

CAROLINE OLIVEIRA DA ROCHA

INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO ALTERNADO EM CELULASES
IMOBILIZADAS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: APLICAÇÃO NA
HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA.

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Júlio de Mesquita
Filho como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa
Marques

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

R672i Rocha, Caroline Oliveira da
Influência de campo magnético alternado em celulasas
imobilizadas em nanopartículas magnéticas: aplicação na
hidrólise de bagaço de cana / Caroline Oliveira da Rocha. –
Araraquara : [s.n.], 2021
131 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques
Coorientador: Ariela Veloso de Paula

1. Biomagnetismo. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Biocatálise.
4. Bagaço de cana. 5. Campos magnéticos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Influência de campo magnético alternado em celulases imobilizadas em nanopartículas magnéticas: aplicação na hidrólise de bagaço de cana

AUTORA: CAROLINE OLIVEIRA DA ROCHA

ORIENTADOR: RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES

COORDINADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ARNALDO SARTI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. LUCIANO AVALONE BUENO (Participação Virtual)
Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas (CECS) / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André



Profa. Dra. SANDRA HELENA PULCINELLI (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 25 de maio de 2021

DADOS CURRICULARES

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Físico-Química
Rua Professor Francisco Degni, nº 55, Quitandinha, Araraquara, 14800-900, SP –
Brasil.

Telefone: (11) 97169-2303 E-mail: carolnine@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2020: Licenciatura em Química. Universidade de Franca, Unifran, São Paulo, Brasil.

2014 – 2016: Mestre em Química. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de biocatalisadores.

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2009 – 2013: Graduação em Bacharelado em Química. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Desenvolvimento de método analítico para determinação de nitrito em alimentos curados e vegetais por espectrofotometria UV-VIS e Tratamento digital de imagens.

Orientador: Arnaldo Alves Cardoso

Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

1. AMANTEA, B. E.; PIAZZA, R. D.; CHACON, J. R. V.; SANTOS, C. C.; COSTA, T. P.; ROCHA, C. O.; BRANDT, J. V.; GODOI, D. R. M.; JAFELICCI, M.; MARQUES, R. F. C. Esterification influence in thermosensitive behavior of copolymers PNIPAm-co-PAA and PNVCL-co-PAA in magnetic nanoparticles surface. COLLOIDS AND SURFACES A-PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, 2019.
2. LUCENA, GUILHERME NUNES; DOS SANTOS, CAIO CARVALHO; PINTO,

GABRIEL CARDOSO; DA ROCHA, CAROLINE OLIVEIRA; BRANDT, JOÃO VICTOR; DE PAULA, ARIELA VELOSO; JÚNIOR, MIGUEL JAFELICCI; MARQUES, RODRIGO FERNANDO COSTA. MAGNETIC CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES (MCLEAs) APPLIED TO BIOMASS CONVERSION. JOURNAL OF SOLID STATE CHEMISTRY, v. 270, p. 58-70, 2018.

3. DA ROCHA, CAROLINE O.; PETRUCI, JOÃO FLÁVIO S.; CARDOSO, ARNALDO A. Methylene Violet 3 RAX Dye as a New Reagent for the Determination of Nitrite in Cured Meats and Vegetables. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 28, p. 1528-1533, 2017.

4. RODRIGUEZ, ANSELMO; ROCHA, CAROLINE; PIAZZA, RODOLFO; SANTOS, CAIO; MORALES, MARCO; FARIA, FERNANDO; IQBAL, ZUBAIR; BARBOSA, LUCAS; CHAVES, YURI; MARIUBA, LUIS; JAFELICCI JR, MIGUEL; MARQUES, RODRIGO. Synthesis, characterization and applications of maghemite beads functionalized with rabbit antibodies. NANOTECHNOLOGY (BRISTOL. ONLINE), v.29, p. 365701 2018.

Trabalhos que foram submetidos em jornais:

1. ROCHA, C. O.; PIAZZA, D. R.; SANTOS, C. C.; LUCENA, G. N.; AMANTEA, B. E.; RODRIGUEZ, A. F. R.; MORALES, M. A.; JR, M. J.; PAULA, A. V.; MARQUES, R. F. C. Improved stability of magnetic cross-linked lipase aggregates for olive oil transesterification. Enzyme and microbial technology, 2021.

2. ROCHA, C. O. RODRIGUEZ, A. F. R.; MORALES, M. A.; JR, M. J.; PAULA, A. V.; MARQUES, R. F. C. Influence of alternative magnetic field in immobilized cellulases onto magnetic nanoparticles: Application in sugar cane bagass hydrolysis. Enzyme and microbial technology, 2021.

Participação em eventos científicos:

1. ROCHA, C. O.; MARQUES, R. F. C.; PAULA, A. V.; JAFELICCI JUNIOR, M.; LUCENA, G. N. Influence of an alternate magnetic field on the cellulase activity immobilized in magnetic nanoparticles. In: 41º RASBQ, 2018, Foz do Iguaçu. Revista

de Anais da SBQ, 2018.

2. ARAUJO, Y. F. T.; MARUYAMA, J. A. ROCHA, C. O. MARCHETTI, C. N. CEBIM, M. A. NINJAREDOX: DESENVOLVIMENTO DE UM JOGO PARA CELULAR. In: Anais do 3º Encontro Nacional de Jogos e Atividades Lúdicas no Ensino de Química, Física e Biologia (Jalequim - Level III). Anais...Foz do Iguaçu (PR) UNILA, 2020. Disponível em: <<https://www.even3.com.br/anais/jalequim2018/109011-NINJAREDOX--DESENVOLVIMENTO-DE-UM-JOGO-PARA-CELULAR>>. Acesso em: 10/03/2020 22:40
3. SMOCIL, L. M.; LUCENA, G. N.; ROCHA, C. O.; MARQUES, R. F. C. Imobilização de lipase pancreática suína em nanopartículas magnética de óxido de ferro. In: 30º Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2018, Araraquara. XXIX Congresso de iniciação científica da UNESP, 2018.
4. KIKUCHI, A. M.; ROCHA, C. O.; MARQUES, R. F. C.; JAFELICCI JR, MIGUEL. Modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com lactase: Biocatalisadores para indústria de laticínios. In: XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2018, Araraquara. XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2018.
5. ROCHA, C. O.; JAFELICCI JUNIOR, M.; PAULA, A. V.; ASSIS, D. R.; MARQUES, R. F. C. Evaluation of magnetic nanoparticles as support for immobilization of porcine pancreatic lipase. In: Fifth international conference on multifunctional, hybrid and nanomaterials, 2017, Lisboa. Resumo dos anais HYMA, 2017.
6. COSTA, T. P.; JAFELICCI JUNIOR, M.; PIAZZA, R. D.; ROCHA, C. O.; MARQUES, R. F. C. Porous hidroxiapatite scaffolds surface modified with pluronics for alendronate delivery. In: Fifth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2017, Lisboa. Resumo HYMMA, 2017.
7. KIKUCHI, A. M.; ROCHA, C. O.; JAFELICCI JUNIOR, M.; MARQUES, R. F. C. Modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com lactase:

Biocatalisadores para a indústria de laticínios. In: XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2017, Araraquara. XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017.

8. MARUYAMA, J. A.; ROCHA, C. O.; NASCIMENTO, E. R. F.; MARQUES, R. F. C. A importância da experimentação nas exposições permanentes de um museu de ciências. In: XVII Encontro nacional de ensino em química, 2016, Florianópolis. Resumo de Anais ENEQ, 2016.

9. ROCHA, C. O.; JAFELICCI JUNIOR, M.; PAULA, A. V.; MARQUES, R. F. C. Nanopartículas Magnéticas como suporte para imobilização de lipases. In: 39ª Reunião anual sociedade brasileira de química, 2016, goiânia. Livros de resumo SBQ, 2016.

10. ROCHA, C. O.; PAULA, A. V.; JAFELICCI JUNIOR, M.; MARQUES, R. F. C. Evaluation of magnetic nanoparticles as support for immobilization of porcine pancreatic lipase. In: XV Brazil MRS Meeting, 2016, Campinas. Resumos XV Brazil MRS Meeting, 2016.

Outros:

- Professora PEB II (Física e Química) no estado de São Paulo (Ibitinga). 2020 - Em andamento.
- Licenciatura em Química pela Unifran. 03/2020,
- Licencianda em Química no Instituto Federal de São Paulo (IFSP-Matão). 06/2017 –12/2018.
- Representante de pós-graduação da congregação do Instituto de Química - Unesp de Araraquara. 01/10/2017 – 01/10/2018.
- Estágio na escola Pueri Domus Araraquara. Lecionava aulas de matemática e adaptação de material para aluno especial. 19/02/2018 – 29/06/2018.
- Supervisão científica do aluno de iniciação científica Leonardo Estevam Matulovic Smocil. 01/04/2017 a 01/08/2018 (bolsa PIBIC).
- Supervisão científica da aluna de iniciação científica Aline Mayumi Kikuchi.

01/08/2016 a 01/08/2018 (bolsa PIBIC).

- Representante de pós-graduação da congregação do Instituto de Química - Unesp de Araraquara. 05/08/2016 a 17/11/2016.
- Estágio Docência na disciplina de Termodinâmica (2º semestre de 2016).

Dedico este trabalho a

José Antonio, Clarice e aos meus pais, Sebastião e Edna.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador por sempre me apoiar, nos momentos mais difíceis sempre me incentivou e por ter esperança no futuro de seus alunos e na academia, o otimismo no meio acadêmico é raro e esse é um dom maravilhoso. Obrigado Jata, sem você não seguiria essa carreira acadêmica, sem seu apoio incondicional não estaria finalizando este trabalho. Se eu fosse pedir alguma coisa era ter convivido mais na rotina do laboratório, ser um professor que faz múltiplas tarefas e tem visão de futuro não é fácil e nós alunos sentimos a sua ausência. Não poderia deixar de mencionar aqui que graças ao Jata, como carinhosamente todos o chamam, não conheceria, o Japa. O impacto do meu orientador na minha vida foi imenso e só tenho a agradecer pela sorte que eu tive.

Agradeço imensamente ao grupo de laboratório de materiais magnéticos e colóides (LaMMC), ao Prof. Miguel pelo exemplo de ser humano ético. Aos colegas, Pelé, Caio, Douglas, Leonardo, Gibbs, Gabriel, Leonardo e Aline pelo apoio no trabalho, pelas conversas filosóficas e pelos desabafos, que foram muitos. Meu muito obrigada, vocês são especiais e guardarei muito carinho sempre. Aos colegas de outros laboratórios que realizei análises por sempre estarem dispostos a colaborar, demonstrando que dentro da academia sem colaboração de todos não conseguiríamos realizar alguma pesquisa. Aos professores Fernando Massarin e Kelly Dússan que contribuíram para a finalização da tese.

Agradeço a Prof.^a Ariela, queridíssima demais, sempre me apoiou muito, pelos puxões de orelha nos momentos que eu precisava ouvir, por simplesmente me ouvir nos momentos difíceis. Ela foi fundamental na minha formação e na minha vida. Um exemplo a ser seguido de dedicação e carinho a profissão. A Ariela é maravilhosa, forte, determinada e poderosa, um exemplo de mulher que seguirei sempre.

Agradeço ao grupo do IPBEN, ao professor Arnaldo Sarti pela colaboração na divisão do laboratório. As colegas, Bruna e Brenda, pelos momentos de conversas maravilhosas sobre o nosso mundo feminino, pela iniciativa e tentativa de entrar no mundo dos negócios, agora precisamos concretizar a ideia.

Agradeço ao grupo de eletrocatalise, ao professor Denis e a Tamires, que recentemente defendeu lindamente sua dissertação de mestrado, pelo apoio e pela representatividade feminina na físico-química.

Agradeço ao meu marido, o Japa, eu tenho muita sorte de tê-lo como companheiro de vida, não dá nem para explicar as infinitas vezes que ele me apoiou, me aconselhou e me ergueu em momentos de desespero. É por ele que estou aqui escrevendo, foi o amor que ele sente por mim e eu sinto por ele que me reergueu e posso concretizar esse sonho de ser doutora. Ele me faz imensamente feliz, mesmo eu sendo uma pessoa que reclama e que está insatisfeita com o mundo como ele é. Obrigada por tornar essa jornada na terra muito melhor. Ao seu lado eu consigo viver de verdade.

Agradeço aos meus pais, Maria Edna e Sebastião que sempre me apoiaram em tudo, mesmo a distância, nesse momento tão complicado de pandemia. Sinto uma saudade imensa por não conseguir vê-los devido ao distanciamento social. Eu tenho muita sorte de tê-los na minha vida e que continue assim por muito tempo, quero cuidá-los e estar sempre pertinho. Ao meu irmão, Glauber, que mesmo a distância, temos um laço de irmandade e cuidado um com o outro.

Agradeço imensamente, a Clarice, pelo acolhimento e amor, por ser uma segunda mãe para mim, que cuida e sempre faz uma comidinha gostosa com muito

amor e carinho. Obrigada pela convivência, pelo amor e todo o cuidado que oferece, não tenho palavras para agradecer a sua dedicação e fé.

Agradeço aos amigos, Camila e Daniel, que são um casal incrível que ajudaram em muitos momentos de conversa e descontração, aos passeios como guias incríveis com uma história interessante para contar e pelo exemplo de trabalho e dedicação à carreira e as pessoas que convivem.

Aos meus cachorros, Marie e Jack, por me animarem e serem companheiros inseparáveis, sempre ao meu lado quando trabalho no home office e esperam com todo entusiasmo quando volto do trabalho presencial. São eles que trazem muita alegria no meu dia a dia.

Agora eu reservei um espaço para mim aqui no final desse agradecimento, gostaria de lembrar a mim mesma, o quanto eu fui forte e guerreira por estar concretizando essa tese. Graças a persistência e teimosia estou hoje aqui escrevendo essas palavras. Graças a minha luta acompanhada por pessoas incríveis que consigo terminar mais uma etapa da minha vida e ainda quero alcançar novos voos e sonhos. Porque sempre fui sonhadora e busco mais.

“Não preciso de um professor de ética para me dizer que não posso, como orientador de dissertação de mestrado ou de tese de doutoramento, surpreender o pós-graduando com críticas duras a seu trabalho porque um dos examinadores foi severo em sua arguição. Se isso ocorre e eu concordo com as críticas feito pelo professor, não há outro caminho que solidarizar-me de público com o orientando, dividindo com ele a responsabilidade do equívoco ou do erro criticado. Não preciso de um professor de Ética para me dizer isto. Meu bom-senso me diz.”

*Pedagogia da Autonomia,
Paulo Freire.*

RESUMO

A biomassa lignocelulósica é um material heterogêneo composto por lignina, hemicelulose e celulose. A capacidade da celulase de converter os componentes da celulose em açúcares fermentáveis para a produção de etanol e moléculas de valor agregado, dependem do acesso do biocatalisador ao substrato, protegido pela lignina. Neste trabalho, o complexo de celulases comercial CELLIC-CTEC2 foi imobilizado em nanopartículas magnéticas e avaliada a influência de campo magnético alternado na difusão de massa e conversão de hemicelulose e celulose durante a hidrólise de bagaço de cana pré-tratado. As amostras de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4), nanopartículas magnéticas funcionalizadas (Fe_3O_4 -APTS) e o complexo enzimático CELLIC-CTEC 2 imobilizado em nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4 -CEL) apresentaram tamanho de cristalito de 10 nm, respectivamente. Os diâmetros hidrodinâmicos foram avaliados por espalhamento de luz, obtendo valores de índice de polidispersão maiores que 0,1, indicando que Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS e Fe_3O_4 -CEL são constituídas por nanopartículas com alta dispersão de tamanhos. A adição de APTS ao suporte leva a uma melhor organização na distribuição de tamanhos. A amostra de Fe_3O_4 -CEL apresentou diâmetro hidrodinâmico de 1335 nm, devido a ligação de celulases na superfície de nanopartículas. A curva de titulação das amostras de Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS e Fe_3O_4 -CEL apresentaram ponto isoelétrico (PI) em pH 5,84, 6,38 e 2,61 respectivamente. A diminuição de PI para 2,61 ocorreu devido a presença do complexo enzimático que possui grupos funcionais ácidos e básicos. Pela análise térmica (TG-DTG) houve aumento na estabilidade térmica da enzima, após o processo de imobilização. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos para confirmar as modificações de superfície. As amostras de Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS e Fe_3O_4 -CEL apresentaram bandas em 580 cm^{-1} e 630 cm^{-1} , relacionadas à vibração Fe-O de magnetita e maghemita, respectivamente. A banda do espectro de Fe_3O_4 -APTS em 1162 cm^{-1} está relacionada com a vibração de grupos amina. No espectro de Fe_3O_4 -CEL foram observadas bandas de deformação de grupos amida do complexo enzimático de celulases. Nos resultados do cromatograma verificou-se a presença de ácido glicurônico. As reações de hidrólise de bagaço com a utilização de Fe_3O_4 -CEL, podem operar em meio alcalino sendo possível utilizar pré-tratamento básico no processo de deslignificação com menos etapas de lavagem. A enzima imobilizada apresentou temperatura ótima em torno de 60°C , o processo pode ter sua temperatura diminuída na presença de biocatalisador magnético o que resultaria em grande economia de energia no processo de hidrólise. Os valores de conversão de hidrólise CEL e Fe_3O_4 -CEL foram avaliados e apresentaram valores muito baixos, a conversão de hemicelulose para o derivado imobilizado apresentou valor de 18,46 % após 48 horas de hidrólise. Após 8 ciclos catalíticos o biocatalisador magnético apresentou 30 % da atividade inicial. A conversão de hemicelulose e celulose foi avaliada sob influência de AMF na frequência de 112 Hz e campo magnético de 25 mT. As amostras livre e imobilizada apresentaram baixa conversão de hemicelulose e celulose devido ao tempo de reação de hidrólise baixo.

Palavras-chave: Nanopartículas Magnéticas. Biocatálise. Imobilização de celulases. Separação Magnética.

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is a heterogeneous material composed of lignin, hemicellulose and cellulose. The ability of cellulase to convert cellulose components into fermentable sugars to produce ethanol and value-added molecules depends on the access of the biocatalyst to the substrate, protected by lignin. In this work, the commercial cellulases complex CELLIC-CTEC2 was immobilized on magnetic nanoparticles and the influence of alternating magnetic field on mass diffusion and conversion of hemicellulose and cellulose during hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse was evaluated. Samples of magnetic nanoparticles (Fe_3O_4), functionalized magnetic nanoparticles (Fe_3O_4 -APTS) and the enzymatic complex CELLIC-CTEC 2 immobilized on magnetic nanoparticles (Fe_3O_4 -CEL) had a crystallite size of 10 nm, respectively. The hydrodynamic diameters were evaluated by light scattering, obtaining polydispersion index values greater than 0.1, indicating that Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS and Fe_3O_4 -CEL are constituted by nanoparticles with high size dispersion. Adding APTS to support leads to better organization in size distribution. The Fe_3O_4 -CEL sample had a hydrodynamic diameter of 1335 nm, due to the binding of cellulases on the surface of nanoparticles. The titration curve of the Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS and Fe_3O_4 -CEL samples showed isoelectric point (PI) at pH 5.84, 6.38 and 2.61 respectively. The decrease in PI to 2.61 was due to the presence of the enzyme complex that has acidic and basic functional groups. By thermal analysis (TG-DTG) there was an increase in the thermal stability of the enzyme after the immobilization process. Infrared absorption spectra were obtained to confirm the surface modifications. The Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS and Fe_3O_4 -CEL samples showed bands at 580 cm^{-1} and 630 cm^{-1} , related to the Fe-O vibration of magnetite and maghemite, respectively. The Fe_3O_4 -APTS spectrum band at 1162 cm^{-1} is related to the vibration of amine groups. In the Fe_3O_4 -CEL spectrum, bands of deformation of amide groups of the cellulase enzyme complex were observed. The chromatogram results showed the presence of glucuronic acid. The bagasse hydrolysis reactions with the use of Fe_3O_4 -CEL can operate in an alkaline medium and it is possible to use basic pre-treatment in the delignification process with fewer washing steps. The immobilized enzyme had an optimal temperature around 60°C , the process can have its temperature decreased in the presence of magnetic biocatalyst, which would result in great energy savings in the hydrolysis process. The CEL and Fe_3O_4 -CEL hydrolysis conversion values were evaluated and showed very low values, the conversion of hemicellulose to the immobilized derivative showed a value of 18.46% after 48 hours of hydrolysis. After 8 catalytic cycles the magnetic biocatalyst showed 30% of the initial activity. The conversion of hemicellulose and cellulose was evaluated under the influence of AMF at a frequency of 112 Hz and a magnetic field of 25 mT. Free and immobilized samples showed low conversion of hemicellulose and cellulose due to the low hydrolysis reaction time.

Keywords: Magnetic nanoparticles. Biocatalysis. Immobilization of cellulases. Magnetic separation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - 1ª Etapa do trabalho: Fluxograma da síntese e caracterização da Fe ₃ O ₄ -APTS.....	27
Figura 1.2 - 2ª Etapa do trabalho: Fluxograma de imobilização de celulase em nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄ -CEL); determinação da atividade hidrolítica do derivado imobilizado utilizando as metodologias da literatura (GHOSE et al.,1987). 28	28
Figura 1.3 - 3ª Etapa do trabalho: Fluxograma da utilização do bagaço-de-cana de açúcar em reator com campo magnético alternado e dosagem da atividade hidrolítica do derivado imobilizado (Fe ₃ O ₄ -CEL).....	28
Figura 2.1- Composição da parede celular de uma planta.....	32
Figura 2.2 - Estrutura da celulose.	33
Figura 2.3 - Polimorfos celulósicos naturais e sintéticos observadas de cima para baixo. As celulosas I α e I β são polimorfos de ocorrência natural exibindo apenas ligações de hidrogênio dentro das camadas. Celulosas II e III, o resultado do pré-tratamento químico da celulose I, modificando o arranjo de empilhamento das cadeias, com ligações de hidrogênio entre as folhas da estrutura.	35
Figura 2.4 - Simulação computacional de microfibrilas de celulose I β com torções, de aproximadamente, 1,5° por unidade de celobiose quando solvatada em água e quando as cadeias terminais não são fixadas.....	36
Figura 2.5 - (A) Hexoses e pentoses típicas encontradas na hemicelulose; (B) Exemplo de estrutura de hemicelulose.	37
Figura 2.6 - Estrutura polimérica macromolecular da lignina	40
Figura 2.7- Pectina formada por ligações covalentes α -1,4 em unidades de ácido D-galacturônico (GalA).....	41
Figura 2.8 – Processos biotecnológico para obtenção de etanol.	43
Figura 2.9 – Classificação das diferentes metodologias de pré-tratamento de biomassa.....	45
Figura 2.10 - Hidrólise enzimática de celulose.....	49
Figura 2.11 - Representação esquemática de mecanismo de retenção (a) e de inversão (b).	51
Figura 2.12 - Visão geral de um processo convencional de conversão bioquímica para produzir combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica. As celulasas podem ser usadas para converter a porção de celulose da biomassa não	

alimentar, como resíduos agrícolas e culturas energéticas, em açúcares fermentáveis para posterior conversão em combustíveis renováveis e produtos químicos.....	55
Figura 2.13 - Métodos de imobilização enzimática.....	59
Figura 2.14 - Ilustração esquemática de (CLEAs) e MCLEAs desenvolvido na presença de reticulador e nanopartículas de maghemita (Fe_2O_3).....	64
Figura 2.15 – Representação esquemática de imobilização enzimática como nanomateriais magnéticos e sua aplicação na hidrólise de biomassa lignocelulósica.	65
Figura 3.1 – Superfície de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS. .	72
Figura 3.2 - Amostra de Fe_3O_4 -APTS.....	74
Figura 3.3 - Difratoograma de Raios X comparando o padrão magnetita com as amostras Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS e Fe_3O_4 -CEL.	75
Figura 3.4 - Tamanho hidrodinâmico das amostras por DLS.	76
Figura 3.5 - Potencial zeta das amostras Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS e Fe_3O_4 -CEL.....	78
Figura 3.6 – Representação da formação de cargas de superfície na magnetita.	79
Figura 3.7 – Microscopia eletrônica de varredura das amostras a 100 nm: a) CEL, b) Fe_3O_4 , c) Fe_3O_4 -APTS e d) Fe_3O_4 -CEL.....	80
Figura 3.8 – Análise termogravimétrica TG-DTG. a) Fe_3O_4 -CEL, b) Fe_3O_4 -APTS, c) CEL livre e d) Variação de massa nas amostras Fe_3O_4 -APTS, Fe_3O_4 -CEL e CEL livre.	81
Figura 3.9 – Espectros na região do Infravermelho das amostras Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS, Fe_3O_4 -CEL.	82
Figura 4.1 – Efeito do pH na atividade enzimática (FPU).....	93
Figura 4.2 – Efeito da temperatura na atividade enzimática (FPU).	95
Figura 4.3 – Efeito do pH na atividade enzimática (endoglicanases).	96
Figura 4.4 – Efeito da temperatura na atividade enzimática (endoglicanases).	97
Figura 4.5 – Reutilização de Fe_3O_4 -CEL para endoglicanases.	98
Figura 4.6- Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes a e b para as amostras de Fe_3O_4 -CEL ($f = 112 \text{ Hz}$, 25 mTfield (250 Oe)). a) substrato: carboximetilcelulose, $t = 25 \text{ min}$. b) substrato: cana de açúcar, $t = 60 \text{ min}$	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar - valores médios internacionais.	30
Tabela 2.2 – Microrganismos empregados na produção de celulase.	43
Tabela 2.3 – Principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e sua consequência (marcadas de 1-5) na hidrólise e na modelagem do processo.	51
Tabela 2.4 – Comparação de alguns modelos cinéticos de hidrólise enzimática da celulase.	52
Tabela 2.5 – Características ou propriedades desejáveis de celulases para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática de celulose.	57
Tabela 2.6 – Exemplos de ligações covalentes no processo de imobilização enzimática.	61
Tabela 2.7- Nanomateriais utilizados na imobilização de várias enzimas e rendimento de imobilização e catalítica após o reciclo.	66
Tabela 3.1 - Diâmetro Hidrodinâmico das amostras Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$	76
Tabela 4.1 - Dosagem de proteína antes e após a imobilização.	92
Tabela 4.2 - Tempo de retenção (min) dos padrões de ácido glicurônico, glicose, xilose e arabinose.	99
Tabela 4.3 – Conversão de hemicelulose e celulose utilizando celulose livre.	100
Tabela 4.4 – Conversão de hemicelulose e celulose utilizando biocatalisador magnético.	100
Tabela 4.5 – Conversão de hemicelulose e celulose utilizando biocatalisador magnético por números de ciclos, cada ciclo tem duração de 24 h.	101
Tabela 4.6– Conversão de hemicelulose e celulose utilizando biocatalisador magnético e substrato CMC sob AMF.	102
Tabela 4.7– Taxa de absorção específica (SAR) dos materiais sintetizados, calculadas a partir do ajuste das curvas temperatura x tempo com campo magnético 25 mT e frequência $f = 420 \text{ kHz}$	104
Tabela 4.8– Conversão de hemicelulose e celulose de celulignina utilizando biocatalisador magnético sob AMF.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GEE Gases do Efeito Estufa

UNCTAD Conferência das Nações Unidas para o Comércio e Desenvolvimento

CLEA Cross-linked enzyme aggregates (Tradução para o português – Agregado de enzimas por ligações cruzadas)

MCLEA Magnetic cross-linked enzyme Aggregates (Tradução para o português – Agregado de enzimas e nanopartículas magnéticas por ligações cruzadas)

AMF Alternating magnetic field (Tradução para o português - Campo magnético alternado)

CEL Celulase

PAM Produção Agrícola Municipal

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MM Michaelis-Menten

APTS 3-Aminopropiltriethoxysilano

RMN Ressonância magnética nuclear

2G Segunda Geração

AFEX Explosão a vapor de fibra de amônia

EG, E1 Endoglicanase

CBH, E2 Celobiohidrolase

BG, E3 β -glicosidase

DP Grau de polimerização

E12 Combinação de E1 e E2

E123 Combinação entre E1, E2 e E3

QSS Estado quase estacionário

CLEC Cross-linked enzyme crystal (Tradução para o português – Agregados de cristais de enzimas por ligação cruzada)

FWHM Full width at half maximum (Tradução para o português – Largura à meia altura)

SAR Specific absorption rate (Tradução para o português – Taxa de absorção específica)

PDI Polydispersity index (Tradução para o português – índice de polidispersividade)

LISTA DE SÍMBOLOS

Fe_3O_4	Nanopartículas de Óxido de Ferro (Magnetita)
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$	Celulase imobilizada em nanopartículas magnéticas
CEL	Celulase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 <i>Objetivo Geral</i>	27
1.2 <i>Objetivos específicos</i>	27
1.3 <i>Organização do trabalho</i>	29
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	30
2.1 <i>Cana-de-açúcar</i>	30
2.2 <i>Biomassa recalcitrante</i>	31
2.2.1 Celulose	32
2.2.2 Hemicelulose	36
2.2.3 Lignina.....	39
2.2.4 Pectina	40
2.3 <i>Processo para produção de etanol a partir de materiais lignocelulósico</i>	41
2.3.1 Produção de Enzimas	42
2.3.2 Pré-tratamento químico de biomassa	42
2.3.2 Hidrólise enzimática	47
2.3.3 Etanol de segunda geração	53
2.4 <i>Biocatálise</i>	54
2.4.1 Estratégias para aumentar a estabilidade enzimática da celulase	56
2.4.2 Imobilização enzimática	57
2.5 <i>MCLEAs</i>	63
3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES IMOBILIZADAS em MCLEAs	68
3.1 <i>Introdução</i>	68
3.2. <i>Materiais</i>	69
3.2.1 Reagentes	69
3.2.2 Técnicas empregadas de caracterização.....	69
3.3 <i>Procedimento experimental</i>	72
3.3.1 Síntese das nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄) funcionalizadas com APTS.....	72
3.3.2 Imobilização de celulase em Fe ₃ O ₄ -APTS	73
3.4 <i>Resultados e discussão</i>	73
3.4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas magnéticas e biocatalisador magnético.	73
3.5 <i>Conclusão</i>	82

4. INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO ALTERNADO EM CELULASES IMOBILIZADAS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA	84
<i>4.1 Introdução</i>	<i>84</i>
<i>4.2. Materiais</i>	<i>86</i>
4.2.1 Reagentes	86
4.2.2 Técnicas empregadas de caracterização.....	87
<i>4.3 Procedimento experimental</i>	<i>88</i>
4.3.1 Dosagem de proteína – método de Bradford	88
4.3.2 Atividade da celulase livre e imobilizada em Fe ₃ O ₄ -APTS.....	88
4.3.4 Hidrólise de CMC e bagaço de cana.....	90
4.3.4 Hidrólise de CMC em AMF.....	92
<i>4.4 Resultados e discussão</i>	<i>92</i>
4.4.1. Rendimento de imobilização enzimática	92
4.4.2. Atividade global FPU de CEL Livre e Fe ₃ O ₄ -CEL	93
4.4.3 Atividade hidrolítica de endoglicanases	95
4.4.4 Hidrólise do bagaço de cana.....	98
4.4.5 Hidrólise sob influência de campo magnético alternado (AMF)	101
<i>4.5 Conclusões</i>	<i>105</i>
CONCLUSÕES FINAIS	107
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
APÊNDICE I.....	124
ANEXO I.....	125

1. INTRODUÇÃO

O etanol de segunda geração (E2G), conhecido também como etanol celulósico, obtido da palha e do bagaço de cana-de-açúcar, é uma alternativa energética que em breve será economicamente viável se forem transpostas as atuais barreiras agrícolas, industriais e tecnológicos para a produção (RABELO, 2010). A tendência no Brasil é que o custo de produção do etanol celulósico empate com o de primeira geração, em 2025. A partir de 2030, existe uma previsão para que o etanol E2G seja mais barato do que o de primeira (ALISSON *et al.*, 2018).

O mercado brasileiro defronta-se com três realidades para o aumento do consumo de etanol: aumento interno do consumo de álcool hidratado pelo sucesso da introdução da alternativa *flex fuel* em veículos leves; expansão das exportações brasileiras de álcool, como forma de enfrentar o aquecimento global e tendo em vista os altos preços do petróleo e pela produção de biodiesel utilizando etanol na transesterificação de biodiesel (RABELO, 2010).

Outro fator que influencia no interesse para a produção de E2G é o corte de emissões domésticas de gases do efeito estufa (GEE). Segundo o relatório lançado pela Conferência das Nações Unidas para o Comércio e Desenvolvimento (UNCTAD), o Brasil terá de cortar 37% das emissões de GEE até 2025 - com base nos níveis de 2005. A participação do etanol e demais biomassas derivadas da cana-de-açúcar na matriz energética deverá saltar dos atuais 16% para 18%, o que exigirá a produção de 50 bilhões de litros do combustível renovável até 2025.

Embora o consumo de etanol se apresente como alternativa na diminuição do efeito estufa no planeta, existem muitas críticas em relação a expansão no cultivo de cana para gerenciar as demandas competitivas de produção de alimentos e preservação ambiental, principalmente, na região amazônica.

As soluções propostas para garantir a produção sustentável do etanol envolvem integrar o desenvolvimento da energia de biomassa com as práticas agrícolas e florestais sustentáveis; melhorar a produtividade de plantios com consideração ao solo, à água e ao uso de nutrientes; e desenvolver tecnologias de produção avançada e conversão (GOLDEMBERG, 2008).

A utilização de biomassa para a produção de etanol envolve duas etapas

principais: a hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares e a fermentação destes em etanol (RABELO, 2010).

O uso do bagaço como matéria-prima apresenta uma série de vantagens: está disponível em grandes quantidades, já vem processado das moendas; tem custo mínimo; está pronto no local evitando o aumento de custo devido ao transporte e integração da usina com o processo de primeira geração (MARINA *et al.*, 2015). No entanto, a biomassa lignocelulósica apresenta estrutura heterogênea, complexa e compacta, sendo necessário submeter à pré-tratamentos antes da hidrólise para a produção do etanol. Este processo é responsável pela remoção da lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, de maneira a tornar a celulose disponível para hidrólise (RABELO, 2010).

Existem muitos métodos de pré-tratamentos: os métodos físicos que envolvem trituração e moagem, extrusão, utilização de micro-ondas, pré-tratamento por congelamento e cavitação hidrodinâmica (KUMAR; SHARMA, 2017), já os métodos químicos englobam a utilização de ácidos e bases, solventes orgânicos, processo de ozonólise e líquido iônico (ZHENG *et al.*, 2017). Além disso, existe o pré-tratamento físico-químico que inclui explosão a vapor, água líquida quente, explosão de fibra por amônia, percolação de reciclagem de amônia, oxidação úmida e explosão por CO₂ (KIM, 2018); pré-tratamento biológico com a utilização de microrganismos e seus produtos e o uso de celulasas (VATS *et al.*, 2013; AKHTAR *et al.*, 2015; PAYE *et al.*, 2016). A combinação desses métodos de pré-tratamento pode ser utilizada na quebra da biomassa lignocelulósica em carboidratos (BRODEUR *et al.*, 2011; MOOD *et al.*, 2013; MULAT *et al.*, 2018).

No processo de hidrólise, as rotas mais utilizadas são por via química ou enzimática. No processo químico, os ácidos são amplamente usados gerando vários subprodutos que inibem a fermentação, devido a degradação parcial da glicose, da hemicelulose e da lignina. Esses subprodutos incluem furfural, hidroximetil furfural e os produtos da desidratação de pentoses e hexoses (MITTAL *et al.*, 2017; PERNA *et al.*, 2018). Além disso, exigem materiais caros para resistirem à corrosão, altas temperaturas e altas pressões. Por este motivo, a sacarificação enzimática tem sido amplamente estudada no mundo, uma vez que proporciona maiores rendimentos e é realizada a pressão ambiente e temperaturas moderadas, sem a formação de

subprodutos indesejáveis (RAI *et al.*, 2018).

Embora, a aplicação de biocatalisadores promova uma abordagem favorável ao meio ambiente, devido a especificidade enzimática e pelo fato de não gerar inibidores tóxicos, a sacarificação enzimática possui um grande obstáculo, os altos custos operacionais. Esse alto custo atribui-se à baixa estabilidade e a baixa reutilização de celulase (CHEN *et al.*, 2017).

Para realizar a hidrólise de biomassa por via enzimática com preços mais acessíveis torna-se necessário reduzir os custos de produção, desenvolvendo métodos de imobilização que permitam a reutilização de celulase por vários ciclos catalíticos, sem perda total da atividade e que promova a estabilidade enzimática contra-ataques químicos e ambientais (CHAPMAN *et al.*, 2018)

O método de imobilização selecionado e o tipo de suporte influenciam na atividade e reutilização da enzima em processos biocatalíticos. Na literatura há muitas maneiras que possibilitam a imobilização de enzimas, com o objetivo de prolongar a atividade enzimática em diversos ciclos, principalmente em processos industriais. Alguns métodos de imobilização incluem ligação covalente, como CLEAs *Cross-linked enzyme aggregates* (Agregado de enzimas por ligações cruzadas), MCLEAs *Magnetic cross-linked enzyme Aggregates* (Agregado de enzimas e nanopartículas magnéticas por ligações cruzadas), adsorção física, encapsulação, e ligação por afinidade química (SIGURDARDÓTTIR *et al.*, 2018).

Considerando os recentes desenvolvimentos em nanotecnologia, uma grande variedade de nanomateriais podem ser usados como suporte para a imobilização de enzimas. A imobilização de enzimas em materiais em escala nanométrica é uma abordagem promissora, que aumenta a eficácia catalítica da enzima (ZDARTA *et al.*, 2018; RAMAKRISHNA *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2018). Enzimas imobilizadas em nanopartículas são conhecidas como "nanobiocatalisador" e o seu desenvolvimento de nanobiocatalisadores é um exemplo de inovação nas áreas de nanotecnologia e de biotecnologia (BUDARIN *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2015; MISSON *et al.*, 2015).

A formação de nanobiocatalisadores inclui a conjugação de enzimas em vários nanomateriais, usando moléculas de reticulação, que favorecem a cinética química e a seletividade para substratos (HUSAIN *et al.*, 2011; INGLE *et al.*, 2017). A

imobilização de enzimas usando moléculas de reticulação fornece um espaçador, que minimiza o impedimento estérico entre a enzima e os suportes sólidos, levando a um aumento na flexibilidade de enzima imobilizada (BASSO *et al.*, 2007).

Embora diferentes abordagens tenham sido relatadas para a imobilização de biocatalisadores, não há literatura aprofundada disponível sobre o envolvimento de locais ativos da enzima durante a imobilização em nanomateriais. A orientação do sítio ativo da enzima durante o processo de imobilização é aleatória e desempenha um papel importante na atividade resultante do biocatalisador imobilizado (LEE *et al.*, 2011).

Uma opção disponível de suporte é a utilização de nanomateriais, que possuem grande área de superfície, essa característica permite um aumento na carga enzimática e reduz a resistência à transferência de massa para o substrato (HUSSAIN *et al.*, 2011).

A síntese de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas ou nanobiocatalisadores magnéticos é uma excelente estratégia devido à facilidade na recuperação de celulase, sendo possível a reutilização do nanobiocatalisador no processo de hidrólise do bagaço de cana. Além disso, o reuso aumenta significativamente a vida útil do biocatalisador (INGLE *et al.*, 2017; RAI *et al.*, 2016).

Neste contexto, nanopartículas magnéticas, especificamente as nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4), além das vantagens citadas anteriormente, ainda sofrem influência de campo magnético externo. Como consequência da relaxação de Néel e Brown, as nanopartículas de Fe_3O_4 produzem calor sob campo magnético alternado – (AMF - *Alternating Magnetic Field*), um fenômeno conhecido como hipertermia magnética (TARTAJ *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2015). Este fenômeno é utilizado na aplicação de nanopartículas magnéticas em biomedicina, no tratamento de câncer e para o direcionamento do fármaco (*drug delivery*), em células cancerígenas (MAY; LI, 2013).

Alguns autores relatam a melhora na atividade das enzimas imobilizadas aplicando baixa frequência de AMF. A energia magnética é convertida em um movimento rotacional do sistema enzima-nanopartícula que aumenta a taxa de colisão com o substrato (ARMENIA *et al.*, 2019), ou desencadeia alterações conformacionais na estrutura tridimensional da enzima (KLYACHKO *et al.*, 2012). O uso de calor

gerado por nanopartículas magnéticas para regular a atividade enzimática também foi relatado na literatura, no entanto esse calor foi utilizado no intumescimento de polímeros termossensíveis ligados à superfície das nanopartículas (ZAKHARCHENKO *et al.*, 2018).

O efeito do calor gerado pelas altas frequências de AMF sobre as enzimas ligadas as nanopartículas magnéticas são pouco estudadas em MCLEAS. Suzuki *et al.* relataram recentemente a ativação específica da α -amilase imobilizadas em micropartículas ferromagnéticas aplicando AMF (SUZUKI *et al.*, 2015; SUZUKI *et al.*, 2016). No entanto, este efeito não foi relatado usando nanopartículas superparamagnéticas, nem foi estudado o efeito da orientação enzimática sobre a superfície de nanopartículas e as mudanças conformacionais causadas pela estratégia de conjugação. No caso de micropartículas ferromagnéticas, a aplicação de um campo magnético desencadeia agregação que não pode ser facilmente revertida, pois seria necessário aquecer as partículas acima da temperatura de Curie (858 K) (GUPTA; GUPTA, 2005). No caso de nanopartículas superparamagnéticas, as propriedades magnéticas não persistem quando o campo magnético externo é removido. Essa é uma vantagem importante pensando na reutilização do nanobiocatalisador.

O grande desafio para uma produção viável do etanol de segunda geração consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado, o que provavelmente possibilitará uma comercialização difundida do produto (RABELO, 2010). O reator magnético diminuiu as etapas do processo de produção de E2G, visando também, uma perfeita integração energética do processo, com o aproveitamento de todos os resíduos gerados.

Neste contexto, o presente trabalho avaliou a síntese de celulase imobilizada em nanopartículas magnéticas submetido a campo magnético alternado para a conversão de celulose em glicose, visando a obtenção de etanol de segunda geração. A associação das tecnologias de imobilização e utilização de AMF, proposta neste trabalho, é bastante promissora e inovadora que proporcionará a produção de etanol de segunda geração, em larga escala, com custos e tempo de operação reduzidos.

1.1 Objetivo Geral

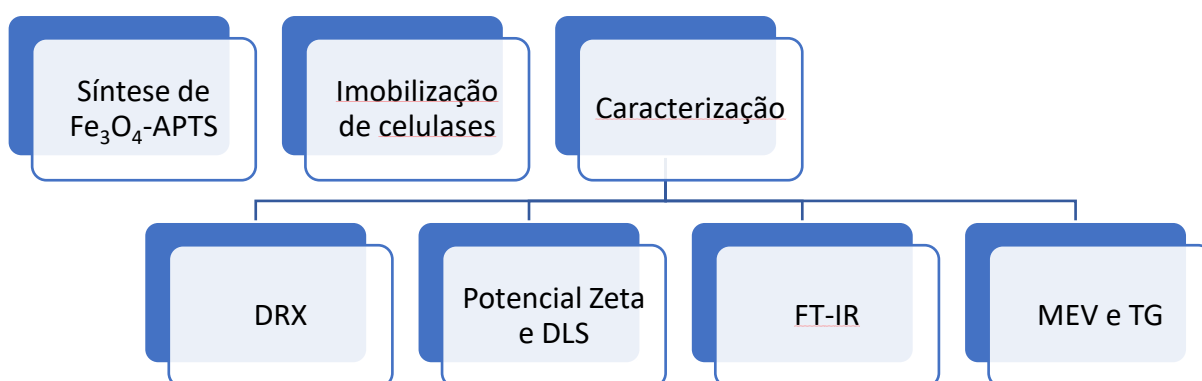
Avaliação da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a celulase comercial imobilizada em suportes magnéticos funcionalizada com 3-aminopropiltrietóxisilano (Fe_3O_4 -APTS) e em campo magnético alternado, com vista à aplicação na produção de etanol de segunda geração.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliação dos parâmetros de síntese do suporte magnético;
- Estudo da atividade enzimática do derivado imobilizado;
- Estabelecer as condições do reator com campo magnético alternado para realizar a hidrólise do bagaço de cana.
- Avaliar o rendimento de imobilização utilizando o suporte.

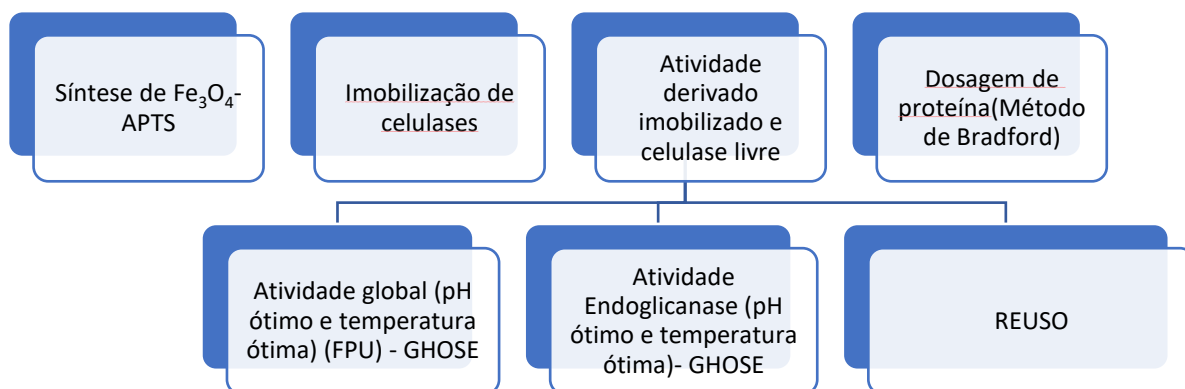
Nas figuras 1.1, 1.2 e 1.3 apresentam uma visão ampla do objetivo desta tese de doutorado em fluxogramas, dividindo o trabalho em três etapas de organização.

Figura 1.1 - 1ª Etapa do trabalho: Fluxograma da síntese e caracterização da Fe_3O_4 -APTS.



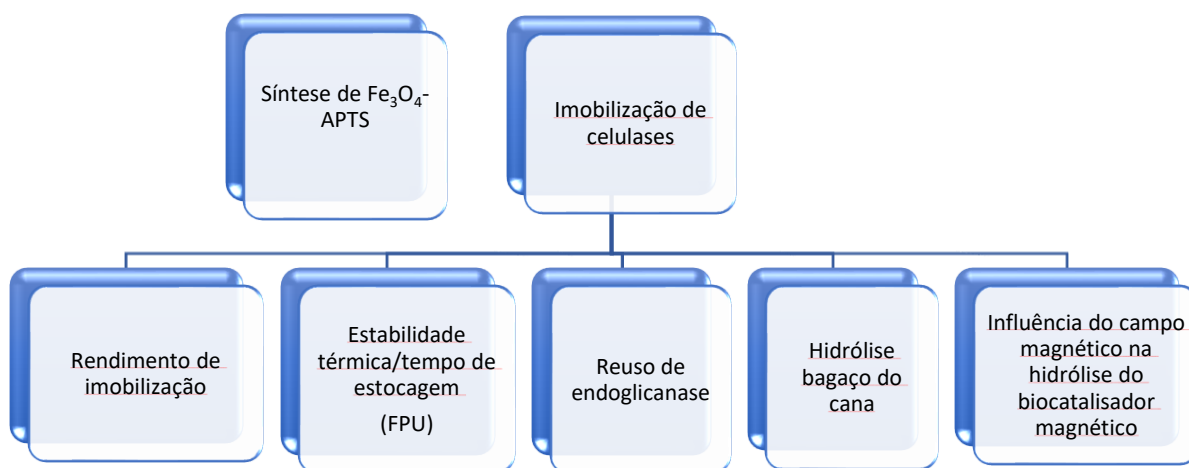
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 1.2 - 2ª Etapa do trabalho: Fluxograma de imobilização de celulase em nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4 -CEL); determinação da atividade hidrolítica do derivado imobilizado utilizando as metodologias da literatura (GHOSE et al.,1987).



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 1.3 - 3ª Etapa do trabalho: Fluxograma da utilização do bagaço-de-cana de açúcar em reator com campo magnético alternado e dosagem da atividade hidrolítica do derivado imobilizado (Fe_3O_4 -CEL).



Fonte: Elaborada pela autora

1.3 Organização do trabalho

Essa tese foi dividida em capítulos, nos quais serão abordados os seguintes temas:

O capítulo 2 apresenta a “Revisão Bibliográfica”, onde são abordados a composição química da biomassa e tipos de imobilização enzimática mais utilizadas, dando ênfase a imobilização em MCLEAs. Apresentam-se também, neste capítulo, os principais conceitos relacionados a hidrólise enzimática, descrevendo a forma de ação das enzimas utilizadas.

No capítulo 3, “Preparação e caracterização de celulasas imobilizadas em MCLEAs”, a metodologia empregada na preparação e caracterização do suporte magnético de óxido de ferro. A metodologia e caracterização empregada na imobilização de celulasas.

No capítulo 4, “Influência de campo magnético alternado em celulasas imobilizadas em nanopartículas magnéticas: aplicação na hidrólise de bagaço de cana”, são apresentados os protocolos de atividade e cinética enzimática do complexo enzimático de celulase, comparando os resultados entre a celulase livre e o derivado. A atividade das amostras de celulasas livres e biocatalisador magnético e a influência de campo magnético alternado na hidrólise de bagaço de cana são avaliadas para a aplicação na produção de etanol de segunda geração.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar para a indústria de açúcar e álcool. Atualmente, não há nenhum estado brasileiro em que a cana-de-açúcar esteja ausente. Segundo dados da pesquisa Produção Agrícola Municipal - PAM do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), em 2015, havia plantações de cana em 3276 dos 5570 municípios brasileiros (IBGE, 2017).

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene originária do sudeste asiático, pertencente à mesma família do trigo, do milho e da aveia, sendo atualmente muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do Brasil (ROSILLO-CALLE et al, 2005). Diferentemente de outros cultivos, como os de cereais, o cultivo da cana-de-açúcar é realizado por meio vegetativo, ou seja, o que se planta no solo não são sementes, mas pedaços de indivíduos adultos, chamados “toletes” ou “olhaduras”. O tolete é composto por nós e entrenós. Cada tolete, com um comprimento entre 30 e 50 centímetros, possui até quatro gemas de brotação, constituídas por tecidos vegetais latentes e reservas nutricionais (AUDE, 1993).

Como subproduto da fabricação de açúcar e etanol, as usinas podem gerar energia elétrica de biomassa, a partir da queima do bagaço de cana-de-açúcar. A tabela 2.1 apresenta a composição média do bagaço de cana.

Tabela 2.1 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar (%)- valores médios internacionais.

Tipo	Holocelulose*	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
Total (%)	70,5	36,0	26,0	20,0	2,2
Fibra (%)	71,5	41,0	27,5	20,5	1,2
Medula (%)	71,0	33,5	29,0	21,0	3,2

*Holocelulose indica a fração total de carboidratos do material da planta que fica depois da remoção da lignina.

Fonte: PATURAU (1989).

Quase todas as usinas sucroalcoleras do Brasil são autossuficientes em energia elétrica e, dependendo da capacidade da unidade industrial, algumas conseguem gerar excesso de energia para ser vendida (DANTAS FILHO, 2009).

Devido ao excedente de bagaço e a legislação que restringe gradualmente a queima, foi estimado que as usinas de açúcar e álcool podem liberar de 30 a 50% do bagaço produzido para usos alternativos, como a produção de etanol de segunda geração (MACEDO, 2011). Com estes altos índices, espera-se que nos próximos cinco anos, a utilização de bagaço de cana para energia seja implementada em larga escala (RABELO, 2010).

2.2 Biomassa recalcitrante

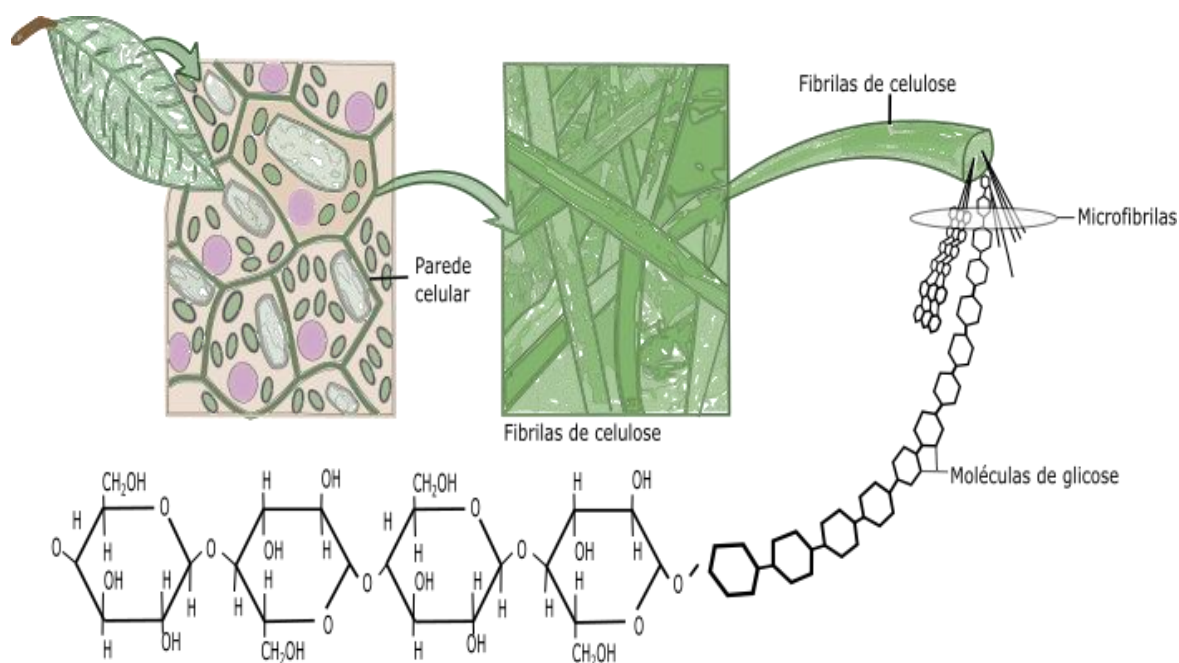
A biomassa de origem vegetal está envolvida em uma estrutura complexa de glicose e possui mecanismos para resistir ao ataque de outros organismos. Fatores naturais contribuem para a recalcitrância desse material lignocelulósico, tais como: (i) o tecido da epiderme da planta (cutícula e cera) (ii) o arranjo e a densidade dos pacotes vasculares (iii) grau de lignificação (iv) estrutura heterogênea e complexidade da parede celular (microfibrilas e matriz polimérica) (v) as mudanças da ação da enzima em substrato insolúvel (vi) inibidores provenientes da fermentação, que existem naturalmente na parede celular ou são produzidos durante o processo de conversão (WYMAN *et al.*, 2005). No contexto da biorrefinaria, estas características químicas e estruturais da biomassa afetam a penetração de líquidos e/ou acessibilidade de enzimas e a atividade modificando os custos de conversão (HIMMEL *et al.*, 2007a).

Em nível molecular (Figura 2.1), a parede celular é composta por microfibrilas de hemicelulose, que são altamente resistentes à hidrólise química e biológica, devido a sua estrutura organizada de cadeias de glicose (NISHIYAMA *et al.*, 2003). A conformação em cadeira dos resíduos de glicose, presente na celulose, faz com que os grupos hidroxilas da cadeia se orientem na posição radial (equatorial), enquanto os átomos de hidrogênio alifático se encontram em posições axiais. Como resultado, há forte ligação de hidrogênio intercadeia, entre cadeias adjacentes em uma folha de celulose e a ligação mais fraca são as interações hidrofóbicas entre as folhas de celulose. A parte hidrofóbica das folhas de celulose permite que a celulose cristalina

seja resistente a hidrólise ácida, contribuindo para a formação de uma camada densa de água perto da superfície de celulose hidratada (MATTHEWS *et al.*, 2006). As fortes ligações de hidrogênio intercadeias favorecem que a celulose cristalina seja resistente a hidrólise enzimática, enquanto a hemicelulose e a celulose amorfa são facilmente degradadas (NISHIYAMA *et al.*, 2003).

Em uma escala microscópica e macroscópica, a natureza heterogênea complexa da biomassa cria limitações ao transporte de massa, prejudicando o acesso de catalisadores químicos e bioquímicos (DING; MICHAEL, 2006).

Figura 2.1- Composição da parede celular de uma planta.



Fonte: Elaborada pela autora

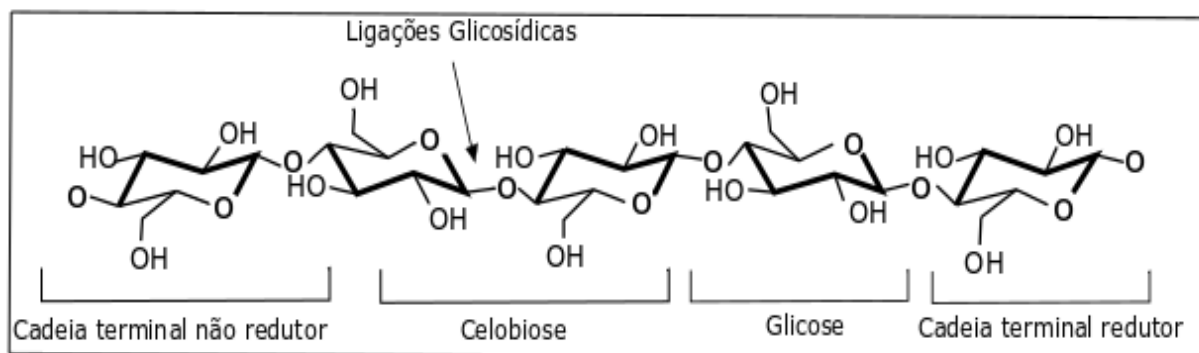
2.2.1 Celulose

A celulose é o material biológico mais abundante na terra, proveniente de plantas terrestre e se caracteriza como polímero de carboidratos mais resistente a degradação catalítica quando comparada com a parede celular de outros polissacarídeos de origem vegetal (HIMMEL *et al.*, 2007b). O estudo da celulose é amplo e diversificado, devido a sua abundância natural e utilidade como biocombustível, precursor químico, e material com inúmeras aplicações em alimentos, tintas, cosméticos e fármacos (SIRO; PLACKETT, 2010; PAYNE *et al.*, 2015).

A celulose é um substrato cristalino insolúvel em água, hidrofílico, e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. A celulose produzida por plantas existe dentro da matriz de outros polímeros, principalmente, hemicelulose, lignina, pectina e outras substâncias, formando a biomassa lignocelulósica.

A estrutura da celulose é um homopolímero β -1,4 ligado por β -D-glicose que exibe cadeias terminais redutora e não redutora (Figura 2.2). Na celulose, as cadeias de glicose são unidas por força de Van der Waals e por ligações de hidrogênio, sendo esta estrutura chamada de fibrila elementar. A junção das fibrilas elementares forma as microfibrilas (FAN; LEE; BEARDMORE, 1980) (Figura 2.1). As regiões dentro das microfibrilas que apresentam uma elevada ordem são denominadas de cristalinas e as regiões menos organizadas, denominadas amorfas (GAMA, 1996).

Figura 2.2 - Estrutura da celulose.



Fonte: NSOR-ATINDANA *et al.* (2017).

Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo redutor) e a glicose (RABELO, 2010). Os açúcares covalentemente bloqueados na cadeia da celulose e hemicelulose são utilizados como matéria-prima renovável para a produção de biocombustíveis (PAYNE *et al.*, 2015).

A celulose possui muitas formas cristalinas. Em 1984, Vanderhart e Atalla demonstraram que a estrutura da celulose vegetal, em sua maioria, constitui-se de uma mistura de polimorfos de celulose I α e I β (VANDERHART; ATALLA, 1984). As principais diferenças entre os polimorfos de celulose I α e I β residem nos padrões de

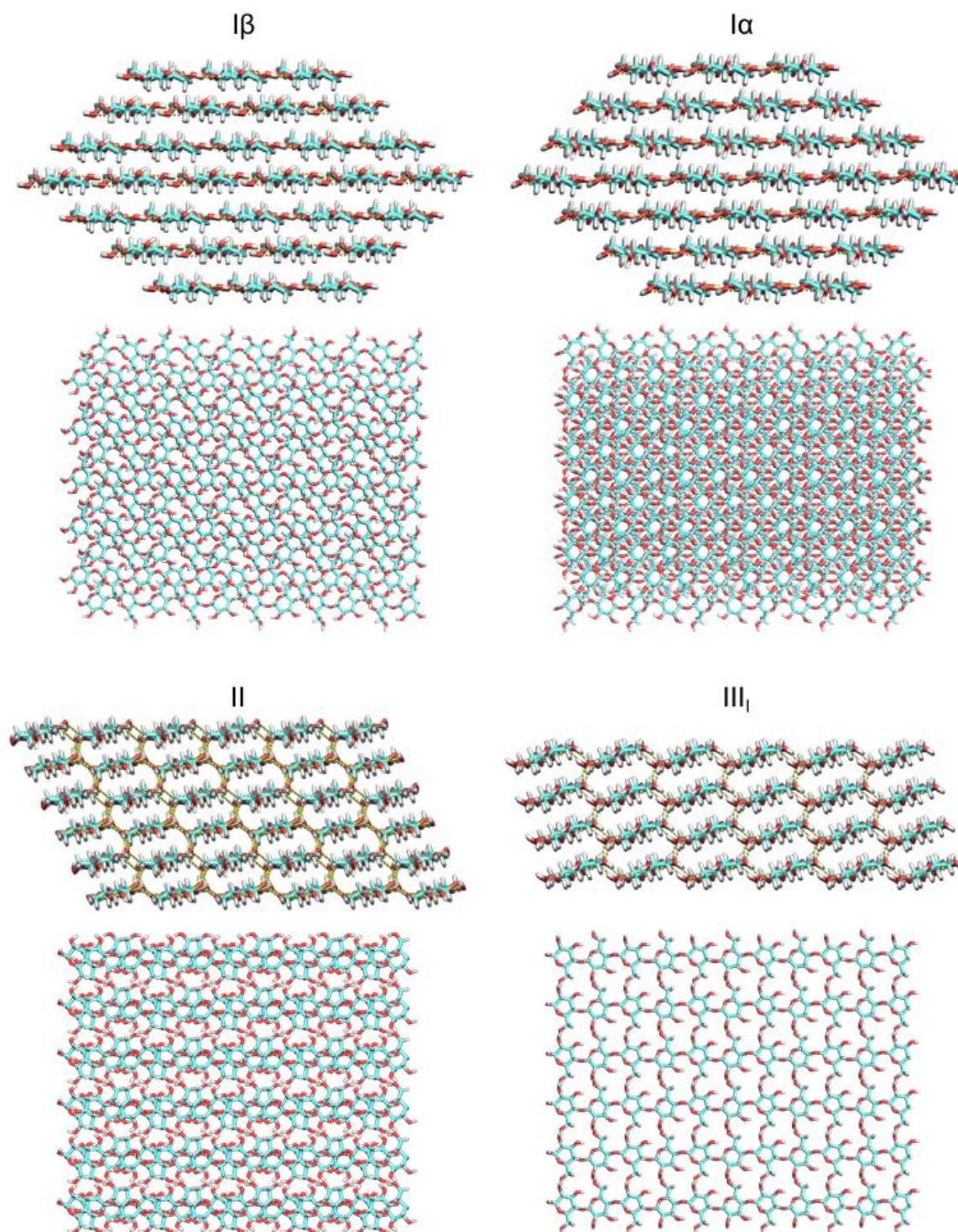
ligação de hidrogênio e o arranjo do empilhamento entre as camadas da cadeia (Figura 2.3). A celulose I α forma uma cela unitária com uma única cadeia, enquanto a celulose I β forma duas camadas diferentes. Em ambas as estruturas de celulose, as ligações de hidrogênio só existem dentro de uma única camada, sem ligações de hidrogênio na intersecção, em seu lugar encontram-se ligações de Van der Waals que contribuem muito para a estabilidade termodinâmica da celulose.

Certos tratamentos químicos podem converter a celulose I em outras formas cristalinas. Tratamento com solventes como o hidróxido de sódio ou dissolução em líquidos iônicos podem converter as cadeias paralelas de celulose em um arranjo antiparalelo com interações intercamadas e intracamadas de ligações de hidrogênio produzindo celulose II (Figura 2.3) (LANGAN; NISHIYAMA; CHANZY, 1999, 2001). Tratamentos químicos menos severos, por exemplo com a amônia, podem também converter celulose I ou celulose II em celulose III (WADA *et al.*, 2004). A celulose III forma camadas escalonadas com ligações de hidrogênio intra e intercamadas, ao contrário da celulose I, onde o empacotamento das cadeias estão dispostas em camadas planas. A celulose II e a celulose III são cadeias mais facilmente catalisadas pelas enzimas da celulase (CHUNDAWAT *et al.*, 2011).

Simulações computacionais também foram aplicadas para obter informações adicionais sobre as propriedades da celulose em nível molecular (BELLESIA *et al.*, 2010; BECKHAM *et al.*, 2011).

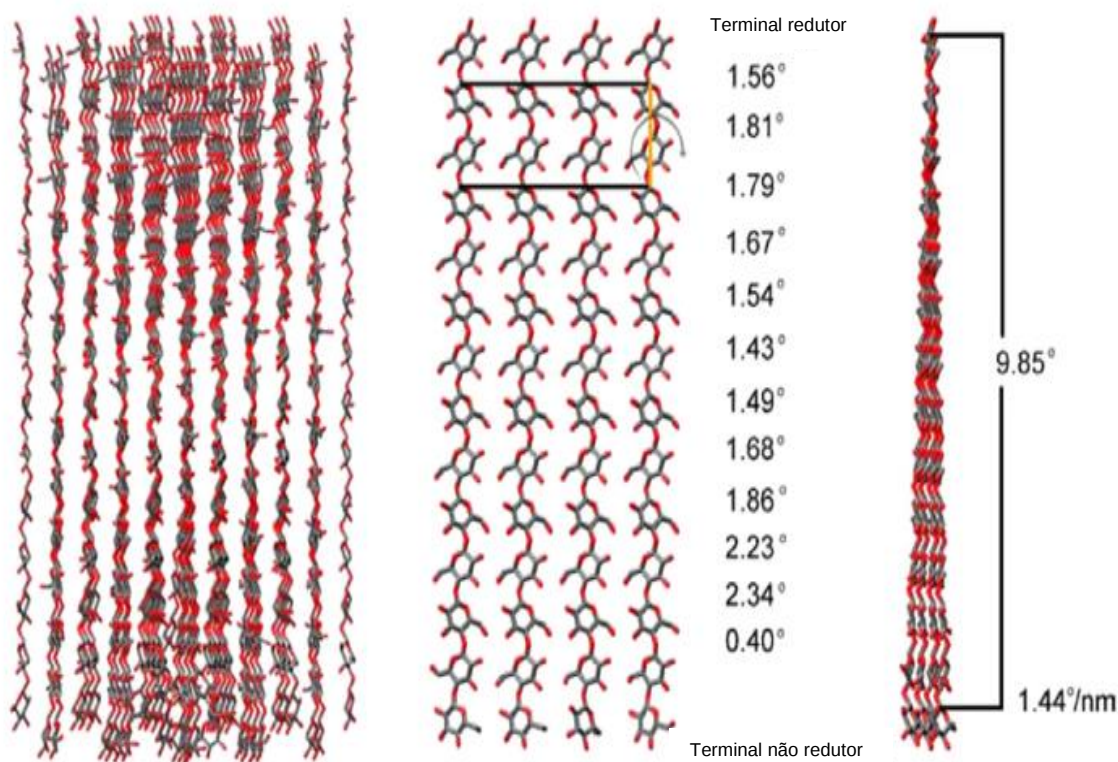
As simulações forneceram evidências de torção de microfibrilas, em um estudo inicial, Matthews *et al.* simulou um modelo de 36 cadeias de celulose I β e demonstrou que as microfibrilas são propensas a torcerem, em aproximadamente, 1,5° por unidade de celobiose (Figura 2.4). Estudos experimentais, como ressonância magnética nuclear (RMN), também demonstram que as microfibrilas de fato exibem torção (MATTHEWS *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2011). A influência da torção das microfibrilas na ação de celulase permanece em grande parte sem resposta. Com a utilização de ferramentas experimentais e computacionais será possível compreender o comportamento das microfibrilas de celulose na parede celular. Este comportamento é a informação chave para compreender a localização das celulasas no processo enzimático.

Figura 2.3 - Polímeros celulósicos naturais e sintéticos observados de cima para baixo. As celulosas I α e I β são polímeros de ocorrência natural exibindo apenas ligações de hidrogênio dentro das camadas. Celulosas II e III, o resultado do pré-tratamento químico da celulose I, modificando o arranjo de empilhamento das cadeias, com ligações de hidrogênio entre as folhas da estrutura.



Fonte: PAYNE *et al.* (2015).

Figura 2.4 - Simulação computacional de microfibrilas de celulose I β com torções, de aproximadamente, 1.5° por unidade de celobiose quando solvatada em água e quando as cadeias terminais não são fixadas.



Fonte: PAYNE *et al.* (2015).

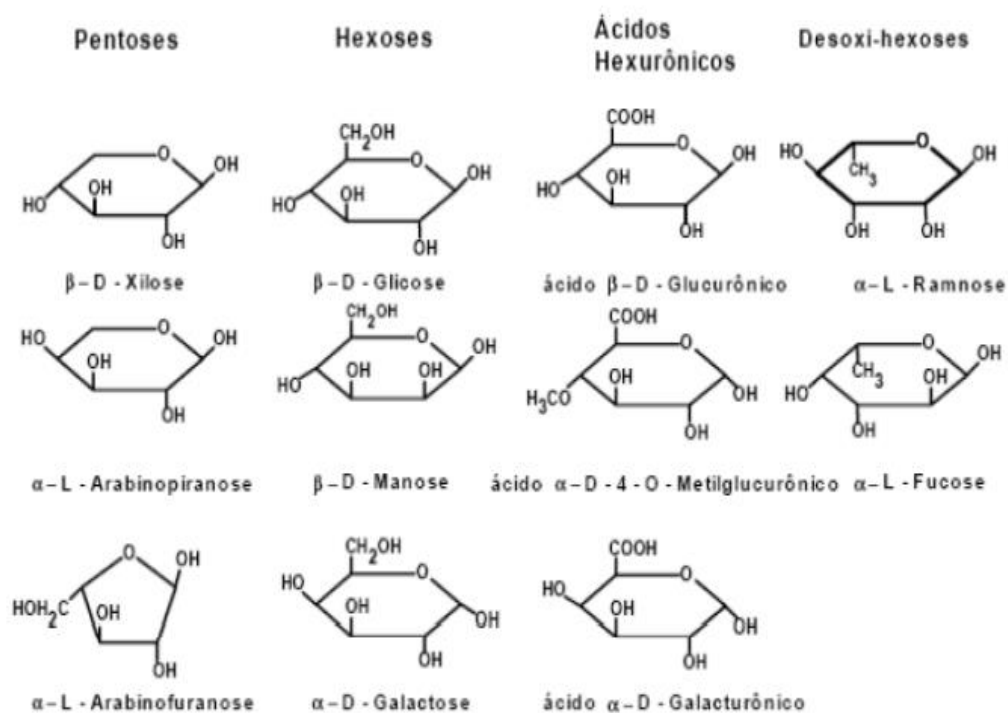
2.2.2 Hemicelulose

As microfibrilas de celulose são revestidas com outro polissacarídeo, a hemicelulose ou xiloglucano. Toda parede de células dicotiledôneas consiste, principalmente, de hemicelulose. Dependendo da espécie da planta, 20-40% dos polissacarídeos da parede celular são hemicelulose e sua fração consiste altamente de heteropolissacarídeo ramificado e geralmente não cristalina (RABELO, 2010).

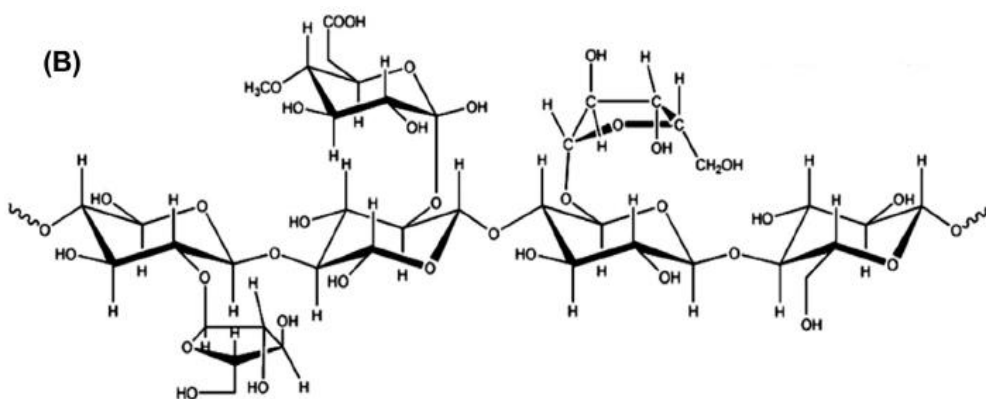
As hemiceluloses têm menor peso molecular que a celulose e cadeias laterais curtas e ramificadas. O resíduo de açúcar de hemicelulose inclui pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-galactose, L-galactose, D-manose), ácidos hexurônico (ácido β -D glicurônico, ácido D-galacturônico) e desoxi-hexoses (L-ramnose e L-fucose) (Figura 2.5).

Figura 2.5 - (A) Hexoses e pentoses típicas encontradas na hemicelulose; (B) Exemplo de estrutura de hemicelulose.

(A)



(B)



Fonte: (A) ALONSO; WETTSTEIN; DUMESIC (2012); (B) BRANDT *et al.* (2013).

Alguns resíduos de açúcar são modificados por acetilação e metilação. A classificação de hemiceluloses depende do tipo de monômero que forma os heteropolímeros chamados de xilana, manose e galactana. As hemiceluloses são o maior constituinte de materiais lignocelulósicos e são componentes estruturais

importantes, encontrados em associação com a lignina e celulose, interagindo covalentemente com a pectina (PRADO et al, 2011).

2.2.2.1 Ácidos Urônicos (Hexurônicos)

O interesse em ácidos orgânicos derivados de açúcares aumentou nos últimos anos, como parte dos esforços para desenvolver biorrefinarias que produzam além de biocombustíveis, outros produtos químicos que sejam candidatos para substituir as moléculas derivadas do petróleo (MEHTIO et al., 2016). Os ácidos orgânicos são obtidos pela oxidação direta de mono ou oligossacarídeos e, são conhecidos como ácidos de açúcar.

Os ácidos urônicos são monossacarídeos oxidados obtidos pela oxidação de grupo hidroxila terminal em um ácido carboxílico. As moléculas dessa classe são componentes importantes de polissacarídeos amplamente utilizados na indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Por exemplo, o ácido glicurônico é o principal ácido urônico extraído de Aloe vera e é usado principalmente para aplicações cosméticas para cuidados com a pele (FARRAN et al., 2015).

- **Ácido glicurônico**

O ácido glicurônico, obtido pela oxidação de D-glicose, é um produto químico altamente valioso e um dos blocos de construção de ácido hialurônico, cujo mercado mundial atual é estimado em mais de 1 bilhão de dólares. O ácido glicurônico é amplamente utilizado na química farmacêutica e medicinal para a síntese de fármacos modificados, utilizado como aditivo na indústria de alimentos e como princípio ativo na indústria farmacêutica, particularmente para a preparação de produtos para o cuidado da pele, como antioxidante e como precursor de biossíntese de ácido ascórbico (Vitamina C). Além disso, é um intermediário para a produção de ácido L-glucônico e ácido 6-amino-L-gulônico, que são moléculas interessantes para a síntese de produtos químicos finos, polímeros e surfactantes (AMANIAMPONG et al., 2016).

Atualmente, a síntese do ácido D-glicurônico é realizada através da oxidação enzimática da D-glicose na posição C6 pela bactérias *Ustilina deusta* e *bacterium industrium* var. *Hoshigakis* sob condições aeróbicas. A separação microbiana, a baixa

produtividade e a seletividade, assim como o descarte e a reciclagem de águas residuais, são as principais desvantagens deste processo. Os catalisadores sólidos também foram explorados para esta reação, até o momento, os catalisadores de metais nobres exibem seletividade muito baixa para ácido D-glicurônico. Os catalisadores de metal como platina ou o paládio disperso sobre o carbono, de leva preferencialmente à oxidação da posição C1 da glicose, resultando na formação de ácido D-glucônico. As rotas eletroquímicas para a formação de ácido glicurônico são reações que ocorrem sob condições de pH controlados, com rendimentos limitados a 2% e exigem metais caros como eletrodos (Au ou Cu). Vale ressaltar que, na maioria dos exemplos citados acima, o ácido glicurônico foi obtido como um sal carboxilato, exigindo assim uma etapa de pós-neutralização antes do processamento. Embora o ácido glicurônico possua um grande potencial de mercado a sua disponibilidade permanece limitada na indústria (AMANIAMPONG *et al.*, 2016).

2.2.3 Lignina

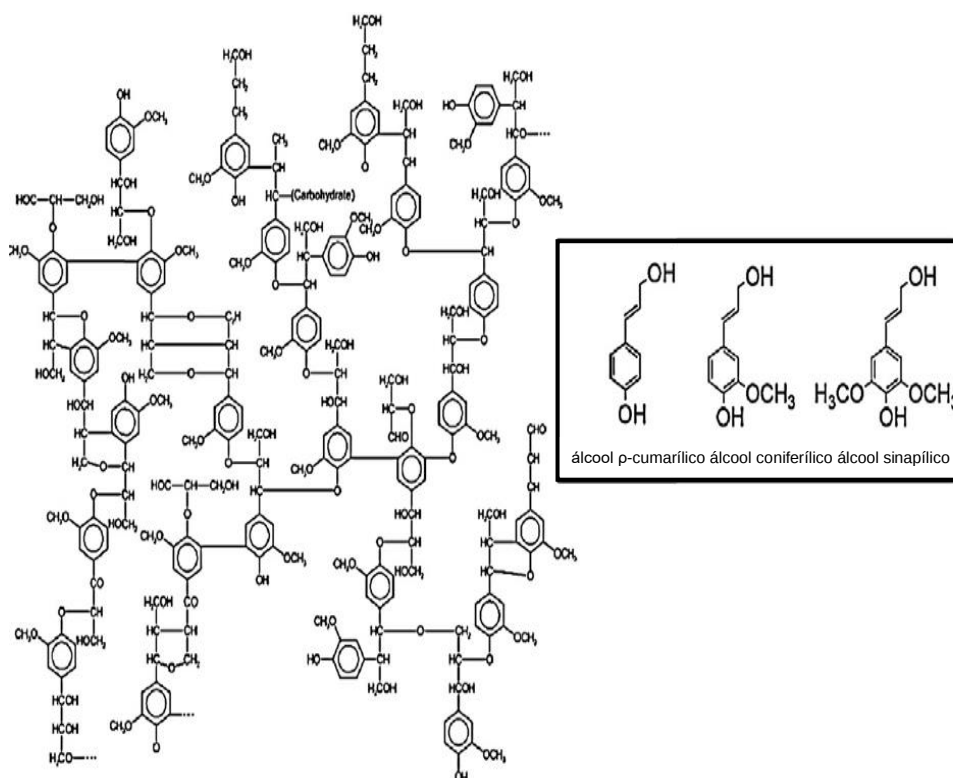
A lignina é um biopolímero polifenólico tridimensional com uma estrutura não uniforme que confere rigidez e recalcitrância às paredes celulares das plantas. Em volume, é o segundo maior biopolímero após a celulose e em sua composição é constituída inteiramente por subunidades aromáticas (SHELDON, 2018). Além disso, a lignina oferece proteção à célula contra-ataques de enzimas externas e confere à planta resistência estrutural (MELATI, 2017).

A lignina é composta por três diferentes monômeros de fenilpropano, denominados álcool sinapílico, álcool coniferílico e álcool p-cumarílico (Figura 2.6). As proporções dos três monômeros na lignina determinam o tipo de configuração na molécula de lignina, que por sua vez determina o grau de ramificação e a reatividade da lignina (MELATI, 2017).

A lignina confere recalcitrância ao material lignocelulósico, principalmente devido à capacidade de ligação aos diversos tipos de moléculas presentes na parede celular. Existem estudos que tem como objetivo obter variedades diferentes de plantas geneticamente modificadas onde o teor de lignina é inferior ao natural. Outras estratégias estão sendo desenvolvidas para diminuir a recalcitrância, ao invés de modificar a expressão de genes de lignina, utiliza-se a incorporação de algumas

moléculas, como o ferulato de coniferil, na estrutura da lignina para melhorar o rendimento enzimático na reação de hidrólise (MELATI, 2017).

Figura 2.6 - Estrutura polimérica macromolecular da lignina



Fonte: CHRISTOPHER; YAO; JI (2014).

A lignina por ser uma molécula complexa e com resistência química torna-se uma barreira que impede o acesso a celulose, principalmente devido à inibição enzimática de celulasas ocasionada pela formação de substâncias inibidoras. Para superar esse problema, diferentes pré-tratamentos foram desenvolvidos para modificar ou remover a lignina. Também é importante notar que a maioria das técnicas de pré-tratamento também modifica de alguma forma as propriedades físico-químicas da biomassa, levando ao aumento do rendimento de glicose (MELATI, 2017).

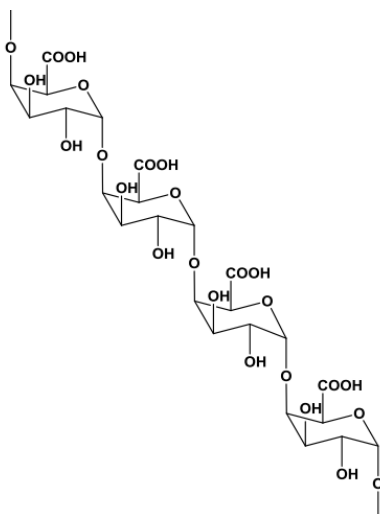
2.2.4 Pectina

A pectina é um polissacarídeo aniônico constituído, em grande parte, por unidades de ácido D-galacturônico (também conhecido como ácido galactosilurônico)

(GalA) e ligados covalentemente por ligações α -1,4 (Figura 2.7). A pectina é derivada de plantas e compõe aproximadamente um terço da parede celular em plantas dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas (ZHENG et al, 2017).

As pectinas constituem componente principal da lamela média da parte vegetal. São as frações que são extraídas mais facilmente da parede celular e apresentam propriedades de gel (RABELO, 2010).

Figura 2.7- Pectina formada por ligações covalentes α -1,4 em unidades de ácido D-galacturônico (GalA).



Fonte: ZHENG et al. (2017).

2.3 Processo para produção de etanol a partir de materiais lignocelulósico

A aplicação mais importante e investigada de maneira incessante, é a utilização de resíduos lignocelulósico para a produção de biocombustíveis. O resíduo lignocelulósico representa a maior parte de recursos renováveis disponível para a humanidade, porém seu uso é limitado devido à falta de tecnologias mais baratas. Uma aplicação de celulase é a conversão de materiais celulósicos em glicose e outros açúcares fermentáveis, que por sua vez pode ser usado, como substrato para a produção de proteínas de células únicas (*Single-Cell Proteins* – SCP) ou como uma variedade de produtos derivados da fermentação, por exemplo o etanol (SONI; NAZIR; CHADHA, 2010) (Figura 2.8).

O processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósico, baseado na hidrólise enzimática, consta basicamente de quatro etapas com distintas etapas de

combinação: produção de enzimas, pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação (SUN; CHENG, 2002).

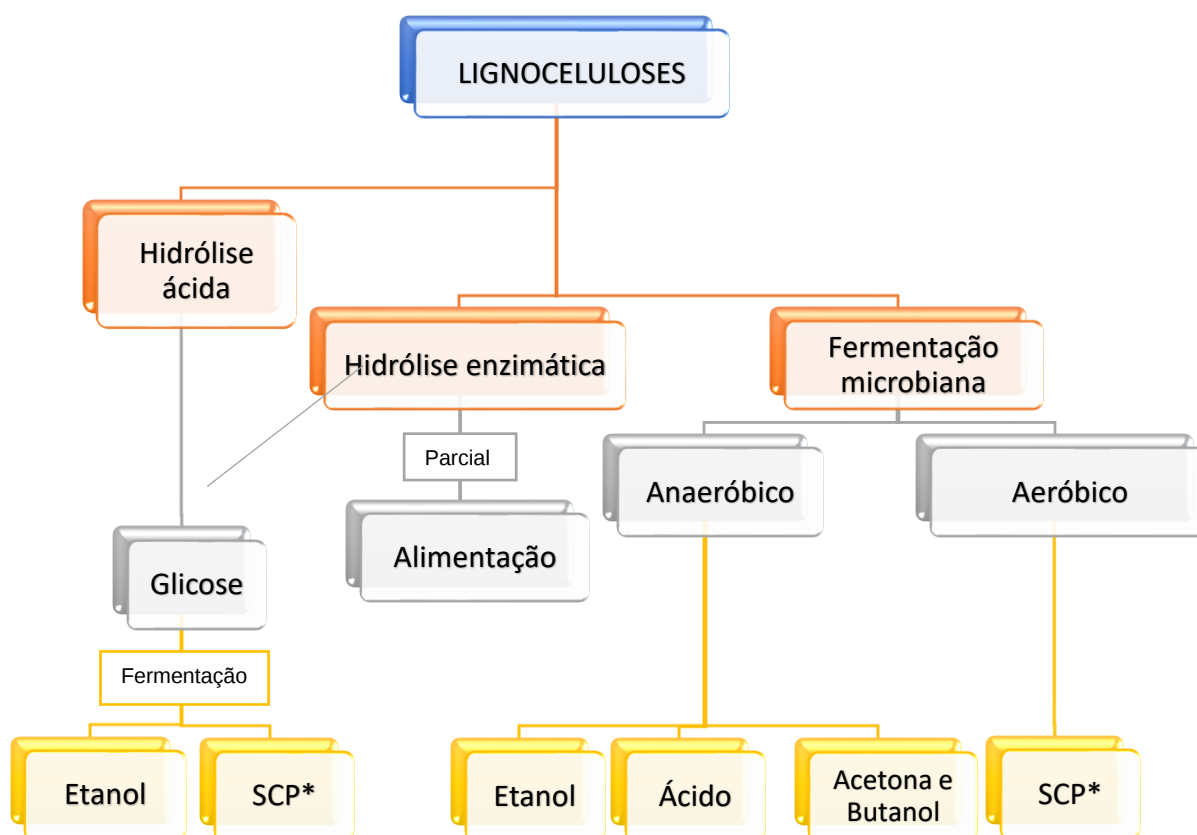
2.3.1 Produção de Enzimas

A degradação microbiana de resíduos lignocelulósicos é resultado da ação de muitas enzimas e os microrganismos cultivados para a produção enzimática são os fungos e as bactérias. Os fungos e as bactérias possuem a habilidade de secretar grandes quantidades de proteína extracelular e são extensivamente estudados na produção de celulases (RAY; BEHERA, 2017). O fungo *Trichoderma reesei*, que converte celulose em glicose, é amplamente estudado na literatura, no entanto outros organismos celulósicos de interesse industrial também são utilizados e estão incluídos na tabela 2.2.

2.3.2 Pré-tratamento químico de biomassa

O pré-tratamento da biomassa é uma etapa necessária para reduzir a recalcitrância por despolimerização e para solubilizar a hemicelulose (aproximadamente 20 a 40% em peso de biomassa). Este passo converte as hemiceluloses em monossacarídeos e oligossacarídeos, que podem ser mais uma vez hidrolisados ou fermentados. A remoção das microfibrilas de hemicelulose expõe o núcleo cristalino de celulose, que pode então ser hidrolisado por enzimas, como a celulase. Além disso, o pré-tratamento normalmente quebra a rigidez, em escala macroscópica, da biomassa e diminui as barreiras físicas, favorecendo o transporte de massa (HIMMEL et al, 2007). A figura 2.9 representa os pré-tratamentos utilizados na biomassa.

Figura 2.8 – Processos biotecnológico para obtenção de etanol.



*SCP: i (proteínas de células únicas).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2.2 – Microrganismos empregados na produção de celulase.

Grupos	Microrganismos	
	Gênero	Espécies
Fungi	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>
		<i>A. nidulans</i>
		<i>A. oryzae</i>
		<i>A. fumigatus</i>
		<i>A. phoenicis</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>
		<i>F. oxysporum</i>

	<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i>
		<i>H. grisea</i>
	<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>
	<i>Paecilomyces</i>	<i>P. themophila</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i>
		<i>P. decumbans</i>
		<i>P. occitanis</i>
	<i>Phanerochaete</i>	<i>P. chrysosporium</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesei</i>
		<i>T. longibrachiatum</i>
		<i>T. harzianum</i>
		<i>T. viride</i>
Bacteria	<i>Acidothermus</i>	<i>cellulolyticus</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>A. subtilis</i>
		<i>pumilus</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C. acetobutylicum</i>
		<i>C. thermocellum</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. fimi</i>
		<i>C. bioazotea</i>
		<i>C. uda</i>

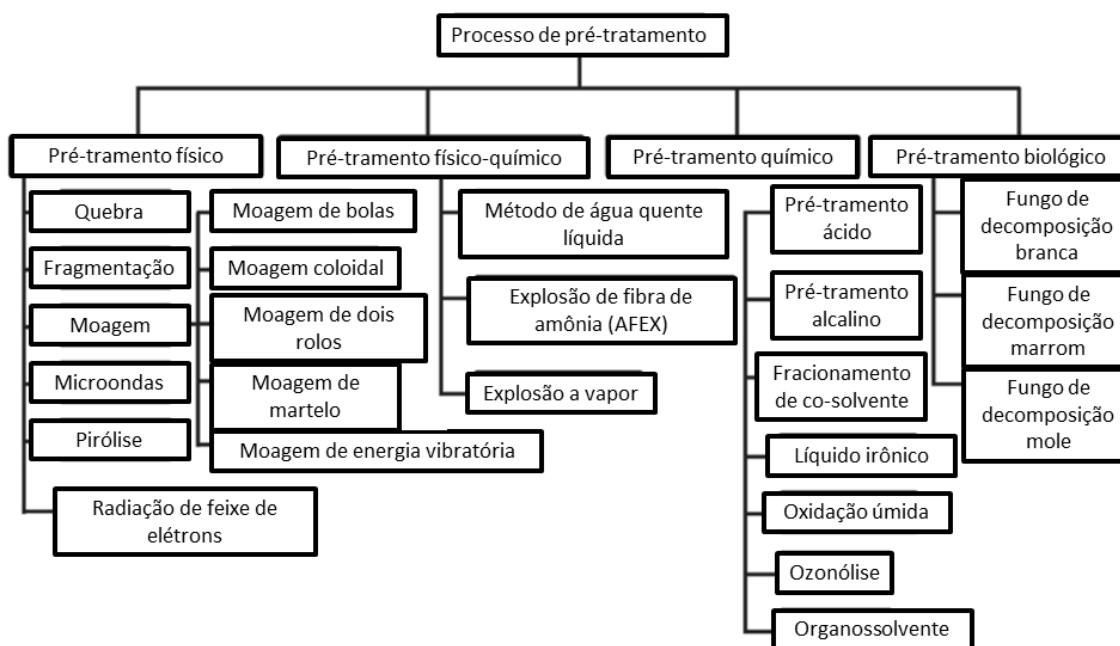
Fonte: RAY; BEHERA (2017).

- **Pré-tratamento químico ácido no estado líquido**

O pré-tratamento termoquímico de biomassa, há muito tempo, é reconhecido como uma tecnologia eficiente para produzir materiais que são degradados pelas enzimas. Por exemplo, o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído de 140°C a 200°C hidrolisa a celulose nas paredes celulares, o que torna as enzimas mais acessíveis no processo de sacarificação. Em condições moderadas, as hemiceluloses são hidrolisadas e os açúcares são solubilizados em monômeros e oligômeros; contudo, o rendimento dos açúcares solubilizados é quantitativamente inferior (60 a 70%)

(HIMMEL *et al.*, 2007). Para o tratamento ácido, a liberação de açúcares de hemicelulose possui cinética de reação lenta, o que promove o aumento de custo de conversão no processo (LIU; WYMAN, 2004).

Figura 2.9 – Classificação das diferentes metodologias de pré-tratamento de biomassa.



Fonte: DEY *et al.* (2018).

- **Pré-tratamento químico ácido no estado sólido**

Outra aplicação de pré-tratamento ácido envolve a utilização de catalisadores ácidos no estado sólido para hidrólise de celulose em açúcares. O catalisador ácido sólido é definido como um sólido que pode doar prótons ou aceitar elétrons durante reações. A eficácia catalítica de um catalisador ácido sólido depende principalmente de seus centros ácidos presentes em sua superfície. Portanto, ácidos sólidos possui locais ácidos de Brønsted que podem catalisar a hidrólise da biomassa com muita eficiência (GUO *et al.*, 2012). Esses catalisadores possuem inúmeras vantagens sobre a hidrólise ácida líquida, que principalmente inclui fácil separação do produto, reciclagem e reutilização do catalisador, menos danos ao reator etc. Além disso, a utilização de catalisadores ácido sólido é considerada uma abordagem ecológica com menor impacto no meio ambiente. O papel desses catalisadores tem sido

extensivamente estudado para a hidrólise de uma variedade de biomassa lignocelulósica. Os catalisadores ácidos sólido comumente usados são: óxidos de metais de transição, zeólitas, resinas de troca catiônica, heteropoliácidos, ácidos sólidos magnéticos etc (HUANG; FU, 2013; GUO *et al.*, 2012).

Além disso, verificou-se que os catalisadores ácidos suportados são muito promissores para a hidrólise de polímero lignocelulósico como a celulose, pois eles possuem espécies ácidas consideravelmente grandes em sua superfície em comparação com as zeólitas e óxidos de metais de transição (HUANG e FU, 2013). Alguns suportes comumente usados para catalisadores sólido ácidos incluem sílica, resinas poliméricas, polímeros porosos de coordenação e carbonos amorfos (óxidos metálicos e zeólitas) (HEGNER *et al.*, 2010)(AKIYAMA *et al.*, 2011). Entre estes, óxidos metálicos são mais utilizados como suportes para catalisadores ácidos sólido devido a estabilidade térmica e mecânica, alta área superficial específica e grande tamanho dos poros.

- **Pré-tratamento químico alcalino**

Existem muitos tipos diferentes de reagentes alcalinos, como hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio que podem ser utilizados no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. O pré-tratamento alcalino tem muitas vantagens em comparação com outros métodos de pré-tratamento, que incluem: condição de reação leve; menor custo de operação; redução da degradação de holocelulose e menor formação de inibidores (KIM *et al.*, 2016). O principal mecanismos de pré-tratamento alcalino são a quebra das ligações éster, remoção da acetilação e clivagem das ligações éter da parede celular no processo de hidrólise do material lignocelulósico. A quebra dessas ligações provoca a alteração da estrutura da lignina, a redução do complexo lignina-hemicelulose, inchaço das fibrilas e a descristalização parcial de celulose (CHENG *et al.*, 2010). A quebra da ligação éter parece ser o mecanismo mais importante durante o pré-tratamento de biomassa, porque as ligações éter são as ligações mais predominantes no polímero de lignina e de polímero de carboidratos da parede celular. Sob condições alcalinas, a ligação éter da lignina é clivada e os anéis aromáticos são, portanto, separados (DA HORA MACHADO; RUGGIERO; NEUMANN, 1994). Contudo, a clivagem da ligação éter

apenas pelo radical hidroxila é uma reação muito lenta e, portanto, o pré-tratamento alcalino é geralmente levado de horas a dias para atingir os efeitos desejados. A taxa de deslignificação e a eficiência do pré-tratamento alcalino dependem do tipo e do conteúdo de lignina de biomassa tratada. Por exemplo, verificou-se que o pré-tratamento com hidróxido de sódio diluído é eficaz para aumentar a digestibilidade enzimática de biomassa de herbáceas com quantidade baixa de lignina, mas foi observado como sendo menos eficaz para biomassa com alto teor de lignina (KUMAR *et al.*, 2009). Os outros fatores que podem afetar a eficiência do pré-tratamento alcalino são a temperatura da reação, a pressão e a carga sólida de biomassa. A temperatura e pressão elevadas reduzem o tempo de reação e aumenta o custo do processo. Altas temperaturas e pressões são aplicadas, principalmente, em processos com baixo teor alcalino (ZHENG *et al.*, 2017).

O pré-tratamento alcalino em altas concentrações são algumas vezes aplicadas à biomassa com alto teor de lignina. Geralmente causa aumento da deslignificação de biomassa, mas em alguns casos ocorre o aumento da dissolução de celulose (CHENG *et al.* 2010). Outro pré-tratamento alcalino conhecido é a expansão de fibra de amônia (AFEX - sigla em inglês), que não degrada a hemicelulose, tornando a parede celular mais acessível para ocorrer a hidrólise enzimática (TEYMOURI *et al.*, 2004).

2.3.2 Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento de biomassa, o material lignocelulósico pode ser hidrolisado à glicose sob a ação de celulasas. As condições do processo: temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração sólido-líquido, dependem do substrato escolhido e das características do complexo enzimático utilizado, que devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso (RABELO, 2010).

As características de biomassa são consideradas importantes para efetuar a hidrólise enzimática: quantidade de lignina, presença de grupos acetil, cristalinidade da celulose, grau de polimerização, área de superfície, volume de poros da fibra de celulose e tamanho de partícula (SEWALT; GLASSER; BEAUCHEMIN, 1997).

2.3.2.1 Celulase

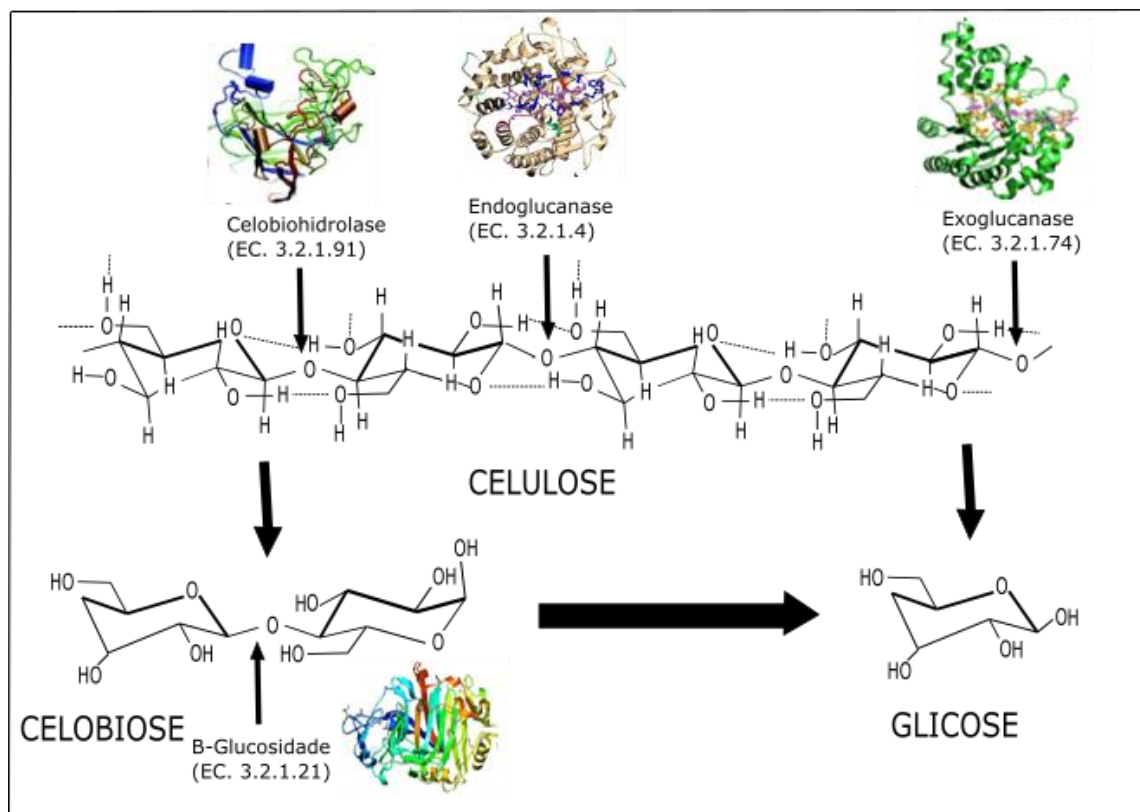
A celulase catalisa a hidrólise de β -1,4-D-ligações glicosídicas na celulose e possui papel importante na quebra de polissacarídeos, principal componente da parede celular da planta. As celulases trabalham sinergicamente com outras enzimas hidrolítica para obter a degradação completa de polissacarídeos para açúcar solúveis (celobiose e glicose) (MORANA *et al.*, 2011).

As celulases envolvem os seguintes tipos de enzimas: a endoglicanase ou endo- β -1,4-glicanase (EC.3.2.1.4), a exoglicanase (EC 3.2.1.74), celobiohidrolase (EC. 3.2.1.91) e β -glicosidase ou celobiase (EC. 3.2.1.21) (Figura 2.10). As enzimas trabalham colaborativamente para realizar a hidrólise do complexo de microfibrilas de celulose da parede celular da planta (MORANA *et al.*, 2011).

As endoglicanases hidrolisam ligações glicosídicas internas, de maneira randômica, em regiões amorfas da celulose e produzem novas cadeias terminais para a quebra da celulose. Essa ação resulta em uma rápida diminuição no tamanho da cadeia do polímero e um aumento gradual na concentração de açúcares redutores. As exoglicanases hidrolisam a cadeia de celulose e oligossacarídeos com alto grau de polimerização, removendo sucessivamente unidades de β -glicose. As celobiohidrolases hidrolisam as regiões cristalinas da cadeia de celulose removendo celobiose de terminais redutores e não redutores. Esta ação resulta na rápida liberação de açúcares redutores, mas com pequenas mudanças no tamanho do polímero. As celobiohidrolases com especificidades para terminais redutores e não redutores trabalham em conjunto. As β -glicosidases convertem os produtos dos oligossacarídeos resultantes em glicose. A ação do complexo enzimático da celulase é demonstrada na figura 2.9. (MORANA *et al.*, 2011).

Novas descobertas no mecanismo de despolimerização da celulose envolvem enzimas como as monoxigenases de polissacarídeos (LPMOs), que empregam cobre, oxigênio e um agente redutor para clivar oxidativamente a celulose (PAYNE, 2015). Além disso, outras enzimas são responsáveis pela quebra da celulose, tais como, as celulases oxidativas que despolimerizam a celulose, em reações radiculares, por exemplo, a enzima celobiose dehidrogenase (aceptor) e as fosforilases de celulose que possuem a função de despolimerizar a celulose usando fosfatos da água (SARANRAJ; STELLA; REETHA, 2012).

Figura 2.10 - Hidrólise enzimática de celulose.



Fonte: Adaptado de MORANA (2011).

As celulasas podem ser aplicadas nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e têxteis (SHARMA; TEWARI, 2016). No entanto, a celulase livre tem algumas limitações na aplicação, devido à baixa recuperação, baixa estabilidade e cinética lenta durante a catálise. Uma alternativa promissora é a imobilização de celulasas para promover maior estabilidade e recuperação do produto formado. Sanchez-Ramirez *et al.*, relatam que a celulase imobilizada com nanopartículas magnéticas pode manter a atividade catalítica por vários ciclos e garantir alta recuperação do substrato. Essa estratégia será abordada de maneira mais aprofundada durante este capítulo.

2.3.2.2 Mecanismo de reação de celulase

Em 1953, Koshland propôs o mecanismo de reação stereoespecífica, que nomeou de reação invertida e de retenção. A figura 2.11 representa os dois tipos de

mecanismos utilizada pela celulase (KOSHLAND JR., 1953). O mecanismo de retenção (a), no qual o primeiro resíduo age como um catalisador ácido (AH) que protona o oxigênio da ligação glicosídica e com a assistência de uma base B^- promove a saída do grupo abandonador. O produto da reação é hidrolisado por uma molécula de água e por substituição nucleofílica no carbono anomérico gera um produto com a mesma estereoquímica do substrato (MORANA, 2011). No mecanismo de inversão (b) ocorre também uma protonação do oxigênio da ligação glicosídica por um resíduo ácido e o grupo abandonador é acompanhado por um ataque, concomitante, de uma molécula de água ativada por um resíduo, a base B^- .

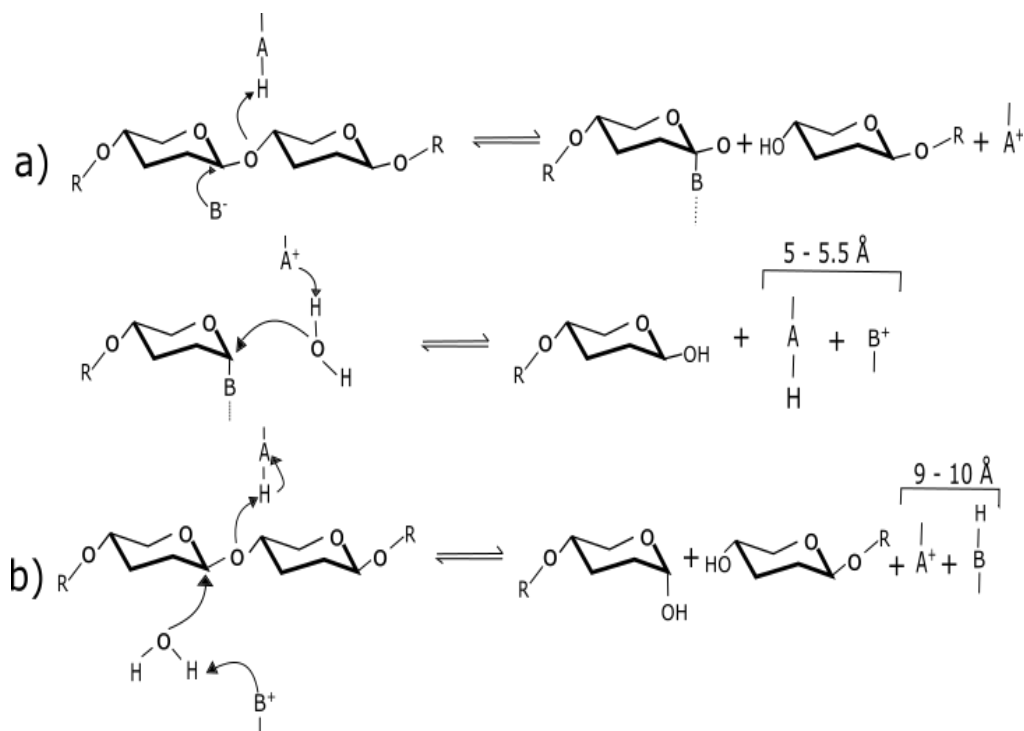
2.3.2.3 Fatores que afetam a hidrólise enzimática

A área de superfície e a cristalinidade são identificadas como os fatores estruturais mais importantes na susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática, já que estão diretamente relacionadas à taxa inicial de hidrólise (RAMOS; NAZHAD; SADDLER, 1993; WALKER; WILSON, 1991; RABELO, 2010). Outras características importantes são o arranjo molecular da celulose e a presença de materiais, tais como a lignina. Alguns fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e suas consequências no processo de modelagem são resumidas na tabela 2.3.

2.3.2.4 Cinética da hidrólise enzimática

Os materiais celulósicos são insolúveis e estruturados e consistem em componentes que são resistentes à degradação enzimática. A hidrólise da celulose exige ações sinérgicas de diversos componentes de celulase em um sistema heterogêneo de reação. Esses fatos determinam que os mecanismos da reação hidrolítica são altamente complexos, tornando-a difícil para a modelagem matemática e às vezes incerta em relação à muitos parâmetros físicos, cinéticos e de transferência de massa (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003; RABELO, 2010).

Figura 2.11 - Representação esquemática de mecanismo de retenção (a) e de inversão (b).



Fonte: MORANA, 2011.

Tabela 2.3 – Principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e sua consequência (marcadas de 1-5) na hidrólise e na modelagem do processo.

	1	2	3	4	5
Fatores relacionados ao substrato					
Cristalinidade da celulose	x			x	
Grau de polimerização (dp)		x			
Disponibilidade/acessibilidade da área superficial	x	x	x	x	x
Organização estrutural (macro ou microestrutura)			x	x	
Tamanho da partícula			x	x	
Porosidade			x	x	x
Presença de lignina e hemicelulose	x			x	x
Fatores relacionadas a enzima					
Natureza do sistema enzimático empregado (EG, CBH, BG)	x	x	x	x	x
Tamanho relativo das enzimas				x	

Concentração da enzima	X	X	X	X	
Adsorção	X	X	X	X	X
Sinergismo	X	X		X	
Inibição ao produto final				X	X
Desativação mecânica					X
Inativação térmica					X
Irreversibilidade da ligação com a lignina				X	X

1: Aumento aparente da cristalinidade do substrato durante toda a hidrólise;

2: Diminuição da DP;

3: Mudanças contínuas na acessibilidade de superfície, e topologia de superfície;

4: Mudanças contínuas na digestibilidade do substrato;

5: Diminuição da concentração de enzima ativa.

EG: Endoglicanase; CBH: Celobiohidrolase; BG: β -glicosidase

Fonte: ANDERSEN (2007).

Os modelos para a reação de hidrólise enzimática podem ser classificados dentro de duas categorias: tipo de modelo (empírico ou mecanístico) e tipo de substrato (puro ou impuro). A maioria dos modelos mecanísticos para a reação de hidrólise enzimática são modelos de Michaelis-Menten com algum tipo de inibição ou modelos mais detalhados com múltiplas reações. Esses modelos geralmente consideram múltiplas reações devido à ação das enzimas ou diferentes substratos (cristalino ou amorfo) ou uma combinação dos dois (RABELO, 2010).

A tabela 2.4 apresenta as características cinéticas básicas, suposições e modelagem aproximada de diversos modelos estabelecidos em diferentes estágios de compreensão da complexa reação de hidrólise da celulose.

Tabela 2.4 – Comparação de alguns modelos cinéticos de hidrólise enzimática da celulase.

Estado do substrato	Sistema Enzimático ^a	Abordagem Cinética ^b	Tipo de inibição	Referências
Material homogêneo	E ₁₂	QSS	Competitiva	HOWELL e STUCK (1975)

Material homogêneo	E ₁₂₃	MM	Competitiva	HUANG (1975)
Grau de polimerização	E ₁ , E ₂ , E ₃	MM	Não-competitiva	OKAZAKI e MOOYOUNG (1978)
Material homogêneo	E ₁₂₃	QSS	Competitiva	HOWELL e MANGAT (1978)
Cristalino e amorfo	E ₁₂₃	MM	-	PEITERSEN e ROSS (1978)
Cristalino e amorfo	E ₁₂₃	QSS	Competitiva	RYU <i>et al.</i> (1892)
Material homogêneo	E ₁₂ , E ₃	-	Não-Competitiva	FAN e LEE (1983)
Ativo e inerte	E ₁₂₃	QSS	Competitiva	GAN <i>et al.</i> (2003)

a E₁ – Endoglicanase; E₂ – Celobiohidrolase; E₃ – β -glicosidase; E₁₂ – Combinação de E₁ e E₂; E₁₂₃ – Combinação entre E₁, E₂ e E₃.

b QSS – Estado quase estacionário; MM – Michaelis-Menten.

Fonte: GAN *et al.* (2003).

2.3.3 Etanol de segunda geração

As usinas de produção de biocombustíveis de segunda geração estão atualmente em desenvolvimento, e várias foram construídos até o momento em todo o mundo, com o objetivo principal de converter biomassa lignocelulósica em etanol. Essas instalações geralmente utilizam um processo de "conversão bioquímica" em que a biomassa tem seu tamanho reduzido por moagem, seguido de uma leve etapa de pré-tratamento termoquímico para quebrar a parede celular da planta em moléculas de celulose, hemicelulose e pectina. Estas estruturas são despolimerizadas pelo ataque de biocatalisadores e convertem-se em açúcares. A última etapa converte esses açúcares em biocombustível e/ou produtos químicos (Figura 2.12) (CHUNDAWAT *et al.*, 2011).

A etapa de hidrólise enzimática é a segunda etapa de despolimerização de biomassa e é um importante fator de custo na produção de bioetanol, devido ao alto custo da produção de enzimas (ADEN; FOUST, 2009; DAVIS *et al.*, 2013; HUMBIRD

et al., 2011; KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2012). No entanto, as celulases são seletivas para a produção de glicose e produzem menos inibidores ao catalisador. Assim, esforços significativos são utilizados para entender e melhorar a compreensão do processo de despolimerização enzimática de biomassa com o objetivo de diminuir o custo da produção de (LYND *et al.*, 2002; PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; ZHANG; LYND, 2004).

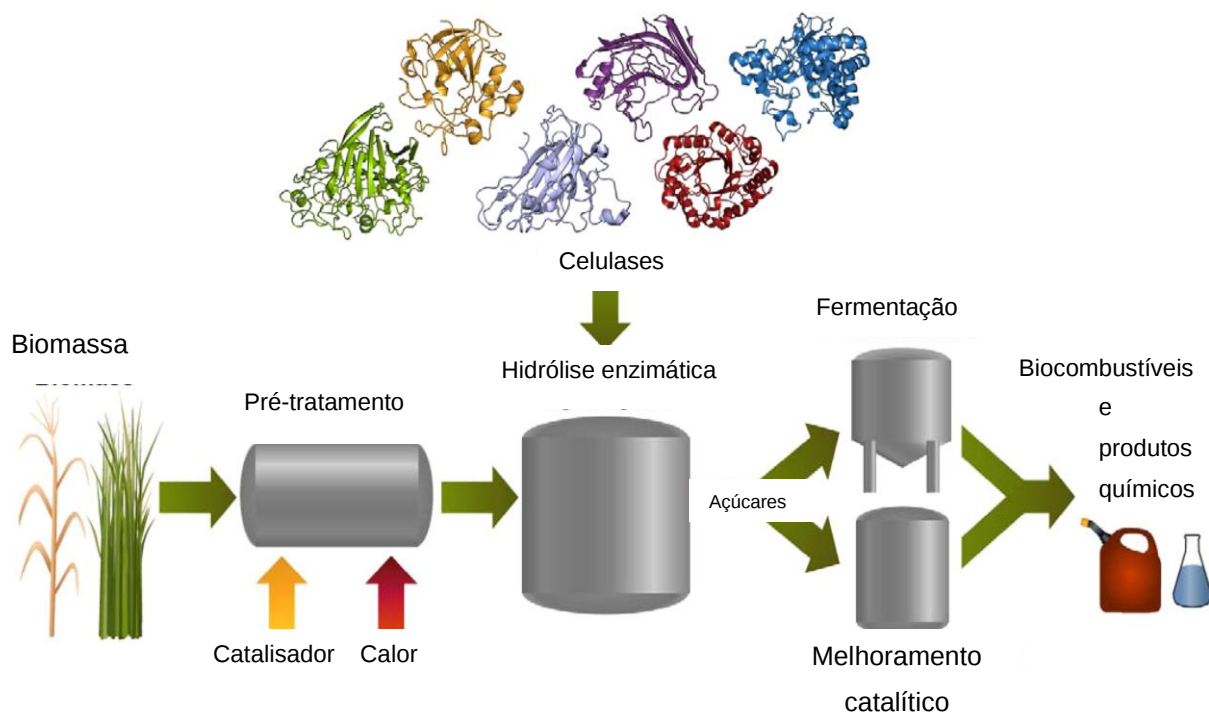
2.4 Biocatálise

A biocatálise envolve a aplicação de enzimas (biocatalisadores) em reações químicas e explora a natureza da catálise para novas propostas de síntese (DRAUZ *et al.*, 2012). Em processo biocatalítico, a escolha da enzima como catalisador é atrativo para a indústria, devido a diminuição nas etapas do processo. Cada enzima é selecionada para uma aplicação biocatalítica específica e para um tipo de substrato. Depois dessa etapa é possível otimizar as propriedades enzimáticas. Hoje, a área de biocatálise, está bem estabelecida em nível industrial, após várias fases de investigação, pesquisa e invenções biotecnológicas.

Há 100 anos, os pesquisadores documentaram que os componentes das células vivas poderiam ser usados para transformações bioquímicas. Rosenthaler usou um extrato vegetal para sintetizar (R) - mandelonitrila, a partir de benzaldeído e cianeto de hidrogênio (ROSENTHALER, 1908, apud BILAL, 2018). Outras pesquisas se iniciaram após essa descoberta, como o uso de detergentes para limpeza de proteases, a conversão de glicose em frutose utilizando a enzima glicose isomerase e a fabricação de antibióticos semissintéticos usando a penicilina G acilase (ESTELL *et al.*, 1985; JENSEN e RUGH, 1987; BRUGGINK *et al.*, 1998, apud BILAL, 2018). As restrições a respeito da estabilidade enzimática foram os grandes desafios técnicos para essas aplicações. A imobilização enzimática possibilitou oferecer alta estabilidade à enzima e facilitou a capacidade de repetição dos biocatalisadores, caracterizando a primeira onda da biocatálise (BILAL *et al.*, 2018a). Na segunda onda da biocatálise, foram utilizadas estratégias iniciais de engenharia de proteínas, especialmente tecnologias de estrutura enzimática, para ampliar a faixa de enzimas em reações de biocatálise de substratos incomuns. Esta tecnologia permitiu a fabricação de intermediários sintéticos não naturais, como por exemplo, a biossíntese

de produtos farmacêuticos e químicos de valor agregado. Outros exemplos importantes são: o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de pressão arterial (diltiazem) que utiliza lipases; síntese de herbicidas mediada pela hidroxinitrila liase; síntese de fármacos (estatina), catalisada pela carbonil redutase para redução de colesterol e a reação de hidratação de acrilonitrila em acrilamida, catalisada pela nitrila hidratase, para a produção de polímeros (GRIENGL et al, 2000; HILLS, 2003; NAGASAWA, 1990, apud BILAL, 2018). Os desafios dessa geração não envolviam apenas a estabilidade da enzima, como também, a otimização do biocatalisador em substratos não naturais.

Figura 2.12 - Visão geral de um processo convencional de conversão bioquímica para produzir combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica. As celulasas podem ser usadas para converter a porção de celulose da biomassa não alimentar, como resíduos agrícolas e culturas energéticas, em açúcares fermentáveis para posterior conversão em combustíveis renováveis e produtos químicos.



Fonte: PAYNE *et al.* (2015).

Na terceira onda da biocatálise, Pim Stemmer e Frances Arnold, introduziram métodos de evolução direcionada que podem modificar extensivamente os biocatalisadores em pouco tempo. Vale ressaltar, que Arnold foi laureada com o prêmio Nobel de química em 2018, pela aplicação desses métodos em biomoléculas.

Essa tecnologia envolve ciclos recorrentes na alteração de aminoácidos randômicos, que foram selecionados e rastreados para encontrar aminoácidos mutantes com melhor estabilidade catalítica e especificidade ao substrato e seletividade. Atualmente, muitos cientistas estão melhorando a eficiência da evolução direcionada para construir bibliotecas "mais inteligentes". As vias metabólicas foram otimizadas, em alguns casos, por exemplo, a integração de genes pertinentes de vários hospedeiros naturais para biossintetizar 1,3-propanodiol, essa molécula é obtida a partir do glicerol. No entanto com essa nova tecnologia o 1,3-propanodiol será produzida a partir da glicose, o que possibilita a obtenção de produtos químicos a partir de recursos renováveis (NAKAMURA, 2003, apud BILAL, 2018).

2.4.1 Estratégias para aumentar a estabilidade enzimática da celulase

As enzimas livres estão disponíveis comercialmente e podem ser aplicadas em escala industrial, no entanto o uso dessas enzimas é limitada devido à baixa eficiência catalítica, baixa estabilidade enzimática, inibição ao produto final, inativação por cisalhamento, adsorção inespecífica etc. (BISWAS *et al.*, 2014; GUPTA; BISARIA, 2018).

A utilização de enzimas celulolíticas para hidrólise da lignocelulose em grande escala depende do desenvolvimento das propriedades enzimáticas (ASGHER *et al.*, 2014). Atualmente, foram desenvolvidas estratégias para aumentar a eficiência na produção de celulases com baixo custo (KUHAD *et al.*, 2016). As pesquisas em estabilidade enzimática englobam: engenharia de proteínas, incluindo evolução dirigida; mutagênese em local dirigido e extensão em cadeias de peptídeo. Outras estratégias abordam encontrar novas enzimas a partir de extremófilos, a produção de recombinantes em enzimas termofílicas em hospedeiros mesofílicos e cepas industriais estão sendo exploradas para produzir enzimas celulolíticas estáveis. Além de produzir enzimas estáveis, existem outras alternativas fáceis e econômicas para estabilizar a enzima, como a engenharia de meios de reação, uso de aditivos e imobilização de enzimas.

Na tabela 2.5 apresenta as características desejáveis da celulase para a eficiência na hidrólise de celulose.

Tabela 2.5 – Características ou propriedades desejáveis de celulasas para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática de celulose.

Propriedades	Impacto na biocatálise
Alta atividade específica	Enzimas com maior atividade específica (unidades em mg ⁻¹ de proteína) podem ser utilizadas em quantidades menores para alcançar o mesmo grau de hidrólise.
Alta eficiência catalítica em celulose cristalina	Celulasas com alta eficiência catalítica reduz o tempo necessário para hidrolisar a celulose cristalina.
Alta estabilidade térmica	Enzimas termoestáveis podem ser usadas em altas temperaturas para acelerar as taxas de hidrólise de celulose.
Resistência a inibição do produto final	A maioria das celulasas é inibida pelos produtos de hidrólise de celulose (glicose e celobiose). As celulasas resistentes à inibição do produto final podem produzir misturas mais concentradas de açúcares, o que evitará a necessidade de concentrar as enzimas antes da bioconversão em bioprodutos como o etanol.
Estabilidade as forças de cisalhamento	Celulasas resistentes ao cisalhamento serão úteis em reatores de hidrólise que necessitam de agitação para suspender o sólido de celulose.

Fonte: BISWAS *et al.* (2014).

2.4.2 Imobilização enzimática

A comercialização de enzimas imobilizadas iniciou-se na década de 1960 e foi desenvolvida como uma técnica de engenharia baseada em produtos químicos para facilitar a reutilização e a recuperação de enzimas (TOSA *et al.*, 1967). Nos últimos anos, existem diversas abordagens de imobilização, como fixação em suportes sólidos e materiais porosos, conjugação com biopolímeros, encapsulamento em géis e desenvolvimento de agregados ou cristais enzimáticos (BILAL *et al.*, 2018a; ZHANG

et al., 2015). Entre várias estratégias de imobilização, a fixação enzimática em superfícies sólidas por adsorção física ou ligações covalentes estabeleceu-se como uma das melhores técnicas. As múltiplas ligações covalentes entre os suportes e as moléculas de proteína podem modificar consideravelmente a conformação da proteína para melhorar a retenção na atividade e na estabilidade enzimática (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). A imobilização melhora significativamente as propriedades enzimáticas, como pH e estabilidade térmica, a tolerância a solventes orgânicos, a atividade e a seletividade, para atender às crescentes demandas industriais de maneira sustentável (SHELDON; VAN PELT, 2013).

As enzimas livres são solúveis em água, portanto não há possibilidade de recuperação em soluções aquosas de forma que são utilizadas apenas uma vez no processo e posteriormente são descartadas. Os custos de processos biocatalíticos são significativamente diminuídos ao imobilizar as enzimas. As vantagens da imobilização enzimática incluem: (i) alta proporção de substrato enzimático; (ii) aumenta o nível de reutilização; (iii) menor chance de contaminação; (iv) aumenta e melhora o processo catalítico; (v) o controle do processo e a estabilidade do produto. No entanto, o processo de imobilização possui algumas desvantagens que são listadas a seguir: (i) alto custo do substrato; (ii) funcionalização da superfície do suporte (iii) inativação da enzima causada pelo calor gerado no sistema (BILAL et al, 2018).

2.4.2.1 Métodos de imobilização enzimática

Artigos recentes demonstraram que as enzimas imobilizadas podem exibir atividades melhoradas quando comparada com a enzima livre em solução aquosa (BILAL *et al.*, 2018b). A Figura 2.13 ilustra alguns métodos utilizados como estratégia de imobilização enzimática.

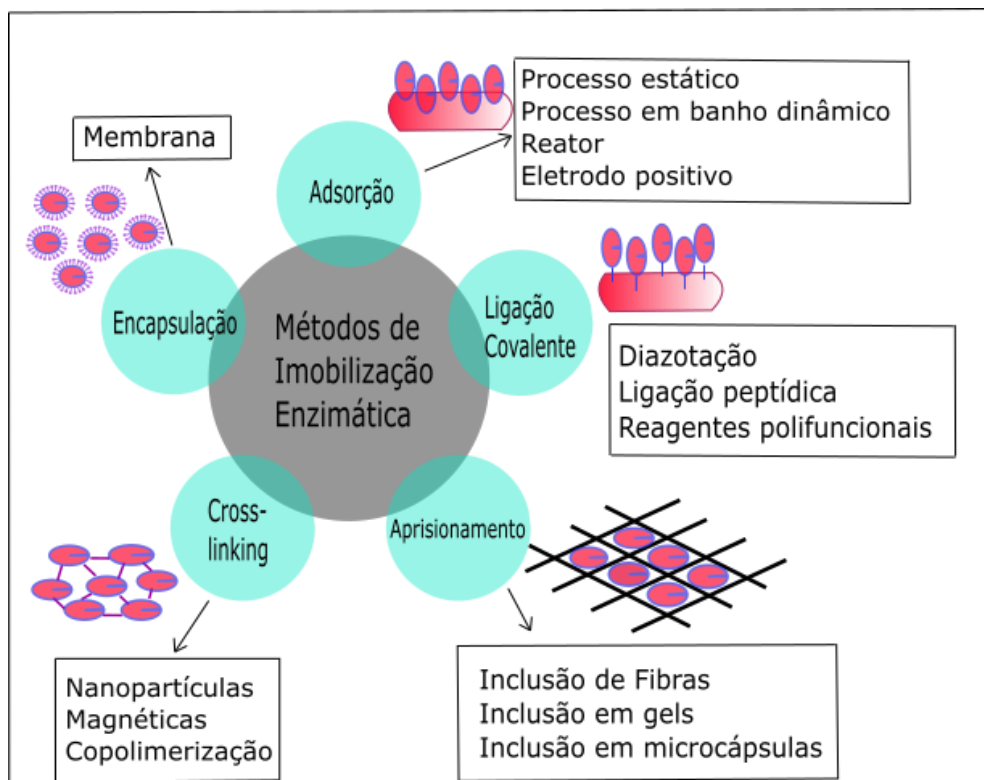
Contudo, não existe um método perfeito ou um suporte ideal para a imobilização enzimática. Em geral, o método para imobilização enzimática pode ser classificado de acordo com o tipo de ligação entre enzima e suporte, entre as quais se destacam: adsorção física, aprisionamento, encapsulamento, ligações covalentes, interações por bioafinidade e reticulação (CLEAs – Cross-Linked Enzyme Aggregates). Uma combinação dessas ligações também é utilizada no processo de

imobilização de enzimas. Por exemplo, a adsorção seguida de reticulação (CLEAs) ou ligação covalente (LEE; AU-DUONG, 2018). A seguir são destacadas de maneira detalhada os tipos de imobilização enzimática.

- **Adsorção Física**

A adsorção física depende, principalmente, das forças de van der Waals, da ligação de hidrogênio, da interação hidrofóbica e de interações eletrostáticas entre enzimas e moléculas presentes na superfície do suporte. Nos métodos de ligação covalente e reticulação, ocorre uma modificação na estrutura da enzima, em alguns casos promovem a desativação enzimática. Essa modificação estrutural não ocorre utilizando o método de adsorção física. No entanto, este método mais simples de imobilização também possui desvantagem devido a possibilidade de desacoplamento das moléculas de enzima do suporte, isso ocorre em condições desfavoráveis, durante o uso e o armazenamento do derivado imobilizado (LEE, 2018).

Figura 2.13 - Métodos de imobilização enzimática.



Fonte: BILAL *et al.* (2018).

- **Aprisionamento e Encapsulamento**

O método de encapsulamento e aprisionamento para a imobilização enzimática, mantém a enzima presa dentro de materiais inertes e porosos ou em membranas. Isso ocorre quando a enzima é induzida a interagir com soluções salinas poliméricas ou inorgânicas para formar partículas insolúveis. As enzimas aprisionadas dentro das partículas sólidas estão bem protegidas de ambientes externos agressivos de reação e, conseqüentemente, a estabilidade enzimática é mantida. A desvantagem deste método é a obtenção de uma atividade hidrolítica mais baixa da enzima, isso ocorre devido a uma resistência à transferência de massa gerada pelo encapsulamento (SHARMA *et al.*, 2014). Vários materiais poliméricos naturais, como: celulose, alginato, colágeno, quitosana e amido, nanopartículas mesoporosas de sílica e alguns polímeros condutores, como a polianilina e o nafion foram usados para encapsular e aprisionar enzimas (SHARMA *et al.*, 2014). No entanto, não há muitos relatos de enzimas encapsuladas ou aprisionadas em nanopartículas provavelmente devido à dificuldade de recuperação nas aplicações. As nanopartículas biopoliméricas de quitosana têm sido usadas para imobilizar as enzimas por aprisionamento e também por ligação covalente (TANG *et al.*, 2019).

- **Ligações covalentes**

A enzima pode se ligar covalentemente a um suporte insolúvel, desde que este suporte tenha sido funcionalizado por grupos orgânicos na superfície. As nanopartículas possuem propriedades ópticas, elétricas, químicas e catalíticas (capacidade para facilitar a transferência de elétrons) e possuem propriedades associadas à alta especificidade da área de superfície. A tabela 2.6 agrupa os quatros exemplos de grupos funcionais de uma estrutura enzimática, que foram imobilizados covalentemente na superfície das nanopartículas. A atividade enzimática, a dinâmica molecular da enzima e a conformação enzimática podem sofrer alteração após a imobilização devido à acessibilidade limitada do substrato ao sítio ativo da enzima que não está adequadamente orientado (SECUNDO, 2013).

Tabela 2.6 – Exemplos de ligações covalentes no processo de imobilização enzimática.

Tipo de ataque covalente	Grupos reacionais		Catalisador	Referências
	Enzima	Nanopartículas		
Reação amino com Carboxila	Amino	Carboxila	NHS e carbodiimina	YU <i>et al.</i> , 2013; LI <i>et al.</i> , 2007
	Carboxila	Amino		
Reação aldeído com Amino	Amino	Aldeído	Com/sem agentes redutores	WANG <i>et al.</i> , 2013; HOU <i>et al.</i> , 2015
Reação amino com epóxido	Amino	Epóxido	pH neutro	PREETY e HOODA, 2014
Ligação com tiol	Tiol	Carbonilas insaturadas Ex. maleimidas	pH fisiológico (6,5-7,5)	ZHANG <i>et al.</i> , 2005; HOLLAND <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Lee *et al.* (2018)

- **Interações por bioafinidade**

Várias moléculas que possuem construção proteína-proteína e proteína-molécula foram investigadas e desenvolvidas para a imobilização enzimática. Por exemplo, as interações entre proteínas marcadas de histidina com metais de transição quelatos e interações entre a avidina ou estreptavidina com enzimas funcionalizadas e com biotina (SOMMARUGA *et al.*, 2014). A imobilização utilizando a interação por bioafinidade possui a vantagem de a enzima ser fixada em uma orientação específica para que o sítio ativo não seja bloqueado por algum suporte insolúvel.

- **CLEAs**

Há grande interesse em utilizar o método de reticulação ou ainda agregados de enzimas por ligação cruzada, a sigla em inglês *CLEAs* (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*) no processo de imobilização enzimática, devido ao alto rendimento, alta estabilidade e baixo custo do processo por não ser necessário a adição de outro suporte de apoio (SHELDON et al, 2013).

Os agregados de enzimas *CLEAs* são desenvolvidos pela precipitação simples de uma enzima, com adição de uma solução de sal (como o sulfato de amônio) ou um solvente orgânico miscível com água, seguido de reticulação com um reagente bifuncional (Figura 2.13). A imobilização por *CLEAs* tem o papel de purificar e imobilizar a enzima em uma única etapa da operação. A tecnologia de *CLEAs* tem sido amplamente aplicada em muitas enzimas, como: hidrolases, liases, oxidoredutases e transferases. *CLEAs* magnéticos também é uma boa opção para a biotransformação de lignocelulose em biocombustíveis de segunda geração (BHATTACHARYA; PLETSCHE, 2015)

Desenvolvido a partir do *CLEC* (*Cross-Linked Enzyme Crystal*), o *CLEA* também apresenta as vantagens, tais como: (i) alta atividade específica; (ii) alta resistência a solventes orgânicos; (iii) resistência quando submetidos a pH extremo e (iii) melhor estabilidade térmica. Essas características são consequências da imobilização, que diminui a flexibilidade da enzima e favorece o desdobramento de estruturas terciárias da enzima, necessária para a atividade catalítica (SHELDON, et al., 2013). Assim, os *CLEAs* não perderiam muita atividade após vários ciclos de reutilização.

Por exemplo, a estabilidade térmica da subtilisina utilizando *CLEAs* foi aprimorada quando comparada com a enzima livre, a enzima imobilizada manteve 45% da atividade catalítica após 10 ciclos (STROHMEIER et al., 2011). A investigação de *CLEAs* de sacarose-fosforilase constatou que a temperatura ótima da enzima imobilizada foi aumentada em 17 °C e apresentou atividade em uma faixa de pH mais ampla (SUN et al., 2016). A estabilidade de armazenamento de enzimas imobilizadas também foi melhorada, os *CLEAs* mantiveram cerca de 67% da atividade inicial e as enzimas livres apresentaram menos de 35% de sua atividade inicial (TOSA, 1965, apud XU, 2018).

As propriedades de CLEAs promovem o desenvolvimento de novos processos para as aplicações industriais. Comparado com o CLEC, as vantagens dos CLEAs são que a enzima não precisa de alto grau de purificação para o processo de imobilização (XU *et al.*, 2018).

O procedimento geral para a preparação de CLEA inclui a precipitação e a reticulação (Figura 2.14). Ao adicionar sais, ou solvente orgânico miscível em água, ou ainda polímeros não iônicos para precipitar a enzima, obtém-se agregados em solução. Os agregados mantêm a maior parte da atividade enzimática, devido a interação não covalente entre as moléculas, formando estruturas de proteína insolúveis que não destroem a estrutura terciária (SHELDON *et al.*, 2013). A precipitação é também um processo de purificação de enzimas. Assim, o CLEA combina purificação e imobilização em uma única etapa.

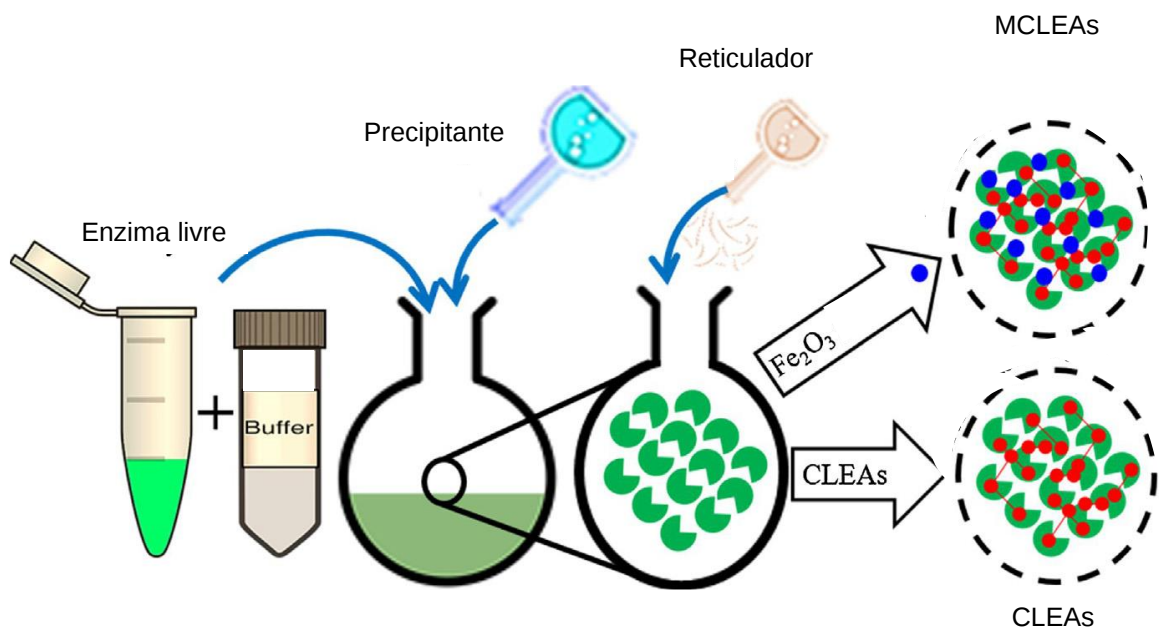
2.5 MCLEAs

As enzimas imobilizadas em nanopartículas são conhecidas como "nanobiocatalisadores". O desenvolvimento de nanobiocatalisadores é um exemplo de inovação e avanços na nanotecnologia e na biotecnologia (BUDARIN *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2015; MISSON *et al.*, 2015). A formação de nanobiocatalisadores inclui a conjugação de enzima nos vários nanomateriais usando moléculas de reticulação que favorecem a cinética química e a seletividade (HUSAIN *et al.*, 2011; INGLE *et al.*, 2017).

A produção de açúcares e biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica por meio da hidrólise enzimática e com o auxílio de nanobiocatalisadores magnéticos é uma ideia que pode ser aplicada no setor industrial, nesta abordagem, as enzimas imobilizadas são recuperadas magneticamente e reutilizadas no substrato (KIM, 2018). A imobilização de enzimas em nanomateriais magnéticos tem atraído atualmente a atenção de muitos pesquisadores porque oferece muitas vantagens, como a alta especificidade, área de superfície, alta estabilidade, baixa toxicidade, baixa resistência à transferência de massa e biocompatibilidade (SÁNCHEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2017). Foi demonstrado que a imobilização de enzimas em suportes sólidos como nanopartículas magnéticas aumentam sua estabilidade térmica quando comparadas com a estabilidade de enzimas livres (KIM *et al.*, 2018; (CHERIAN;

DHARMENDIRAKUMAR; BASKAR, 2015).

Figura 2.14 - Ilustração esquemática de (CLEAs) e MCLEAs desenvolvido na presença de reticulador e nanopartículas de maghemita (Fe_2O_3).



Fonte: BILAL *et al.* (2018).

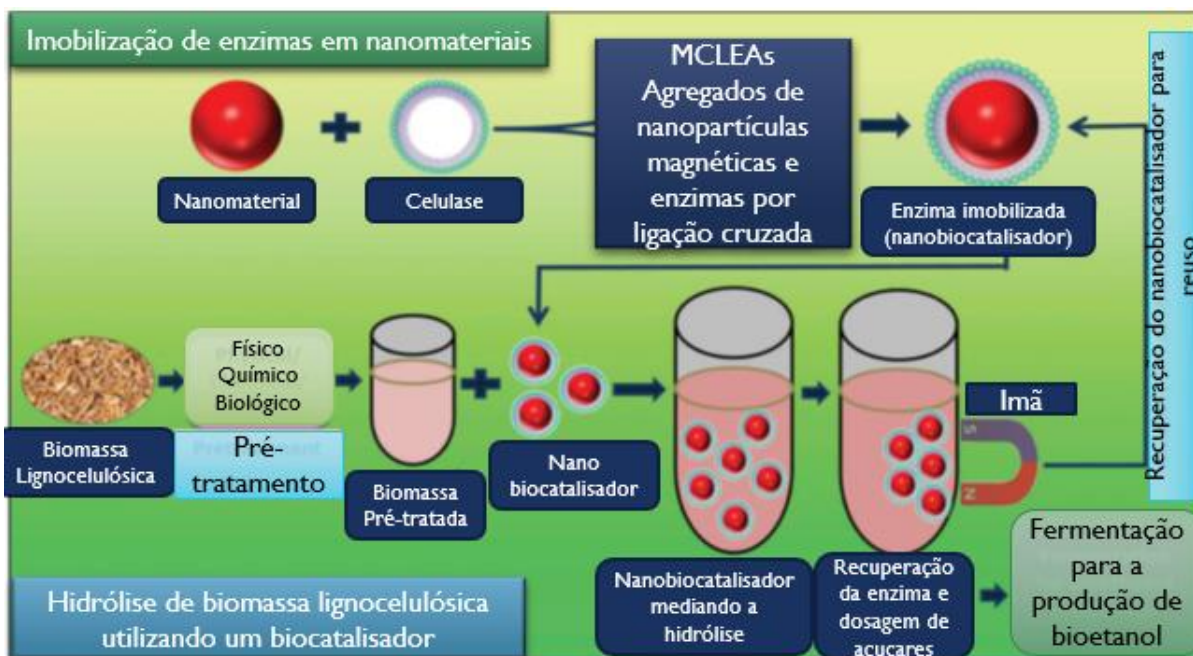
Estudos demonstraram que a imobilização da β -glicosidase em polímeros de nanofibras magnéticas pelo método de aprisionamento hidrolisou a celobiose em glicose e que esta opção de imobilização pode ser utilizada para a produção de bioetanol (LEE; AU-DUONG, 2018). Da mesma forma, a β -glicosidase (isolada de fungos) imobilizada em nanopartículas magnéticas foi utilizado como nanobiocatalisador para a hidrólise de celobiose, que teve eficiência de 93%. Além disso, cerca de 50% da atividade catalítica da enzima imobilizada se manteve após o 16º ciclo, o que confirmou uma maior estabilidade enzimática após a imobilização (ABRAHAM *et al.*, 2014).

Outro estudo, pesquisou a celulase imobilizada em nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) usando carbodiimina como polímero de ligação e foi usado com eficiência para a hidrólise da celulose microcristalina. Devido à natureza magnética das nanopartículas, a enzima pode ser recuperada facilmente e reciclada seis vezes (JORDAN; KUMAR; THEEGALA, 2011). Em outro estudo, a combinação de celulase e β -ciclodextrina foi utilizada para a hidrólise da palha de arroz. A combinação foi

preparada por imobilização de celulase isolada de *Aspergillus niger* em β -ciclodextrina conjugada com nanopartículas magnéticas usando processos de silanização e amidação reductiva. Foi relatado que a atividade catalítica da celulase imobilizada foi melhorada devido ao efeito sinérgico da β -ciclodextrina quando comparada a celulase livre (RAI *et al.*, 2018). Recentemente, Sanchez-Ramirez *et al.* imobilizaram a celulase, de *Trichoderma reesei*, covalentemente em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana usando glutaraldeído como uma molécula de reticulação. Foi observado que a enzima imobilizada reteve cerca de 80% de sua atividade após 15 ciclos, na hidrólise de carboximetilcelulose (SÁNCHEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2017).

A figura 2.15 ilustra uma representação esquemática de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas e sua aplicação na hidrólise de biomassa lignocelulósica. Na tabela 2.7 resume-se os nanomateriais mais utilizados na imobilização de diferentes enzimas e também reúne os resultados sobre a eficácia catalítica após o reuso.

Figura 2.15 – Representação esquemática de imobilização enzimática como nanomateriais magnéticos e sua aplicação na hidrólise de biomassa lignocelulósica.



Fonte: RAI *et al.* (2018).

Tabela 2.7- Nanomateriais utilizados na imobilização de várias enzimas e rendimento de imobilização e catalítica após o reciclo.

Nanomateriais	Enzima	Tipo de Imobilização	Rendimento de imobilização	Eficiência catalítica após o reciclo	Ref.
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	celulase	Ligação covalente	98%	52% após o 3º ciclo	YANG <i>et al.</i> , 2004
Nanopartículas de MnO ₂	celulase	Ligação covalente	75%	60% após o 5º ciclo	CHERIAN <i>et al.</i> , 2016
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	β -glicosidase	Ligação covalente	93%	50% após 16º ciclo	VERMA <i>et al.</i> , 2013
Nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄)	celulase	Ligação covalente	90%	10% após 6º ciclo	JORDAN <i>et al.</i> , 2011
Nanopartículas de ferrita de zinco	celulase	Ligação covalente	53%	***	MANASA <i>et al.</i> , 2017
MWCNTs* funcionalizado	celulase	Adsorção Física	97%	52% após 6º ciclo	MUBARAK <i>et al.</i> , 2017
MWCNTs funcionalizado com EDAC**	celulase	Ligação covalente	85%	75% após 6º ciclo	AHAMD <i>et al.</i> , 2018
MWCNTs funcionalizado com ácido carboxílico	celulase	Ligação covalente	98%	***	MOHAMMED-ABD <i>et al.</i> , 2012
Suporte híbrido de TiO ₂ -lignina	celulase	Interações Físicas	80%	90% após 10º ciclo	ZDARTA <i>et al.</i> , 2017
Nanopartículas superparamagnéticas	β -glicosidase e celobiohidrolase	Ligação covalente	100%	43% após 10º ciclo	SONG <i>et al.</i> , 2016
Nanopartículas magnéticas com quitosana	celulase	Ligação covalente	100%	80% após 15º ciclo	SÁNCHEZ-RAMÍREZ <i>et al.</i> , 2017
Nanosuporte de grafeno magnético	celulase	Ligação covalente	***	55% após 4º ciclo	GOKHALE <i>et al.</i> , 2013
Mesoporo de sílica	celulase	Adsorção	***	78% após	HARTONO <i>et</i>

funcionalizada com grupos vinil e amina		Física		1º ciclo	<i>al.</i> , 2010
Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ e Fe ₃ O ₄ /nanocompósito de alginato	celulase	Adsorção Física	***	56% após 1º ciclo	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2015
Nanopartícula de ouro e prata	celulase	Adsorção Física	***	78% após 6º ciclo	MISHRA <i>et al.</i> , 2015

* nanotubos de carbono com paredes múltiplas

** N-etil-N- (3-dimetilaminopropil) cloridrato de carbodiimida

*** resultado não foi mencionado

Fonte: RAI *et al.* (2018).

3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES IMOBILIZADAS EM MCLEAS

Neste capítulo são apresentadas as metodologias empregadas na preparação e na caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro funcionalizadas com APTS (Fe_3O_4 -APTS) e as celulase imobilizadas no suporte (Fe_3O_4 -CEL).

3.1 Introdução

Os avanços recentes na área de biocatálise tornaram possível a imobilização enzimática em nanoestruturas (GOKHALE; LEE, 2012). As nanopartículas devem possuir tamanhos na escala de 1 a 100 nm devido ao efeito do tamanho finito. Esse efeito está relacionado ao confinamento quântico de elétrons e à efeitos de superfície da nanopartícula, relacionando com a quebra de simetria do cristal. Além disso, as nanopartículas possuem grande área de superfície, que permite o aumento de carregamento enzimático e reduz a limitação de difusão de massa (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

A utilização de nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) para a imobilização de enzimas apresenta muitas vantagens, destacam-se entre elas, grande área de superfície e estabilidade, baixa toxicidade, baixa resistência a transferência de massa e a biocompatibilidade. A principal vantagem da utilização de magnetita está relacionada a fácil separação e reutilização do biocatalisador do meio reacional na presença de um campo magnético externo (ZHAO; ZHANG; FENG, 2012).

Outro ponto importante a ser citado é o desenvolvimento de estratégias para proteção das nanopartículas para diminuir o processo de oxidação durante e após a síntese. Neste trabalho foi utilizada a molécula 3-aminopropiltrietóxisilano para recobrir a superfície da nanopartícula magnética, além de promover a estabilização, o grupo funcional ($-\text{NH}_2$) pode se ligar com várias moléculas (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

A ativação química ocorre devido a molécula bifuncional, o glutaraldeído, que permite a ligação das nanopartículas magnéticas em uma lateral e a outra parte se liga ao aminoácido. O glutaraldeído é altamente reativo e é um agente muito versátil para a imobilização de enzimas devido a formação de bases de Schiff (GOKHALE e

LEE; 2012). Os aminoácidos da enzima (lisina, cisteína, tirosina e histidina) se ligam covalentemente com o grupo funcional da superfície do suporte com a utilização de glutaraldeído.

A aplicação de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) como transportador para imobilização de celulases foi relatado anteriormente. A maioria dos estudos se concentra na hidrólise de celulose disponível como agente químico e seu produto químico derivados. Até o momento, existem poucos relatos de sua aplicação em substratos lignocelulósico (XU et al, 2011; SANCHEZ-RAMIREZ et al, 2017).

3.2. Materiais

3.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados durante a síntese e a caracterização das amostras apresentam pureza analítica e não houve tratamento prévio de purificação. Os sais, ácidos e bases utilizados foram: cloreto de ferro(II) tetra hidratado (99%, Sigma Aldrich), cloreto de ferro(III) hexahidratado (99%, Sigma Aldrich), cloreto de sódio (97%, Mallincrodt), hidróxido de sódio (97%, Synth). Foram utilizados, glutaraldeído (25%, Sigma Aldrich), citrato de sódio (99%, Merck) e ácido cítrico (99%, Sigma Aldrich). Para a imobilização foi utilizada a celulase CELIC-CETEC 2 (Sigma Aldrich), polietilenoglicol PEG (PM 4600, Sigma Aldrich), 3-aminopropiltrietoxisilano (99%, Sigma Aldrich).

3.2.2 Técnicas empregadas de caracterização

3.2.2.1 Difração de Raios X (DRX)

As amostras foram caracterizadas em um difratômetro da Siemens, modelo D5005, usando radiação $K\alpha$ do Cobre, com comprimento de onda (λ) igual a 0,15418 nm. As medidas foram feitas em um intervalo de varredura 2θ de 20° a 80° , com velocidade de varredura $0,02^\circ$ por segundo. Todas as amostras foram analisadas na forma de pó.

As posições dos picos (2θ) e os valores de largura à meia altura (FWHM – *full*

width at half maximum) foram calculados pelo ajuste do perfil de difração a uma função Voigt utilizando o programa Origin 9.0. Pela equação de Scherrer (Equação 1) e a partir da largura à meia altura do pico mais intenso do padrão de raios-X foi determinado o tamanho de cristalito.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que, D é o tamanho médio dos cristalitos, K é a constante de proporcionalidade que depende da forma da nanopartícula, λ é o comprimento de onda da radiação de Cu, θ é o ângulo entre o feixe de raios-X e β é a largura do pico de difração.

3.2.2.2 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos no modo reflectância em um equipamento da PerkinElmer, modelo Frontier, para identificar as bandas características das nanopartículas e da celulase. As amostras foram maceradas, dispersas em KBr e prensadas em forma de pastilhas. Os espectros foram obtidos no intervalo de 2000 a 500 cm^{-1} .

3.2.2.3 Potencial Zeta

O potencial Zeta foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern. O equipamento calcula o potencial Zeta a partir de valores de mobilidade eletroforética, aplicando a equação de Henry representada abaixo (Equação 2). A mobilidade eletroforética é medida aplicando potencial em cada eletrodo da cubeta. As partículas carregadas migram para o eletrodo de carga oposta quando sua velocidade é determinada. As amostras foram dispersas em uma solução aquosa de NaCl 0,001 mol/L. As amostras foram tituladas no intervalo de pH de 3 a 10.

$$U_e = \frac{2e \zeta f(ka)}{3n} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que, U_e = mobilidade eletroforética, ζ = Potencial Zeta, ϵ = Constante Dielétrica, n = viscosidade e $f(k_a)$ = função de Henry.

3.2.2.4 Espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic light scattering - DLS*) ”.

O diâmetro hidrodinâmico foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, na qual o detector é posicionado em um ângulo de 173° em relação a luz incidente sobre a amostra, em uma temperatura de 25° C, utilizou-se água como dispersante da amostra. A técnica de espalhamento de luz dinâmico relaciona o tamanho das partículas com o movimento Browniano. O movimento Browniano refere-se à movimentação das partículas devido a colisões randômicas com as moléculas do líquido, desta maneira, o detector registra a intensidade de luz espalhada ao incidir um feixe de laser sobre a partícula em movimento, relacionando o tamanho das partículas pela equação de Stokes-Einstein (equação 3):

$$D_h = \frac{KT}{3\pi nD} \quad (\text{Equação 3})$$

em que, D_h = diâmetro hidrodinâmico, D = coeficiente de difusão translacional, K = constante de Boltzmann, T = temperatura e n = viscosidade.

3.2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (FEG-MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em microscópio JEOL JSM 7500F. As amostras foram preparadas a partir da dispersão das nanopartículas em isopropanol, posteriormente foram gotejadas sobre substrato de silício para realização das análises.

3.2.2.6 Análise Térmica (TG)

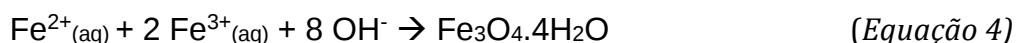
A análise termogravimétrica das amostras foi realizada em um equipamento PerkinElmer Simultaneous Thermal Analyzer (STA) 6000 sob fluxo de ar sintético 20

mL/min. As amostras foram aquecidas a 50 °C até 1000 °C a uma taxa de aquecimento de 40° C/min.

3.3 Procedimento experimental

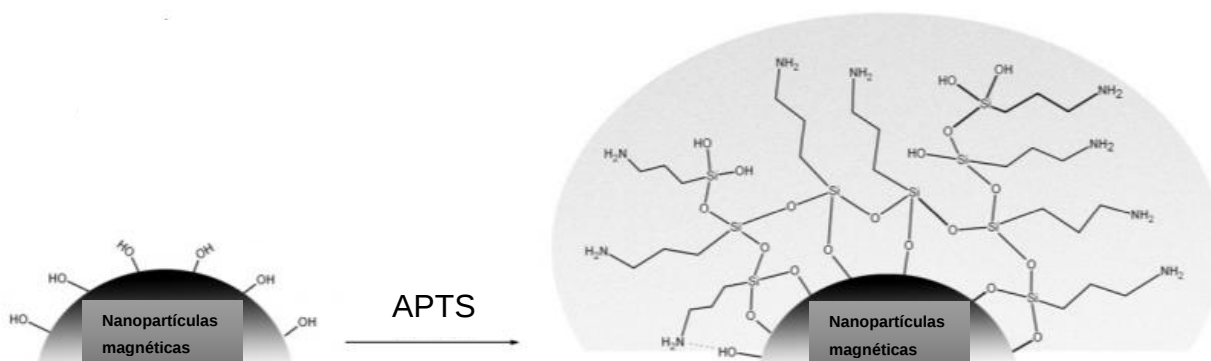
3.3.1 Síntese das nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) funcionalizadas com APTS

As nanopartículas magnéticas foram obtidas pelo método de co-precipitação em meio alcalino a partir da dissolução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na proporção 1:2 em 10 mL de água destilada. Foi preparada uma solução de hidróxido de amônio em água destilada até atingir pH entre 11 e 13. Essa solução foi aquecida, sob agitação, até 80°C e posteriormente foram adicionados 1,6 mL da solução contendo $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ para ocorrer a síntese por coprecipitação abaixo:



Após 5 minutos de reação foram adicionados 200 μL de 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTS) dispersadas no ultrassom por 1 hora. Após o término do experimento foram realizadas três lavagens com água destilada descartando-se o sobrenadante, e as nanopartículas foram armazenadas em tubos falcon à temperatura ambiente. Na figura 3.1, mostra a superfície de nanopartículas magnéticas após a funcionalização com APTS.

Figura 3.1 – Superfície de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS.



Fonte: APUD BINI *et al.* (2014).

3.3.2 Imobilização de celulase em Fe_3O_4 -APTS

Uma alíquota de 5 mL de nanopartículas funcionalizadas com APTS foi retirada e adicionada em um tubo falcon que continha 18 mL de tampão citrato pH 4,8. Posteriormente foram adicionados 2 mL de glutaraldeído (25%); a solução foi agitada em um agitador vórtex e depois permaneceu em repouso por 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se com água e solução tampão (cinco vezes com cada solvente) para garantir a retirada do glutaraldeído. Foi adicionada uma alíquota de 5 mL de celulases CELIC CETEC 2 em tampão citrato de sódio 4,8 e posteriormente 0,01 g de PEG foram adicionadas. A solução foi agitada por 3 horas para a adição de 5 mL de nanopartículas e 200 μL de glutaraldeído, que manteve a agitação por mais 16 horas, sob temperatura de 25°C. Com a ajuda de um ímã, a solução foi lavada 5 vezes com água e tampão citrato (pH 4,8) para a retirada de celulase não imobilizada.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas magnéticas e biocatalisador magnético.

As nanopartículas magnéticas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, por se tratar de um método simples, rápido e barato. As nanopartículas foram obtidas pela adição de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em uma solução aquosa de hidróxido de amônio, após essa etapa adicionou-se o organoalcóxissilano, APTS, para a funcionalização das nanopartículas sintetizadas. Esse processo resultou em precipitados de coloração preta em meio básico (pH entre 11 e 13). A suspensão coloidal apresentou coloração marrom após duas semanas de armazenamento a temperatura ambiente, o que indica mudança de estado de oxidação da fase magnetita (Fe_3O_4) para maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) devido ao contato da solução com o ar atmosférico. Essa modificação pode ser visualizada na figura 3.2.

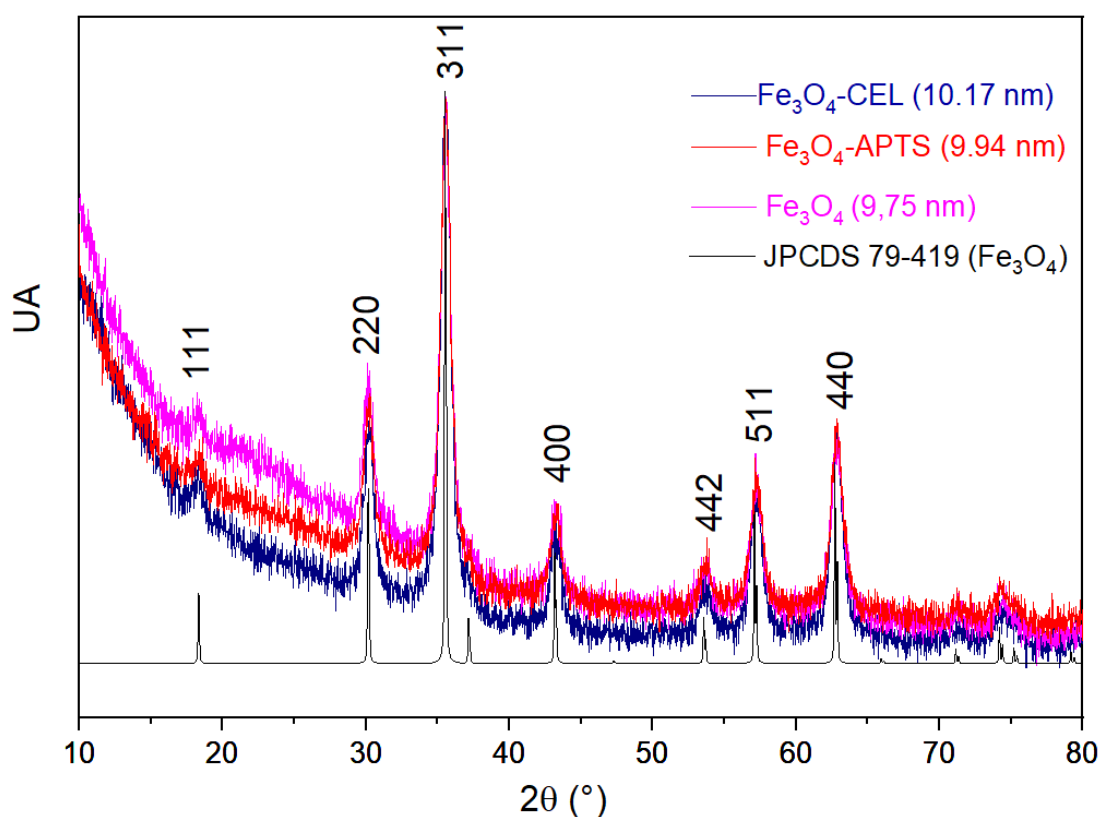
Figura 3.2 - Amostra de Fe_3O_4 -APTS.



Fonte: Elaborada pela autora

Os difratogramas de raios-X são apresentados na figura 3.3 foram obtidos para as amostras de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sem recobrimento na superfície (Fe_3O_4), com funcionalização da superfície (Fe_3O_4 -APTS) e imobilizadas com a celulase (Fe_3O_4 -CEL), respectivamente. Os difratogramas mostram picos de Bragg (3 1 1), (2 2 0), (5 1 1) e (4 4 0) na mesma posição da estrutura padrão de magnetita (cartão JCPDS nº 39-1346), apresentando padrão de reflexões característico da estrutura cúbica do tipo espinélio. Os picos são intensos e possuem alargamento típico de nanopartículas magnéticas. Não foram encontrados picos que pudessem ser atribuídos a segunda fase.

Figura 3.3 - Difratoograma de Raios X comparando o padrão magnetita com as amostras Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS e Fe_3O_4 -CEL.



Fonte: Elaborada pela autora.

Pela equação de Scherrer (Equação 1) e a partir da largura a meia altura do pico mais intenso (3 1 1) do padrão de raios-X foi determinado o tamanho de cristalito das amostras analisadas de nanopartículas. As amostras de Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS e Fe_3O_4 -CEL apresentaram tamanho de cristalito de 10 nm. Estes tamanhos se encontram na faixa de 5 a 20 nm, geralmente, característico de monodomínios que apresentam comportamento superparamagnético (MORTE, 2017). As três amostras apresentaram tamanhos de cristalitos semelhantes as nanopartículas nuas de Fe_3O_4 , isso significa que o procedimento de revestimento com APTS e o processo de imobilização enzimática não afeta a forma e o tamanho médio dos cristalitos (AL-RASHDI *et al.*, 2018).

As amostras de Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS, Fe_3O_4 -CEL e CEL livre foram medidas em água para determinar o diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersividade (PDI) em solução. Os diâmetros hidrodinâmicos das amostras apresentaram diâmetros muito maiores do que o estimado pela técnica de difração de

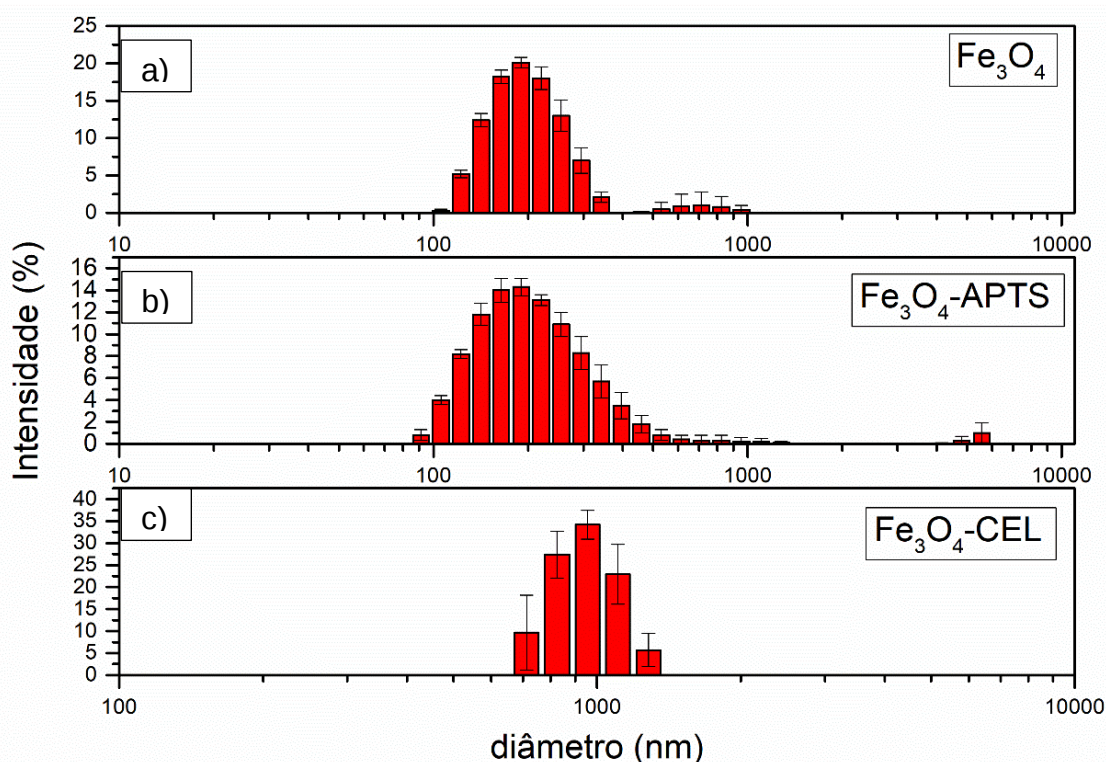
raios-X. Esse resultado é esperado devido a camada de hidratação e a região difusa de cargas formadas pelos contra-íons que são consideradas na técnica de espalhamento dinâmico da luz. As amostras estudadas nas dispersões coloidais são apresentadas na tabela 3.1 e na figura 3.4.

Tabela 3.1 - Diâmetro Hidrodinâmico das amostras Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$.

Amostras	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	PDI
Fe_3O_4	288	0,388
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$	221	0,304
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$	1335	0,374

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3.4 - Tamanho hidrodinâmico das amostras por DLS.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores do índice de polidispersão são maiores que 0,1, indicando que a

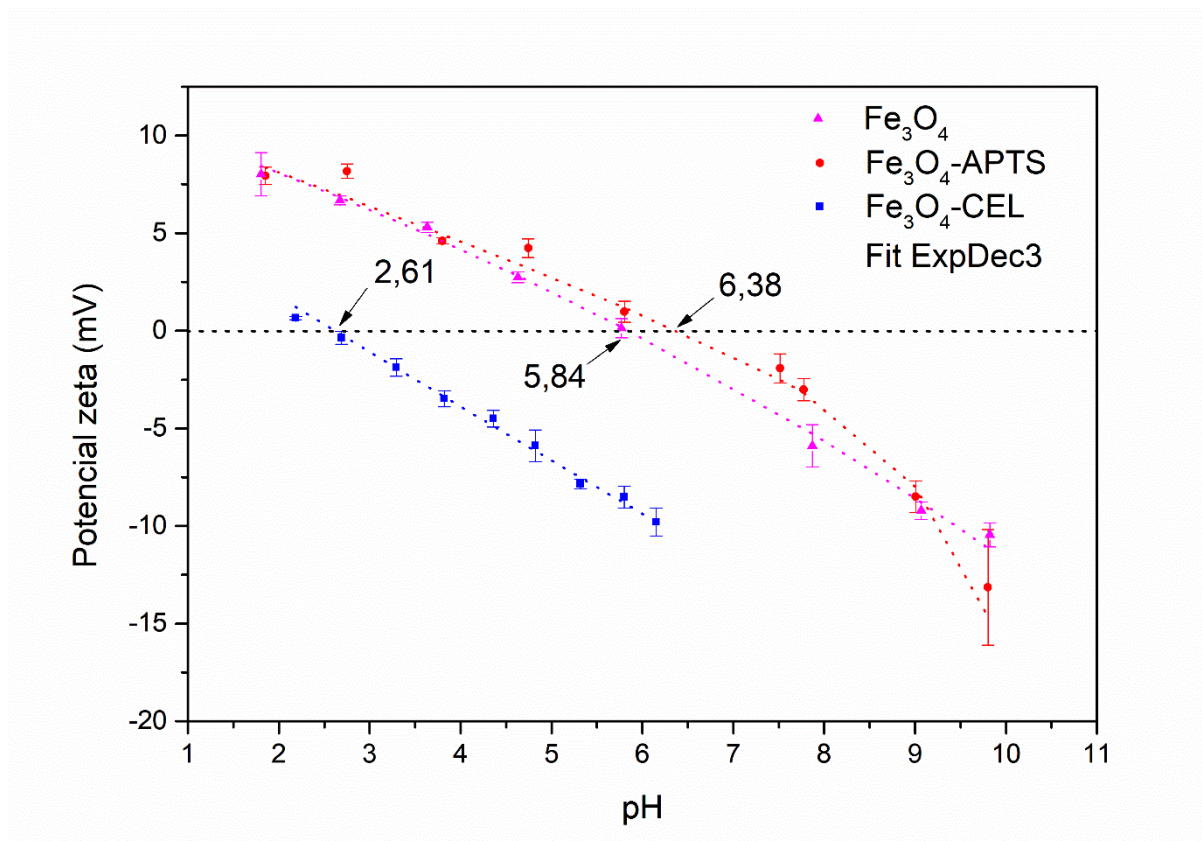
magnetita preparada é constituída por nanopartículas com alta dispersão de tamanhos. Esse comportamento polidisperso pode ser observado na figura 3.4.a. A curva de distribuição de tamanho de nanopartículas sem recobrimento de superfície apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de $228 \pm 1,00$ nm. Devido ao método de preparação por coprecipitação da magnetita não se deve descartar a formação de agregados. Os grãos produzidos possuem alta dispersão de tamanhos, o que dificulta o controle e a distribuição de tamanho, principalmente em nanopartículas menores que 20 nm (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

Após a funcionalização com APTS, as nanopartículas apresentaram maior variação de tamanhos quando comparada com a magnetita antes da reação de policondensação. As populações de Fe_3O_4 -APTS variaram entre tamanhos de 90 e 220 nm, com diâmetro hidrodinâmico médio de $221 \pm 3,80$ nm. Esse resultado indica que o tamanho de nanopartículas magnéticas depende de dois mecanismos. No primeiro negligencia a ideia de agregação e assume que a distribuição de tamanho pode ser alcançada por uma rápida explosão inicial de nucleação, seguida por crescimento a difusão, que está limitada pela adição de APTS condensado diretamente na superfície da nanopartícula. O segundo mecanismo, de agregação controlada, assume que a nucleação ocorre continuamente durante toda a reação, onde os núcleos agregam-se uns aos outros, produzindo uma distribuição de tamanhos (ALMEIDA, 2008). A adição de APTS leva a uma melhor organização na distribuição de tamanhos de nanopartículas, como observado na figura 3.4.b, o que sugere que não necessariamente aumentará o diâmetro hidrodinâmico médio.

A amostra de Fe_3O_4 -CEL apresentou diâmetro hidrodinâmico de 1335 nm, este grande aumento de tamanho, ocorreu devido a ligação do complexo enzimático de celulase na superfície das nanopartículas. A imobilização da celulase promoveu aumento considerável na tamanho do material.

O potencial zeta de superfície foi medido com a finalidade de estudar a carga na superfície das nanopartículas magnéticas em função do pH. As modificações na carga de superfície das nanopartículas podem ser observadas antes, após a funcionalização com grupos aminas na reação de policondensação com o APTS e na imobilização com a celulase. Esta análise foi realizada para as amostras Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS, Fe_3O_4 -CEL (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Potencial zeta das amostras Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$.



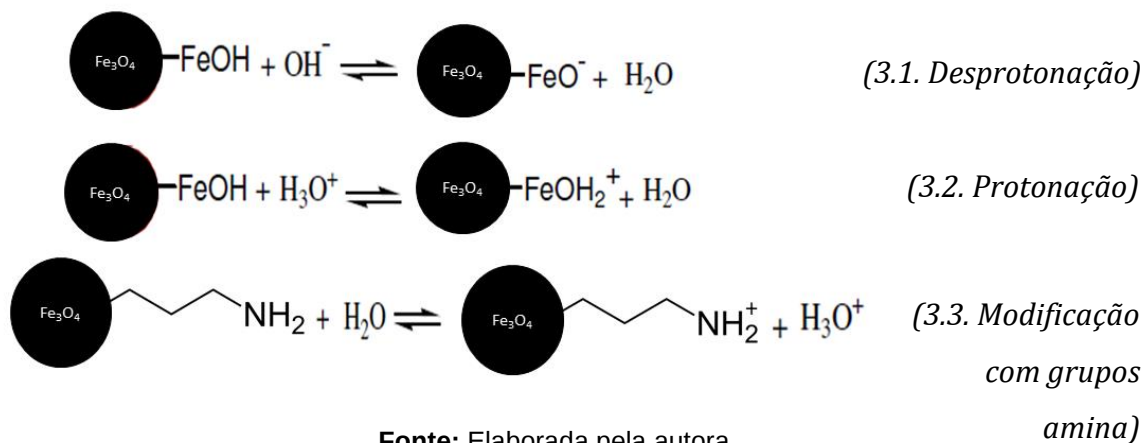
Fonte: Elaborada pela autora

A presença de cargas na superfície das nanopartículas ocorre de acordo com as reações de equilíbrio mostradas na figura 3.6. As equações (3.1) e (3.2) representam, respectivamente, a desprotonação e protonação da superfície de nanopartículas de magnetita. A equação (3.3) exemplifica a superfície de nanopartículas funcionalizadas com grupos amina.

A curva de titulação das amostras de Fe_3O_4 apresentou valores positivos de potencial zeta em pH ácido, refletindo a densidade de cargas positivas na superfície das nanopartículas de óxido de ferro, uma vez que os grupos Fe-OH se encontram protonados (Fe-OH_2^+). Em pH 5,84, o potencial zeta possui valor igual a zero, indicando neste ponto a carga nula de superfície das nanopartículas, também chamado de ponto isoelétrico. Em pH próximos ao ponto isoelétrico (PI), as nanopartículas se agregam e se sedimentam rapidamente. Em meio básico, os valores de potencial zeta apresentam sinal negativo, os grupos Fe-OH presentes em sua superfície, estão desprotonados (Fe-O^-) e a superfície adquire carga negativa

(APUD BINI, 2014).

Figura 3.6 – Representação da formação de cargas de superfície na magnetita.



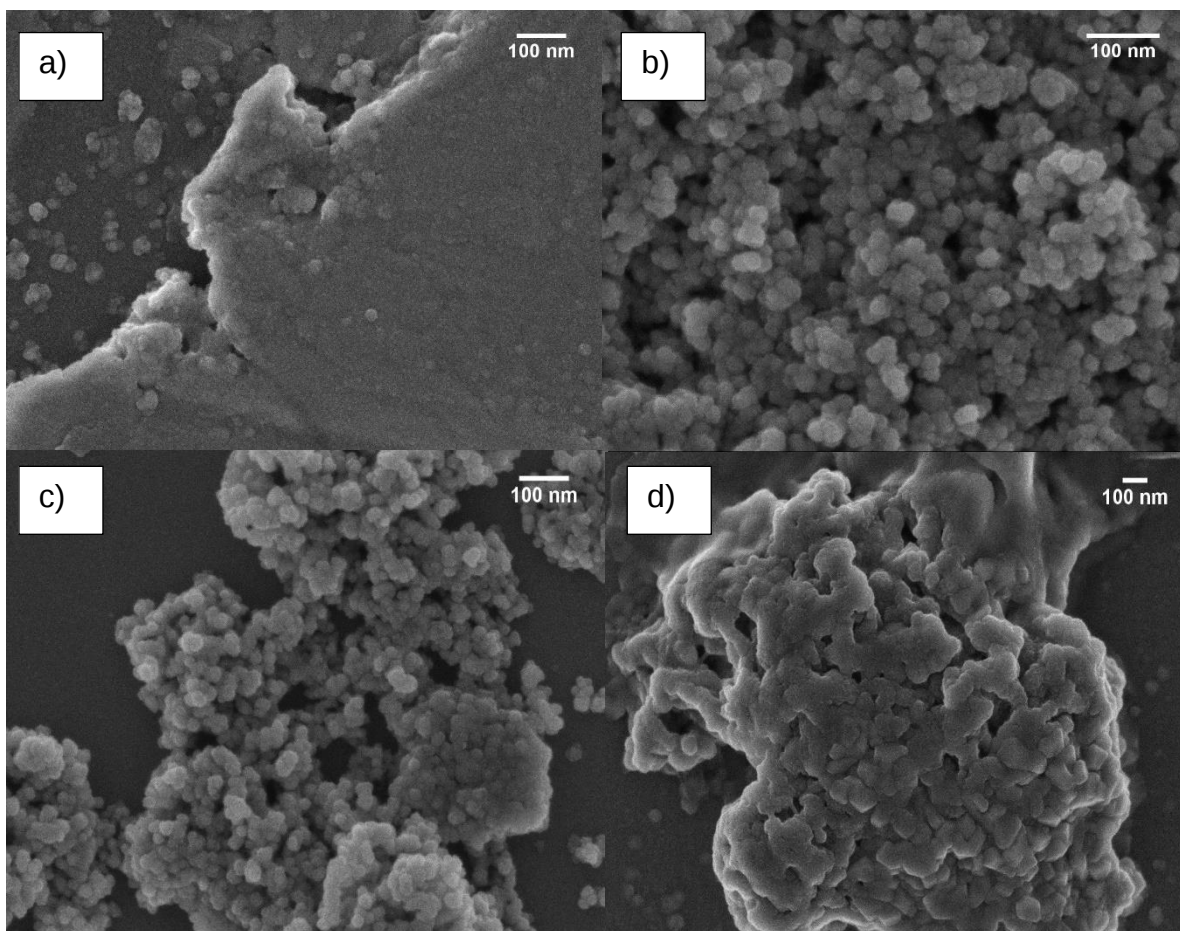
As nanopartículas funcionalizadas, Fe₃O₄-APTS, apresentaram carga nula de superfície em pH 6,38. Neste ponto ocorre a formação de agregados devido à presença de grupos amina com carga neutra (NH₂). Vale ressaltar que existem várias ligações entre a superfície da nanopartículas e o APTS como indicado na figura 3.1, no entanto nesta representação foi mostrada apenas uma ligação para melhor visualização das reações. Observa-se que o valor de pH no ponto isoelétrico é maior após a funcionalização com APTS, devido à presença de grupos amina na superfície que possuem pKa de 10,64. Em meio ácido, os valores de potencial são positivos e são referentes aos grupos amina que estão protonados (NH₃⁺). Em meio básico, o potencial será negativo, neste momento os grupos amins na superfície estarão desprotonados (NH₂⁻).

A imobilização de celulasas nas nanopartículas pode ser observada devido à diminuição do ponto isoelétrico para 2,61. A celulase se comporta como uma molécula anfotérica e possui grupos funcionais ácidos e básicos. A carga líquida de superfície é afetada pelo pH e pode se tornar mais carregada positivamente ou negativamente devido a perda e ao ganho de prótons. Após o ponto isoelétrico, as celulasas imobilizadas são carregadas negativamente (WANG *et al.*, 2013).

As imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras de CEL, Fe₃O₄, Fe₃O₄-APTS e Fe₃O₄-CEL são apresentadas na figura 3.7. A figura 3.7.a, apresentou agregados do complexo enzimático de celulase CELIC CTEC 2. Na figura

3.7.b, observa-se a formação de agregados de nanopartículas magnéticas com morfologia esférica e tamanho em média de 18 nm e a agregação pode ser atribuída, em grande parte, ao processo de secagem utilizado no preparo das amostras para as análises de MEV. A figura 3.7.c, apresenta morfologia e tamanhos de nanopartículas semelhantes a amostra anterior de Fe_3O_4 , a modificação de superfície com APTS não alterou a morfologia das nanopartículas magnéticas e formou agregados com tamanhos de nanopartículas de 20 nm. Na figura 3.7.d observa-se a presença de celulase na superfície de Fe_3O_4 -APTS.

Figura 3.7 – Microscopia eletrônica de varredura das amostras a 100 nm: a) CEL, b) Fe_3O_4 , c) Fe_3O_4 -APTS e d) Fe_3O_4 -CEL.



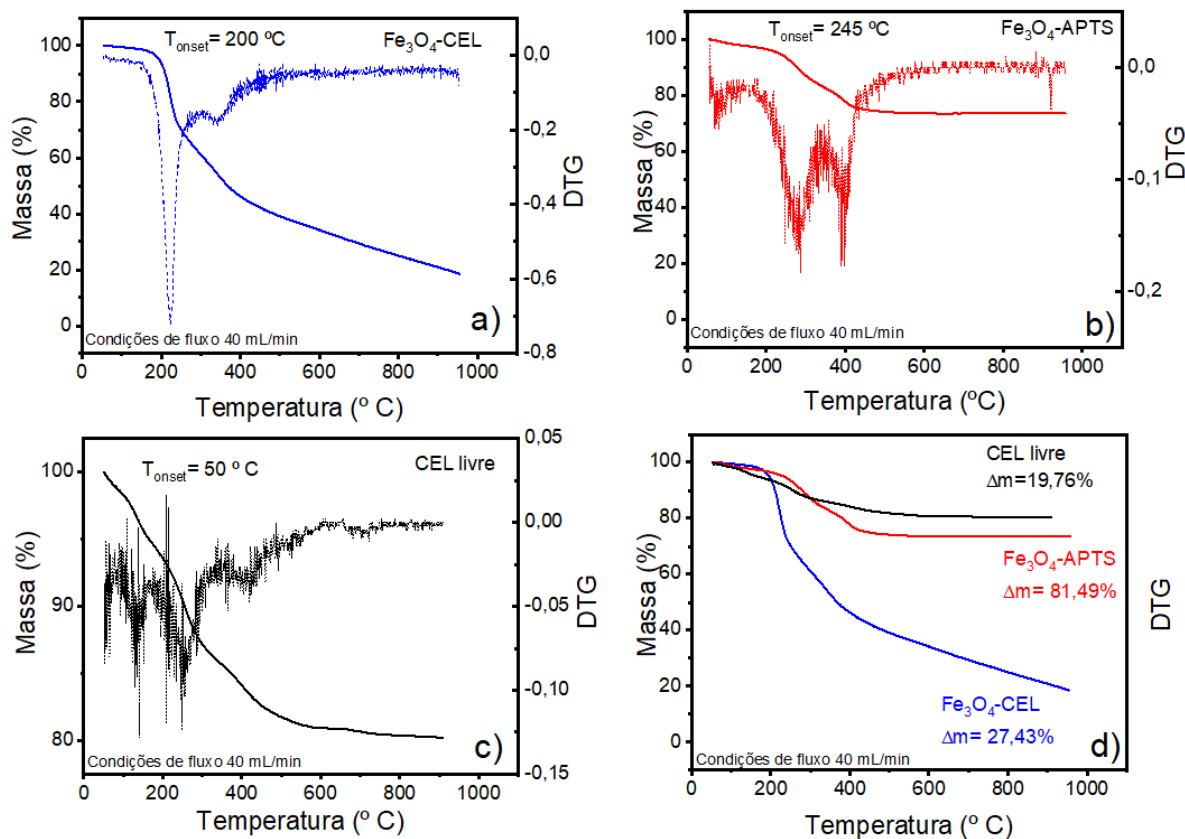
Fonte: Elaborada pela autora.

A análise térmica das amostras de Fe_3O_4 -APTS, Fe_3O_4 -CEL e CEL livre é mostrada da figura 3.8. A amostra de Fe_3O_4 -CEL (figura 3.8.a) apresentou três eventos térmicos e perda de massa total de 27,43%. O primeiro evento é de perda de água proveniente do complexo enzimático a 100 °C, seguido pelos eventos a 300

°C e a 400 °C, que está relacionado a decomposição dos grupos proteicos da enzima. A temperatura de decomposição inicial (onset) da celulase imobilizada foi a 200 °C.

Na curva TG-DTG de Fe_3O_4 -APTS (figura 3.8.b) foi observado dois eventos térmicos e perda de massa total de 81,49%. A temperatura de decomposição inicial (onset) do suporte iniciou em 245 °C e está relacionado com a evaporação de água adsorvida na superfície do suporte. O segundo evento térmico a 330 °C resultou na degradação de grupos orgânicos do alcóxissilano (ALMEIDA, 2008).

Figura 3.8 – Análise termogravimétrica TG-DTG. a) Fe_3O_4 -CEL, b) Fe_3O_4 -APTS, c) CEL livre e d) Variação de massa nas amostras Fe_3O_4 -APTS, Fe_3O_4 -CEL e CEL livre.

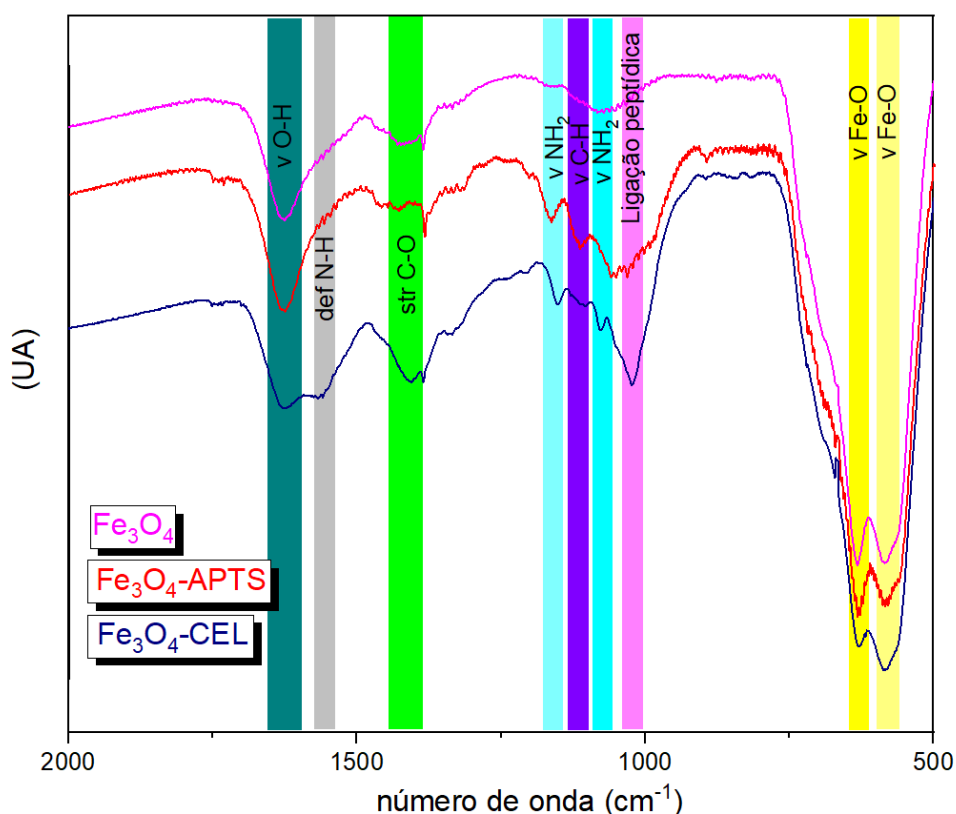


Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 3.9 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTS, Fe_3O_4 -CEL. Nos espectros observam-se bandas em 580 cm^{-1} e 630 cm^{-1} , relacionadas à vibração Fe-O de magnetita e maghemita, respectivamente. A banda do espectro de Fe_3O_4 -APTS em 1162 cm^{-1} está relacionada com a vibração de grupos amina e em 1113 cm^{-1} atribuída a ligação C-H

no plano (SOCRATES, 2001). As bandas identificadas correspondem ao organoalcóxisilano, APTS. No espectro de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ foram observadas bandas em 1024 cm^{-1} característico de glicinas, em 1154 cm^{-1} relacionadas a vibração de amina ($-\text{NH}_2$), em 1413 cm^{-1} atribuídas ao estiramento C-H e em 1556 cm^{-1} relacionadas a deformação de grupos amida (deformação N-H). A presença de bandas correspondentes ao grupo funcional amida, ao aminoácido e aos estiramentos C-O são esperados em moléculas que possuem proteínas em sua composição, dessa forma atribui-se ao complexo enzimático celulase presente na amostra de celulase imobilizada em nanopartículas (SOCRATES 2001, p.266).

Figura 3.9 – Espectros na região do Infravermelho das amostras Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$.



Fonte: Elaborada pela autora

3.5 Conclusão

As amostras de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ apresentaram tamanho de cristalito de 9,75 nm, 9,94 nm e 10,17 nm, respectivamente. Os diâmetros

hidrodinâmicos das nanopartículas foram avaliados por espalhamento de luz, obtendo valores de índice de polidispersão maiores que 0,1, indicando que Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ são constituídas por nanopartículas com alta dispersão de tamanhos. A adição de APTS leva a uma melhor organização na distribuição de tamanhos, o que sugere que não necessariamente aumentará o diâmetro hidrodinâmico médio. A amostra de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ apresentou diâmetro hidrodinâmico de 1335 nm, este grande aumento de tamanho, ocorreu devido a ligação do complexo enzimático de celulase na superfície das nanopartículas.

A curva de titulação das amostras de Fe_3O_4 apresentou valores positivos de potencial zeta em pH ácido, refletindo a densidade de cargas positivas na superfície das nanopartículas de óxido de ferro, uma vez que os grupos Fe-OH se encontram protonados (Fe-OH_2^+) e apresentou PI em pH 5,84. As nanopartículas funcionalizadas, apresentaram carga nula de superfície em pH 6,38. Neste ponto ocorreu a formação de agregados devido à presença de grupos amina com carga neutra (NH_2). A imobilização de celulasas nas nanopartículas pode ser observada devido à diminuição do ponto isoelétrico para 2,61. A celulase se comporta como uma molécula anfotérica e possui grupos funcionais ácidos e básicos.

A análise termogravimétrica foi analisada para a avaliação da perda de massa. A temperatura de decomposição inicial (onset) da celulase livre foi de 200 °C. O que indica um aumento na estabilidade térmica.

Nos espectros na região do infravermelho foram obtidos para confirmar as modificações de superfície. As amostras de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ apresentaram bandas em 580 cm^{-1} e 630 cm^{-1} , relacionadas à vibração Fe-O de magnetita e maghemita, respectivamente. A banda do espectro de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTS}$ em 1162 cm^{-1} está relacionada com a vibração de grupos amina. No espectro de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ foram observadas bandas de deformação de grupos amida do complexo enzimático das celulasas.

A partir dos resultados obtidos pelas caracterizações das amostras foi possível verificar e analisar os processos de síntese e funcionalização de nanopartículas magnéticas por co-precipitação e a imobilização deste suporte em celulasas CELLIC CTEC 2. Todas as etapas foram realizadas com sucesso, seguindo para a etapa seguinte do próximo capítulo de avaliação da atividade hidrolítica e hidrólise enzimática.,

4. INFLUÊNCIA DE CAMPO MAGNÉTICO ALTERNADO EM CELULASES IMOBILIZADAS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA

Neste capítulo são apresentadas as metodologias empregadas na dosagem de proteína e nos protocolos estabelecidos para determinar a atividade enzimática de celulase livre e celulase imobilizadas em nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4 -CEL). São apresentados também os resultados a conversão de celulose e hemicelulose quando a celulase imobilizada é submetida em campo magnético alternado (AMF), utilizando como substrato carboximetilcelulose e a hidrólise de bagaço de cana e sua reutilização em ciclos catalíticos.

4.1 Introdução

As usinas brasileiras especializadas na produção de E2G são: Raízen e GranBio. A Raízen está localizada em Piracicaba (SP) e utiliza o bagaço de cana, enquanto a GranBio localizada em São Miguel do Campos (AL), utiliza a palha de cana. Ambas as empresas iniciaram a produção em larga escala em 2015 e houve aumento no processamento do resíduo da cana em 2019, atingindo 81,39 mil toneladas de bagaço e palha consumidos (NOVA CANA, 2020).

As duas empresas produziram 6,11 milhões de litros de etanol celulósico no mesmo ano, o que poderia indicar uma expectativa positiva para o mercado se não fossem os entraves tecnológicos pelos quais as empresas passam. Um desses entraves incluem a solubilidade das enzimas, a partir do momento que se adiciona o coquetel enzimático no meio reacional, após a hidrólise essas enzimas que possuem alto custo são descartadas na etapa de separação. Esse prejuízo poderia ser minimizado com a imobilização de celulases em nanopartículas magnéticas, que podem ser recuperadas e utilizadas em novos ciclos catalíticos. Outro fator importante a ser considerado para a diminuição do custo da produção do E2G é o design do reator que teria menos etapas de separação, sendo necessário apenas a utilização de um campo magnético externo induzido por um ímã de neodímio.

Um sistema de imobilização adequado pode melhorar a estabilidade da enzima em condições de reação adversas como pH extremo, alta temperatura e/ou na

presença de solventes orgânicos. Outro ponto a ser considerado no processo de biocatálise é a contaminação de produtos de reações catalisadas pelas enzimas imobilizadas que pode ser diminuída ou completamente contornada (LIESE; HILTERHAUS, 2013).

A reação de hidrólise catalisada pelo biocatalisador magnético pode modificar o sítio ativo do complexo enzimático de celulasas, havendo preferência de formação a outras moléculas, além de açúcares redutores, como o ácido glicurônico. As moléculas derivadas da hidrólise de celulose são separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo necessário a utilização de padrões para identificar esses compostos.

Após os processos biocatalíticos, o grande desafio está na separação dos biocatalisadores imobilizados do meio reacional. Neste contexto, a associação de enzimas às nanopartículas magnéticas é uma estratégia muito utilizada para a separação do produto após a reação enzimática com o auxílio de aplicação de campo magnético externo (LIU et al, 2018).

Nas últimas décadas, as nanopartículas têm recebido grande atenção como suporte enzimático. As propriedades deste material são atraentes para a aplicação na imobilização enzimática. Entre essas propriedades destacam-se a grande área de superfície e a presença de grupos hidroxila em sua superfície, o que permite sua funcionalização e a ligação com a enzima. A baixa porosidade e a estabilidade mecânica são as características que reduzem os obstáculos estéricos e são importantes para o desenvolvimento de um sistema catalítico de matriz enzimática (LIU et al, 2015). A propriedade magnética das nanopartículas pode garantir fácil separação e recuperação das enzimas imobilizadas para uso contínuo, além disso os processos de imobilização na indústria podem ser simplificados (LIU et al, 2018).

Ainda são necessários avanços no uso de nanopartículas magnéticas como suporte enzimático, para melhor compreensão do efeito das propriedades magnéticas na atividade enzimática. Vale ressaltar que o uso das propriedades magnéticas de nanopartículas não se restringe apenas à recuperação magnética. Quando estão sob campo magnético alternado (AMF), as nanopartículas magnéticas apresentam relaxação de Néel e de Brown, ao girar elas colidem entre si produzindo calor, fenômeno conhecido como hipertermia magnética (WU et al, 2015).

A aplicação de AMF pode favorecer a cinética enzimática ao aumentar a taxa

de colisão entre o biocatalisador e o substrato, alterar o estado de agregação do MCLEA e desencadear mudanças conformacionais enzimáticas ou aumentam a taxa de difusão, levando a melhorias de atividade no MCLEAs (ARMENIA et al, 2019). Embora a hipertermia magnética tenha sido amplamente utilizada em aplicações biomédicas como tratamento de câncer e na entrega de fármacos, ainda permanece quase inexplorada para a aplicação na catálise enzimática, especialmente utilizando MCLEAs.

LIU e colaboradores relataram a melhora na atividade de MCLEAs de lipases sob AMF quando comparado com a enzima livre na resolução de (R, S) -2-octanol. Segundo os autores, a frequência influenciou mais na atividade da enzima, enquanto a intensidade do campo não alterou significativamente a resposta enzimática (LIU et al, 2015). No entanto, avanços em relação a diferentes enzimas e AMF com diferentes amplitudes e as frequências precisam ser investigadas cuidadosamente (LUCENA et al., 2020).

O custo do suporte magnético estimado, levando em consideração apenas os reagentes envolvidos na síntese, foi de R\$ 2,65 para 1 mL de derivado imobilizado. Levando em consideração que esse valor foi realizado com reagentes com alto grau analítico. O custo real será mais baixo aplicado nas indústrias devido aos reagentes com menor pureza e a reutilização por vários ciclos catalíticos barateando o valor apresentado.

4.2. Materiais

4.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para a imobilização foram celulase CELIC-CTEC 2 (Sigma Aldrich), polietilenoglicol PEG (PM 4600, Sigma Aldrich), 3-aminopropiltriethoxisilano (Sigma Aldrich). Para a obtenção da atividade hidrolítica foram utilizados como substrato 50 mg de filtro de papel quantitativo whatman nº 1 (1,0 x 6,0 cm), ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (LAC) e carboximetilcelulose (LAC). O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foi disponibilizado pela Prof. Dr. Kelly Johana Dussan Medina, IPBEN, UNESP, Araraquara. O pré-tratamento empregado se encontra no Apêndice I e composição está na tabela 1, Anexo I.

4.2.2 Técnicas empregadas de caracterização

4.2.2.1 Espectroscopia na região do UV-Visível

Os espectros UV-Visível foram obtidos por espectrofotômetro da marca Perkin Elmer modelo Lambda 465. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo de 3.5 L e no comprimento de onda de 540 e 595 nm, característico da absorção de ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS e de reagente de Bradford, respectivamente.

4.2.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para quantificar a concentração de açúcares após a hidrólise, os produtos da reação foram analisados por CLAE em cromatógrafo Shimatzu equipado com bomba de gradiente (LC-20AD Pump) e detector de índice de refração (RID-10A *Refractive Index Detector*). A separação dos compostos foi obtida em coluna analítica de troca iônica Aminex HPX-87H a 60°C e solução de H₂SO₄ (0,05 M) fase móvel, vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e tempo de corrida individual de 12 min. As concentrações de picos encontrados foram analisadas e obtidas pela curva de calibração, utilizando padrões analíticos de açúcares e ácidos orgânicos – glicose (t_r=8,9 min), xilose (t_r=9,4 min), arabinose (t_r=10,1 min) e ácido glicurônico (t_r=8,3 min). As amostras foram diluídas na proporção 1:5 e 1:10 em tampão citrato de sódio.

4.2.2.3 Hipertermia

As medidas de hipertermia magnética foram realizadas no equipamento magneTherm™ da NanoTherics da Universidade de São Paulo, São Carlos/SP. Em eppendorf de 2 mL, 10 mg de bagaço de cana foram pesados e 1 mL (0.971 g/mL) de Fe₃O₄-CEL dispersas em tampão citrato de sódio (pH 4,8) e colocados em um recipiente de isopor no centro de uma bobina com 17 voltas. As medições foram realizadas com frequência de 112 kHz e 25 mTfield (250 Oe), 1 a cada 5 minutos ao longo de 30 minutos e a variação da temperatura foi medida por uma sonda óptica GaAsfiber acoplada a um transdutor de sinal, ambos da OpSens Inc.

4.3 Procedimento experimental

4.3.1 Dosagem de proteína – método de Bradford

Para o cálculo de rendimento de imobilização (equação 5), inicialmente foi preparada uma solução 0,01 mg/mL de soroalbumina (BSA), utilizada como padrão. A partir desta solução padrão foi realizada diluições para as concentrações de 0; 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25; 7,5 e 8,75 µg/mL. Adicionou-se 0,8 mL de reagente de Bradford e mediu a absorção da forma aniônica em espectrofotômetro, para a obtenção da curva de calibração na figura 1 em Anexo I.

$$R = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde R é o rendimento de imobilização, P_i é a quantidade de proteína total antes da imobilização enzimática (mg/mL) e P_f é a quantidade de proteína total do sobrenadante após a imobilização (mg/mL).

A equação 6 da curva analítica obtida está destacada abaixo:

$$Abs = 0,88081 [Proteína] + 0,06758 \quad R^2 = 0,994 \quad (\text{Equação 6})$$

Abs é o valor da absorbância e [proteína] é a concentração de proteína expressa em µg/mL.

4.3.2 Atividade da celulase livre e imobilizada em Fe_3O_4 -APTS

A caracterização de celulase apresenta problemas especiais para os estudos de atividade. O substrato é insolúvel e estruturalmente variável, esse fator somado à complexidade da estrutura da celulase dificulta a dosagem de atividade hidrolítica, sendo necessário a utilização de protocolos específicos para cada enzima componente do complexo enzimático de celulase.

Antes de iniciar o estudo aplicando o complexo enzimático CELLIC CTEC 2 em bagaço de cana, ensaios de atividade foram realizados para comparar as atividades

enzimáticas de celulase livre e celulase imobilizada.

4.3.3.2 Preparação das amostras utilizando filtro de papel (FPU) para açúcares redutores produzidos na reação de hidrólise.

O ensaio FPU não é linear, por isso neste caso atribui-se um valor arbitrário de 2 mg de açúcar redutor produzido em 50 mg de filtro de papel (4%) em 60 minutos para calcular FPU (Filter Paper Unit). A unidade FPU é baseada na unidade internacional (IU).

$$1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{ de açúcares redutores formados} \\ \text{durante a reação de hidrólise.} \quad (\text{Equação 7})$$

Considerando a glicose como o açúcar redutor produzido, considera-se que 1 IU=0,18 mg x min⁻¹. A quantidade absoluta de glicose liberada no ensaio FPU é 2 mg (2 mg glicose corresponde a 2/0,18 μmol). Esta quantidade de glicose foi produzida por 0,3 mL de enzima adicionada nas amostras por 60 minutos:

$$2 \text{ mg} = \frac{2}{0,18 \times 0,3 \times 60} = 0,62 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1} = \text{IU mL}^{-1} \quad (\text{Equação 8})$$

Foram preparadas soluções padrão de glicose em concentrações de 1; 2; 3,25; e 5 mg/mL para a obtenção da curva de calibração (Figura 2 em Anexo I). O branco foi preparado utilizando 1,2 mL de tampão citrato (pH 4,8, 0,03 mol/L) e 0,3 mL de água, que foram colocadas no banho maria por 1 hora à 50°C, posteriormente foram adicionados 3 mL de DNS. A solução foi submetida a temperatura de 100°C por 5 minutos. Para a preparação do branco da enzima foi utilizado 1,2 mL de tampão citrato e 0,3 mL de enzima, foram submetidas a tratamento térmico por 1 hora à 50 °C, posteriormente foi adicionado 3 mL de DNS. A solução foi colocada no banho maria à 100 °C por 5 minutos. No tubo de reação foram realizadas diluições da enzima, e o mesmo procedimento para a preparação do branco da enzima foi utilizado, no entanto o substrato foi 50 mg de filtro de papel quantitativo whatman nº 1(1,0 x 6,0 cm). Todas as amostras foram medidas em espectrômetro UV-vis a λ=540 nm (GHOSE, 1987). A

equação da curva analítica encontrada está representada abaixo:

$$Abs = 0,20524 [glicose] - 0,02743 \quad R^2 = 0,998 \quad (\text{Equação 9})$$

Abs é o valor da absorbância e [glicose] é a concentração de glicose expressa em µg/mL.

4.3.3.3 Preparação de amostras de Carboximetilcelulose (CMC) para a determinação de atividade de endoglicanases

Para este procedimento foi utilizado 2% de carboximetilcelulose (grau de substituição = 0,7) em 0,05 mol/L de tampão citrato de sódio pH 4,8. A partir da solução estoque de glicose 2 mg/mL foram preparadas diluições em concentrações de 0,25; 0,3; 0,5; 1; 1,3 e 2 mg/mL para a obtenção da curva de calibração (Figura 3 em Anexo I). No ensaio foi adicionado 0,5 mL de enzima em um tubo de ensaio, duas diluições foram feitas. Uma diluição deve liberar mais que 0,5 mg de açúcares redutores e outra diluição com liberação menor que 0,5 mg (quantidade absoluta). Após a diluição, o tubo de ensaio foi levado ao banho à 50 °C e foi adicionado 0,5 mL de substrato e incubado nesta temperatura por 30 minutos. 3 mL de DNS foi adicionado ao tubo de ensaio e fervido por 5 minutos. Foram feitas amostras para o branco e branco da enzima. Todas as amostras foram medidas em espectrômetro UV-vis a λ=540 nm. A equação da curva analítica encontrada está representada abaixo:

$$Abs = 0,38416 [glicose] - 0,0630 \quad R^2 = 0,990 \quad (\text{Equação 10})$$

Abs é o valor da absorbância e [glicose] é a concentração de glicose expressa em µg/mL.

4.3.4 Hidrólise de CMC e bagaço de cana

Para quantificar a quantidade de açúcares redutores (glicose, xilose e arabinose) e ácido glicurônico foi obtida três equações, uma para cada açúcar, respectivamente, e o ácido relacionando a área do pico com a concentração obtida na

curva de calibração (Figura 4, ANEXO I).

$$\text{Área} = 274064 [\text{glicose}] + 422,67 \quad R^2 = 1,0 \quad (\text{Equação 11})$$

$$\text{Área} = 272885 [\text{xilose}] + 282,97 \quad R^2 = 1,0 \quad (\text{Equação 12})$$

$$\text{Área} = 272735 [\text{arabinose}] - 39,154 \quad R^2 = 0,998 \quad (\text{Equação 13})$$

$$\text{Área} = 272735 [\text{ácido glicorônico}] - 39,154 \quad R^2 = 0,991 \quad (\text{Equação 14})$$

A hidrólise do bagaço de cana e de CMC foram realizadas em banho termoestatizado sob temperatura de 60° C. As amostras de 10 mg de bagaço de cana pré-tratada e amostras de 0,5 mL de CMC foram adicionados em tubos de ensaios, utilizado 1,2 mL de tampão citrato, 0,3 mL de biocatalisador e colocados no banho por 1 hora. O biocatalisador foi retirado com o auxílio de um imã, posteriormente as soluções foram armazenadas em eppendorf para análise no equipamento de CLAE. O grau de conversão de bagaço de cana foi determinado utilizando as equações abaixo:

$$\text{Conversão de hemicelulose (\%)} = \left(\frac{M_{\text{ác}}}{F_H \cdot M_b} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

$$\text{Conversão de hemicelulose (\%)} = \left(\frac{M_x}{F_H \cdot M_b} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 16})$$

$$\text{Conversão de celulose (\%)} = \left(\frac{M_g}{F_C \cdot M_b} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 17})$$

Em que $M_{\text{ác}}$ é a massa de ácido glicurônico após a hidrólise (mg), F_H é a fração de hemicelulose (g.g^{-1}), M_b é a massa de bagaço de cana utilizada para realizar a hidrólise, M_x é a massa de xilose após a hidrólise, M_g é a massa de glicose após a hidrólise e F_c é a fração de celulose.

4.3.4 Hidrólise de CMC em AMF

A hidrólise de CMC foi realizada no equipamento magneTherm™ da NanoTherics sob temperatura de 60° C. As amostras de 0,5 mL de CMC foram adicionados em tubos de ensaios e submetidas ao campo por 3,2, 10,15, 20, 25, 30 e 60 minutos. A solução de catálise foi retirada com o auxílio de um imã, posteriormente as soluções foram armazenadas em eppendorf para análise no equipamento de CLAE.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1. Rendimento de imobilização enzimática

Os dados de rendimento de imobilização podem ser obtidos realizando experimentos para a dosagem de proteína pelo método de Bradford, antes e após a imobilização enzimática. A água de lavagem possui a quantidade de proteína perdida após a síntese, sendo possível o cálculo de rendimento. Na tabela 4.1 encontram-se os resultados de quantidade de proteína das amostras CEL e Fe₃O₄-CEL. Inicialmente a celulase livre apresentou quantidade de proteína de 0,23053 µg/mL e após a imobilização enzimática apresentou 0,23039 µg/mL. Este resultado demonstra que a quantidade de proteína perdida foi muito pequena e o cálculo de rendimento de imobilização, segundo a equação 5 da seção 4.3.3.1, foi de 99%.

Tabela 4.1 - Dosagem de proteína antes e após a imobilização.

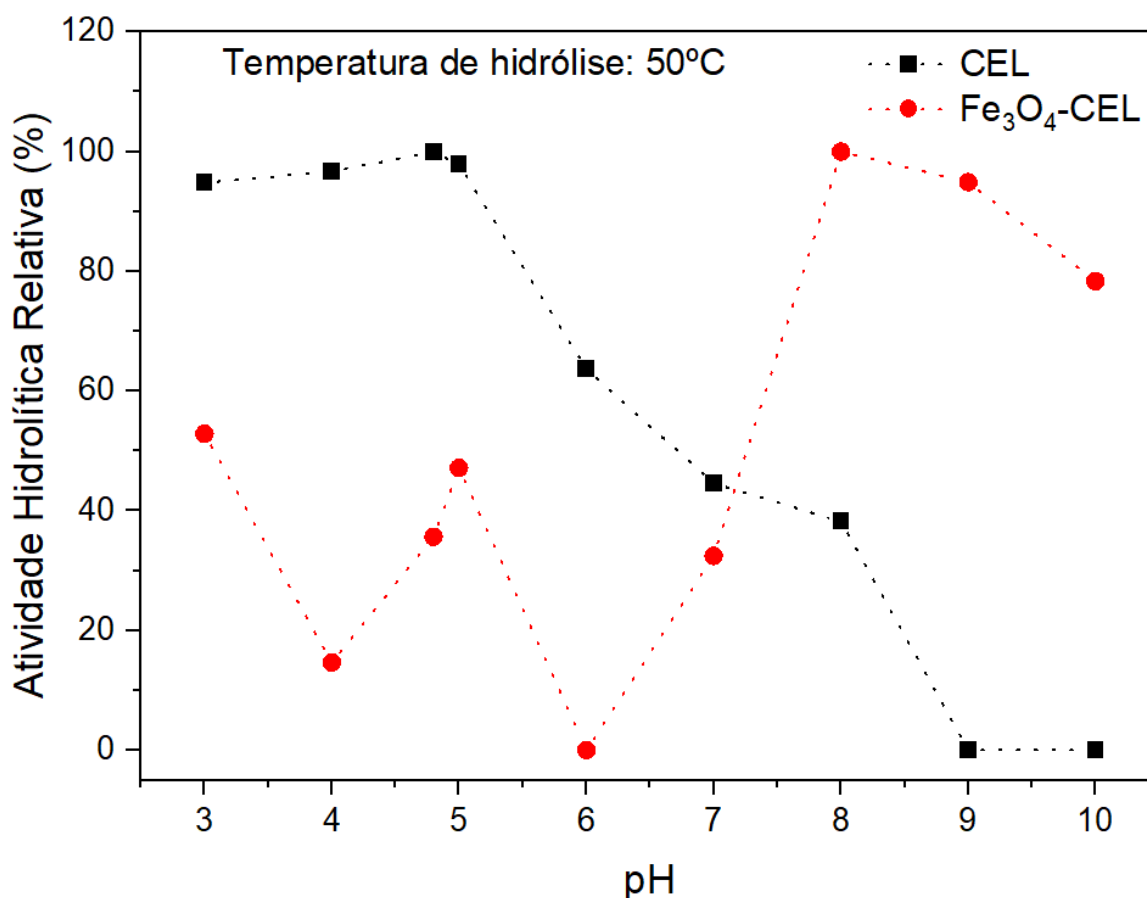
<i>Biocatalisador</i>	<i>Tempo de imobilização (h)</i>	<i>Rendimento de imobilização (%)</i>	<i>Quantidade de proteína (µg/mL)</i>
CEL	-	-	0,23053
Fe ₃ O ₄ -CEL	16	99%	0,23039

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2. Atividade global FPU de CEL Livre e Fe₃O₄-CEL

Na figura 4.1 apresenta a atividade hidrolítica global de celulase imobilizada em nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄-CEL) e celulasas livres (CEL). Na faixa de pH de 3 a 7, a celulase livre apresentou resultados de atividade hidrolítica maiores quando comparada com a celulase imobilizada. Em algumas situações, a imobilização pode provocar a diminuição na atividade enzimática, devido as ligações covalentes formadas entre enzimas e nanopartículas magnéticas, alterando a conformação do sítio da enzima. Outro fator que influencia nos resultados de atividade de celulasas está relacionado ao tipo de substrato, no caso da atividade hidrolítica global utiliza-se substrato sólido o que interfere no efeito de transferência de massa que depende dos mecanismos de adsorção e dessorção ao sítio ativo da enzima (OBENG *et al.*, 2017).

Figura 4.1 – Efeito do pH na atividade enzimática (FPU).



Fonte: Elaborada pela autora.

A modificação conformacional de celulase imobilizada apresentou vantagens

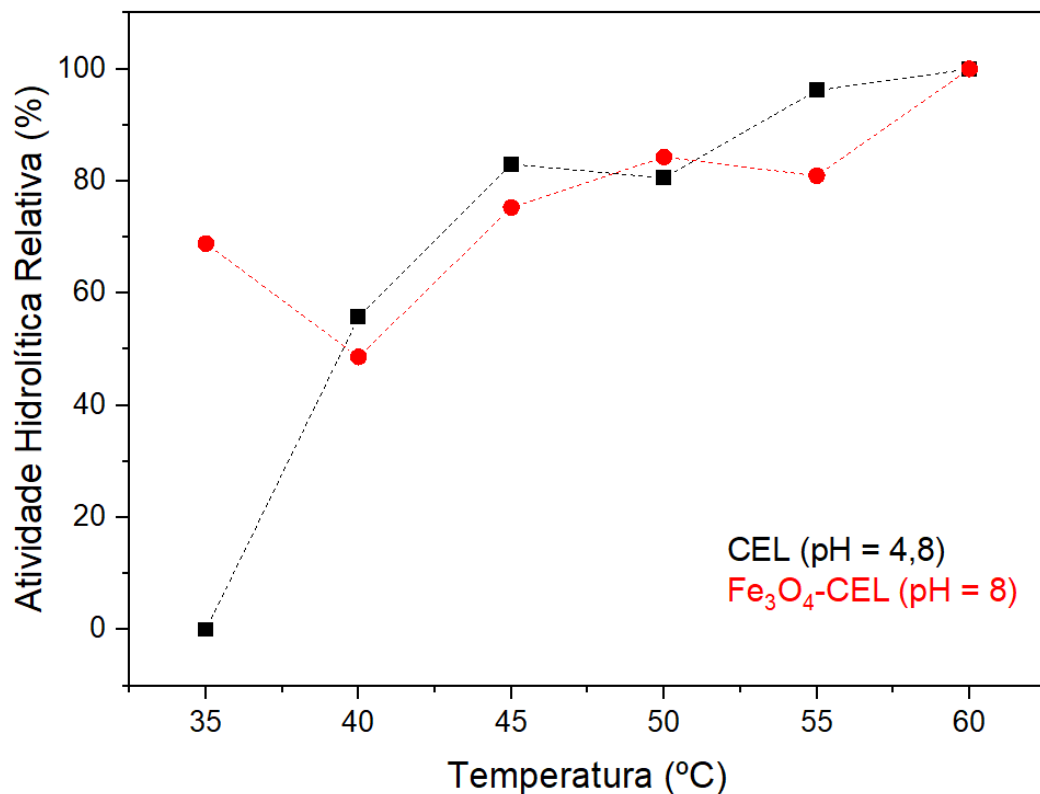
em pH mais básicos, na faixa de pH entre 8 e 10, a enzima imobilizada apresentou excelentes resultados de atividade. Nas faixas de pH entre 6 e 6,5 não apresentou atividade hidrolítica para diluições que liberassem acima de 2 mg de glicose, por este motivo foi considerada atividade igual a zero. A celulase imobilizada possui pH ótimo em 8, enquanto a celulase livre apresentou pH ótimo em 4,8. A tabela 2 referente aos dados apresentados no gráfico da figura 4.1 pode ser encontrada no anexo I.

Atualmente existem poucas indústrias no mundo que produzem E2G em larga escala, a partir do levantamento realizado (SUSMOZAS *et al.*, 2020), verificou-se que as empresas utilizam coquetel enzimático de celulase na sua forma livre, portanto as rotas de hidrólise do bagaço e palha de cana operam entre pH 4,8 e 5. Com a possibilidade de utilização do suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$, o pH do meio reacional alcalino demonstrou maior atividade, sendo possível utilizar pré-tratamento básico no processo de deslignificação e aplicação do biocatalisador magnético com menos etapas de lavagem.

Para verificar a temperatura ótima das amostras de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ e CEL foram realizados experimentos em diferentes valores de temperatura (35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C). Na tabela 3 apresenta os valores de atividade hidrolítica em FPU de celulase livre e imobilizada que se encontra no Anexo I. A figura 4.2, apresenta os resultados de atividade hidrolítica relativa, a celulase imobilizada apresentou maior estabilidade térmica em 35 e 50 °C quando comparada com a livre. A celulase livre apresentou baixa atividade hidrolítica na temperatura de 35 °C, em temperaturas maiores de 40, 45 e 55 °C houve aumento de atividade. A amostra de CEL apresentou temperatura ótima em 60 °C, mesmo resultado foi obtido para $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$.

As indústrias de E2G operam em temperatura amenas que podem variar entre 40 e 50 °C (SUSMOZAS *et al.*, 2020) devido a utilização de coquetel enzimático solúvel. Observa-se que a enzima suportada apresentou quase o mesmo perfil que a enzima imobilizada, sendo a principal diferença no comportamento o fato de a enzima imobilizada apresentar atividade em torno de 35°C. Este resultado sugere que o processo pode ter sua temperatura diminuída quando na presença da enzima imobilizada obtida neste trabalho, o que resultaria em grande economia de energia no processo.

Figura 4.2 – Efeito da temperatura na atividade enzimática (FPU).

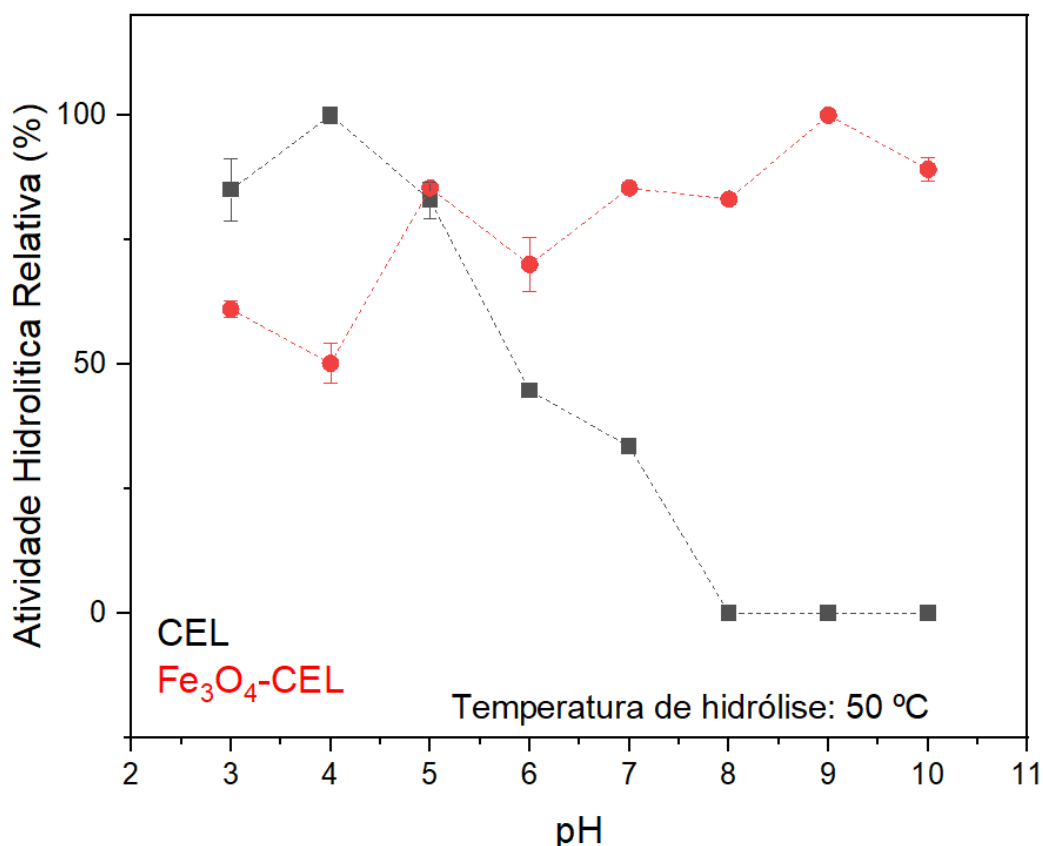


Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.3 Atividade hidrolítica de endoglicanases

Na figura 4.3 apresenta a atividade hidrolítica de endoglicanases para celulase imobilizada em nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄-CEL) e celulases livres (CEL). A tabela 4, Anexo I, lista os resultados de atividade hidrolítica para endoglicanases em U/mL. Na faixa de pH de 3 a 6, a celulase livre apresentou maior estabilidade ao pH. Na faixa de pH de 7 a 10, a celulase imobilizada apresentou melhores resultados, enquanto a celulase livre foi inativada. A celulase imobilizada possui pH ótimo em 9, enquanto a celulase livre apresentou pH ótimo em 4,8. Nos processos industriais, o pH de trabalho está na faixa de 5 a 7, com esses resultados podemos inferir que a modificação conformacional das enzimas favorece processos de hidrólise em meio alcalino. Vale ressaltar que o CMC é um substrato solúvel o que implica em pouca resistência à transferência de massa.

Figura 4.3 – Efeito do pH na atividade enzimática (endoglicanases).



Fonte: Elaborada pela autora.

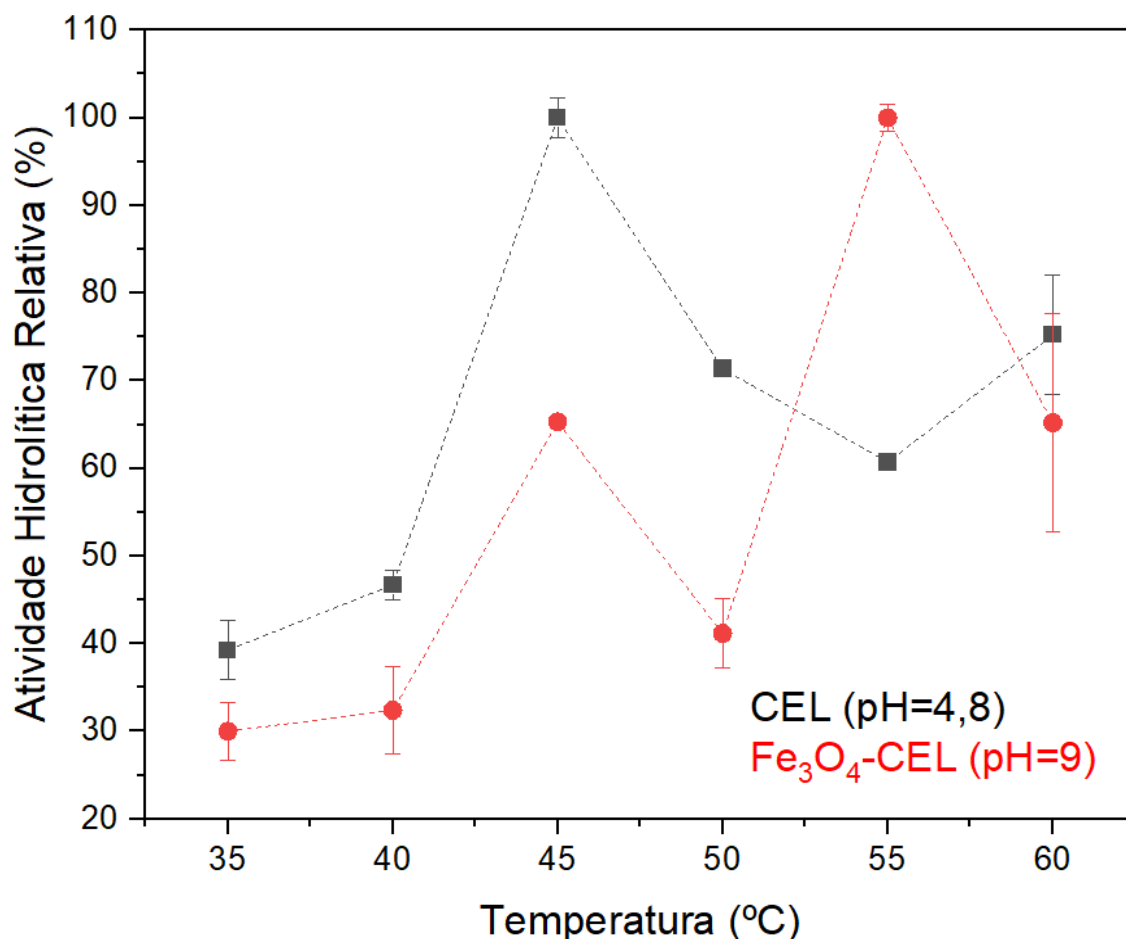
As endoglicanases podem apresentar maior composição no coquetel enzimático CELLIC-CTEC 2, a possibilidade de que a modificação conformacional de celulase imobilizada esteja relacionada em grande parte a essa enzima, o que explica os resultados de atividade global em meio alcalino.

Para verificar a estabilidade térmica das amostras de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ e CEL foram realizados experimentos em diferentes valores de temperatura (35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 60°C) para endoglicanases. Na tabela 5, no anexo I, estão listados os valores de atividade hidrolítica em U/mL de celulase livre e imobilizada.

A figura 4.4 apresenta os resultados de atividade hidrolítica relativa. A celulase imobilizada apresentou maior estabilidade térmica que a livre nas temperaturas de 55 °C. A celulase livre apresentou baixa atividade hidrolítica na temperatura de 35 °C, mesmo resultado foi obtido para o ensaio FPU. Para as diluições de celulase realizadas não houve liberação de glicose acima de 0,5 mg, por este motivo, atribuiu-se valor de atividade igual a zero. A amostra de CEL apresentou temperatura ótima

em 45 °C, enquanto para Fe₃O₄-CEL foi obtido em 55 °C.

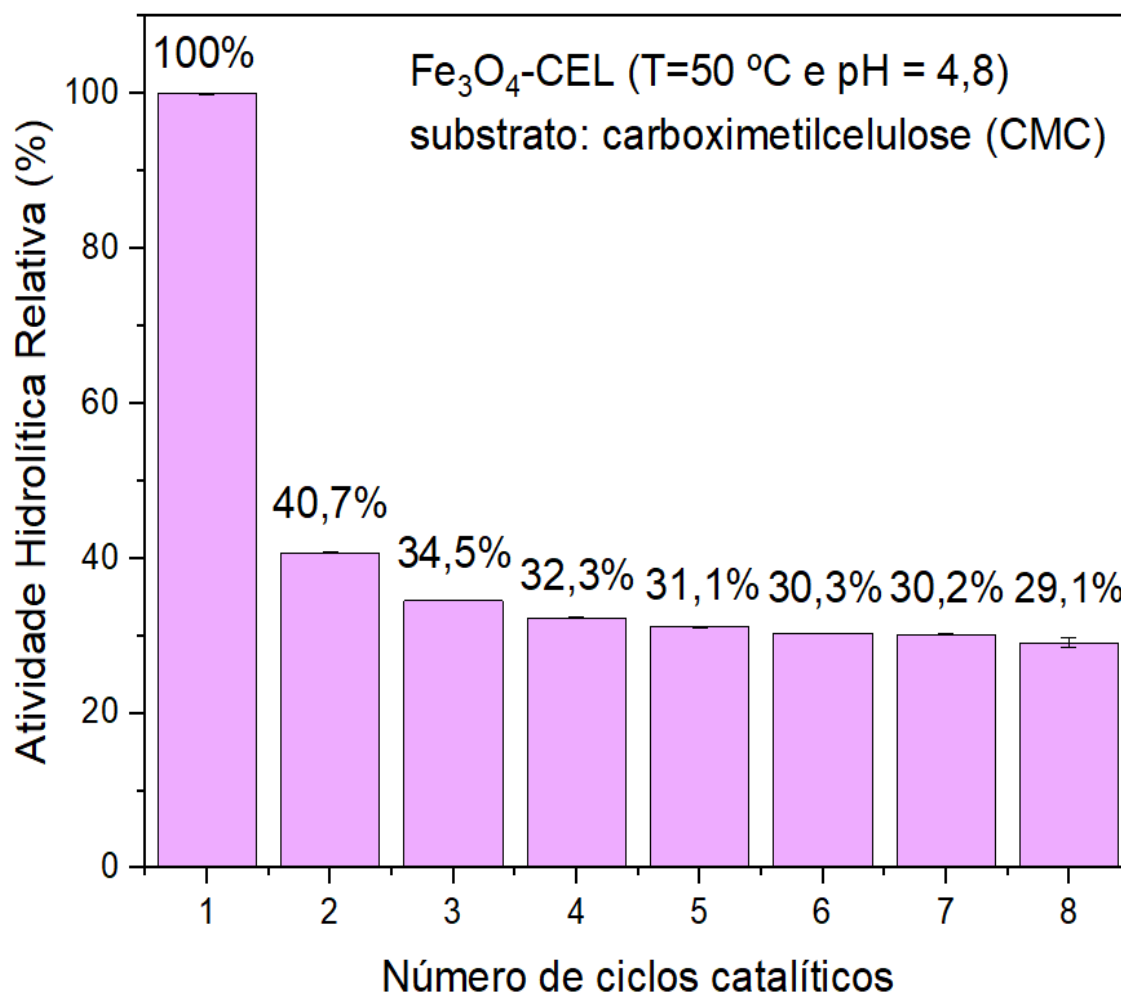
Figura 4.4 – Efeito da temperatura na atividade enzimática (endoglicanases).



Fonte: Elaborada pela autora.

Foi avaliada a capacidade de reutilização da amostra de celulase imobilizada (fig. 4.5), para isso a mesma enzima imobilizada foi reutilizada por 8 ciclos em substrato solúvel de carboximetilcelulase. No segundo ciclo houve redução percentual de 59,3% na atividade de Fe₃O₄-CEL para endoglicanases. No terceiro ciclo houve perda de mais 6,2% e se manteve praticamente constante em 30% da atividade hidrolítica inicial nos ciclos seguintes. Ainda há possibilidade de otimização experimental para aumento dos ciclos catalíticos, utilizando solventes orgânicos no processo de lavagem do biocatalisador magnético para que consiga diminuir o impedimento dos sítios ativos do complexo enzimático pelo substrato.

Figura 4.5 – Reutilização de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ para endoglicanases.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.4 Hidrólise do bagaço de cana

Com o objetivo de avaliar a conversão (%) de hemicelulose e celulose na reação de hidrólise dos biocatalisadores (CEL e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$) foram realizados ensaios de hidrólise enzimática por 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, utilizando as frações sólidas de hidrólise enzimática por 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, utilizando as frações sólidas de bagaço de cana (celulignina) obtidas do pré-tratamento. As condições de pré-tratamento tornam a hemicelulose contida na biomassa mais acessível às celulasas o que influencia diretamente na conversão em glicose. O tempo de retenção para os açúcares redutores (glicose, xilose e arabinose) e ácido glicurônico são apresentados na tabela 4.2. A partir deste resultado foi possível comparar com os resultados obtidos pelos cromatogramas.

Os cromatogramas de conversão de hemicelulose de celulignina em ácido glicurônico no tempo de retenção de 8,3 minutos são apresentados na figura 4 (ANEXO I). Não era esperado este resultado, esperava-se a conversão de hemicelulose em xilose, visto que o fabricante do complexo enzimático CELLIC CTEC2 descreve como um produto otimizado para a produção de etanol celulósico (NOVOZYMES, 2010). A partir dos resultados obtidos, a modificação conformacional das enzimas provocada pela imobilização ao suporte magnético promoveu a preferência por outra rota de hidrólise contribuindo para a formação de ácido glicurônico.

Tabela 4.2 - Tempo de retenção (min) dos padrões de ácido glicurônico, glicose, xilose e arabinose.

Padrões	Tempo de retenção (min)
Ácido glicurônico	8,324
Glicose	9,412
Xilose	10,082
Arabinose	10,937

Fonte: Elaborada pela autora.

Na tabela 4.3 apresenta-se a relação de tempo de reação e conversão de hemicelulose (%) e celulose (%) ao utilizar o complexo enzimático na forma livre. Os resultados apresentam conversão de celulose muito baixa, enquanto a conversão de hemicelulose para a amostra de CEL apresentou maior conversão de 18,46% após 48 horas de hidrólise. Os valores de conversão estão relacionados diretamente com a forma de preparo da solução de celulignina e tampão citrato, sendo que foram preparadas soluções separadas em tubos de ensaio com 10 mg de substrato e 1,2 mL tampão. Os resultados podem ser melhorados preparando o substrato em um béquer com tampão citrato e o substrato em batelada e depois retirar as alíquotas necessárias para a reação de hidrólise.

Tabela 4.3 – Conversão de hemicelulose e celulose utilizando celulase livre.

Tempo de reação (h)	Conversão de Hemicelulose (%)	Conversão de celulose (%)
4	3,225	-
8	14,37	0,03077
12	9,202	-
24	12,91	-
48	18,46	-
72	11,95	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliar a conversão (%) de hemicelulose e celulose do biocatalisador magnético (Fe₃O₄-CEL) foram realizados ensaios de hidrólise enzimática por 4, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 horas (Tabela 4.4). Os cromatogramas de conversão de hemicelulose em xilose encontram-se na figura 5 (ANEXO I). Não houve formação de ácido glicurônico, houve também conversão de celulose em glicose no tempo de reação de 4 h. Estudos mais aprofundados sobre a modificação conformacional do complexo enzimático devem ser realizados para relacionar os resultados aos mecanismos de hidrólise. É necessário salientar que apenas esta amostra apresentou preferência para conversão de hemicelulose em xilose, todas as outras amostras houve preferência para a formação de ácido glicurônico. A partir deste resultado, os estudos pela rota de imobilização descrita nesta tese devem ser aplicados para a produção de ácido glicurônico.

Tabela 4.4 – Conversão de hemicelulose e celulose utilizando biocatalisador magnético.

Tempo de reação (h)	Conversão de Hemicelulose (%)	Conversão de celulose (%)
4	31,96	2,618
8	5,266	0,02628
12	1,953	0,03383
24	1,971	0,02951
36	5,503	0,09695
48	5,946	0,1264

72	6,473	0,1265
----	-------	--------

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 4.5 apresenta o número de ciclos em relação a conversão de hemicelulose (%), o tempo de reação de cada ciclo foi de 24 h. No primeiro ciclo, a conversão de hemicelulose foi de 17%, os próximos ciclos apresentam conversão com valores de porcentagem menores devido ao impedimento do sítio ativo pelo substrato. Esse impedimento tem como consequência a diminuição de hidrólise com valores de conversão de hemicelulose entre 3,3% e 9,3%.

Tabela 4.5 – Conversão de hemicelulose e celulose utilizando biocatalisador magnético por números de ciclos, cada ciclo tem duração de 24 h.

Número de ciclos	Conversão de Hemicelulose (%)	Conversão de celulose (%)
1	17,09	-
2	3,397	-
3	12,58	0,03098
4	9,144	0,04628
5	5,731	-
6	9,296	-
7	9,237	-

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.5 Hidrólise sob influência de campo magnético alternado (AMF)

Para avaliar a influência de AMF, as amostras de carboximetilcelulose (CMC) com o biocatalisador magnético foram submetidas a campo magnético alternado por 3,2, 15, 20, e 25 minutos. Os cromatogramas se encontram no anexo I. Em todas as amostras não foram encontrados picos de arabinose, o pico de ácido glicurônico, glicose e xilose foram encontradas para todas as reações. A hipótese de que a glicose seria oxidada à ácido glicurônico pode ser descartada, pelos resultados obtidos nos cromatogramas observa-se a formação de ácido no tempo de reação de apenas 3,2 minutos. A tabela 4.6 apresenta baixa conversão de hemicelulose e celulose utilizando biocatalisador magnético. Observa-se pelos resultados que a conversão de

hemicelulose diminuiu sob influência de AMF na frequência de 112 Hz e campo magnético de 25 mT.

Tabela 4.6– Conversão de hemicelulose e celulose utilizando biocatalisador magnético e substrato CMC sob AMF.

Tempo de reação (min)	Conversão de Hemicelulose (%)	Conversão de celulose (%)
3,2	0,6283	0,02838
15	0,5423	0,02628
20	0,5464	0,03383
25	0,2870	0,03129

Fonte: Elaborada pela autora.

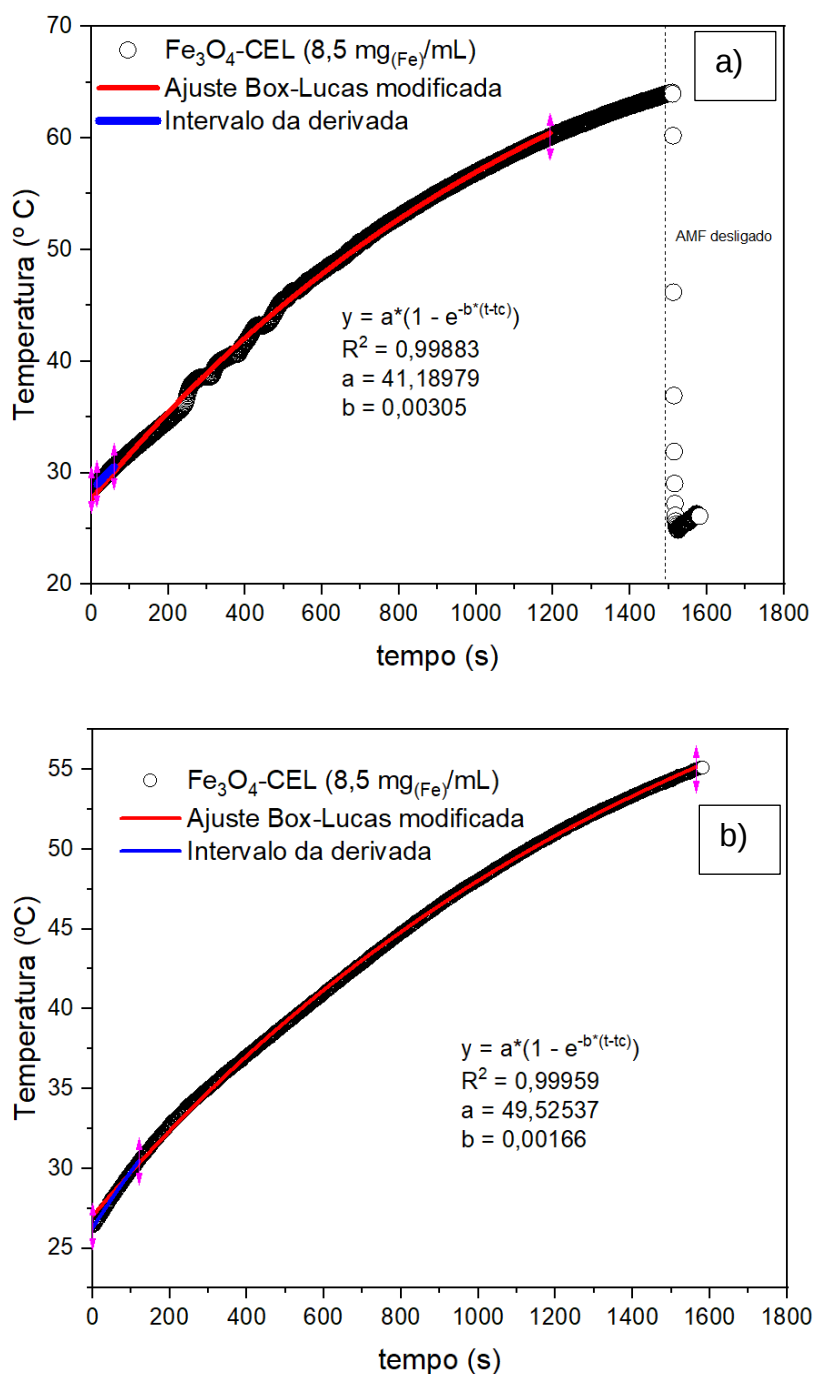
A partir da curva de aquecimento da amostra de Fe₃O₄-CEL, foi calculado o valor de taxa de absorção específica (SAR) que, de forma simplificada, mede a energia absorvida por unidade de massa do material magnético presente na amostra. O cálculo de SAR está relacionado com a equação 18.

$$SAR = C_m \Phi \left(\frac{dT}{dt} \right)_{max} \quad (\text{Equação 18})$$

Em que C_m é a capacidade calorífica da amostra ou da água (4,187 J.g⁻¹.K⁻¹), Φ é a razão entre as massas da dispersão e do material magnético presente nessa dispersão (Φ=m_{dispersão}/m_{Fe}) e (dT/dt)_{max} corresponde a inclinação da curva de aquecimento (VERGÉS *et al.*, 2008). Os valores de (dT/dt)_{max} foram calculados para a curva de aquecimento pelo ajuste da equação BoxLucas modificada (Equação 18), da qual o produto dos parâmetros a e b é numericamente igual à inclinação inicial da curva analisada. A figura 4.7 apresenta o método de cálculo desses parâmetros de alíquotas de 0,3 mL de amostra Fe₃O₄-CEL (8,5 mg (Fe)/mL). O mesmo método foi aplicado para a amostra de bagaço de cana pré-tratada (celulignina). Os valores de SAR calculados estão na tabela 4.12.

$$y = a \left(1 - e^{-b*(t-t_c)} \right) \quad \text{Equação (19)}$$

Figura 4.6- Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes a e b para as amostras de Fe₃O₄-CEL (f = 112 Hz, 25 mTfield (250 Oe)). a) substrato: carboximetilcelulose, t = 25 min. b) substrato: cana de açúcar, t = 60min.



Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que a energia absorvida pelas nanopartículas de óxido de ferro (magnetita) durante a biocatálise de CMC sob influência de campo magnético alternado é ligeiramente maior que a energia absorvida pelo mesmo biocatalisador no

processo de hidrólise de bagaço de cana. Os dados da tabela 4.7 sugerem que o tipo de substrato utilizado atua como uma barreira que limita a difusão de calor das nanopartículas (Fe₃O₄-APTS). Salienta-se que o cálculo de SAR é usado em processos de hipertermia em drug delivery e que, portanto, é necessário padronizar os cálculos para a aplicação em biocatálise.

Tabela 4.7– Taxa de absorção específica (SAR) dos materiais sintetizados, calculadas a partir do ajuste das curvas temperatura x tempo com campo magnético 25 mT e frequência f = 420 kHz

Substrato	Material	SAR/W.g ⁻¹
CMC	Fe ₃ O ₄ -CEL	15,83
Celulignina (bagaço)	Fe ₃ O ₄ -CEL	10,3597

Fonte: Elaborada pela autora.

A amostra de bagaço de cana (celulignina) foi hidrolisada pelo biocatalisador magnético e submetida ao mesmo campo magnético alternado e frequência da amostra de CMC por 60 minutos. A tabela 4.8 apresenta a conversão de hemicelulose e celulose que foram baixas nas condições do experimento. As reações de hidrólises de bagaço de cana devem ocorrer em tempo mínimo de reação de 24 horas para a obtenção de valores de conversão de hemicelulose e celulose significativos, portanto o uso de campo magnético alternado não aumentou a conversão em tempo de reação menor.

Tabela 4.8– Conversão de hemicelulose e celulose de celulignina utilizando biocatalisador magnético sob AMF.

Tempo de reação (min)	Conversão de Hemicelulose (%)	Conversão de celulose (%)
60	0,5706	0,02109

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Conclusões

Os cálculos de rendimento de imobilização demonstraram que 99% de celulase utilizada no ensaio foi imobilizada, devido ao baixo teor de proteína na água de lavagem.

A atividade hidrolítica global FPU foram analisadas para avaliar o comportamento enzimático do coquetel do complexo de celulasas após a imobilização. A celulase livre apresentou pH ótimo em 4,8 e apresentou resultados de atividade maiores em uma faixa de pH mais ácido. A celulase imobilizada apresentou bons resultados na faixa de pH básica de 8 a 10, e pH ótimo em 8 e não apresentou atividade significativa em pH 6 e 6,5.

A atividade hidrolítica de endoglicanases, enzima presente no coquetel enzimático, também foram analisadas para avaliar a atividade após o processo de imobilização. A celulase imobilizada apresentou bons resultados na faixa de pH de 5 a 10 e pH ótimo em 9. A celulase livre apresentou pH ótimo em 4 e após esse valor de pH a atividade diminui para zero na faixa de pH básico.

A conversão (%) de hemicelulose e celulose na reação de hidrólise dos biocatalisadores (CEL e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$) foram avaliados e apresentaram conversão de celulose muito baixa, enquanto a conversão de hemicelulose para a amostra de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ apresentou maior conversão de 18,46% após 48 horas de hidrólise. Não era esperado este resultado, esperava-se a conversão de hemicelulose em xilose, visto que o fabricante do complexo enzimático CELLIC CTEC2 descreve como um produto otimizado para a produção de etanol celulósico. O biocatalisador magnético apresentou 30 % da atividade inicial após 8 ciclos catalíticos em substrato de carboximetilcelulose.

A conversão de hemicelulose e celulose foi avaliada sob influência de AMF na frequência de 112 Hz e campo magnético de 25 mTfield. As amostras livre e imobilizada apresentaram baixa conversão de hemicelulose e celulose devido ao tempo de reação de hidrólise baixo e a aplicação de campo magnético alternado não influenciou no aumento da taxa de conversão. As reações de hidrólises de bagaço de cana devem ocorrer em tempo mínimo de reação de 24 horas para a obtenção de valores de conversão de hemicelulose e celulose significativos.

Observa-se que a energia absorvida pelas nanopartículas de óxido de ferro

(magnetita) durante a biocatálise de CMC sob influência de campo magnético alternado é ligeiramente maior que a energia absorvida pelo mesmo biocatalisador no processo de hidrólise de bagaço de cana.

CONCLUSÕES FINAIS

O método de imobilização enzimática utilizando nanopartículas magnéticas foi realizado com sucesso e apresentou resultados inesperados em relação aos produtos da reação de hidrólise do bagaço de cana. Neste processo de hidrólise foi identificada a molécula de ácido glicorônico que possui valor agregado pois é o precursor do ácido hialurônico utilizado, principalmente, como molécula antioxidante na indústria de cosméticos. Existem poucas rotas de síntese citadas na literatura do ácido hialurônico e esta rota proposta neste trabalho deve ser investigada mais detalhadamente em pesquisas futuras.

As reações de hidrólise do bagaço e palha de cana operam entre pH 4,8 e 5. Com a possibilidade de utilização do suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$, o pH do meio reacional alcalino demonstrou maior atividade, sendo possível utilizar pré-tratamento básico no processo de designificação e aplicação do biocatalisador magnético com menos etapas de lavagem.

A utilização de coquetel enzimático de celulasas solúvel opera em temperatura amenas que podem variar entre 40 e 50 °C. Observa-se que a enzima imobilizada apresentou boa atividade em torno de 35 °C, embora a temperatura ótima seja a 60 °C. Este resultado sugere que o processo pode ter sua temperatura diminuída quando na presença de biocatalisador magnético obtido neste trabalho, o que resultaria em grande economia de energia no processo de hidrólise.

Os valores de conversão de hidrólise CEL e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ foram avaliados e apresentaram valores muito baixos, a conversão de hemicelulose para o derivado imobilizado apresentou valor de 18,46 % após 48 horas de hidrólise. Após 8 ciclos catalíticos o biocatalisador magnético apresentou 30 % da atividade inicial. A conversão de hemicelulose e celulose foi avaliada sob influência de AMF na frequência de 112 Hz e campo magnético de 25 mT. As amostras livre e imobilizada apresentaram baixa conversão de hemicelulose e celulose devido ao tempo de reação de hidrólise baixo.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação de atividade de celobiase e celobiohidrolase do coquetel enzimático, CELLIC CTEC 2, imobilizada em nanopartículas magnéticas;
- Aumento na eficiência de conversão de hemicelulose e celulose (%) modificando o processo de preparo da amostra;
- Modificação da aplicação do estudo para produção de ácido glicorônico, molécula com valor agregado e alta demanda no mercado mundial;
- Estudos cinéticos das amostras de celulase livre e imobilizada;
- Estudo sobre modelagem computacional, para compreender as mudanças de conformação das enzimas do complexo enzimático e estudar como o substrato interfere na reação de hidrólise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, R. E. et al. Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014.

ADEN, A.; FOUST, T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 535–545, 2009.

AKIYAMA, G. et al. Cellulose hydrolysis by a new porous coordination polymer decorated with sulfonic acid functional groups. **Advanced Materials**, v. 23, n. 29, p. 3294–3297, 2011.

AL-RASHDI, K. S. et al. Structural and Mossbauer studies of nanocrystalline Mn²⁺ doped Fe₃O₄ particles. **Hyperfine Interact**, p. 1–11, 2018.

ALISSON, E. et al. Etanol de segunda geração poderá ser economicamente viável a partir de 2025. **Agência FAPESP**, p. 1–6, 2018.

ALMEIDA, M. P. S. DE. **Síntese e caracterização de nanopartículas de maguemitita recobertas com sílica funcionalizada com grupos amina**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2008.

ALONSO, D. M.; WETTSTEIN, S. G.; DUMESIC, J. A. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 24, p. 8075–8098, 2012.

ANDERSEN, N. **Enzymatic hydrolysis of cellulose: Experimental and modeling studies**. Tese (Doutorado em Química) - BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark, 2007

ARMENIA, I. et al. Enzyme activation by alternating magnetic field: Importance of the bioconjugation methodology. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 537, p. 615–628, 2019.

ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56–66, 2014.

AUDE, M. I. DA S. Growth stages of sugarcane and its effects on productivity. **Ciência Rural**, v. 23, p. 241-248, 1993.

BASSO, A. et al. In Silico analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilisation of CalB and PGA on sepabeads. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, n. 6, p. 877–886, 2007.

BECKHAM, G. T. et al. Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 231–238, 2011.

BELLESIA, G. et al. In silico studies of crystalline cellulose and its degradation by enzymes. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 11, p. 1184–1188, 2010.

BHATTACHARYA, A.; PLETSCHKE, B. I. Strategic optimization of xylanase-mannanase combi-CLEAs for synergistic and efficient hydrolysis of complex lignocellulosic substrates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 140–150, 2015.

BILAL, M. et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530–2544, 2018a.

BILAL, M. et al. State-of-the-art protein engineering approaches using biological

macromolecules: A review from immobilization to implementation view point. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 893–901, 2018b.

BISWAS, R.; PERSAD, A.; BISARIA, V. S. Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts. In: BISARIA, V. S.

Akihiko Kondo. **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**. USA: John Wiley & Sons, 2014. p. 3-7.

BJORK SIGURDARDÓTTIR, S. et al. Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. **Adv. Synth. Catal.**, v. 360, p. 2578 –2607, 2018.

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550–583, 2013.

BRODEUR, G. et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

BUDARIN, V. et al. Nanocatalysts for Biofuels. In POLSHETTIWAR, V. **Nanocatalysis Synthesis and Applications**. USA: John Wiley & Sons, 2013, p. 595–614.

CHAPMAN, J. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, p. 20–29, 2018.

CHEN, H. Z.; LIU, Z. H. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 5, p. 489–499, 2017.

CHENG, Y. S. et al. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1768–1784, 2010.

CHERIAN, E.; DHARMENDIRAKUMAR, M.; BASKAR, G. Immobilization of cellulase onto MnO₂ nanoparticles for bioethanol production by enhanced hydrolysis of

agricultural waste. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, v. 36, n. 8, p. 1223–1229, 2015.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, n. MAR, p. 1–13, 2014.

CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Restructuring the Crystalline Cellulose Hydrogen Bond Network Enhances Its Depolymerization Rate. p. 11163–11174, 2011.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326–346, 2011.

DA HORA MACHADO, A. E.; RUGGIERO, R.; NEUMANN, M. G. The photodegradation of lignins in the presence of hydrogen peroxide. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 107–115, 1994.

DANTAS, T. L. P. Decomposição de peroxide de hidrogênio em um catalisador híbrido e oxidação avançada de efluente têxtil por reagente de fenton modificado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

DAVIS, R. et al. Process Design and Economics for the Conversion of Lignocellulosic Biomass to Hydrocarbons: Dilute-Acid and Enzymatic Deconstruction of Biomass to Sugars and Biological Conversion of Sugars to Hydrocarbons. **National Renewable Energy Laboratory-NREL**, p. 147, 2013.

DIAS, M. O. de S. et al. Surgacane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.

DING, S. . & MICHAEL, E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 597–606, 2006.

DRAUZ, K.; H. GRÖGER, O. MAY. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: a Comprehensive Handbook**, Ed.: John Wiley & Sons, 2012.

FAN, L. T.; LEE, Y. -H; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 1, p. 177–199, 1980.

FERNANDES, A. N. et al. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 47, 2011.

GAMA, F. M. P. Mecanismo bioquímico de ação de celulasas de *Trichoderma reesei*. Tese (Doutorado em Engenharia Biológica), Escola de Engenharia - Departamento de Engenharia Biológica - Universidade do Minho, 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**, v. 38, n. 7, p. 1003–1018, 2003.

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

GOKHALE, A. A.; LEE, I. Cellulase immobilized nanostructured supports for efficient saccharification of cellulosic substrates. **Topics in Catalysis**, v. 55, n. 16–18, p. 1231–1246, 2012.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuel industry. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, 2008.

GUO, F. et al. Solid acid mediated hydrolysis of biomass for producing biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 5, p. 672–690, 2012.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide

nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 2005.

GUPTA, M. N.; BISARIA, V. S. Stable Cellulolytic Enzymes and Their Application in Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. v. 1700633, p. 1–10, 2018.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HEGNER, J. et al. Conversion of cellulose to glucose and levulinic acid via solid-supported acid catalysis. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 17, p. 2356–2358, 2010.

HILLS, G.; Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v.105, n. 10, p. 601–607, 2003.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 2007a.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–7, 2007b.

HUANG, Y. B.; FU, Y. Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. **Green Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 1095–1111, 2013.

HUMBIRD, D. et al. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. **National Renewable Energy Laboratory**, p. 1–147, 2011.

HUSAIN, Q. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 1, p. 37–43, 2011.

IBGE. **A Geografia da cana-de-açúcar**. Ed.: IBGE, Rio de Janeiro, 2017.

INGLE, A. P. et al. Comparative evaluation of free and immobilized cellulase for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for sustainable bioethanol production. **Cellulose**, v. 24, n. 12, p. 5529–5540, 2017.

JORDAN, J.; KUMAR, C. S. S. R.; THEEGALA, C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 139–146, 2011.

KIM, D. Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini review. **Molecules**, v. 23, n. 2, 2018.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083–1087, 2012.

KLYACHKO, N. L. et al. Changing the Enzyme Reaction Rate in Magnetic Nanosuspensions by a Non-Heating Magnetic Field. **Changes**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

KOSHLAND JR., D. E. Koshland - original. **Biol. Rev.**, v. 28, n. February, p. 416–436, 1953.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, 2017.

LANGAN, P.; NISHIYAMA, Y.; CHANZY, H. A Revised Structure and Hydrogen-

Bonding System in Cellulose II from a Neutron Fiber Diffraction Analysis. n. 11, p. 9940–9946, 1999.

LANGAN, P.; NISHIYAMA, Y.; CHANZY, H. X-ray Structure of Mercerized Cellulose II at 1 Å Resolution. p. 410–416, 2001.

LEE, C.-K.; AU-DUONG, A.-N. **Emerging Areas in Bioengineering 4 Enzyme Immobilization on Nanoparticles: Recent Applications**. First Edit ed. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018.

LEE, S. Y. et al. Inorganic nanomaterial-based biocatalysts. **BMB Reports**, v. 44, n. 2, p. 77–86, 2011.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236–6249, 2013.

LIU, C.; WYMAN, C. E. The effect of flow rate of very dilute sulfuric acid on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 43, n. 11, p. 2781–2788, 2004.

LU, A.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles : Synthesis, Protection, Functionalization and Application Angewandte. p. 1222–1244, 2007.

LUCENA, G. N. et al. Synthesis and characterization of magnetic cross-linked enzyme aggregate and its evaluation of the alternating magnetic field (AMF) effects in the catalytic activity. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 516, n. June, p. 167326, 2020.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology Downloaded from , 2013 by INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY MADRAS. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MACEDO, I. C. Geração de energia elétrica a partir de biomassa no Brasil: situação atual, oportunidades e desenvolvimento, Relatório para o MCT, Brasília, 2001.

MATTHEWS, J. F. et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Iβ. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 1, p. 138–152, 2006.

MAY, J. P.; LI, S. D. Hyperthermia-induced drug targeting. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 4, p. 511–527, 2013.

MELANI, R. B. *et al.* Key factors affecting the recalcitrance and conversion process of biomass. **BioEnergy Research**, v. 12, p.1-20, 2018.

MELLO, G. F. deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol celulósico. XII COBEQ - UFSCar, São Carlos, 2017.

MISSION, M.; ZHANG, H.; JIN, B. Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 12, n. 102, 2015.

MITTAL, A. et al. Production of Furfural from Process-Relevant Biomass-Derived Pentoses in a Biphasic Reaction System. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 7, p. 5694–5701, 2017.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MORANA, A. et al. Cellulases from Fungi and Bacteria and their biotechnological applications. In GOLAN, A. **Cellulase: Types and Action, Mechanism, and Uses**. UK Ed: Nova Science Pub, 2011.

MORTE, E. D. F. B. **SUPORTES MODIFICADOS COM PROPRIEDADES SUPERPARAMAGNETICAS**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE, Rio de Janeiro,

2017.

MULAT, D. G. et al. Enhancing methane production from lignocellulosic biomass by combined steam-explosion pretreatment and bioaugmentation with cellulolytic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2018.

NADEEM AKHTAR, KANIKA GUPTA, DINESH GOYAL, A. G. Effect of Hydrothermal Carbonization Reaction Parameters on. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 33, n. 3, p. 676–680, 2015.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 71–92, 2013.

NISHIYAMA, Y. et al. Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose Ia from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 47, p. 14300–14306, 2003.

NOVA CANA. Levantamento inédito detalha produção de etanol celulósico de Raízen e GranBio. Disponível em: < <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/levantamento-inedito-detalhes-producao-etanol-celulosico-raizen-granbio-270820>>. Acesso em: 10/02/2021.

NSOR-ATINDANA, J. et al. Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food. **Carbohydrate Polymers**, v. 172, n. April, p. 159–174, 2017.

P, K. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

PATURAU, J. M. By-products of the sugar cane industry – an introduction to their industrial utilization. 3^a Ed. Amsterdam, Elsevier, 435 p, 1989.

PAYE, J. M. D. et al. Biological lignocellulose solubilization: Comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

PAYNE, C. M. et al. Fungal Cellulases. **Chem. Rev.**, v. 115, p. 1308-1448, 2015.

PERCIVAL ZHANG, Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, 2006.

PERNA, M. S. C.; BASTOS, R. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotech.**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2018.

PRADO, H. F. A. et al. **Cellulase: Types and Action, Mechanism, and Uses**. Ed.: Nova Science Publishers, New York, 2011, p. 183-210.

RABELO, S. C. Avaliação E Otimização De Pré-Tratamentos E Hidrólise Enzimática Do Bagaço De Cana-De-Açúcar Para a Produção De Etanol De Segunda Geração. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - UNICAMP, Campinas, 2010.

RAI, M. et al. Emerging role of nanobiocatalysts in hydrolysis of lignocellulosic biomass leading to sustainable bioethanol production. **Catalysis Reviews**, p. 1–26, 2018.

RAMAKRISHNA, T. R. B. et al. Controlling enzyme function through immobilisation on graphene, graphene derivatives and other two dimensional nanomaterials. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 20, p. 3200–3218, 2018.

RAMOS, L. P.; NAZHAD, M. M.; SADDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 10, p. 821–831, 1993.

RAY, R. C.; BEHERA, S. S. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases. In BRAHMACHARI, G. **Biotechnology of Microbial Enzymes** Production,

Biocatalysis and Industrial Applications, Ed: Elsevier Inc., 2017.

ROSILLO-CALLE, F. BAJAY, S. V. ROTHMAN, U. Uso da biomassa para a produção de energia na indústria brasileira, Campinas, SP, Editora Unicamp, 2005.

SÁNCHEZ-RAMÍREZ, J. et al. Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for Agave Atrovirens lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 1, p. 9–22, 2017.

SARANRAJ, P.; STELLA, D.; REETHA, D. Microbial Cellulases and Its Applications: a Review. **International Journal of Biochemistry & Biotech Science**, v. 1, n. January 2012, p. 1–12, 2012.

SECUNDO, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6250–6261, 2013.

SEWALT, V. J. H.; GLASSER, W. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Lignin Impact on Fiber Degradation. 3. Reversal of Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Chemical Modification of Lignin and by Additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1823–1828, 1997.

SHARMA, A.; TEWARI, R. Cellulases : Classification , Methods of Determination and Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1346–1380, 2016.

SHELDON, R. A. Enzymatic Conversion of First- and Second-Generation Sugars. In: VAZ JR., S. (Ed.). . **Biomass and Green Chemistry: Building a Renewable Pathway**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 169–189.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SIRO, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials :

a review. p. 459–494, 2010.

SOMMARUGA, S. et al. Immobilization of carboxypeptidase from *Sulfolobus solfataricus* on magnetic nanoparticles improves enzyme stability and functionality in organic media. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

SONG, J. et al. Attachment of enzymes to hydrophilic magnetic nanoparticles through DNA-directed immobilization with enhanced stability and catalytic activity. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 8458–8468, 2018.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 277–283, 2010.

STROHMEIER, G. A. et al. Application of designed enzymes in organic synthesis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4141–4164, 2011.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

SUZUKI, M. et al. Encouragement of enzyme reaction utilizing heat generation from ferromagnetic particles subjected to an AC magnetic field. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2015.

SUZUKI, M. et al. Efficient DNA ligation by selective heating of DNA ligase with a radio frequency alternating magnetic field. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, n. July, p. 360–364, 2016.

TANG, W. et al. Polyamine-induced tannic acid co-deposition on magnetic nanoparticles for enzyme immobilization and efficient biodiesel production catalysed by an immobilized enzyme under an alternating magnetic field. **Catalysis Science and Technology**, v. 9, n. 21, p. 6015–6026, 2019.

TARTAJ, P. et al. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290- 291 PA, p. 28–34, 2005.

TEYMOURI, F. et al. Ammonia Fiber Explosion Treatment of Corn Stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, n. 1–3, p. 0951–0964, 2004.

VANDERHART, D. L.; ATALLA, R. H. Studies of Microstructure in Native Celluloses Using Solid-State NMR. **Macromolecules**, v. 17, p. 1465–1472, 1984.

VATS, S. et al. Development of a microbial consortium for production of blend of enzymes for hydrolysis of agricultural wastes into sugars. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 72, n. 9–10, p. 585–590, 2013.

WADA, M. et al. Cellulose III I Crystal Structure and Hydrogen Bonding by Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. p. 8548–8555, 2004.

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 3–14, 1991.

WANG, Z. et al. Lignosulfonate-mediated cellulase adsorption: Enhanced enzymatic saccharification of lignocellulose through weakening nonproductive binding to lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.

WU, W. et al. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 2, p. 23501, 2015.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18 SPEC. ISS., p. 1959–1966, 2005.

XU, M. Q. et al. Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts. **Catalysts**, v. 8, n. 10, p. 1–20, 2018.

ZAKHARCHENKO, A. et al. Magnetic field remotely controlled selective biocatalysis.

Nature Catalysis, v. 1, n. 1, p. 73–81, 2018.

ZDARTA, J. et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, 2018.

ZHANG, W. et al. Increase in stability of cellulase immobilized on functionalized magnetic nanospheres. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 375, p. 117–123, 2015.

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.

ZHAO, F.; ZHANG, B.; FENG, L. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles. **Materials Letters**, v. 68, n. 01, p. 112–114, 2012.

ZHENG, Y. et al. Chapter One Principles and Development of Lignocellulosic Biomass Pretreatment for Biofuels. In: **Advances in Bioenergy**, Ed.: Elsevier, Holanda, 2017.

APÊNDICE I

Pré-tratamento do bagaço de cana

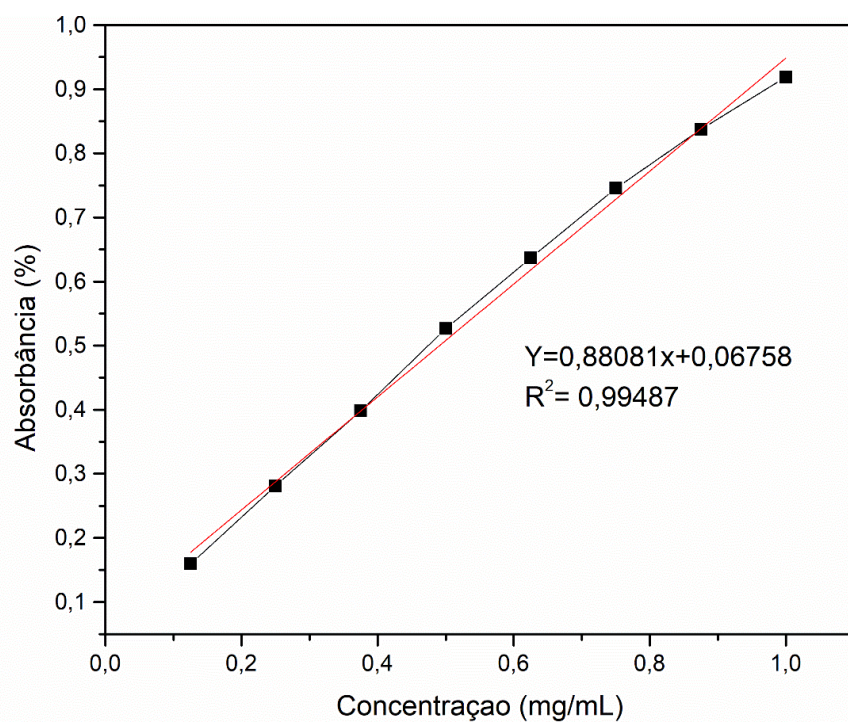
O bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado e submetido à hidrólise ácida (pré-tratamento) em autoclave utilizando Erlenmeyer com capacidade volumétrica de 5 litros. A hidrólise foi realizada empregando-se 2 % (p/v) de ácido sulfúrico para uma relação sólido-líquido de 1:10, temperatura de 121 °C por 71 minutos (TÉLLEZ-LUIS, 2002, apud MELLO, 2017). O hidrolisado hemicelulósico obtido, após ser filtrado para separação da massa sólida (celulignina), foi armazenado em câmara fria a 4 °C. A celulignina resultante dessa etapa foi lavada com água para remoção do ácido residual, seca ao sol até umidade em torno de 10 % e armazenada à temperatura ambiente para posterior processo de deslignificação.

Deslignificação do bagaço de cana pré-tratada

O sólido resultante da etapa de pré-tratamento (celulignina) foi submetido a um processo de deslignificação alcalina, em autoclave utilizando Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL, com uma relação sólido-líquido de 1:20, a uma temperatura de 110 °C (DUSSÁN, 2014, apud MELLO, 2017), concentração de NaOH 2,2%p/v) e o tempo de reação de 100 min. A fração sólida obtida (celulose) foi lavada com água destilada para remoção da lignina extraída até pH neutro. Após este procedimento, a fração celulósica obtida tem 85 % de celulose

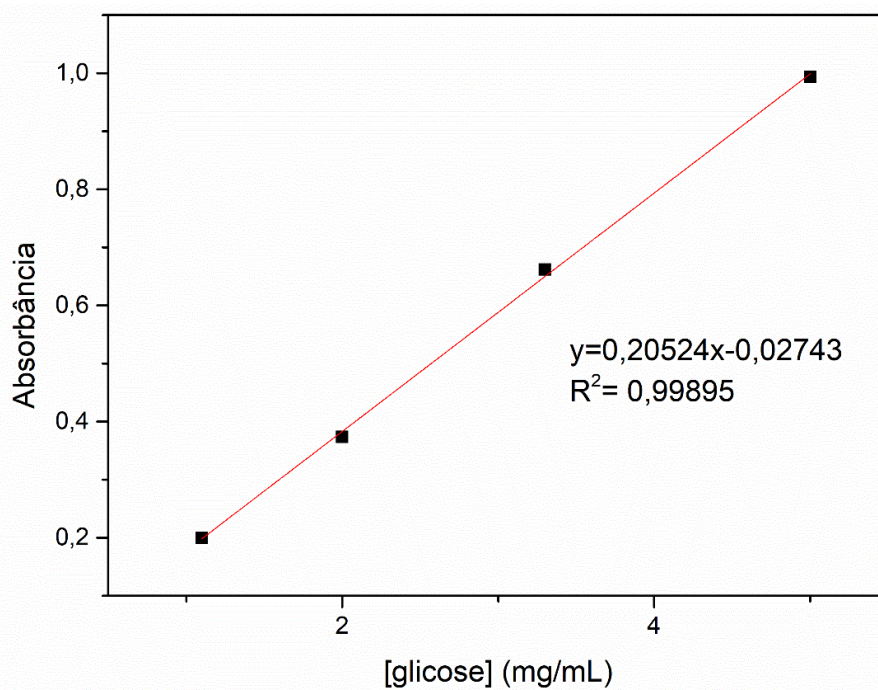
ANEXO I

Figura 1 - Curva e calibração para a dosagem de proteína.



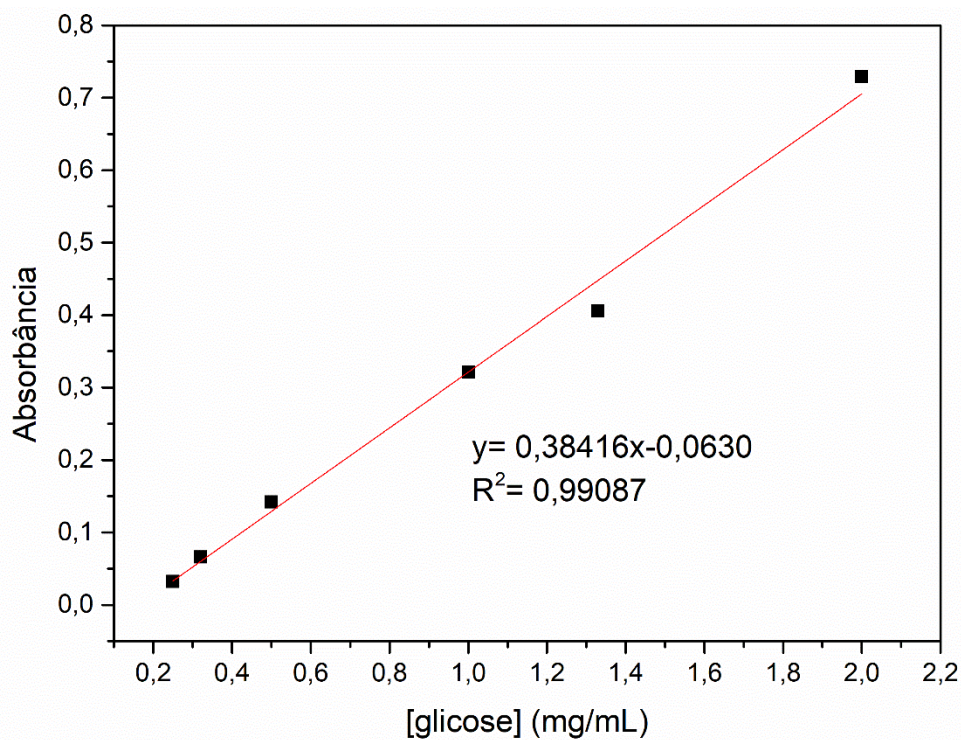
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2 - Curva de calibração para a ensaio FPU.



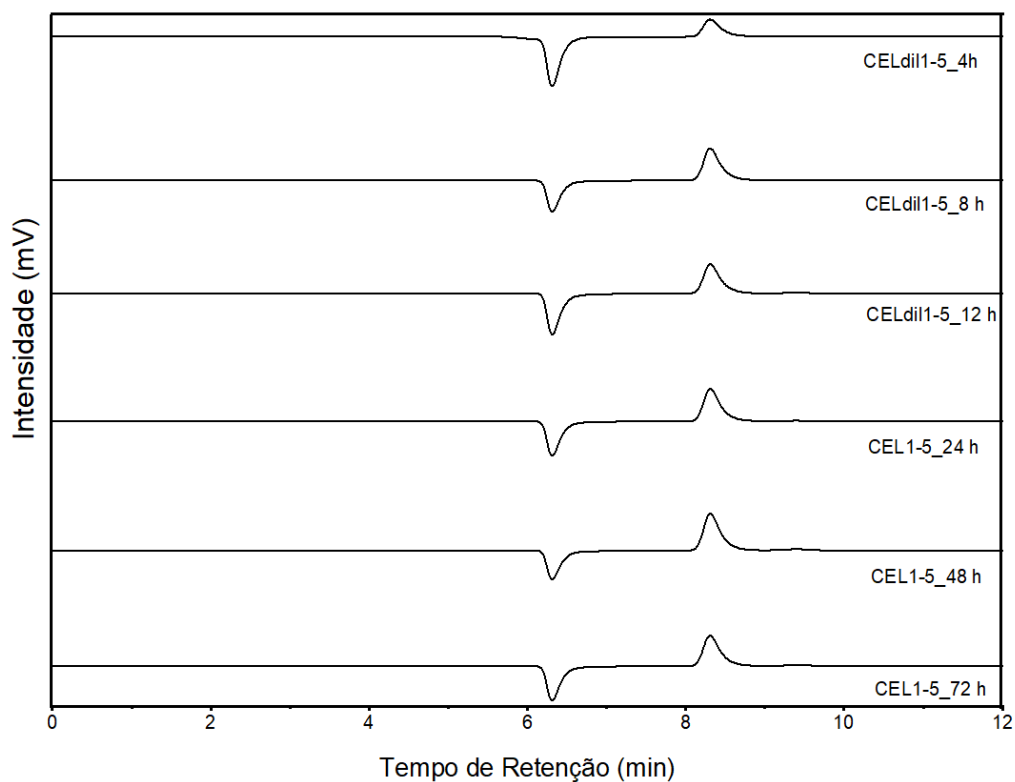
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 3 - Curva de calibração para a ensaio de atividade para endoglicanase.



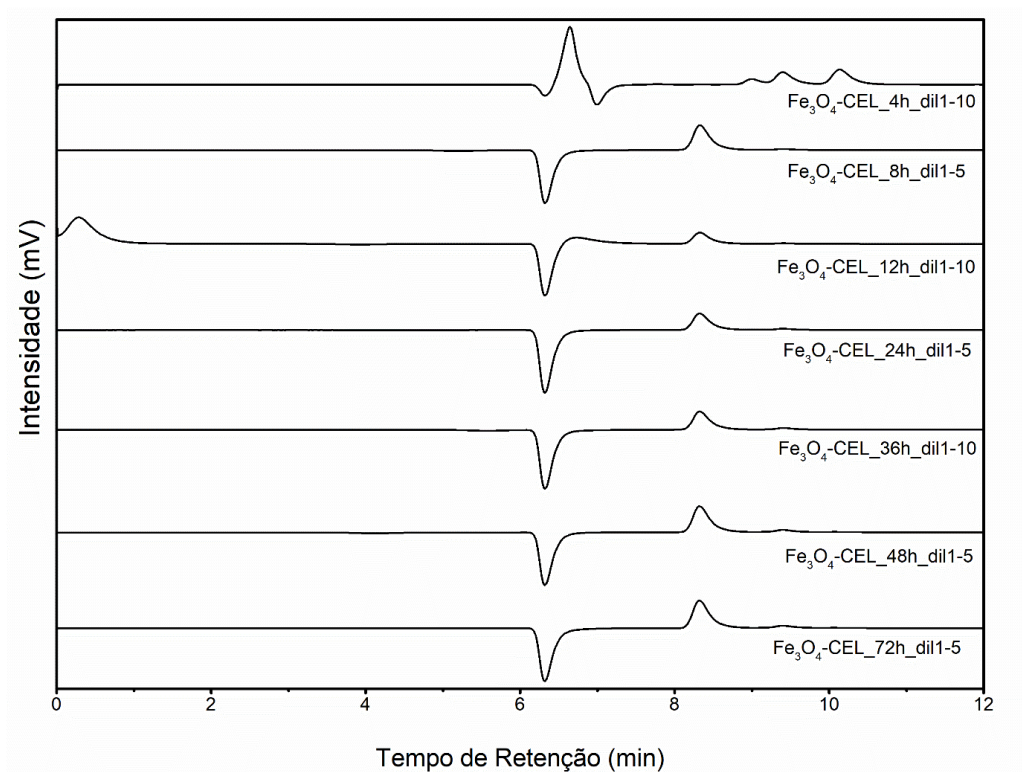
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4 - Hidrólise de bagaço de cana utilizando celulase livre.



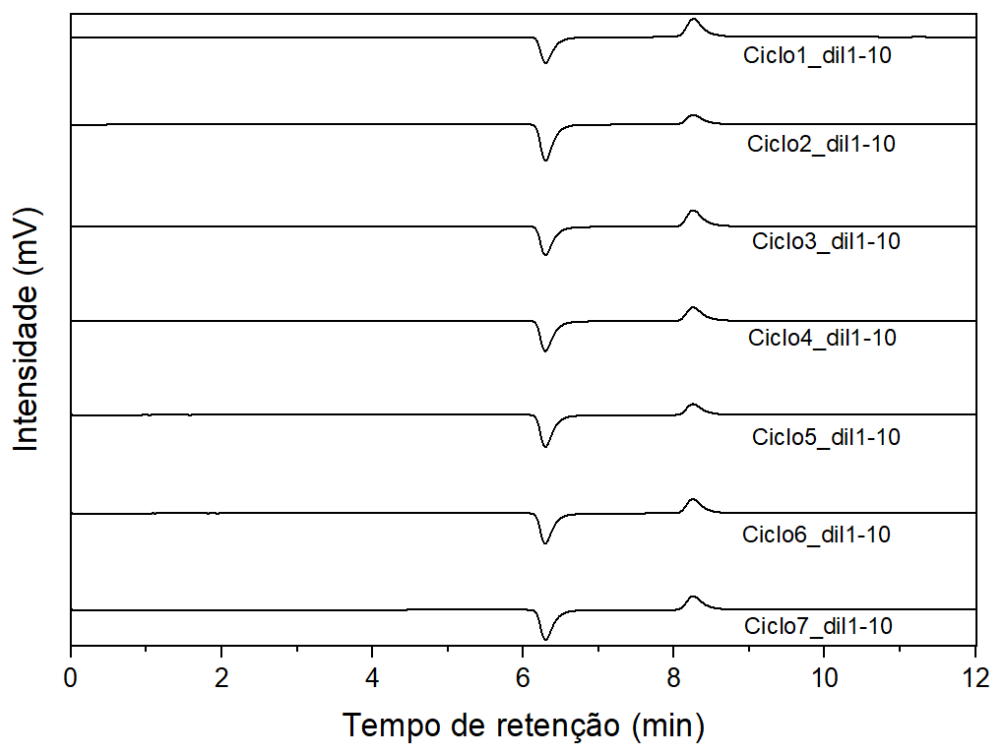
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 – Hidrólise de celulignina utilizando biocatalisador magnético.



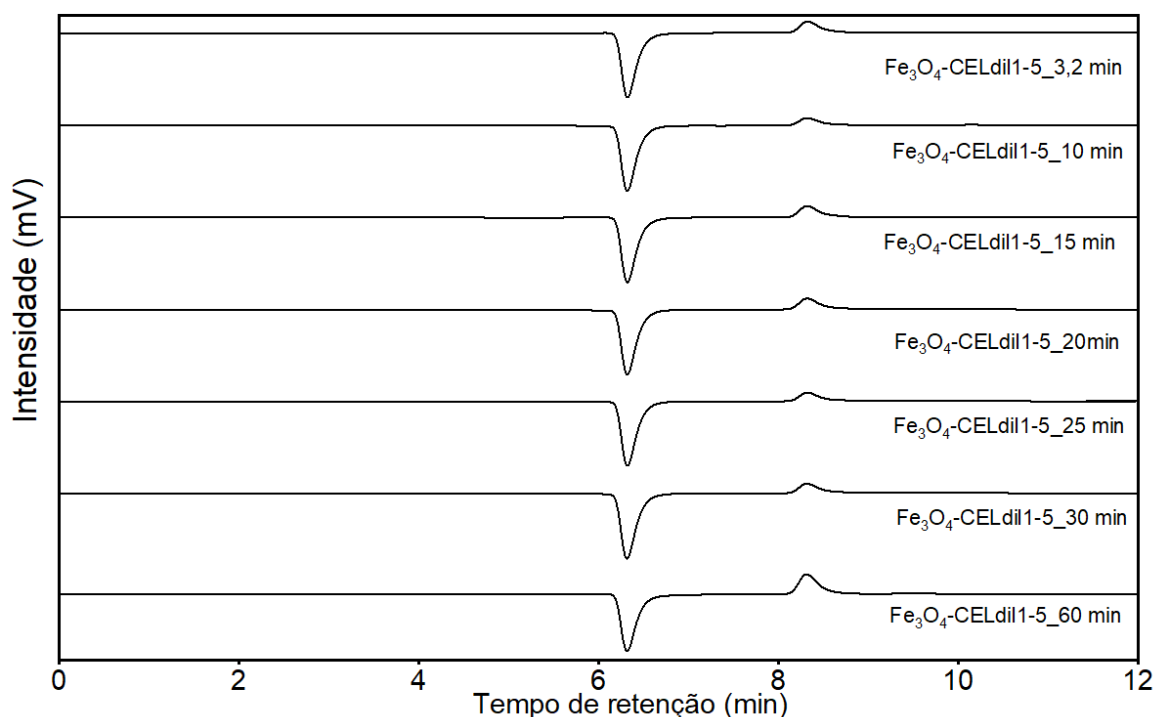
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6 - Hidrólise de bagaço de cana utilizando $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CEL}$ realizada em ciclos de 24 h.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7 - Hidrólise de CMC em campo magnético alternado.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1 - Composição de Celulignina (bagaço de cana pré-tratada utilizada na análise).

Componentes	Bagaço “in natura”	Celulignina
Celulose (%)	32,49 ± 1,66	105,5 ± 1,05
Hemicelulose (%)	21,83 ± 0,68	13,37 ± 0,85
Lignina total (%)	27,80 ± 1,30	34,63 ± 0,84
Acetil (%)	2,87 ± 0,49	0,54 ± 0,08
Extrativos (%)	15,40 ± 0,64	
Cinzas (%)	5,17 ± 0,32	3,05 ± 0,04
Total (%)	105,5 ± 1,05	99,05 ± 0,39

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Efeito do pH na atividade enzimática (FPU).

<i>pH</i>	<i>Atividade</i>	<i>Atividade</i>
	<i>Hidrolítica FPU</i>	<i>Hidrolítica FPU</i>
	<i>CEL</i>	<i>Fe₃O₄-CEL</i>
3	403±0,00	83±0,00
4	410±0,00	23±0,00
4,8	424±0,00	56±0,00
5	415±0,00	74±0,00
5,5	404±0,00	82±0,00
6	269±0,00	0±0,00
6,5	246±0,00	0±0,00
7	189±0,00	51±0,00
7,5	164±0,00	66±0,00
8	162±0,00	157±0,00
9	0±0,00	149±0,00
10	0±0,00	123±0,00

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Efeito da temperatura na atividade enzimática (FPU).

<i>T(°C)</i>	<i>Atividade</i>	<i>Atividade</i>
	<i>Hidrolítica FPU</i>	<i>Hidrolítica FPU</i>
	<i>CEL</i>	<i>Fe₃O₄-CEL</i>
35	0±0,00	622±0,00
40	365±0,00	439±0,00
45	542±0,00	680±0,00
50	526±0,00	761±0,00
55	628±0,00	734±0,00
60	653±0,00	903±0,00

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 4 - Efeito do pH na atividade enzimática (endoglicanases).

<i>pH</i>	<i>Atividade Hidrolítica para endoglicanases (U/mL) CEL</i>	<i>Atividade Hidrolítica para endoglicanases (U/mL) Fe₃O₄-CEL</i>
3	787 ± 6,18	163 ± 1,66
4	926 ± 1,72	134 ± 3,98
4,8	883 ± 21,39	84,0 ± 4,23
5	768 ± 3,63	228 ± 0,832
6	414 ± 0,00	187 ± 5,40
7	310 ± 0,00	228 ± 0,00
8	0,00 ± 0,00	222 ± 1,15
9	0,00 ± 0,00	267 ± 0,00
10	0,00 ± 0,00	238 ± 2,36

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 - Efeito da temperatura na atividade enzimática (FPU).

<i>T(°C)</i>	<i>Atividade Hidrolítica Endoglicanase CEL</i>	<i>Atividade Hidrolítica Endoglicanase Fe₃O₄-CEL</i>
35	376 ± 3,36	604 ± 3,29
40	447 ± 1,72	652 ± 4,93
45	957 ± 2,26	1314 ± 0,40
50	683 ± 2,26	828 ± 3,97
55	581 ± 0,00	2012 ± 1,489
60	720 ± 6,85	1312 ± 12,50

Fonte: Elaborada pela autora.

