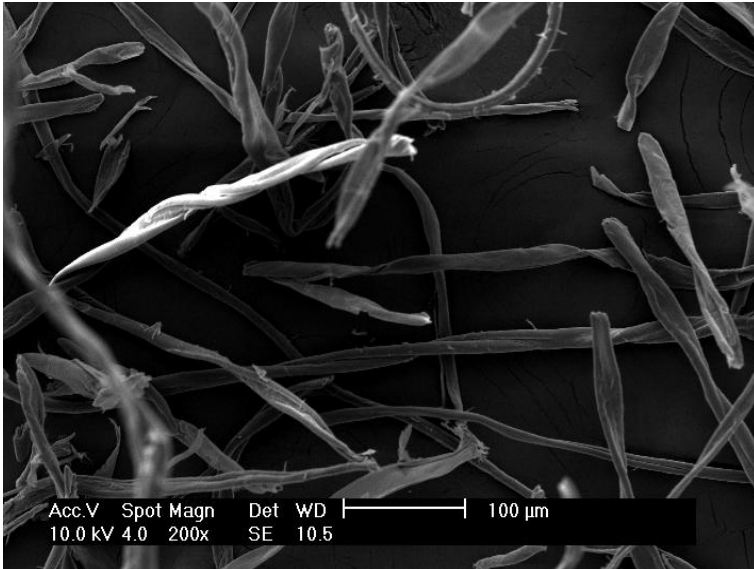
O efeito das enzimas sobre as fibras celulósicas é normalmente avaliado por imagens obtidas por MEV em amostras sem e com tratamento enzimático em diferentes condições. Em muitas situações com o uso das imagens é possível observar as alterações estruturais sofridas na superfície das amostras de celulose.

Csiszár *et al.* (2001) observaram alterações na superfície das fibrilas de algodão, tais como remoção de irregularidades superficiais, tornando-a mais limpa e plana, em tratamento com diferentes complexos enzimáticos comerciais sob condições otimizadas. Wang *et al.* (2008) obtiveram resultados similares com aplicação de celulase comercial, onde não foram observadas modificações na forma da fibra, apenas uma superfície mais lisa devido à remoção das microfibrilas.

Diferentemente destes, Cavaco-Paulo & Almeida (1994) notaram a redução da espessura das fibrilas, bem como pontos de grande degradação estrutural ocasionados pela aplicação de diferentes concentrações enzimáticas e condições de agitação mecânica. Nestas condições, os autores concluíram que agitação mecânica é um fator importante para a degradação da estrutura fibrilar, mesmo em processos com dosagens enzimáticas controladas.

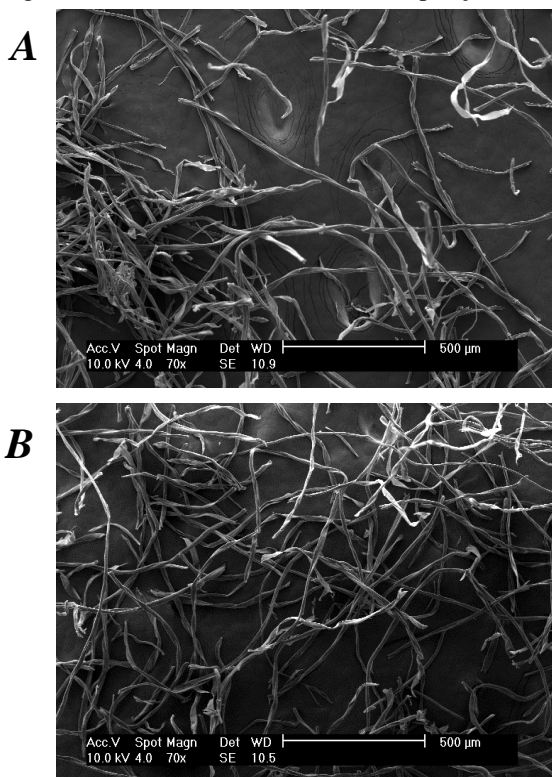
As imagens obtidas neste trabalho permitem uma análise das características do pó de algodão após o tratamento enzimático a uma concentração de 5 mg de proteína/g de substrato e um tempo reacional de 180 min nas diferentes condições de tratamento. As amostras apresentam características diferenciadas, e para uma análise inicial do pó gerado na hidrólise utilizou-se imagens com diferentes ampliações que possibilitaram uma melhor observação. Em seguida fez-se um comparativo da superfície dos fragmentos de fibrila após tratamento e de uma amostra em “branco”, sem tratamento.

Figura 26. Análise de MEV de pó de algodão após tratamento enzimático na ausência de inibidor a uma ampliação de 200X.



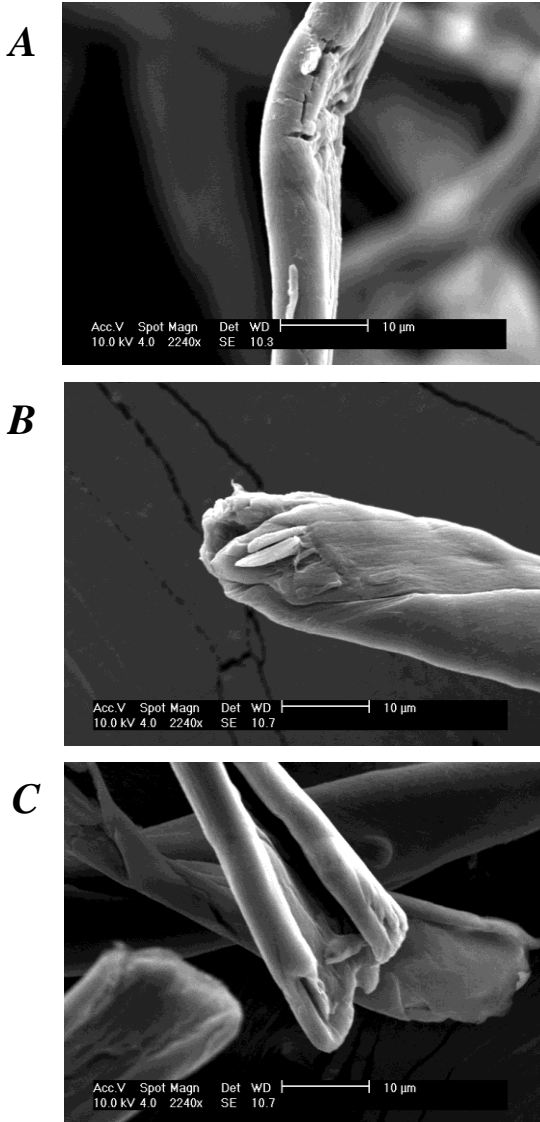
A Figura 26 apresenta imagem de fragmentos de algodão após tratamento enzimático na ausência de concentrações iniciais de inibidores. Essa demonstra heterogeneidade no tamanho das fibrilas geradas após hidrólise, bem como escamações pela superfície das fibrilas. A partir desta, observa-se o efeito decorrente da sobrecarga de enzima, elevada agitação mecânica e excessivo tempo de reação da celulase sobre o substrato sólido.

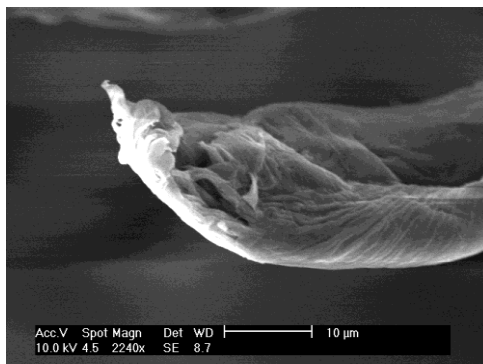
Figura 27. Imagens de MEV após tratamento na presença de concentrações iniciais de glicose (A) e celbiose (B) a uma ampliação de 70X.



A Figura 27 mostra o pó de algodão gerado após a hidrólise enzimática na presença dos inibidores glicose (A) e celbiose (B), a concentrações iniciais de 2,055 mg/mL e 3,904 mg/mL, respectivamente (11,41 $\mu\text{mol/L}$). Similarmente ao observado na Figura 26, é possível detectar a fragmentação das partículas de fibrila. Contudo, nestas imagens não se observa grandes alterações na estrutura superficial de ambas as amostras.

Figura 28. Imagens de MEV para amostras de fragmentos de algodão na ausência de concentrações iniciais de inibidores (A), na presença de concentração inicial de glicose (B), de celobiose (C) e de amostra sem tratamento enzimático (D) a uma ampliação de 2240X.



D

A Figura 28 apresenta a superfície dos fragmentos de algodão obtidos após as diferentes condições de tratamento (sem inibidor - A, presença de glicose - B e presença de celobiose - C) e tecido felpudo sem tratamento enzimático (D). Comparando-se as superfícies das fibrilas, confirma-se a maior degradação sofrida pela amostra tratada sem inibidores (A), onde a presença de escamações e locais de ruptura é acentuada frente às demais amostras. Já as amostras com concentrações iniciais de inibidores apresentam uma superfície mais lisa, com poucas áreas de protruções. Na imagem ampliada da amostra em “branco” (D), torna-se visível uma superfície áspera, característica das fibras não submetidas a tratamento com enzimas celulases. Na extremidade desta amostra é observada a ruptura física das fibrilas de algodão.

5.3.3.2 Índice de Cristalinidade através da análise de Difração de Raio X (DRX)

A cristalinidade da celulose apresenta um papel importante no conhecimento da hidrólise enzimática. Índice de cristalinidade da celulose vem sendo utilizado por mais de cinco décadas para interpretar mudanças na estrutura da celulose após tratamentos físico-químicos e biológicos. Contudo, a interpretação desses resultados para a celulose tratada através de hidrólise enzimática torna-se uma análise complexa (PARK, BAKER, *et al.*, 2010).

Atualmente, trabalhos sobre a ação enzimática comprovam que a enzima hidrolisa mais rapidamente a porção amorfa da celulose, preferencialmente à hidrólise lenta e de maior dificuldade que ocorre na parte cristalina da celulose. Apesar disso, a quantidade da porção amorfa

realmente hidrolisada pela celulase é pequena comparada com a quantidade total presente nas amostras de algodão (PARK, BAKER, *et al.*, 2010).

Em tratamento com pectinase em diferentes concentrações e tempo de reação, Kalantzi *et al.* (2008) obtiveram um aumento da cristalinidade do substrato. Foi observado que após 3 h de reação com 1000 unidades/g de tecido obteve-se um incremento no índice de cristalinidade para 91%, onde atribui-se estes valores à remoção da matéria amorfa encontrada no algodão sem tratamento prévio. (KALANTZI, MAMMA, *et al.*, 2008). Já na aplicação de celulase comercial (Celluclast), Wang *et al.* (2008) observaram um pequeno aumento na cristalinidade do algodão após 2 h de tratamento. Estes autores propuseram que esse pequeno incremento na cristalinidade está relacionado com o ataque da região amorfa pelas endoglucanases, expondo essas áreas para a ação das CBHs, porém essa variação só pôde ser observada após duas horas de tratamento devido à baixa velocidade reacional.

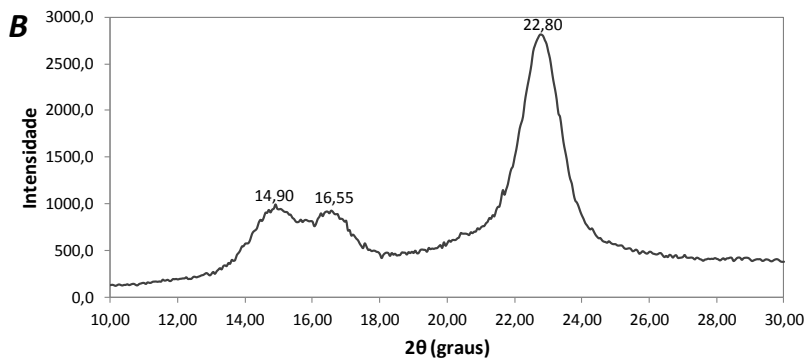
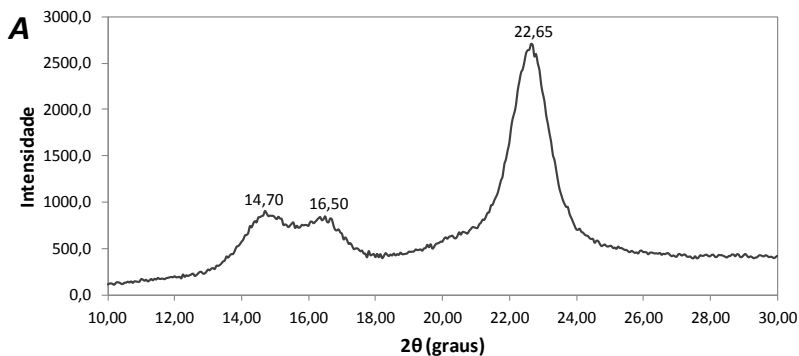
A Figura 29 apresenta os padrões de difração de raio X obtidos a partir do pó de algodão após hidrólise enzimática nas diferentes condições de tratamento. Como padrão foi utilizada uma amostra de tecido felpudo não submetida à ação enzimática. A partir dos difratogramas de DRX foi possível obter os valores de cristalinidade (%ICr) das amostras estudadas (Tabela 6). Em todos os ensaios é possível observar a presença dos picos que correspondem as deflexões nos planos 101, $10\bar{1}$ e 002, característicos do polimorfismo da celulose I.

Analisando os resultados de índice de cristalinidade obtidos para as quatro amostras é possível observar não haver variações significativas, onde na amostra sem tratamento obteve-se o menor valor de índice de cristalinidade (82,25%). Este valor apresenta-se muito próximo ao encontrado por Cavaco-Paulo (1995) (ICr: 83,0%) em seu estudo com fibras de algodão sem tratamento. Zhang & Lynd (2004) apresentam valores de índice de cristalinidade de 81,0% a 95,0% para algodão. Já Tomaz *et al.* (1994) obtiveram um valores médio de índice de cristalinidade de $60,18 \pm 0,87\%$ em análise de três variedades comerciais de algodão, inferiores ao encontrado neste trabalho.

Os valores obtidos, de forma crescente, para as amostras após tratamento enzimático são de 85,19%, 85,27% e 86,24% na presença de glicose, na ausência de inibidor e na presença de celobiose, respectivamente. Essas pequenas variações não podem ser associadas à ação hidrolítica nem ao efeito inibitório da glicose e celobiose,

conforme já mencionado anteriormente por Cavaco-Paulo (1995). Este sugere que a extensão da hidrólise e a composição da celulose não são fatores determinantes para a variação da cristalinidade das fibras de algodão. Os valores de índice de cristalinidade aumentam após submersão da celulose em água e posterior secagem, devido a uma recristalização da amostra. Logo, conclui-se que diferentes condições de secagem em diferentes temperaturas (ambiente ou na presença de calor) é um fator responsável pelo incremento no índice de cristalinidade das fibras de algodão (PALA, 2002; ZHANG e LYND, 2004).

Figura 29. Difratoograma de DRX apresentando os picos cristalinos (101), (10 $\bar{1}$) e (002) característicos da celulose I, após tratamento (A) sem inibidor, (B) com glicose [2,0 mg/mL], (C) com celobiose [3,9 mg/mL] e (D) tecido felpudo sem tratamento.



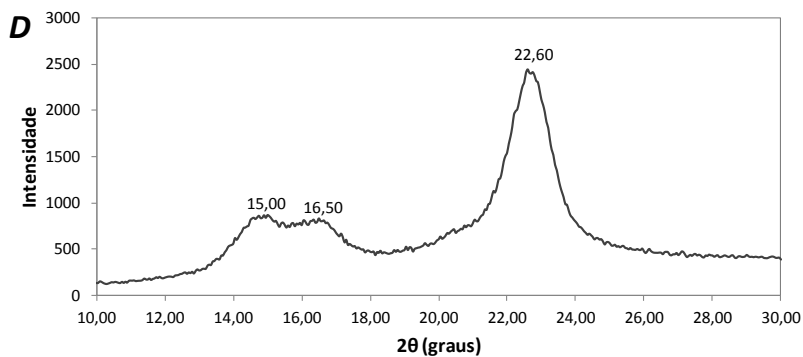
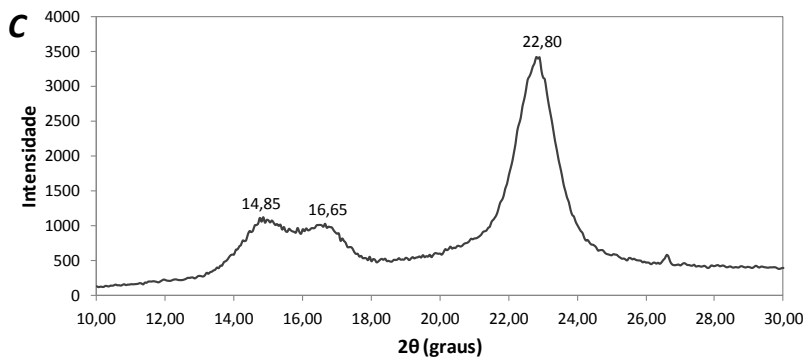
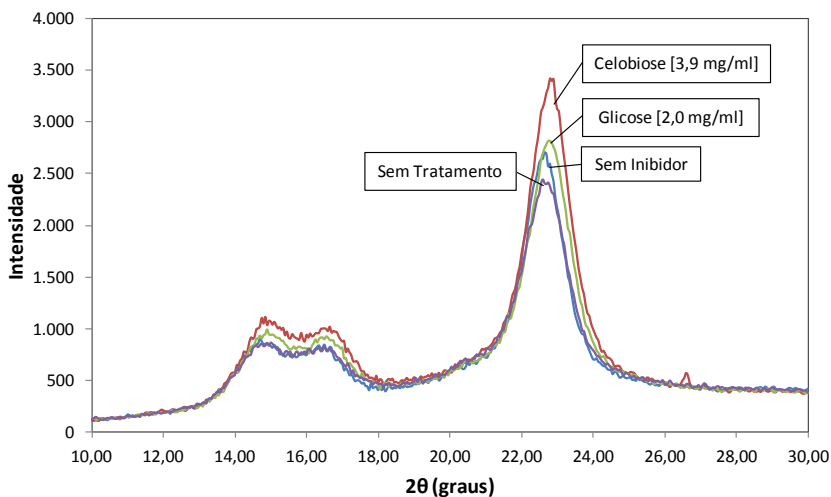


Tabela 6: Índice de cristalinidade (ICr (%)) obtido a partir da razão entre as intensidades do halo amorfo (I_{am}) e do pico correspondente ao plano cristalino 002 (I_{002}) da celulose I.

| Amostra | Plano amorfo (I_{am}) | Plano cristalino (I_{002}) | Cristalinidade ICr (%) |
|--------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Sem inibidor | 398,5 | 2.705,5 | 85,27 |
| Glicose [2,0 mg/mL] | 417,0 | 2.816,0 | 85,19 |
| Celobiose [3,9 mg/mL] | 470,5 | 3.420,5 | 86,24 |
| Sem tratamento | 434,0 | 2.444,5 | 82,25 |

Através da sobreposição dos difratogramas (Figura 30) é possível observar as diferentes larguras dos picos dos planos 101, $10\bar{1}$ e 002, referentes às porções cristalinas da amostra de algodão, sugerindo diferenças nos tamanhos e na microdeformação dos cristalitos. Porém, para quantificá-los é necessário a deconvolução dos picos, através de programas computacionais e a utilização da equação de Scherrer, mas sabe-se que por análise das figuras a largura dos picos no difratograma é inversamente proporcional ao tamanho médio dos cristalitos (PALA, 2002; WANG, ZHAO e DENG, 2008).

Figura 30. Diferentes picos no plano cristalino (002) observado através de difratograma de DRX da amostra de pó de algodão após tratamento enzimático nas diferentes condições e amostra de tecido felpudo sem tratamento.



Os resultados apresentados neste capítulo demonstram os diferentes efeitos inibitórios sofridos pela celulase quando em presença de glicose e celobiose. Contudo, não foram observadas alterações expressivas na superfície e na cristalinidade do pó de algodão após hidrólise enzimática nas diferentes condições reacionais.

6 CONCLUSÃO

O complexo celulásico comercial de origem *Trichoderma reesei* aplicado industrialmente na etapa de biopolimento e utilizado neste trabalho apresentou elevada atividade endoglucanase sobre carboximetilcelulase (CMC) como substrato, bem como elevada atividade total sobre papel filtro, aparentemente apresentando alto sinergismo das enzimas que o compõem.

A celobiose não apresentou pronunciado efeito inibitório nos 60 min de tratamento com diferentes concentrações enzimáticas, ficando muito próximo do ensaio sem a presença de inibidores. Já a presença de glicose mesmo em baixas concentrações demonstrou ser um forte inibidor do complexo enzimático. Apenas a baixas concentrações enzimáticas a glicose não apresentou efetividade na inibição, obtendo-se resultados similares de açúcares redutores totais nos diferentes experimentos. O mesmo efeito observa-se na cinética enzimática, contudo o experimento contendo celobiose apresentou uma tendência à inibição após os 60 min.

A perda de massa, nos experimentos com diferentes concentrações enzimáticas, apresentou uma pequena variação comparada com a grande variação de concentração enzimática aplicada nos processos. Os resultados obtidos estão abaixo do que comumente são desejáveis no processo de biopolimento. Um fator determinante para este resultado é a aplicação de agitação mecânica intensa, dada pela atrição dos rolos que compõem o maquinário industrial e o tecido durante o tratamento de biopolimento, não observada nesta etapa de simulação em escala de bancada.

Quando aplicada uma concentração enzimática e quantidades superiores de glicose e celobiose sobre agitação mecânica mais intensa, os resultados de açúcares redutores totais permaneceram similares aos obtidos anteriormente na etapa de simulação de biopolimento. Contudo, confirma-se que após 60 min, o efeito de inibição da celobiose torna-se mais pronunciado, para as diferentes concentrações enzimáticas e de inibidores investigadas.

Nas mesmas condições de experimento, obtiveram-se as cinéticas de absorção enzimática sobre o substrato 100% algodão. A adição de glicose e celobiose apresentaram um efeito benéfico à adsorção da enzima sobre o substrato. Na presença dos inibidores a adsorção foi quase que instantânea nos primeiros minutos de reação. Na solução

contendo glicose a adsorção foi superior aos demais ensaios, porém não obteve-se em nenhum dos três experimentos a saturação do substrato, caracterizando uma tendência de contínua absorção.

A perda de massa, em condição de elevada concentração enzimática e agitação mecânica, foi superior na ausência de inibidores, sendo o tratamento com glicose o que apresentou menor resultado. Comparando estes resultados com a quantidade de pó de algodão formado na hidrólise, os valores estão em conformidade, pois de forma similar, os tratamentos apresentaram maior formação de pó na ausência de inibidor, na presença de celobiose e na presença de glicose, respectivamente.

A partir da análise de imagens obtidas por MEV, foi possível observar heterogeneidade no tamanho das partículas de pó de algodão, sendo mais pronunciado no tratamento na ausência de inibidor. Superficialmente, observou-se a presença de escamações e pontos de ruptura quando não aplicadas concentrações iniciais de inibidor no ensaio, contudo na presença destes a superfície das fibrilas apresenta-se mais lisa, com poucas áreas de protruções e escamações.

O valor de cristalinidade obtido através de difração de raio X para a amostra de tecido sem tratamento enzimático foi muito próximo ao apresentado na literatura, demonstrando que a técnica aplicada e o equacionamento utilizado estão corretos, podendo ser reproduzidos em trabalhos futuros. Nas amostras após tratamento enzimático nas diferentes condições, obteve-se um incremento no índice de cristalinidade, porém conclusões efetivas não podem ser tiradas em comparação a amostra sem tratamento, devido à modificação na cristalinidade que o algodão sofre ao ser submetido a diferentes condições de umidade e secagem. Além disso, os três resultados para as amostras após tratamento na ausência de inibidor e na presença de glicose e celobiose são muito próximos, não apresentando variações expressivas capazes de obter-se conclusões do efeito dos inibidores sobre a modificação estrutural dos fragmentos de algodão.

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se, para o desenvolvimento de trabalhos futuros, a avaliação dos seguintes aspectos:

- Quantificar os produtos da reação enzimática, glicose e celobiose, através da análise por HPLC durante processo

hidrolítico na presença de concentrações iniciais dos polissacarídeos inibidores;

- Analisar o efeito de biopolimento, bem como perda de massa do substrato têxtil e formação de pó de algodão através da aplicação de endoglucanase e celobiohidrolase purificadas;
- Avaliar a cinética enzimática através da utilização de reatores de membranas, minimizando o efeito dos produtos inibidores;
- Comparar o efeito de biopolimento quando aplicado celulase de pH neutro e ácido, de diferentes origens microbianas;
- Determinar a cristalinidade do substrato de algodão utilizando diferentes técnicas de análise.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALY, A. S.; MOUSTAFA, A. B.; HEBEISH, A. Bio-technological treatment of cellulosic textiles. **Journal of Cleaner Production**, v. 12, n. 7, p. 697-705, 2004.

AL-ZUHAIR, S. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4078-4085, 2008.

ANDRIĆ, P. et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 308-324, 2010a.

ANDRIĆ, P. et al. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 280-297, 2010b.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, 2010.

AZEVEDO, H.; RAMOS, L. P.; CAVACO-PAULO, A. Desorption of cellulases from cotton powder. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 17, p. 1445-1448, 2001.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROADBENT, A. D. **Basic Principles of Textile Coloration**. [S.l.]: Society of Dyers and Colourists, 2001. 578 p.

BROTMAN, Y. et al. Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. **Plant Physiology**, v. 147, p. 779-789, 2008.

BUSCHLE-DILLER, G. Substrates and their structure. In: CAVACO-PAULO, A.; BÜBITZ, G. M. **Textile processing with enzymes**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. Cap. 2, p. 228.

CAVACO-PAULO, A. **Influência da Agitação Mecânica e da Composição Enzimática no Tratamento do Algodão com Celulasas**. Universidade do Minho. Braga, p. 76. 1995.

CAVACO-PAULO, A.; ALMEIDA, A.; BISHOP, D. Hydrolysis of cotton cellulose by engineered cellulases from *Trichoderma reesei*. **Textile Research Journal**, v. 68, n. 4, p. 273-280, 1998.

CAVACO-PAULO, A.; ALMEIDA, L. Cellulase Hydrolysis of Cotton Cellulose: The Effects of Mechanical Action, Enzyme Concentration and Dyed Substrates. **Biocatalysis**, v. 10, p. 353-360, 1994.

CAVACO-PAULO, A.; ALMEIDA, L. D.; DAVID, B. Cellulase activities and finishing effects. **Textile Chemist and Colorist**, v. 28, n. 6, p. 28-32, 1996.

CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. M. Catalysis and Processing. In: CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. M. **Textile Processing with Enzymes**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. Cap. 3, p. 228.

CORTEZ, J. M.; ELLIS, J.; BISHOP, D. P. Cellulase finishing of woven, cotton fabrics in jet and winch machines. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 239-245, 2001.

CSISZÁR, E.; URBÁNSZKI, K.; SZAKÁCS, G. Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 1065-1072, 2001.

CUNHA, R. T.; PEREIRA JR, N.; ANDRADE, C. M. M. C. Aplicação de enzimas em processos industriais têxteis. **Química Nova**, v. 82, p. 38-56, 1996.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. **Process Biochemistry**, 38, 2003. 1003-1018.

GERBER, P. J. et al. Adsorption of a *Trichoderma reesei* endoglucanase and cellobiohydrolase onto bleached Kraft fibres. **Cellulose**, v. 4, p. 255-268, 1997.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure & Appl. Chem.**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GUILLÉN, J. G.; GARRIDO, J. M. **Algodón y celulosa: estructura y propiedades**. [S.l.]: Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), 1987. 249 p.

HEIKINHEIMO, L. **Trichoderma reesei cellulases in processing of cotton**. VTT Technical Research Centre of Finland. Espoo, p. 77. 2002.

HEIKINHEIMO, L. et al. Effect of Purified *Trichoderma reesei* Cellulases on Formation of Cotton Powder from Cotton Fabric. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, n. 7, p. 1917-1922, 2003.

JÄGER, G. et al. How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, 2011.

JASIŃSKA, I. Assessment of a Fabric Surface after the Pilling Process Based on Image Analysis. **Fibers & Textiles in Eastern Europe**, v. 17, n. 2, p. 55-58, 2009.

KALANTZI, S. et al. Effect of pectate lyase bioscouring on physical, chemical and low-stress mechanical properties of cotton fabrics. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8185-8192, 2008.

LENTING, H. B. M.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. Mechanism of interaction between cellulase action and applied shear force, an hypothesis. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 217-226, 2001a.

LENTING, H. B. M.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. Guidelines to come to minimized tensile strength loss upon cellulase application. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 2-3, p. 227-232, 2001b.

LINDER, M.; TEERI, T. T. The roles and function of cellulose-binding domains. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 15-28, 1997.

LOSONCZI, A. K. **Bioscouring of Cotton Fabrics**. Budapest University of Technology and Economics. Budapest, p. 82. 2004.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MARTINS, L. F. et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, 99, 2008. 1417-1424.

MCCLOSKEY, S. G.; JUMP, J. M. Bio-Polishing of Polyester and Polyester/Cotton Fabric. **Textile Research Journal**, v. 75, n. 6, p. 480-484, 2005.

MEDVE, J. **Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of celobiohydrolase I, II and endoglucanase II**. Lund University. [S.l.]. 1997.

MIETTINEN-OINONEN, A. Cellulases in the textile industry. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial Enzymes**. [S.l.]: Springer, v. XII, 2007. Cap. 4, p. 642.

MIETTINEN-OINONEN, A. et al. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 3, p. 305-317, 2005.

NIERSTRASZ, V. A.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. Process engineering and industrial enzyme applications. In: CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. M. **Textile processing with enzymes**. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2003. Cap. 4, p. 120-158.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PALA, H. **Aplicação de celulasas e xilanases na reciclagem de fibras de papel**. Universidade do Minho. Braga, p. 409. 2002.

PALA, H.; MOTA, M.; GAMA, F. M. Enzymatic depolymerisation of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, n. 68, p. 101-108, 2007.

PARK, S. et al. cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1-10, 2010.

PERE, J. et al. Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 2-3, p. 247-255, 2001.

PINTO, J. R. C. **Production of Cellulose-Binding Domains by Proteolysis; Studies on the Adsorption and Modification of Cellulose Fibres**. Universidade do Minho. Braga, p. 123. 2006.

PINTO, J. R. et al. Studies on the Cellulose-Binding Domains Adsorption to Cellulose. **Langmuir**, v. 20, n. 4, p. 1409-0413, 2004.

REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **J Bacteriol**, v. 59, p. 485-497, 1950.

SALOHEIMO, M. et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 4202-4211, 2002.

SANTOS, A. P. **Extração e caracterização do amido do fruto-do-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil) e elaboração de filmes biodegradáveis**. Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, p. 112. 2009.

SCHÜLEIN, M. Protein engineering of cellulases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 239-252, 2000.

SREENATH, H. K. et al. Enzymatic Polishing of Jude/Cotton Blended Fabrics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 1, p. 18-20, 1996.

TECHNISCHE Universität Braunschweig. **Brenda - The Comprehensive Enzyme Information System**. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/>>. Acesso em: Junho 2010.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 160-167, 1997.

TOLAN, J. S.; FOODY, B. Cellulase from Submerged Fermentation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 65, 1999. 41-67.

TOMAZ, R. M. A. G. et al. Determinação dos índices de cristalinidade de fibras celulósicas. **Bragantia**, v. 53, n. 1, p. 121-126, 1994.

TOMME, P. et al. Comparison of a Fungal (Family I) and Bacterial (Family II) Cellulose-Binding Domain. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 15, p. 4356-4363, 1995.

WAKELYN, P. J. et al. Cotton Fibers. In: LEWIN, M. **Handbook of Fiber Chemistry**. 3^o Edição. ed. [S.l.]: CRC, 2007. Cap. 9, p. 521-667.

WANG, Y.; ZHAO, Y.; DENG, Y. Effect of enzymatic treatment on cotton fiber dissolution in NaOH/urea solution at cold temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 178-184, 2008.

WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I.; BHAT, K. M. The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. **Biochemical Journal**, v. 260, n. 1, p. 37-43, 1989.

XIAO, Z. et al. Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β -Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2004. 113-116.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.