



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

LEONARDO MOREIRA ROPELATO

**IMOBILIZAÇÃO DE ENDOGLUCANASE E XILANASE DE
PREPARADO ENZIMÁTICO COMERCIAL EM ÓXIDO DE
GRAFENO MAGNETIZADO**

Araraquara, SP

2022

LEONARDO MOREIRA ROPELATO

**IMOBILIZAÇÃO DE ENDOGLUCANASE E XILANASE DE
PREPARADO ENZIMÁTICO COMERCIAL EM ÓXIDO DE
GRAFENO MAGNETIZADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Roberto Paz Cedeño

Araraquara, SP

2022

R785i Ropelato, Leonardo Moreira.
Imobilização de endoglucanase e xilanase de preparado enzimático comercial em óxido de grafeno magnetizado / Leonardo Moreira Ropelato.
– Araraquara: [S.n.], 2022.
66 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Fernando Masarin.
Coorientador: Fernando Roberto Paz Cedeño.

1. Óxido de grafeno. 2. Imobilização de enzimas. 3. Enzimas celulolíticas. 4. Subprodutos agroindustriais. 5. Hidrólise enzimática. 6. Endoglucanase. 7. Xilanase. 8. Celluclast. I. Masarin, Fernando, orient. II. Paz Cedeño, Fernando Roberto, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a Deus por me permitir vivenciar e concluir um importante ciclo em minha vida profissional.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe e ao meu irmão, por todo apoio e suporte prestado durante esse importante ciclo e também durante o desenvolvimento do presente Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço à minha namorada, Marcela, por todo apoio e incentivo durante toda a minha graduação.

Agradeço ao meu Orientador, Fernando Masarin, por todos os ensinamentos, parcerias e por todo suporte técnico prestado durante o desenvolvimento do meu projeto.

Também agradeço ao Fernando Paz, que como meu Coorientador me ensinou muitas coisas e muitas vezes me guiou no dia a dia do laboratório.

Meus sinceros agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio fornecido para o desenvolvimento do projeto de Iniciação Científica que foi utilizado integralmente no presente Trabalho de Conclusão de Curso.

Estendo os meus agradecimentos a todos os(as) técnicos(as) e companheiros(as) de pesquisa dos laboratórios do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, e do laboratório de Enzimologia do Departamento de Alimentos e Nutrição, por todos os ensinamentos e auxílios prestados no dia a dia.

Por fim, agradeço também a todo o corpo Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial aos Docentes do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, por contribuírem com a minha formação profissional.

RESUMO

Uma etapa fundamental no processamento de subprodutos ricos em celulose e hemicelulose é a sua hidrólise em açúcares monoméricos e sua posterior conversão em bioprodutos de interesse comercial. A hidrólise química e/ou física geralmente gera custos energéticos altos e subprodutos tóxicos. Nesse contexto, a aplicação de enzimas neste tipo de hidrólise é muito mais correta e amigável ao meio ambiente. Entretanto, o uso industrial de enzimas pode ser inviável economicamente dependendo de seu custo e da dificuldade de reuso, bem como da manutenção de sua estabilidade durante o processo biocatalítico. A fim de superar essas limitações, surge como técnica promissora a imobilização de enzimas em materiais sólidos. Nesse contexto, o presente projeto propôs imobilizar enzimas celulolíticas, de preparado enzimático comercial, em óxido de grafeno magnetizado (OGM) e avaliar o potencial da imobilização e atividade catalítica no presente suporte. A síntese de óxido de grafeno magnetizado (OGM) apresentou um rendimento de 15,9 vezes superior em relação à quantidade inicial de óxido de grafeno (OG) utilizada. Foi definida uma faixa ideal para a quantidade de proteínas adicionadas na imobilização de 55-65 mg por grama de suporte, considerando a saturação do suporte e a estabilização da atividade enzimática, com um rendimento de imobilização por proteínas de 68% e cerca de 42 mg de proteína imobilizada por grama de suporte. As condições ideais para a atividade de endoglucanase e xilanase, livres e imobilizadas, encontraram-se na faixa de pH 4-5 e temperatura de 50-70°C. A fim de avaliar a imobilização das presentes enzimas de maneira mais assertiva, foram determinados os parâmetros de Rendimento, a Eficiência e Atividade Recuperada a partir das atividades enzimáticas. Os rendimentos para imobilização de endoglucanase e xilanase em OGM pela rota utilizada foram regulares e iguais a 25,6 e 40%, respectivamente. Contudo, as eficiências alcançadas foram de 70,9 e 84,4%. O derivado imobilizado apresentou atividade de endoglucanase e xilanase de $191,7 \pm 7,6$ e $337,5 \pm 58,0$ U por grama de suporte, respectivamente, nas condições ideais previamente determinadas. A partir do estudo de estabilidade térmica realizado constatou-se que a imobilização covalente de endoglucanase e xilanase em OGM pela rota de imobilização utilizada não melhorou a estabilidade térmica das enzimas estudadas. Contudo, tais resultados não são capazes, de forma isolada, de descartar o potencial da aplicação do derivado obtido, uma vez que a imobilização de enzimas em suportes sólidos visa facilitar a sua separação do meio, recuperação e reutilização, parâmetros fundamentais para as aplicações industriais.

Palavras chaves: Óxido de grafeno; Imobilização de enzimas; Enzimas celulolíticas; Subprodutos agroindustriais; Hidrólise enzimática; Endoglucanase; Xilanase; Celluclast.

ABSTRACT

A fundamental step in the processing of by-products rich in cellulose and hemicellulose is their hydrolysis into monomeric sugars and their subsequent conversion into bioproducts of commercial interest. Chemical and physical hydrolysis often generates high energy costs and toxic by-products. In this context, the application of enzymes in this type of hydrolysis is much more correct and environmentally friendly. However, the industrial use of enzymes may be economically unfeasible depending on their cost and the difficulty of reuse, as well as the maintenance of their stability during the biocatalytic process. In order to overcome these limitations, the immobilization of enzymes in solid materials appears as a promising technique. In this context, the present project proposed to immobilize cellulolytic enzymes, from commercial enzyme preparations, in magnetized graphene oxide (MGO) and to evaluate the potential of immobilization and catalytic activity in the present support. The synthesis of magnetized graphene oxide (MGO) showed a yield of 15.9 times higher than the initial amount of graphene oxide (GO) used. An ideal range was defined for the amount of proteins added in the immobilization of 55-65 mg per gram of support, considering the saturation of the support and the stabilization of the enzymatic activity, with a protein immobilization yield of 68% and about 42 mg of protein immobilized per gram of support. The ideal conditions for the activity of endoglucanase and xylanase, free and immobilized, were found in the range of pH 4-5 and temperature of 50-70°C. In order to assess the immobilization of the present enzymes in a more assertive way, the parameters of Yield, Efficiency and Recovered Activity were determined from the enzymatic activities. Yields for immobilization of endoglucanase and xylanase in MGO by the route used were regular and equal to 25.6 and 40%, respectively. However, the efficiencies achieved were 70.9 and 84.4%. The immobilized derivative showed endoglucanase and xylanase activity of 191.7 ± 7.6 and 337.5 ± 58.0 U per gram of support, respectively, under the ideal conditions previously determined. From the thermal stability study carried out, it was found that the covalent immobilization of endoglucanase and xylanase in GMO by the immobilization route used did not improve the thermal stability of the studied enzymes. However, such results are not able, in isolation, to rule out the potential application of the derivative obtained, since the immobilization of enzymes on solid supports aims to facilitate their separation from the medium, recovery and reuse, fundamental parameters for industrial applications.

Keywords: Graphene oxide; Immobilization of enzymes; Cellulolytic enzymes; Agro-industrial by-products; Enzymatic hydrolysis; Endoglucanase; Xylanase; Celluclast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do grafeno e do óxido de grafeno.....	12
Figura 2 - Rota esquemática para a síntese de Fe ₃ O ₄ @GO.....	13
Figura 3 - Imobilização por ligação covalente em suporte funcionalizado.....	14
Figura 4 - Imagens de microscopia de força atômica da peroxidase de rábano (HRP) ligada ao GO.....	15
Figura 5 - Procedimento de magnetização, funcionalização do óxido de grafeno e imobilização de Lipase.....	15
Figura 6 - Representação esquemática do processo completo de imobilização de enzimas em óxido de grafeno magnetizado e funcionalizado com EDAC e NHS e dispersão de derivado imobilizado.....	16
Figura 7 - Representação da estrutura de um fragmento de celulose.....	17
Figura 8 - Estrutura de uma xilana de <i>Eucalyptus</i>	19
Figura 9 - Estrutura modelo da lignina.....	19
Figura 10 - Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira e microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular.....	20
Figura 11 - Microscopia eletrônica de lignocelulósico e modelo didático que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas.....	21
Figura 12 - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i>	22
Figura 13 - Atividade relativa de endoglucanases de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em função de diferentes temperaturas.....	31
Figura 14 - Atividade relativa de endoglucanases de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em função de diferentes valores de pH.....	32
Figura 15 - Atividade relativa de xilanase de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em função de diferentes temperaturas.....	33
Figura 16 - Atividade relativa de xilanase de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em função de diferentes valores de pH.....	34
Figura 17 - Óxido de Grafeno (OG) após secagem e devido armazenamento.....	36
Figura 18 - Processo de lavagem do Óxido de grafeno Magnetizado (OGM), com o auxílio de um ímã.....	37
Figura 19 - Óxido de Grafeno Magnetizado (OGM) sendo atraído por um ímã.....	38
Figura 20 - Rendimento de imobilização (%), Proteína imobilizada (mg.g ⁻¹) e Atividade de xilanase (UI.g ⁻¹) em cada ensaio realizado, em relação a quantidade de Proteína adicionada (mg).....	39

Figura 21 - Rendimento de imobilização (%), Proteína imobilizada (mg.g^{-1}) e Atividade de endoglucanase (UI.g^{-1}) em cada ensaio realizado, em relação a quantidade de Proteína adicionada (mg).....	39
Figura 22 - Rendimento de imobilização por proteínas em função do tempo de imobilização.....	42
Figura 23 - Atividade relativa de endoglucanase, de preparado enzimático comercial, na forma livre e imobilizada em OGM, em função de diferentes valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	43
Figura 24 - Atividade relativa de endoglucanase, de preparado enzimático comercial, na forma livre e imobilizada em OGM, em função de diferentes valores de pH.....	44
Figura 25 - Atividade relativa de xilanase, de preparado enzimático comercial, na forma livre e imobilizada em OGM, em função de diferentes valores de Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	45
Figura 26 - Atividade relativa de xilanase, de preparado enzimático comercial, na forma livre e imobilizada em OGM, em função de diferentes valores de pH.....	46
Figura 27 - Estabilidade térmica de endoglucanase e xilanase nas formas livres e imobilizadas em OGM.....	51
Figura 28 - Estabilidade de armazenamento de endoglucanase e xilanase imobilizadas em OGM, considerando-se a Atividade Relativa (%) do derivado em função do tempo de armazenamento (dias).....	54
Figura 29 - Curva analítica para determinação da concentração de glicose (Apêndice).....	63
Figura 30 - Curva analítica para determinação da concentração de xilose (Apêndice).....	63
Figura 31 - Curva analítica para determinação da quantidade de proteínas totais, via método de Bradford (Apêndice).....	64
Figura 32 - Curva analítica para determinação da quantidade de proteínas totais, via método de Bradford, utilizando-se 0,5 mL de amostra (Apêndice).....	64
Figura 33 - Curva analítica para determinação da concentração de p-nitrofenol (mg/mL) (Apêndice).....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. Óxido de grafeno (OG).....	12
3.2. Magnetização do óxido de grafeno (OG).....	13
3.3. Imobilização de enzimas.....	13
3.4. Imobilização de enzimas em óxido de grafeno como suporte.....	14
3.5. Composição química e estrutura dos materiais lignocelulósicos.....	16
3.6. Enzimas de interesse comercial para conversão de biomassa.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Determinação de atividade enzimática.....	23
4.2. Determinação de proteínas.....	25
4.3. Determinação da temperatura ideal para atividade enzimática.....	25
4.4. Determinação do pH ideal para atividade enzimática.....	25
4.5. Síntese do óxido de grafeno (OG).....	26
4.6. Síntese do óxido de grafeno magnetizado (OGM).....	26
4.7. Imobilização covalente de celulases e xilanases em OGM.....	27
4.8. Avaliação do rendimento de imobilização em função do tempo.....	28
4.9. Determinação da estabilidade térmica de endoglucanase e xilanase.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Atividades enzimáticas do preparado comercial Celluclast.....	30
5.2. Avaliação das condições ideais para atividade enzimática de endoglucanase e xilanase.....	31
5.3. Atividades de endoglucanase e xilanase nas condições ideais.....	35

5.4. Síntese de óxido de grafeno (OG).....	35
5.5. Síntese de óxido de grafeno magnetizado (OGM).....	36
5.6. Imobilização de endoglucanase e xilanase em óxido de grafeno magnetizado (OGM).....	38
5.7. Avaliação do rendimento de imobilização em função do tempo.....	41
5.8. Avaliação das condições ideais para atividade enzimática de endoglucanase e xilanase imobilizadas em OGM.....	43
5.9. Determinação dos parâmetros de imobilização.....	49
5.10. Estabilidade térmica de endoglucanase e xilanase imobilizadas em OGM.....	51
5.11. Estabilidade de armazenamento de endoglucanase e xilanase imobilizadas em OGM.....	53
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS.....	57
8. APÊNDICE.....	63

1. INTRODUÇÃO

As celulasas e hemicelulasas são enzimas capazes de promover a hidrólise de materiais lignocelulósicos que é composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em conjunto para a liberação de oligossacarídeos e monômeros de açúcares com menor complexidade estrutural e mais facilmente metabolizados (MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

O Brasil, um dos maiores produtores agrícolas do mundo, gera quantidades significativas de subprodutos agroindustriais decorrentes do processamento de produtos como cana-de-açúcar, arroz, milho, soja, dentre outros (MORAES et al., 2017). Sendo assim, são provenientes principalmente de indústrias dos setores sucroalcooleiro, celulose e papel, e alimentos. Os subprodutos da agroindústria são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, e, portanto, apresentam grande potencial para reutilização. Atualmente, a reutilização destes potenciais subprodutos tem crescido substancialmente abrangendo aspectos econômicos e ambientais (FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017). Uma etapa chave no processamento da celulose e da hemicelulose refere-se à hidrólise enzimática dessas frações visando à liberação de açúcares fermentescíveis e sua posterior aplicação industrial na produção de bioprodutos de interesse comercial (MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

A aplicação de enzimas em escala industrial pode não ser viável economicamente se o processo apresentar elevado custo e dificuldades de manutenção da estabilidade estrutural da enzima durante. A fim de superar essas limitações, surge como uma alternativa a técnica de imobilização de enzimas. De acordo com Aragon (2013) a imobilização enzimática em materiais sólidos oferece muitas vantagens, destacando-se o seu reuso, a possível separação do produto e o aumento da estabilidade da enzima. A imobilização por ligação do tipo covalente, um dos métodos de imobilização mais estudados, envolve o acoplamento irreversível de enzimas a um suporte adequado. Este método, portanto, oferece uma forma mais estável da enzima em seu suporte. Embora a literatura ainda não reporte muitos estudos acerca da ligação de biomacromoléculas (enzimas) ao óxido de grafeno (OG), sabe-se que o mesmo possui uma grande área superficial, abundantes grupos funcionais contendo oxigênio (como grupos epóxi, hidroxila e carboxila) e capacidade de dispersar-se em água, permitindo que o OG seja um material muito promissor para a imobilização de enzimas de interesse comercial (HEIDARIZADEH et al., 2017; PARK, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar a imobilização covalente de endoglucanase e xilanase de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em óxido de grafeno magnetizado (OGM).

2.2. Objetivos específicos

• Determinar as condições ideais para a atividade enzimática de endoglucanase e xilanase de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em sua forma livre;

• Sintetizar o óxido de grafeno magnetizado (OGM);

• Imobilizar covalentemente endoglucanase e xilanase em suporte de óxido de grafeno magnetizado (OGM);

• Avaliar o rendimento de imobilização em função do tempo;

• Determinar as condições ideais para a atividade enzimática de endoglucanase e xilanase do derivado imobilizado;

• Avaliar o potencial de imobilização de endoglucanase e xilanase em suporte de óxido de grafeno magnetizado (OGM);

• Avaliar a estabilidade térmica de endoglucanase e xilanase de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em suas formas livre e imobilizada em OGM;

• Avaliar a estabilidade de armazenamento de endoglucanase e xilanase, de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) imobilizadas em OGM;

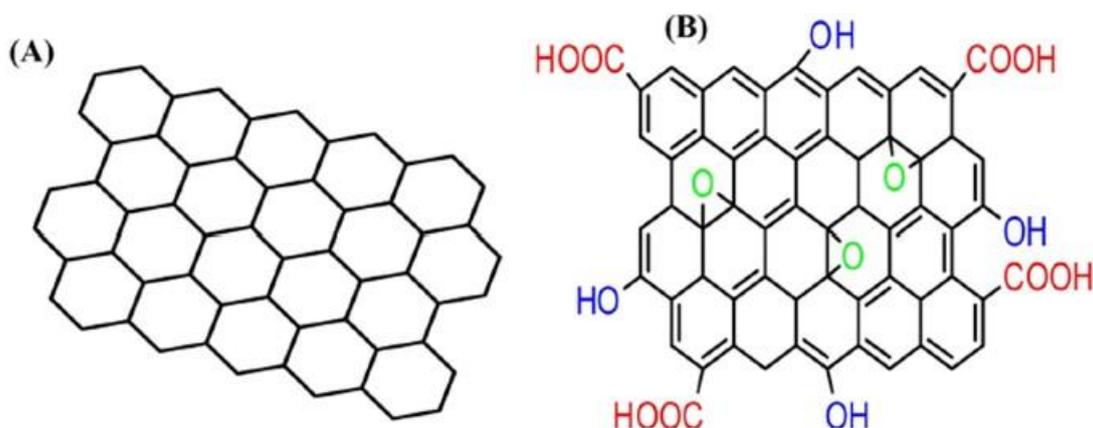
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Óxido de grafeno

Estudos acerca da oxidação de grafite têm sido realizados há mais de um século, abrangendo desde sua caracterização até suas aplicações. O grafite reage com agentes oxidantes fortes, tais como permanganato de potássio (KMnO_4) e ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e, posteriormente, segue-se os processos de purificação e esfoliação em água, como introduzido por Hummers e Offeman (HUMMERS; OFFEMAN, 1958).

O óxido de grafite tem uma estrutura em forma de camadas semelhante à do grafite, porém o plano dos átomos de carbono está ligado à vários grupos que contêm oxigênio, os quais são responsáveis por expandir a distância entre as camadas e torná-las hidrofílicas. Estas camadas oxidadas podem ser esfoliadas em água sob a ação de ultrassom. Quando o material esfoliado contém apenas uma ou poucas camadas de átomos de carbono, como o grafeno, denomina-se óxido de grafeno (OG) (NOVOSELOV, 2004) (Figura 1).

Figura 1. Fórmula estrutural do grafeno (A) e do óxido de grafeno (B).



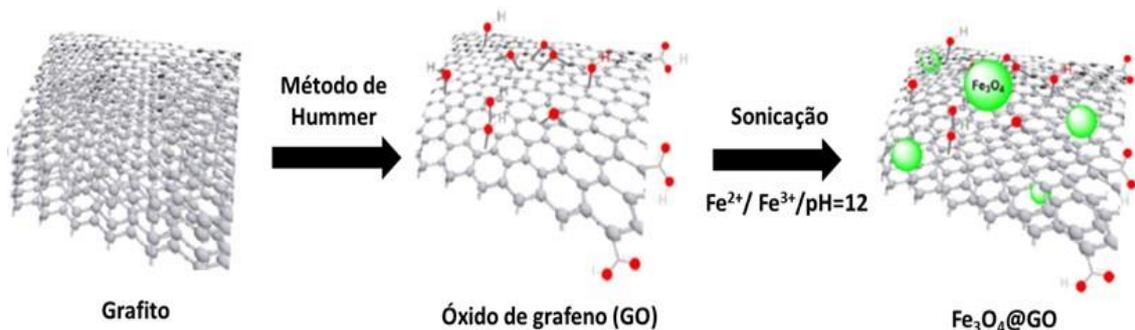
Fonte: ADEEL et al., 2018.

Sendo assim, o OG é um material de camada atômica única formada por moléculas de carbono, hidrogênio e oxigênio, e pode ser obtido pela oxidação de cristais de grafite, os quais são baratos e abundantes (RAY, 2015; ADEEL et al., 2018). Desta forma, o OG apresenta potencial para ser empregado em processos de imobilização de enzimas. Recentemente, alguns trabalhos sobre magnetização de OG, junto à sua utilização como suporte para imobilização de enzimas, têm revelado grande potencial para essa aplicação (HEIDARIZADEH et al., 2017).

3.2. Magnetização do óxido de grafeno (OG)

Desde a descoberta das primeiras nanopartículas magnéticas, foram desenvolvidos vários tipos de aplicações e dentre elas, pode-se destacar a catálise (ROSTAMNIA et al., 2015; ROSTAMNIA; DOUSTKHAH, 2015; SBISSI et al., 2015). As nanopartículas magnéticas podem ser formadas a partir de óxido de ferro III (Fe_3O_4) e óxido de ferro II (Fe_2O_3). Estes nanomateriais são famosos por suas propriedades magnéticas, as quais permitem sua fácil recuperação com o auxílio de um ímã externo (DOUSTKHAH; ROSTAMNIA, 2016). Doustkhah e Rostamnia (2016) mostraram que nanopartículas de Fe_3O_4 podem ser ligadas à superfície do OG por coprecipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução alcalina sobre a adição de amônia a 80°C (Figura 2).

Figura 2. Rota esquemática para a síntese de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$.



Fonte: DOUSTKHAH; ROSTAMNIA, 2016.

3.3. Imobilização de enzimas

Enzimas são biocatalisadores específicos e sustentáveis na natureza. A biocatálise surgiu como uma importante tecnologia para atender à crescente demanda por produtos mais sustentáveis, especialmente na síntese de produtos farmacêuticos, alimentícios e outros produtos químicos finos. Graças aos avanços nas áreas de biotecnologia e de engenharia de proteínas, atualmente é possível produzir a maioria das enzimas para fins comerciais, de tal maneira a garantir as propriedades enzimáticas desejadas, tais como à especificidade do substrato, atividade, seletividade e estabilidade (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Apesar de todas vantagens apresentadas, o uso de enzimas em escala industrial geralmente é dificultado pelos elevados custos desses recursos e pela difícil manutenção da estabilidade da enzima, o que muitas vezes não permite a reutilização da mesma.

Sendo assim, as técnicas de imobilização visam suprir essas desvantagens. Além do manuseio mais adequado da enzima, com uma formulação sólida ao invés de líquida, a imobilização também facilita a recuperação e a reutilização da enzima, permitindo assim o seu uso rentável, como por exemplo, em operações contínuas em biorreatores de leito fixo. Outro benefício que também pode ser observado é o melhoramento da estabilidade frente as condições do processo catalítico (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Sobretudo, os métodos de imobilização enzimática podem ser divididos em três categorias: ligação em suportes sólidos, confinamento e ligações cruzadas. A ligação a um suporte pode ser física (adsorção), iônicas ou covalentes. No entanto, em geral a adsorção física não é forte o suficiente para manter a enzima fixada ao suporte sob condições industriais rigorosas. As ligações iônicas e covalentes geralmente são mais fortes e capazes de impedir que a enzima sofra lixiviação da superfície do suporte. A ligação covalente é uma das formas mais estáveis de imobilização, uma vez que envolve a associação irreversível da enzima com o suporte adequado (Figura 3) (ARAGON, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Figura 3. Imobilização por ligação covalente em suporte funcionalizado.



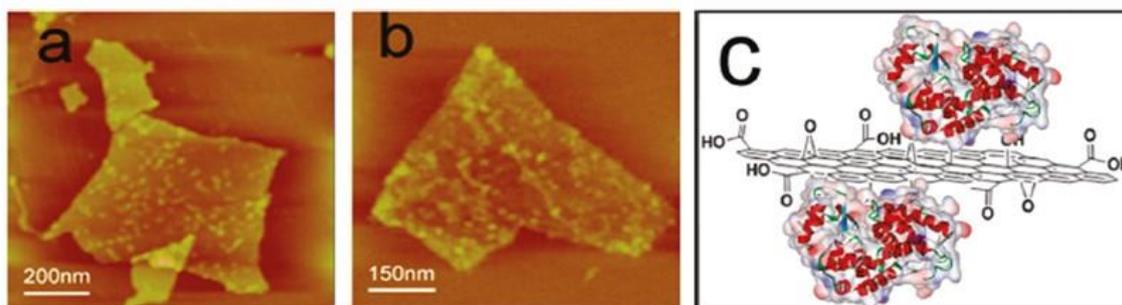
Fonte: Adaptado de Sheldon; Van Pelt, 2013.

3.4. Imobilização de enzimas em óxido de grafeno (OG) como suporte

A área superficial teórica de 890 m^2 (MONTES-NAVAJAS et al., 2013), os abundantes grupos funcionais contendo oxigênio, como grupos epóxi, hidroxila e carboxila e a alta solubilidade em água fazem com que OG seja um material muito promissor para muitas aplicações (LI et al., 2008; PARK; RUOFF, 2009). No entanto, até o momento poucos estudos sobre ligações de biomacromoléculas, como enzimas, ao OG foram reportados na literatura (ZHANG et al., 2010).

Zhang et al. (2010) demonstraram que filmes de OG podem ser usados como suportes para imobilizar a enzima peroxidase de rábano (HRP). Os grupos funcionais da superfície do OG fazem a imobilização das enzimas ocorrer rapidamente através da interação eletrostática sem fazer nenhuma modificação previa no material. A superfície plana do OG permite ver a enzima imobilizada “in situ” usando microscopia de força atômica, conforme apresentado na Figura 4 (ZHANG et al., 2010).

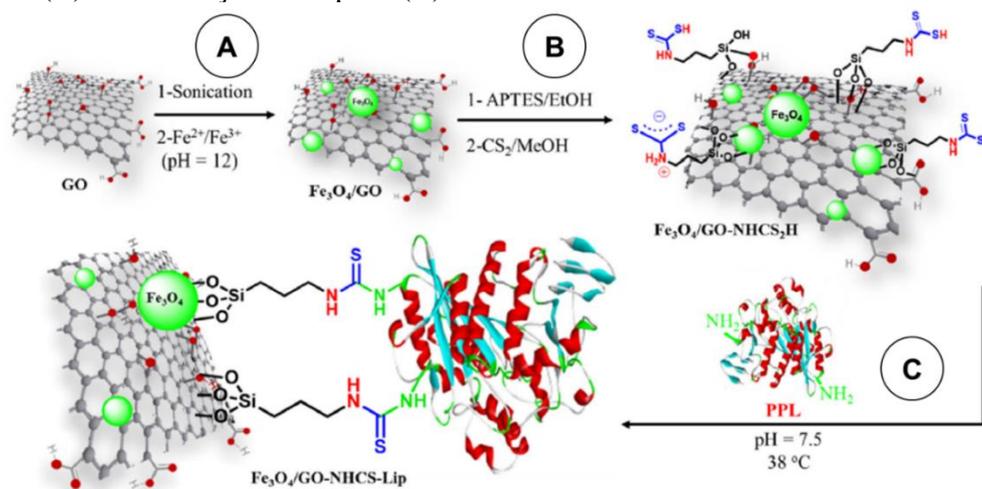
Figura 4. Imagens de microscopia de força atômica da peroxidase de rábano (HRP) ligada ao GO com (a) baixa carga de enzimas e (b) alta carga de enzimas. (c) Modelo esquemático da HRP ligada ao GO.



Fonte: ZHANG et al., 2010.

Heidarizadeh et al. (2017) reportaram a imobilização covalente de lipase de pâncreas porcino (PPL) na superfície de óxido de grafeno magneticamente separável ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$) funcionalizando a superfície deste com a utilização de (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) e CS_2 , conforme apresentado na Figura 5.

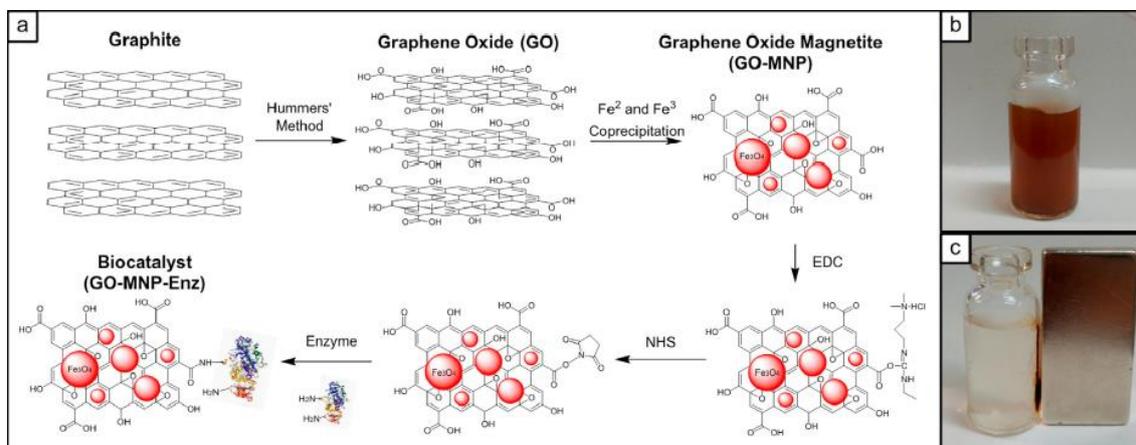
Figura 5. (A) Procedimento de magnetização e (B) funcionalização do óxido de grafeno. (C) Imobilização de Lipase (C).



Fonte: HEIDARIZADEH et al., 2017.

Outro exemplo de funcionalização OG é o estudo reportado por Shen et al. (2010), o qual avaliou a imobilização da proteína albumina de soro bovino (BSA) utilizado como uma modelo, a partir de amidação ativada por diimida. O processo contém duas principais etapas: primeiramente, os grupos carboxílicos do OG são ativados por cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC). O éster ativo estável é formado na presença de N-Hidroxissuccinimida (NHS). Em segundo lugar, o éster ativo reage com os grupos amina da BSA, formando uma ligação covalente entre o OG e a BSA. O procedimento de preparação do OG não causou desnaturação das espécies proteicas e garantiram a fixação uniforme da BSA no OG. Além disso, o presente método apresentado é promissor para ser usado na ligação de outros sistemas biológicos à materiais a base de grafeno (SHEN et al., 2010). A Figura 6 exemplifica o método de imobilização por completo, desde a síntese de OGM até o processo de imobilização, abordando a referida funcionalização com EDAC-NHS (PAZ-CEDENO et al., 2021).

Figura 6. Representação esquemática do processo completo de imobilização de enzimas em óxido de grafeno magnetizado e funcionalizado com EDAC e NHS (a) e dispersão de derivado imobilizado (b) (c).



Fonte: PAZ-CEDENO et al., 2021.

3.5. Composição química e estrutura dos materiais lignocelulósicos

A biomassa vegetal é a fonte renovável mais abundantemente encontrada na natureza, englobando principalmente os subprodutos agroindustriais e os resíduos urbanos. Os materiais lignocelulósicos são formados basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, que são unidas entre si por ligações do tipo covalente. Essas frações dominantes são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais

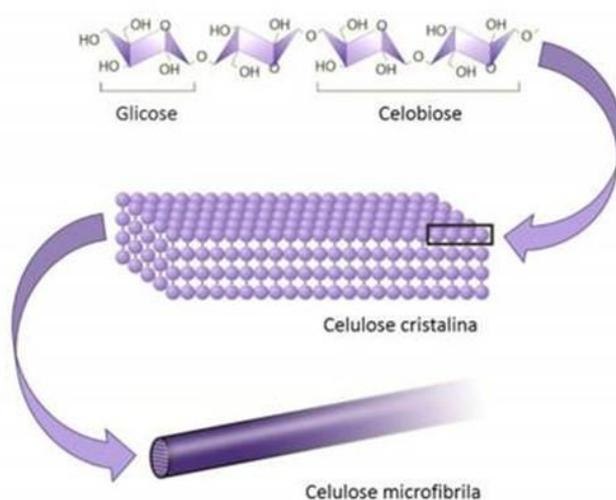
lignocelulósicos. A composição química dos materiais lignocelulósicos presentes na parece celular varia de espécie para espécie. De maneira geral, a celulose está presente em maior quantidade, seguida da lignina e, por fim, da hemicelulose (CASTRO; JUNIOR, 2010; MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

A composição química dos materiais lignocelulósicos pode ser dividida em frações de baixa e elevada massas molares. A fração de baixa massa molar é composta por substâncias orgânicas, geralmente denominadas de extrativos, e substâncias inorgânicas, que são sais de íons metálicos. Os extrativos compreendem vários compostos químicos, que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água. Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor dos lignocelulósicos e estão presentes em pequenas quantidades (de 2 a 8%). Como exemplos de extrativos, podemos citar: ceras, flavonoides, terpenos, lignanas e ácidos graxos, que são encontrados livres ou esterificados. Os compostos inorgânicos estão presentes em quantidades ainda menores nos lignocelulósicos (de 1 a 2%) (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

3.5.1. Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de anidroglicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Duas unidades de glicose adjacentes (celobiose) formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água. A celobiose é a unidade básica de repetição da cadeia de celulose (Figura 7) (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009; FARINAS, 2011).

Figura 7. Representação da estrutura de um fragmento de celulose.



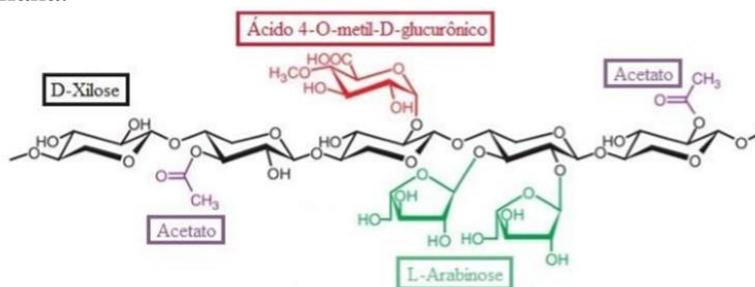
Fonte: Adaptado de Fonseca, 2015.

A massa molar da celulose varia consideravelmente (50.000,00 a 2,5 milhões g.mol⁻¹), dependendo da origem da amostra. Por tratar-se de um polímero autêntico, o tamanho das cadeias é usualmente especificado como grau de polimerização, que é a razão entre a massa molar média da celulose e a massa molar de uma unidade de anidroglicose. Da mesma forma que a massa molar, o grau de polimerização varia com a origem da amostra, assumindo valores altos como no algodão (15.300) e chegando a menos de 305 no Rayon. Outra característica da celulose é a possibilidade de formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, o que proporciona a origem da formação das microfibrilas (Figura 7). As microfibrilas apresentam regiões cristalinas, nas quais as fibras se encontram ordenadas, e regiões amorfas, nas quais as fibras estão desordenadas (mais distantes entre si), apresentando-se menor empacotamento. A celulose cristalina é a responsável por conferir uma alta resistência à tração na parede celular dos vegetais. Na parede celular dos materiais lignocelulósicos, as microfibrilas de celulose estão paralelamente organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

3.5.2. Hemicelulose

As hemiceluloses representam um tipo de polissacarídeo de menor grau de polimerização (100-200 unidades). As hemiceluloses são polissacarídeos lineares, porém contem grupos substituintes ao longo de sua cadeia principal (Figura 8). As cadeias principais das hemiceluloses podem ser compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além de xilose (pentose), dependendo do tipo e origem da hemicelulose. Desta forma, as hemiceluloses podem ser homopolímeros (por exemplo, xilana, formado por anidroxilose na cadeia principal) ou heteropolímeros (por exemplo, glucomanana, formado por anidroglicose e anidromanose na cadeia principal). Os grupos substituintes podem apresentar quantidades variáveis de arabinose (grupo arabinosil), ácido acético (grupo acetil), além de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira e gramíneas (Figura 8). O teor de hemiceluloses em diferentes tipos de madeiras e gramíneas é bastante variável, podendo-se admitir um valor médio de cerca de 20% (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

Figura 8. Estrutura de uma xilana de *Eucalyptus*. Tipos de ligações presentes em uma molécula de xilana.

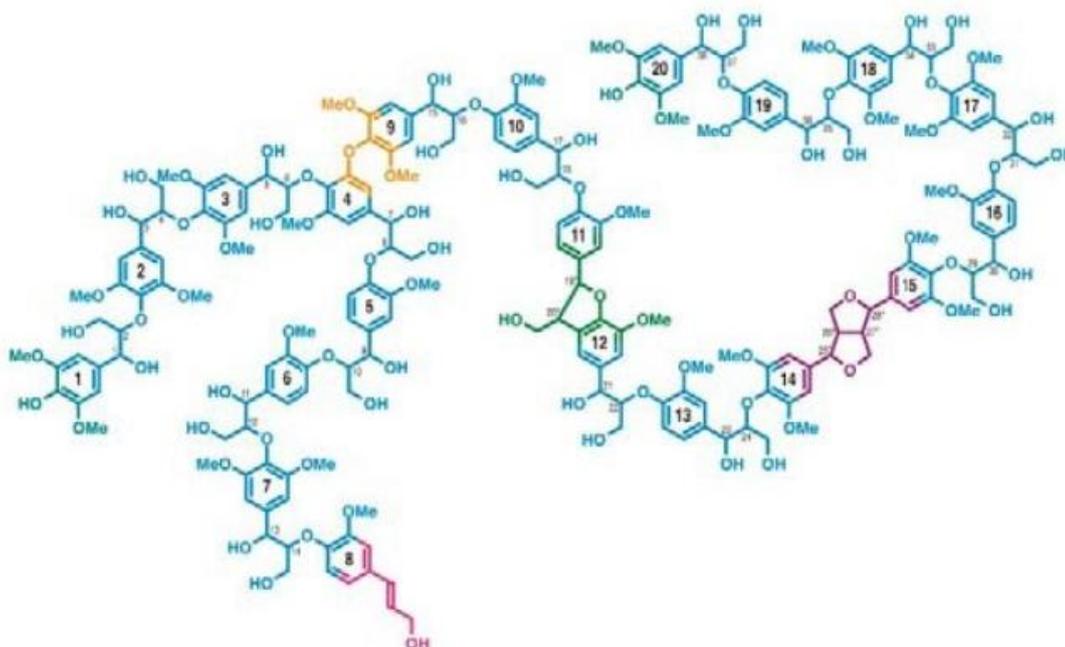


Fonte: Adaptado de Fonseca, 2015.

3.5.3. Lignina

A lignina é o segundo componente em maior quantidade nos lignocelulósicos e sua presença proporciona toda a complexidade existente nos processos de polpação. A lignina é uma macromolécula formada pela polimerização desidrogenativa de álcoois hidroxicinâmílicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Devido ao processo de polimerização ser aleatório, a macromolécula de lignina possui estrutura bastante complexa, conforme apresentado na Figura 9 (RALPH et al., 2004; GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

Figura 9. Estrutura - Modelo da lignina.

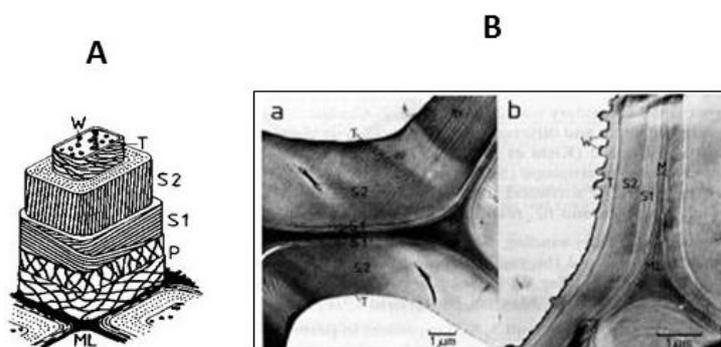


Fonte: RALPH et al., 2004.

A grande complexidade estrutural da lignina faz dela uma das macromoléculas naturais mais difíceis de caracterizar-se quimicamente. A maior parte da lignina não pode ser removida da matriz lignocelulósica sem que haja alterações estruturais durante a etapa de extração. Além disso, nenhum método de caracterização *in situ* é informativo o suficiente para ser empregado de forma conclusiva sem o auxílio de outras metodologias. Sendo assim, a melhor maneira de estudar a estrutura dessa macromolécula parece ser através do emprego de várias técnicas analíticas, que forneçam resultados corroborativos.

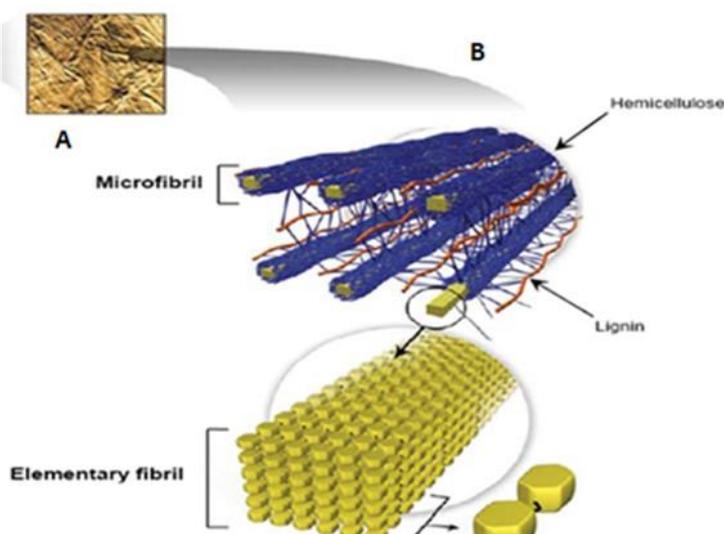
É importante ressaltar que os componentes dos materiais lignocelulósicos se encontram intimamente associados, para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal. Na parede celular do vegetal, tais compostos se organizam formando diferentes camadas. Desde a lamela média (ML) até o lúmen da célula, encontram-se as paredes primária (P), secundária, formada pelas camadas S₁, S₂ e terciária T (ou S₃). A lignina ocorre, em maior quantidade, na parede S₂ e apresenta concentração elevada na lamela média. As hemiceluloses dispõem-se rodeando as microfibrilas de celulose (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009). As Figuras 10AB apresentam as várias camadas da parede celular e ilustram como a lamela média envolve as células, funcionando como sustentador do complexo celular que forma uma árvore. A Figura 11AB apresentam a microscopia eletrônica e um modelo didático de como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

Figura 10. (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira (FENGEL; WENEGER, 1989). (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S₁ = parede secundária, S₂ = parede secundária e T = parede terciária.



Fonte: GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009.

Figura 11. (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo didático que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um lignocelulósico.



Fonte: GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009.

3.6. Enzimas de interesse comercial para conversão de biomassa

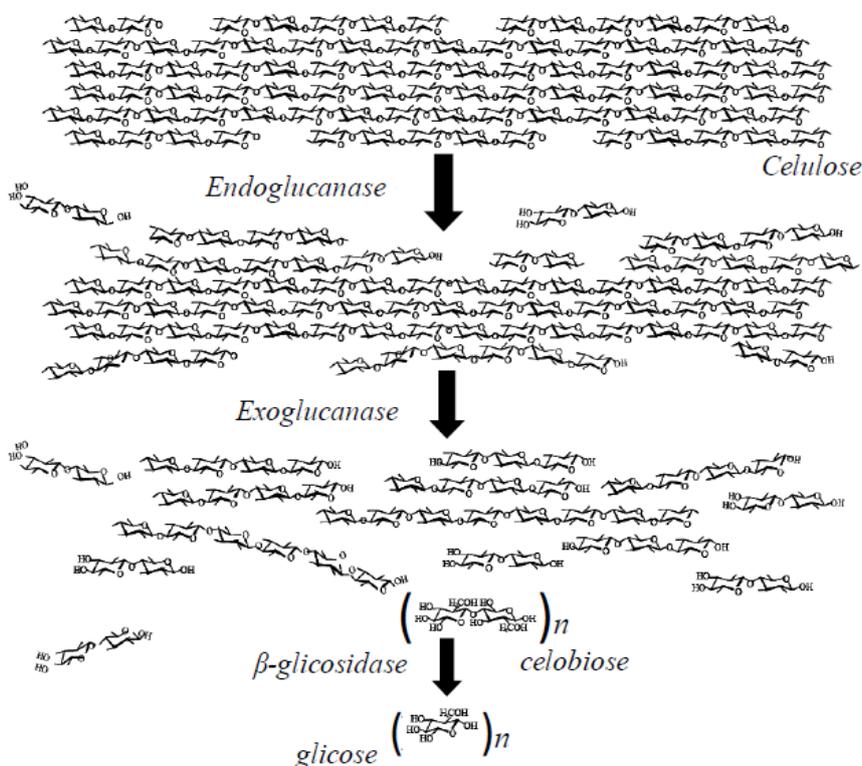
3.6.1. Celulases

As celulases (EC # 3.2.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo β -1,4 presentes na molécula de celulose. As celulases são muito diversas em suas estruturas e modo de ação, desempenhando um importante papel no ciclo global do carbono na natureza. Elas podem ser produzidas por plantas, fungos, algumas bactérias e alguns animais (WILSON, 2009a).

As celulases são atualmente a terceira categoria de enzima industrial mais comercializada em todo o mundo, devido à sua aplicação em processamento de algodão, reciclagem de papel, como enzimas detergentes, na extração de suco e como aditivos para alimentação animal. No entanto, as celulases poderão se tornar as enzimas mais comercializadas no mundo, se o bioetanol e/ou outros biocombustíveis obtidos pela fermentação de açúcares, utilizando-se enzimas para conversão da biomassa vegetal, se torne um importante combustível de transporte (WILSON, 2009b). A produção de celulases está intimamente ligada à capacidade de manipulação genética de microrganismos produtores, a fim produzir quantidades elevadas de celulases de modo a proporcionar uma atividade ótima para usos específicos (WILSON, 2009b).

Existem três tipos de celulases diferentes: endocelulases (também conhecidas como endoglucanases), exocelulases (também conhecidas como celobiohidrolases) e celobiase ou β -glicosidase. As endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente o interior da cadeia de celulose; as exo-1,4- β -D-glucanases ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91) clivam as extremidades reductoras e não reductoras da cadeia de celulose e liberam unidades de celobiose; e as 1,4- β -D-glicosidases, ou celobiasas, (EC 3.2.1.21) hidrolisam oligossacarídeo e celobiose em glicose. (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008) (Figura 12).

Figura 12. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*.



Fonte: MARTINS et al., 2008.

3.6.2. Xilanases

As xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas que catalisam a hidrólise da xilana, o segundo polissacarídeo mais abundante e um importante componente do material hemicelulósico presente nas paredes celulares dos vegetais (UFFEN, 1997). Essas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações β -1,4 da cadeia principal da xilana, produzindo diversos xilo-oligômeros de comprimentos variados. As xilanases são produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras (BAJPAI, 2009). Muitas

bactérias e fungos secretam xilanases sobre materiais lignocelulósicos a fim de liberar xilose e usá-la como um produto diretamente assimilável para o seu crescimento (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

As principais aplicações industriais de xilanases encontram-se nos setores de biocombustíveis, papel e celulose, alimentos e bebidas e nutrição animal. Devido às suas características biotecnológicas, as xilanases são mais frequentemente produzidas a partir de microrganismos (BAJPAI, 2014; BIELY, 1985).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Determinação de atividade enzimática

4.1.1. Endoglucanase

A atividade de endo-1,4- β -glucanase foi determinada segundo Tanaka et al, 1981. O método consiste na hidrólise de carboximetilcelulose (CMC), resultando na formação de extremidades reductoras, as quais devem ser quantificadas posteriormente através do método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Uma alíquota de 0,9 mL de solução composta por CMC 0,44% (massa/volume), dissolvida em tampão acetato de sódio 0,05 M e pH 4, foi adicionada à 0,1 mL de preparado enzimático (Celluclast) devidamente diluído. A mistura resultante foi mantida a 50°C durante 60 min. Após o período determinado, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. Os tubos foram tratados termicamente a 100°C por 5 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm. Uma amostra controle foi preparada utilizando-se 0,9 mL do substrato e, somente após a adição do DNS, adicionou-se 0,1 mL do extrato enzimático diluído. O branco foi preparado adicionando-se 0,9 mL da solução tampão acetato de sódio pH 4 e 0,1 mL de água no lugar do extrato enzimático diluído. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando-se uma curva analítica previamente elaborada (Apêndice 1). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de glicose por minuto, a 50°C.

4.1.2. Xilanase

Para a determinação de xilanase total foi utilizada a metodologia proposta por Bailey, Biely e Poutanen (1992). O método consiste na hidrólise da xilana, resultando na formação de açúcares redutores, os quais devem ser posteriormente quantificados pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Uma alíquota de 0,9 mL de

solução composta por xilana de *Birchwood* 1% (massa/volume), dissolvida em tampão acetato de sódio 0,05 M e pH 5, foi adicionada à 0,1 mL de preparado enzimático (Celluclast) devidamente diluído. A mistura resultante foi mantida durante 5 min a 50°C. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. Uma amostra controle foi preparada utilizando-se 0,9 mL do substrato e, somente após a adição do DNS, adicionou-se 0,1 mL do extrato enzimático diluído. Após a reação descrita, os tubos foram tratados termicamente a 100°C por 5 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm. O branco foi preparado adicionando-se 0,9 mL da solução tampão acetato de sódio pH 4 e 0,1 mL de água no lugar do extrato enzimático diluído. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de xilose utilizando-se uma curva de calibração previamente elaborada (Anexo 2). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de xilose por minuto, a 50°C.

4.1.3. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo Yu et al (1987) o qual através da liberação de p-nitrofenol durante a hidrólise do reagente comercial p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG). Foi preparada uma solução de pNPG 0,1% (massa/volume) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e uma alíquota de 0,8 mL da solução foi adicionada à 0,2 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50°C por 30 min sem agitação. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de bicarbonato de sódio 10% (massa/volume) e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 410 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de p-nitrofenol utilizando uma curva analítica com padrão autêntico deste (Apêndice 5). Uma unidade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de p-nitrofenol por minuto, a 50°C.

4.1.4. Exoglucanase

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada segundo Tanaka et al. (1981) o qual consiste na hidrólise de avicel, resultando na formação de extremidades reductoras, detectadas pelo método do DNS. Uma alíquota de 0,9 mL de suspensão composta por avicel 0,5% (massa/volume) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5, foi adicionada à 0,1 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada

a 50°C por 120 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. Os tubos foram tratados termicamente a 100°C por 5 min, seguido de centrifugação da suspensão obtida. O sobrenadante foi recuperado e analisado em espectrofotômetro a 540 nm. Um controle foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorvância foram convertidos em concentração de glicose utilizando uma curva analítica previamente elaborada (Apêndice 1). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de açúcares redutores por minuto, a 50°C.

4.2. Determinação de proteínas

Para quantificação de proteínas totais, foi utilizada a metodologia proposta por Bradford (1976), com modificações. Primeiramente, para o preparo da curva analítica, utilizou-se uma solução padrão de soro albumina bovina (Bovine serum albumin, BSA) de concentração conhecida ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), para obter soluções com diferentes concentrações. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de reagente Bradford (Sigma) e 0,1 mL de amostra (solução de BSA), devidamente diluída. Por fim, após 5 min, agitou-se as amostras em *vortex* e realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para determinação de proteínas totais no preparado enzimático Celluclast utilizado no estudo, seguiu-se a mesma metodologia, contudo a amostra analisada foi uma solução do preparado enzimático, devidamente diluída. Por fim, após a leitura em espectrofotômetro, utilizou-se a curva analítica, previamente elaborada (Apêndice 3) para converter os dados de absorvância obtidos em concentração de proteínas.

4.3. Determinação da temperatura ideal para a atividade enzimática

Para determinação da temperatura ideal de atividade enzimática de endoglucanase e xilanase total nas formas livres foram realizados os ensaios enzimáticos descritos nos itens 4.1.1 e 4.1.2, respectivamente, variando-se a temperatura do ensaio. As temperaturas analisadas foram: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C.

4.4. Determinação do pH ideal para a atividade enzimática

Para determinação do pH ótimo das atividades de endoglucanase e xilanase total, nas formas livres, foram realizados os ensaios enzimáticos descritos nos itens 4.1.1 e 4.1.2, respectivamente, variando-se o apenas o tampão utilizado no preparo do

substrato, o qual foi o tampão McIlvaine (uma solução tampão composta por ácido cítrico e hidrogenofosfato dissódico). Os ensaios foram realizados na temperatura ideal, a qual foi previamente determinada como descrito no item 4.3. Os substratos (CMC 0,44% e xilana de Birchwood 1%) foram preparados em seis sistemas de tampões com valores de pH que variam de 3-8.

4.5. Síntese do óxido de grafeno (OG)

A síntese do OG foi realizada de acordo com a metodologia descrita na literatura, com algumas modificações (HUMMERS; OFFEMAN, 1958). Uma cuba de vidro, contendo gelo, foi colocada sobre uma placa de agitação magnética. Em um balão de 500 mL, com fundo redondo, foi colocado 1 g de grafite (“Graphite powder” 99,99%, Sigma). O balão foi colocado dentro da cuba. Posteriormente, foram adicionados ao balão 60 mL de H₂SO₄ (96%, massa/massa), vagarosamente, mantendo-se sob agitação durante 15 min. Em seguida foram adicionados lentamente 100 mL de solução de KMnO₄ (3,5 g de KMnO₄ em 100 mL de água ultrapura) com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. Em seguida, o sistema foi retirado do banho de gelo e mantido sob agitação por mais 120 min. Passado o determinado período, o balão foi novamente colocado em banho de gelo e 100 mL de água destilada foram adicionados lentamente, lavando-se as paredes do balão. Depois, uma porção de aproximadamente 10 mL de H₂O₂ (30% massa/massa) foi adicionada até o sistema parar de borbulhar. O sistema foi retirado do banho de gelo e mantido na capela sem agitação e durante 12h, a fim de que ocorra formação de precipitado. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, retirou-se o sobrenadante até chegar nas proximidades do precipitado. A dispersão foi então filtrada sob sistema munido de vácuo e em seguida o sólido obtido foi lavado com os seguintes solventes: 500 mL de água destilada, 250 mL de uma solução aquosa de HCl (10%, volume/volume), 250 mL de etanol (98%, volume/volume e por fim mais 200 mL de água destilada. Após a lavagem, o sólido foi devidamente mantido em uma estufa sob vácuo a 50°C para secagem.

4.6. Síntese de Óxido de grafeno magnetizado (OGM)

A síntese de OGM foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Paz-Cedeno et al. (2021) e Doustkhah e Rostamnia (2017) (HEIDARIZADEH; DOUSTKHAH; ROSTAMNIA, 2017; PAZ-CEDENO et al., 2021). Desta forma, foram adicionados 1,755 g de cloreto de ferro III hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) e 0,645 g de

cloreto de ferro II tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) à 100 mL de uma solução de ácido acético (3%, volume/volume), em um béquer de 250 mL previamente colocado sob um agitador magnético. Em seguida, adicionaram-se à mistura 10 mL de dispersão de OG ($5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e então a temperatura foi acertada para 80°C . Após atingir a determinada temperatura, foram adicionados 20 mL de hidróxido de amônio (25%, massa/massa) à mistura reacional, a qual permaneceu sob agitação vigorosa durante 15 min. Finalmente, a reação foi parada e o precipitado foi coletado com um ímã externo e lavado várias vezes com água destilada e metanol (99%, volume/volume). Em seguida, o precipitado permaneceu em uma estufa a 50°C durante 12h, para secagem.

4.7. Imobilização covalente de endoglucanases e xilanase em OGM

A imobilização por ligação covalente no suporte OG foi desenvolvida de acordo com as metodologias propostas por Shen et al. (2010) e Sakata et al. (2012), com modificações (SHEN et al., 2010; SAKATA et al., 2012). Foram preparados 20 mL de suspensão de OGM ($0,5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e em seguida a suspensão foi submetida à sonicação durante 1h. Posteriormente, foram adicionados 20 mg de N-Hidroxisuccinimida (NHS) e novamente a suspensão foi submetida à sonicação durante 15 min. Depois, foram adicionados 24 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), mantendo-se a solução em agitação durante 2h. O material obtido (OGM funcionalizado) foi recuperado com o auxílio de um ímã externo e lavado várias vezes com o mesmo tampão. Posteriormente, o material foi disperso em tampão acetato 0,05 M (pH 4,8) atingindo-se uma concentração de $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Uma vez obtido o OGM reativo, foi adicionada uma quantidade de enzimas previamente determinada e a suspensão foi mantida sob agitação por 12h. O material obtido (OGM-Enz) foi recuperado com o auxílio de um ímã externo e lavado duas vezes com o tampão de imobilização, uma vez com uma solução de glicina 1 M e novamente com o tampão de imobilização. Finalmente o derivado imobilizado foi disperso no tampão de imobilização, atingindo-se uma concentração de $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Inicialmente, para a determinação da carga inicial de proteínas ideal a ser fixada, a atividade do derivado foi dosada nas condições ideais para a atividade das enzimas livres pré-determinadas.

Para avaliar a imobilização, foi determinada a massa de proteínas no sobrenadante utilizando o reagente de Bradford (BRADFORD, 1976). O rendimento de imobilização pelo teor de proteínas foi determinado através da Equação 1.

$$RP = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) * 100\% \quad (1)$$

Onde P_i é a massa inicial de proteínas (mg); P_f é a massa de proteínas (mg) no sobrenadante após imobilização. Sendo assim, é possível considerar $(P_i - P_f)$ como a massa de proteína imobilizada.

Além disso, para confirmar o sucesso da imobilização enzimática, foram determinados os seguintes parâmetros, nas condições ideais para a atividade da enzima em suas formas livre e imobilizada, as quais foram previamente determinadas: Rendimento de imobilização, Eficiência de imobilização e Atividade recuperada. Os cálculos foram realizados conforme as Equações 2, 3 e 4 (SHELDON; VAN PELT, 2013).

$$RI = \left(\frac{U_0 - U_f}{U_0} \right) * 100\% \quad (2)$$

Onde:

RI: Rendimento de imobilização (%)

U_0 : Atividade enzimática total da enzima livre (U)

U_f : Atividade enzimática total do sobrenadante final após a imobilização (U)

$$EFI = \left(\frac{U_{EI}}{U_0 - U_f} \right) * 100\% \quad (3)$$

Onde:

EFI: Eficiência de imobilização (%)

U_{EI} : Atividade enzimática total do derivado (U)

U_0 : Atividade enzimática total da enzima livre (U)

U_f : Atividade enzimática total do sobrenadante final após a imobilização (U)

$$AR = \frac{U_{EI}}{U_0} * 100\% \quad (4)$$

Onde:

AR: Atividade recuperada (%)

U_{EI} : Atividade enzimática total do derivado (U)

U_0 : Atividade enzimática total da enzima livre (U)

4.8. Avaliação do rendimento de imobilização em função do tempo

O referido ensaio teve como principal objetivo avaliar o tempo de imobilização covalente, via EDAC-NHS, de endoglucanase e xilanase em OGM a partir do monitoramento do rendimento de imobilização a partir da quantidade de proteínas

totais, via método de Bradford (1976), em diferentes tempos de imobilização. Nesse sentido, utilizou-se o método proposto de imobilização, conforme descrito no tópico 4.7 deste trabalho, e os tempos avaliados foram 1, 3, 5 e 20h. Para o presente ensaio, foi utilizada a faixa ideal de carga inicial de proteínas pré-determinada de 55-65 mg, o que na prática representa 180 µL de preparado enzimático diluído 10 vezes.

4.9. Determinação da estabilidade térmica de endoglucanase e xilanase

Para a determinação da estabilidade térmica de endoglucanase e xilanase de preparado enzimático comercial (Celucast-Novozyme), foram dosadas as atividades das respectivas enzimas, nas condições ideais pré-determinadas, conforme a metodologia descrita no tópico 4.1, nos seguintes intervalos de tempo de exposição: 8, 24, 48 e 72h. As temperaturas avaliadas no ensaio foram de 30, 40, 45, 50 e 60°C. É válido ressaltar que o presente estudo foi desenvolvido para as enzimas em suas formas livre e imobilizada em OGM para posterior comparação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividades enzimáticas de preparado comercial Celluclast

A Tabela 1 apresenta os resultados das atividades enzimáticas de celulases e xilanases presentes no preparado enzimático Celluclast. As atividades foram dosadas conforme descrito na seção 4.1. de Material e Métodos do presente trabalho.

Tabela 1. Atividade de endoglucanase, xilanase, β -glicosidase e exoglucanase de preparado enzimático comercial Celluclast do presente trabalho e outras reportadas na literatura.

Enzima	Atividade (U.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Referência
Endoglucanase	296,2 \pm 7,7	7,2	Este trabalho
Endoglucanase	5227,4	29,5	(MENDES et al., 2011)
Endoglucanase	545,7	5,1	(GONÇALVES, 2013)
Xilanase	408,7 \pm 32,4	10,0	Este trabalho
Xilanase	1098,64	6,2	(MENDES et al., 2011)
Xilanase	481,5	4,5	(GONÇALVES, 2013)
Xilanase	693,4	27,3	(MAFEI et al., 2019)
β -glicosidase	69,3 \pm 0,6	1,7	Este trabalho
β -glicosidase	47,844	0,27	(MENDES et al., 2011)
Exoglucanase	22,8 \pm 3,2	0,6	Este trabalho

Concentração de proteínas no preparado enzimático Celluclast: 41 mg.mL⁻¹; 177,2 mg.mL⁻¹; 25,4 mg.mL⁻¹ e 107 mg.mL⁻¹ para este trabalho, MENDES et al., 2011, MAFEI et al., 2019 e GONÇALVES, 2013, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho e pelos reportados na literatura (Tabela 1), constata-se que a atividade enzimática de endoglucanase e xilanase (em U.mL⁻¹), apresentaram diferenças consideráveis. Contudo, ao relacionar a atividade com a concentração de proteínas presentes do preparado (atividade enzimática específica, U.mg⁻¹), houve uma maior aproximação dos valores, com exceção da atividade específica de endoglucanase, a qual no estudo de Mendes (2011) foi aproximadamente quatro vezes maior. Assim como para a atividade específica de xilanase obtida por Mafei (2019) de 27,3 U.mg⁻¹, cerca de três vezes maior em relação ao valor obtido no presente trabalho. Além disso, é possível inferir que por mais que se trate do mesmo preparado enzimático, que há variações na atividade enzimática das

enzimas que o compõe. Essas variações podem ser explicadas pelas pequenas variações na metodologia empregada para a dosagem das atividades, mas principalmente pelas características intrínsecas ao preparado de acordo com o lote de produção e período, estando esse fato evidenciado pela considerável diferença na quantidade de proteínas por mL de preparado Celluclast encontradas de 41 e 177,2 mg.mL⁻¹, para este trabalho e para Mendes (2011) , respectivamente.

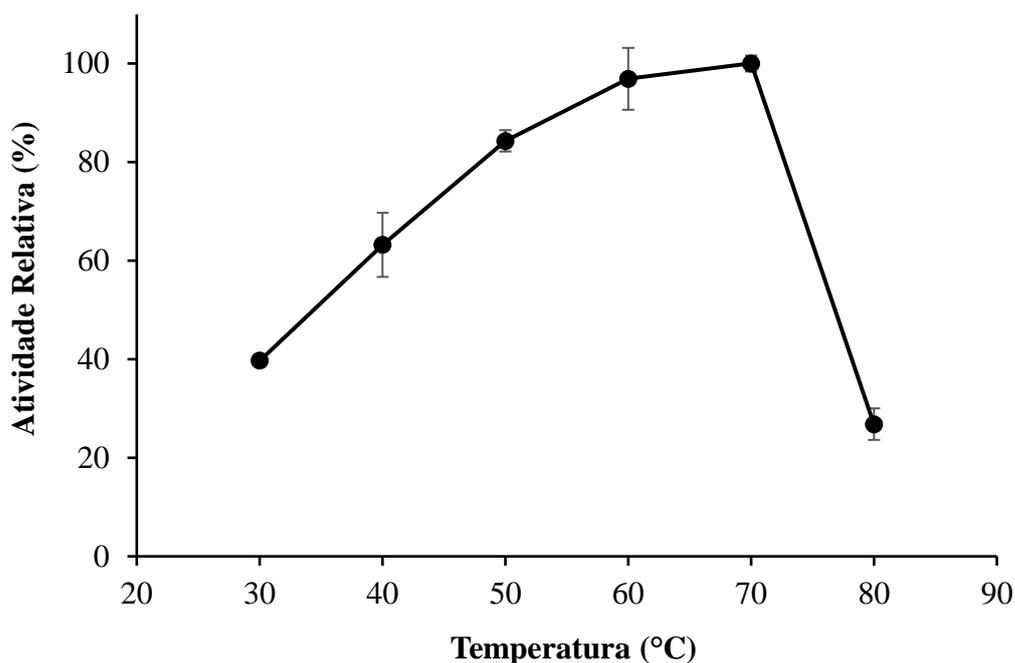
5.2. Avaliação das condições ideais para atividade enzimática de endoglucanase e xilanase

5.2.1. Endoglucanase

5.2.1.1. Temperatura ideal

A Figura 13 apresenta os resultados de atividade relativa de endoglucanase (de preparado enzimático Celluclast em diferentes temperaturas.

Figura 13. Atividade relativa de endoglucanases de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em função de diferentes temperaturas.



Fonte: Próprio autor.

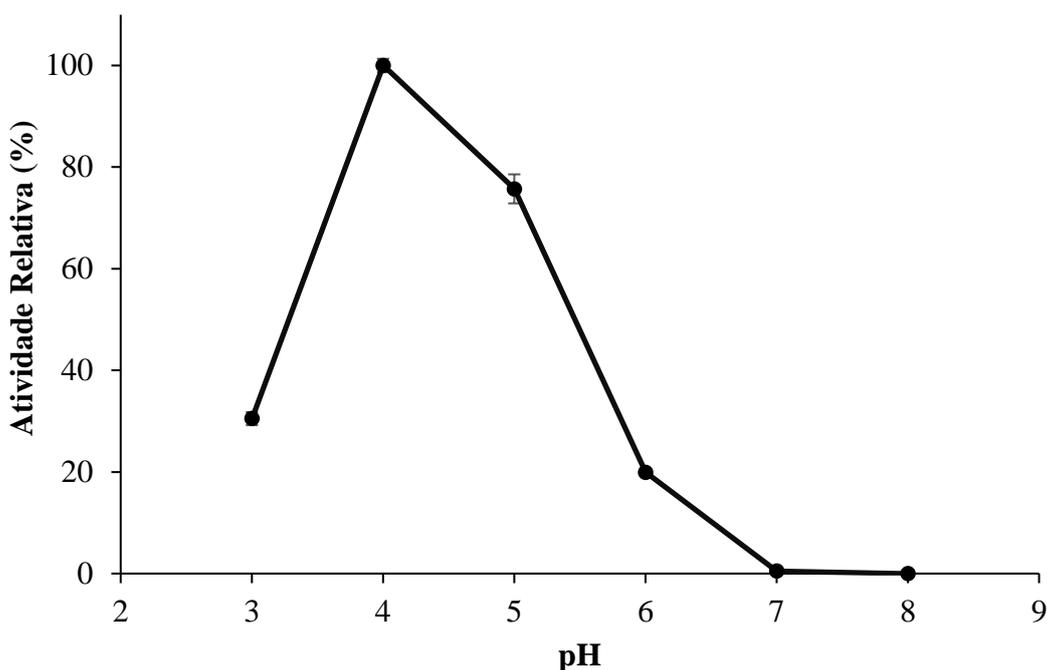
Desta forma, é possível afirmar que a faixa de temperatura ideal para a atividade enzimática de endoglucanases foi de 60-70°C (Figura 13), correspondendo a atividades entre 340,4-351,2 U.mL⁻¹, respectivamente. Realizando-se o teste Tukey (software Bioestat), constatou-se não haver diferença significativa entre as atividades relativas nas

referidas temperaturas. Sendo assim, para determinação do pH ideal para a atividade de endoglucanase fixou-se a temperatura de 60°C.

5.2.1.2. pH ideal

A Figura 14 apresenta os resultados de atividade relativa de endoglucanase do preparado enzimático Celluclast, em diferentes valores de pH.

Figura 14. Atividade relativa de endoglucanases de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em função de diferentes valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

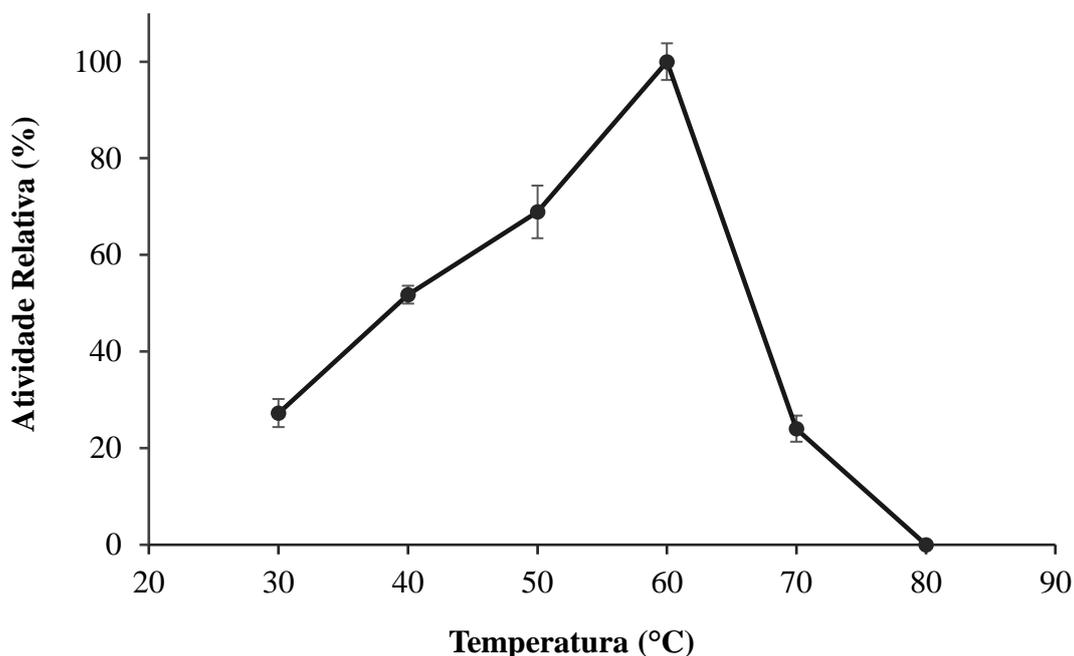
A partir dos valores conferidos é possível afirmar que o pH ideal para a atividade de endoglucanase foi de 4 com atividade média de 377,7 U.mL⁻¹.

5.2.2. Xilanase

5.2.2.1. Temperatura ideal

A Figura 15 apresenta os resultados de atividade relativa de xilanase de preparado enzimático Celluclast, em diferentes temperaturas.

Figura 15. Atividade relativa de xilanase de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em função de diferentes temperaturas.



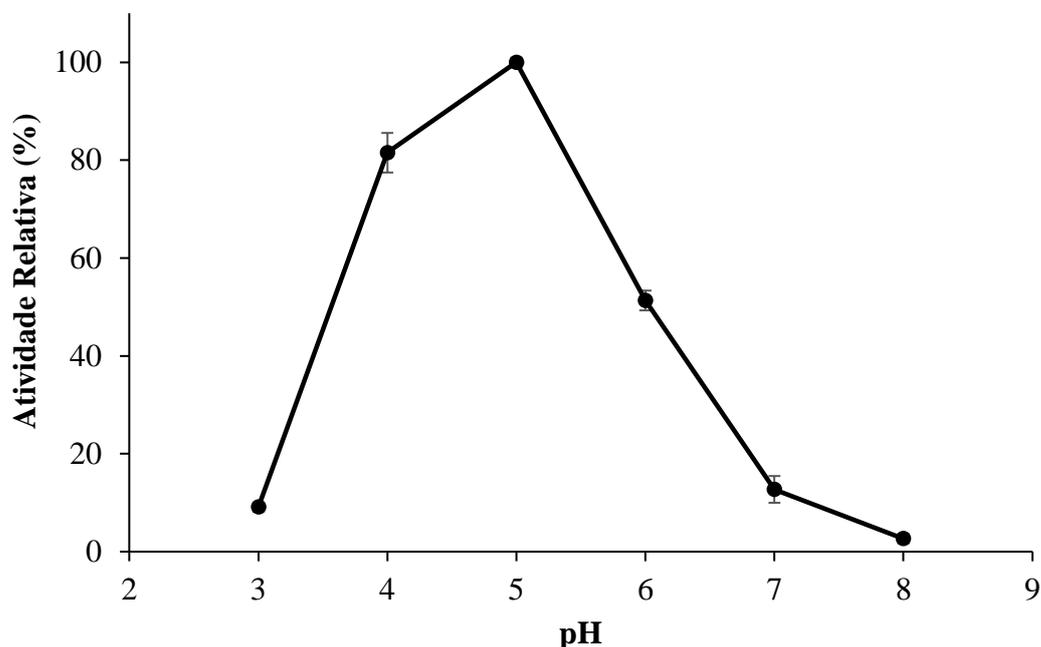
Fonte: Próprio autor.

A partir dos valores conferidos é possível afirmar que a temperatura ideal para a atividade de xilanase foi de 60°C, com atividade média de 593,2 U.mL⁻¹. Sendo assim, para determinação do pH ideal para a atividade enzimática de xilanase fixou-se a temperatura de 60°C.

5.2.2.2. pH ideal

A Figura 16 apresenta os resultados de atividade relativa de xilanase de preparado enzimático Celluclast, em diferentes valores de pH, que exibe o pH ideal para a enzima xilanase.

Figura 16. Atividade relativa de xilanase de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em função de diferentes valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

A partir dos valores conferidos é possível afirmar que o pH ideal para a atividade de xilanase foi de 5, com atividade média de $664,2 \text{ U.mL}^{-1}$.

Segundo o NCBE (National Centre for Biotechnology Education) a Celluclast-Novozymes é um preparado enzimático contendo atividades de celulasas, produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*, e comumente empregado na hidrólise de glicose, celobiose e diversos polímeros de glicose. Para fins práticos, as condições ideais para a atividade deste preparado enzimático geralmente se encontram na faixa de pH 4,5-6,0 e temperatura entre 50-60 °C. Tal informação coincide com os resultados obtidos no presente estudo, que mostra que para a atividade de xilanase as condições ideais foram no valor de pH igual a 5 e temperatura igual a 60°C. O estudo de Tang et al. (2017), o qual avaliou a estabilidade térmica de xilanase de *Trichoderma reesei* modificadas estruturalmente, obteve 60°C como temperatura ideal para atividade da enzima, corroborando com o presente trabalho. Já no estudo desenvolvido por Aragon (2013), foram obtidas uma faixa de temperatura de 55-60°C e pH 5 como condições ideais para a atividade de xilanase, produzida por *Aspergillus niger*.

No caso da enzima endoglucanase, o pH ideal para atividade foi de 4 e a faixa de temperatura ideal foi de 60-70°C. Estudos recentes reportaram que endoglucanases

mutantes de *Trichoderma reesei* podem atuar em temperaturas mais elevadas, com uma faixa de temperatura ideal entre 65-75°C (AKBARZADEH, 2018), corroborando com o presente estudo. Pereira (2013) ainda reportou que a temperatura ideal para a atividade ideal de endoglucanase oriunda de fungo *Aspergillus Niger*, isolado a partir do Bioma Cerrado, foi de 70°C.

5.3. Atividades de endoglucanase e xilanase nas condições ideais

A partir dos resultados obtidos a partir do estudo de determinação das condições ideais para as atividades de endoglucanase e xilanase, optou-se por determinar as atividades específicas das enzimas nas referidas condições. Os resultados obtidos de atividades específicas para as enzimas endoglucanase e xilanase contidas em preparado enzimático Celluclast (nas condições ideais de pH e temperatura) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade (U.mL⁻¹) e Atividade específica (UI.mg⁻¹) das enzimas endoglucanase e xilanase de preparado enzimático comercial Celluclast (Novozymes) nas condições ideais de pH e temperatura.

Enzima	Atividade (U.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
Endoglucanase	377,7	9,2 ± 0,1
Xilanase	664,2	16,2 ± 0,2

Os valores de atividade específica para este trabalho, foram obtidos nas condições ideais de pH e temperatura para a atividade de endoglucanases e xilanase, previamente determinadas.

De maneira geral, a partir da Tabela 2, é possível verificar que nas condições ideais de pH e temperatura das enzimas estudadas, ambas as atividades foram ligeiramente maiores se comparado aos valores obtidos nas condições dos ensaios realizados na Tabela 1. Isso se deve ao fato intrínseco de que nas condições ideais são as situações em que a atividade da enzima, ou seja, a conversão de substrato em produto é máxima.

5.4. Síntese de Óxido de Grafeno (OG)

A Figura 17 apresenta o aspecto visual do OG obtido. O processo de síntese de OG gerou aproximadamente 1,7 g do material. Desta forma, houve um aumento de massa total de 0,7 g em relação à carga inicial de grafite utilizada.

Figura 17. Óxido de Grafeno (OG) após secagem e devido armazenamento.



Fonte: Próprio autor.

5.5. Síntese de Óxido de Grafeno Magnetizado (OGM)

O proposto processo de síntese de OGM gerou 672,5 mg. Desta forma, houve um aumento da massa total de 622,5 mg, ou seja, um rendimento de aproximadamente 13,5 vezes, em relação a quantidade inicial de OG utilizada. O material sintetizado apresentou propriedades magnéticas como esperado (Figura 19).

Ao evoluir no trabalho, a quantidade de OGM disponível naturalmente foi esgotando. Sendo assim, foram realizadas mais duas sínteses, em momentos diferentes, as quais permitiram um estudo mais detalhado sobre o rendimento do processo. A partir do proposto processo de síntese de OGM foi possível obter 1,58 gramas de material. É válido ressaltar que, nesse caso, a fim de produzir uma maior quantidade de material, a metodologia foi realizada duplicando-se as quantidades de OG e dos reagentes utilizados na síntese. Sendo assim, constata-se que houve um aumento de massa total de 1,49 gramas, o que compreende um rendimento de aproximadamente 15,9 vezes em relação a massa inicial de OG utilizada. Esse aumento de massa ocorre devido a interação das nanopartículas de Fe_3O_4 com a superfície do OG a partir da coprecipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução alcalina sobre a adição de amônia a 80°C , conforme descrito por Doustkhah e Rostamnia (2016). A partir da Tabela 3, a qual apresenta o resultado supracitado e o compara com as sínteses realizadas anteriormente ao presente trabalho, é possível verificar um rendimento médio de 14,5 vezes em relação a massa de OG inicial.

Tabela 3. Dados acerca do rendimento do processo de produção de OGM.

Massa de OG (mg)	Massa de OGM (mg)	Aumento de massa (X vezes)	Média	Desvio Padrão	CV (%)
50,0	672,5	13,5			
100,0	1424,0	14,2	14,5	$\pm 1,2$	8,5
100,0	1586,5	15,9			

Onde CV = Coeficiente de Variância, calculado pela equação: $(\text{Desvio Padrão} / \text{Média}) \times 100\%$.

A partir dos resultados supracitados, é possível correlacionar a quantidade inicial de grafite utilizada na síntese de OG com a massa de OGM produzida. Conforme registrado em sínteses e resultados anteriores, foram obtidos 1,7 g de OG a partir da metodologia utilizada, com uma quantidade inicial de grafite de 1 g (HUMMERS; OFFEMAN, 1958). É válido reforçar que esse aumento de massa ocorre devido a oxidação dos cristais de grafite e a consequente ligação de vários grupos que contêm oxigênio à matriz (RAY, 2015; ADEEL et al., 2018). Sendo assim, considerando todos os resultados de rendimento apresentados na Tabela 3 e a massa total de OG obtida, constata-se que a partir de 1 g de grafite é possível obter aproximadamente $24,7 \pm 2,1$ g de OGM. As Figuras 18 e 19 retratam algumas das etapas fundamentais para síntese de Óxido de grafeno magnetizado (OGM).

Figura 18. Processo de lavagem do Óxido de grafeno Magnetizado (OGM), com o auxílio de um ímã.



Fonte: Próprio autor.

Figura 19. Óxido de Grafeno Magnetizado (OGM) sendo atraído por um imã.

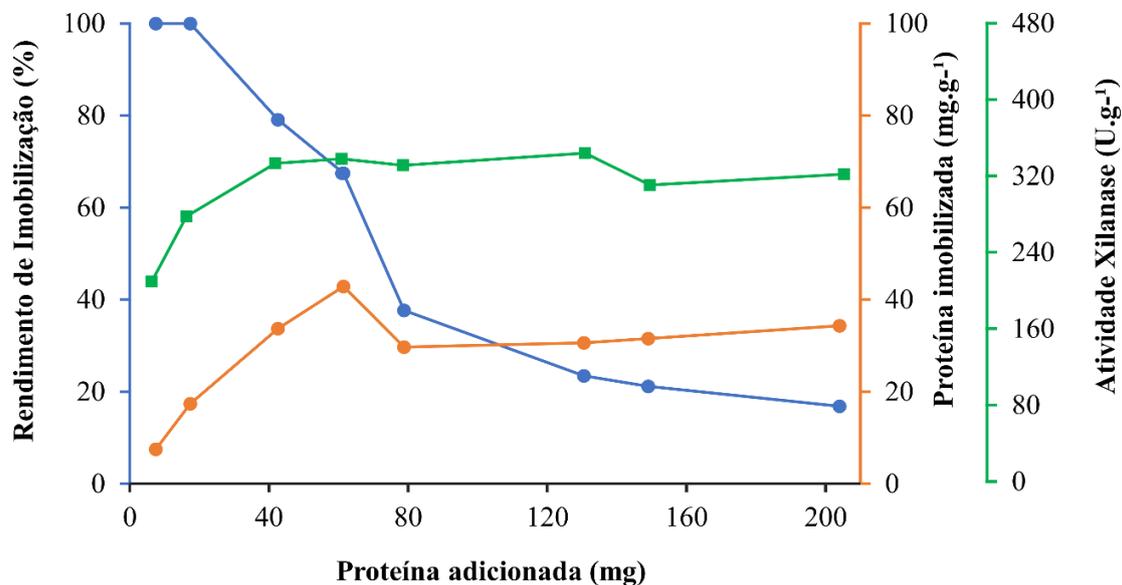


Fonte: Próprio autor.

5.6. Imobilização de endoglucanase e xilanase em óxido de grafeno magnetizado (OGM)

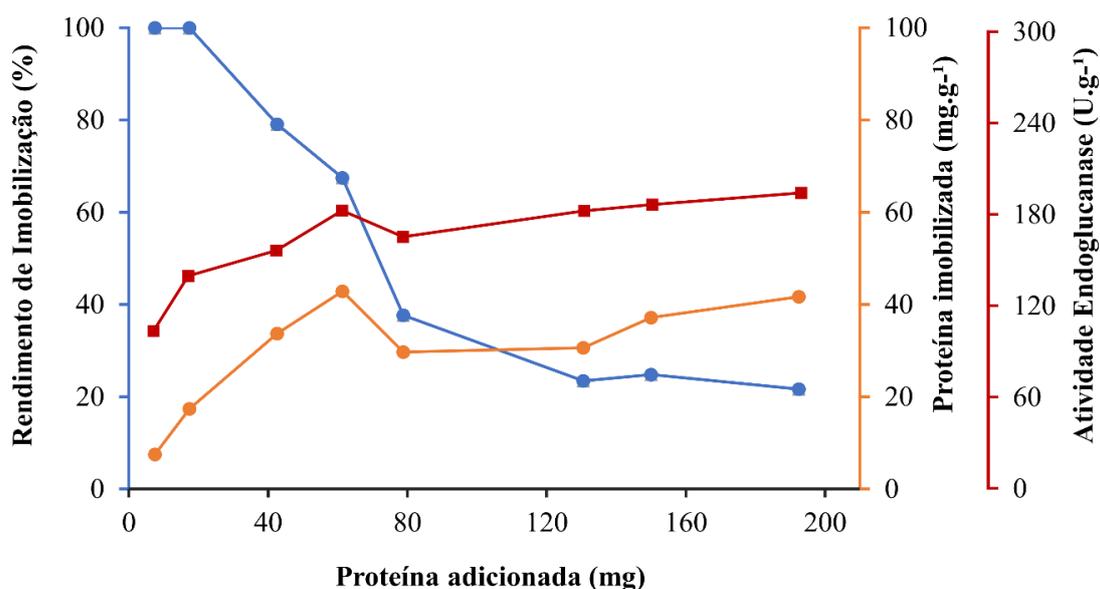
O processo de imobilização enzimática, utilizando diferentes cargas de proteína para uma massa constante de OGM (mg de proteína por g de OGM), foi avaliado para determinar o rendimento da imobilização através do monitoramento do teor de proteínas (Figuras 20 e 21). Antes de determinar as condições ideais de atividade para as enzimas previamente imobilizadas em OGM reativo, optou-se por determinar a quantidade inicial de proteínas ideal, a qual foi fixada para os estudos subsequentes de determinação das condições ideais e dos parâmetros de imobilização a partir das atividades enzimáticas. Esta quantidade de proteínas ideal está relacionada com a saturação do suporte, ou seja, quando as enzimas não se ligam covalentemente com o OGM reativo presente no meio reacional de maneira a garantir sua função, principalmente devido ao fato de não haver mais extremidades reativas. Para esta avaliação, foi considerada a quantidade de proteína imobilizada e, principalmente, as atividades enzimáticas de xilanase e endoglucanase do derivado enzimático, uma vez que o preparado enzimático Celluclast possui uma gama de celulasas e outras proteínas em sua composição.

Figura 20. Rendimento de imobilização (%) (azul), Proteína imobilizada ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) (laranja) e Atividade de xilanase ($\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$) (verde) em cada ensaio realizado, em relação a quantidade de Proteína adicionada (mg) (eixo x). Os dados de Proteína imobilizada foram reportados em mg por grama de suporte (OGM Reativo) e os dados de Atividade enzimática foram reportados em UI por grama de derivado (OGM Reativo-Enzima).



Fonte: Próprio autor.

Figura 21. Rendimento de imobilização (%) (azul), Proteína imobilizada ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) (laranja) e Atividade de endoglucanase ($\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$) (vermelho) em cada ensaio realizado, em relação a quantidade de Proteína adicionada (mg) (eixo x). Os dados de Proteína imobilizada foram reportados em mg por grama de suporte (OGM Reativo) e os dados de Atividade enzimática foram reportados em U por grama de derivado (OGM Reativo-Enzima).



Fonte: Próprio autor.

A partir dos gráficos apresentados (Figuras 20 e 21), é possível verificar que maiores rendimentos de imobilização ocorrem próximos aos menores teores de proteínas adicionados. Para as cargas iniciais entre 7,5-17,4 mg, obteve-se um rendimento de imobilização de 100%, ou seja, toda proteína adicionada foi imobilizada no suporte OGM reativo. No estudo de Jordan (2011), o qual avaliou a ligação covalente de celulasas em nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) através de carbodiimida, também reportou que a ligação máxima enzima-suporte ocorreu com cargas de proteínas inferiores.

De acordo com referidos gráficos, também é possível verificar que a quantidade de proteína imobilizada estabiliza a partir da carga inicial de aproximadamente 60 mg de proteína, caracterizando assim a saturação do suporte. Consequentemente, também se verifica que o rendimento de imobilização cai consideravelmente para maiores cargas iniciais de proteína, uma vez que se adiciona uma maior quantidade de proteína, mas com a saturação do suporte não há imobilização e assim uma maior quantidade de proteínas é encontrada no sobrenadante. É válido ressaltar que as variações encontradas nos pontos experimentais dos gráficos podem ser atribuídas a reprodutibilidade dos ensaios, limitações do método de quantificação e a possíveis erros experimentais. Contudo, tais variações não comprometeram o objetivo do proposto estudo.

Sendo assim, conforme já mencionado, como o preparado enzimático Celluclast é um *blend* de enzimas celulolíticas, e além disso podem haver outras proteínas contaminantes, esse parâmetro é importante, porém deve ser avaliado em conjunto com as atividades das enzimas estudadas, atribuindo assim um caráter mais sensível e específico para se determinar a carga ideal de proteínas inicial. Nesse sentido, é possível constatar que houve a estabilização das atividades das enzimas xilanase e endoglucanase a partir da carga inicial de 60 mg de proteína, com atividade média de 330 U.g^{-1} e 180 U.g^{-1} , respectivamente, entre os pontos experimentais subsequentes. Sendo assim, definiu-se uma faixa ideal para a quantidade de proteínas adicionada (carga inicial) de 55-65 mg, com rendimento de imobilização médio de 68% e uma quantidade proteína imobilizada média de 42 mg por grama de suporte. Essa carga inicial foi fixada para os estudos subsequentes de determinação das condições ideais e dos parâmetros de imobilização a partir das atividades enzimáticas. Um resultado semelhante foi reportado no estudo de Paz-Cedeno et al. (2021), o qual avaliou a imobilização de celulasas e xilanasas do preparado enzimático Cellic CTec 2 em OGM pela rota EDAC-NHS e obteve 50 mg por grama de suporte como quantidade de

proteína ideal, com rendimento de imobilização de 96,5%, a partir da estabilização da atividade de celulases totais do derivado enzimático. A quantidade de proteína imobilizada média obtida, dada em miligramas por grama de suporte (OGM reativo), utilizando a metodologia com a rota EDAC-NHS proposta, foi superior aos valores apresentados por outros estudos de imobilização de celulases utilizando outras vias sintéticas (GOKHALE; LU; LEE, 2013). Gokhale (2013) avaliou em seu estudo a imobilização por ligação do tipo covalente de celulases em suportes de grafeno 2D e reportou uma carga de proteína imobilizada de aproximadamente 2,5 mg por grama de suporte. Já no trabalho desenvolvido por Mehnati-Najafabadi et al. (2018), o qual avaliou a imobilização xilanases em OGM através de espaçadores, obteve 273 mg de enzima imobilizada por grama de suporte funcionalizado, a qual foi fixada como ideal uma vez que para quantidades superiores houve perda de atividade (MEHNATI-NAJAFABADI; TAHERI-KAFRANI; BORDBAR, 2018).

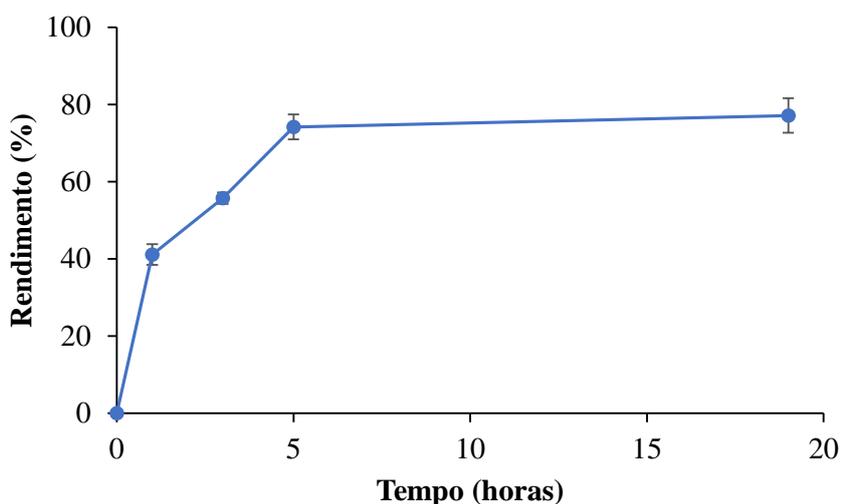
Jordan (2011) também desenvolveu um estudo semelhante a fim de determinar o ponto de saturação da superfície de nanopartículas magnéticas para imobilização de celulases. Neste estudo, ele constatou que a relação ideal da massa de proteínas imobilizadas e a massa do suporte, dada em $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$, foi de 0,02, uma vez que se atingiu o valor máximo de atividade enzimática. Para relações com valores superiores, houve uma diminuição significativa na atividade enzimática do derivado. Uma explicação para tal fato é que caso ocorra à saturação da superfície do suporte, é possível que a incorporação de mais enzima cause um bloqueio nos sítios ativos, impedindo a interação enzima-substrato e conseqüentemente a redução da atividade (JORDAN; KUMAR; THEEGALA, 2011).

5.7. Avaliação do rendimento de imobilização em função do tempo

Conforme já mencionado na seção de materiais e métodos do presente trabalho, o referido ensaio teve como principal objetivo avaliar o rendimento de imobilização em função do tempo. A quantidade de proteínas adicionada no início do processo foi de $64,1 \pm 6,1$ mg de proteínas por g de suporte, encontrando-se assim dentro da faixa ideal previamente determinada. A partir da Figura 22, verificou-se um perfil crescente da quantidade de proteínas imobilizada ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de suporte), e conseqüentemente no rendimento de imobilização (%), em função do tempo. Os maiores rendimentos foram encontrados após 5 e 19h de imobilização, sendo estes iguais a 74,2 e 77,2%, respectivamente. Nesse sentido, realizou-se o teste estatístico (Tukey, através do

software Bioestat) confirmando não haver diferença significativa entre os rendimentos médios, obtidos após 5 e 19h. Dessa forma, é possível constatar que após 5h de imobilização a quantidade de proteínas imobilizada máxima, relacionada a carga inicial de proteínas utilizada, é atingida e igual a aproximadamente 47,6 e 49,5 mg.g⁻¹ de suporte para 5 e 19 horas, respectivamente. Além disso, também é possível verificar que para os tempos inferiores a 5 horas, não se atinge a quantidade máxima de proteínas imobilizada alcançando-se rendimentos de aproximadamente 41,2 e 55,7 % para 1 e 3h, respectivamente. Contudo, apesar dos resultados obtidos, refletiu-se sobre a rotina de trabalho com foco na realização do processo de imobilização e a posterior aplicação no mesmo dia e, dessa forma, concluiu-se que seria mais conveniente manter o tempo de imobilização de aproximadamente 20h, o qual foi utilizado durante todo o estudo.

Figura 22. Rendimento de imobilização por proteínas em função do tempo de imobilização.



Fonte: Próprio autor.

No estudo de Gao et al. (2018), no qual foi desenvolvido um método rápido de imobilização covalente de celulases em OG a partir de espaçadores hidrofóbicos, os autores avaliaram o tempo ideal para o processo de imobilização proposto. Nesse caso, constatou-se que o rendimento de imobilização, determinado a partir da quantidade de proteínas, estabilizou após 10 min, atingindo-se um platô (GAO et al., 2018). Zhang et al. (2015) também estudou o efeito do tempo de imobilização na quantidade de proteína imobilizada, contudo com foco na imobilização de celulases em nanopartículas magnéticas funcionalizadas. No referido trabalho, os autores obtiveram um perfil semelhante ao obtido no presente estudo, no qual a quantidade de proteínas imobilizada

estabilizou-se após aproximadamente após 6 h (ZHANG et al., 2015). Por fim, é válido ressaltar que os estudos supracitados obtiveram resultados que estão intrinsicamente associados aos métodos de imobilização propostos e avaliados, os quais foram diferentes do utilizado no presente trabalho. Contudo, tais investigações reforçam a importância de se avaliar o efeito do tempo de imobilização na quantidade de proteínas imobilizada visando-se a otimização do processo como um todo.

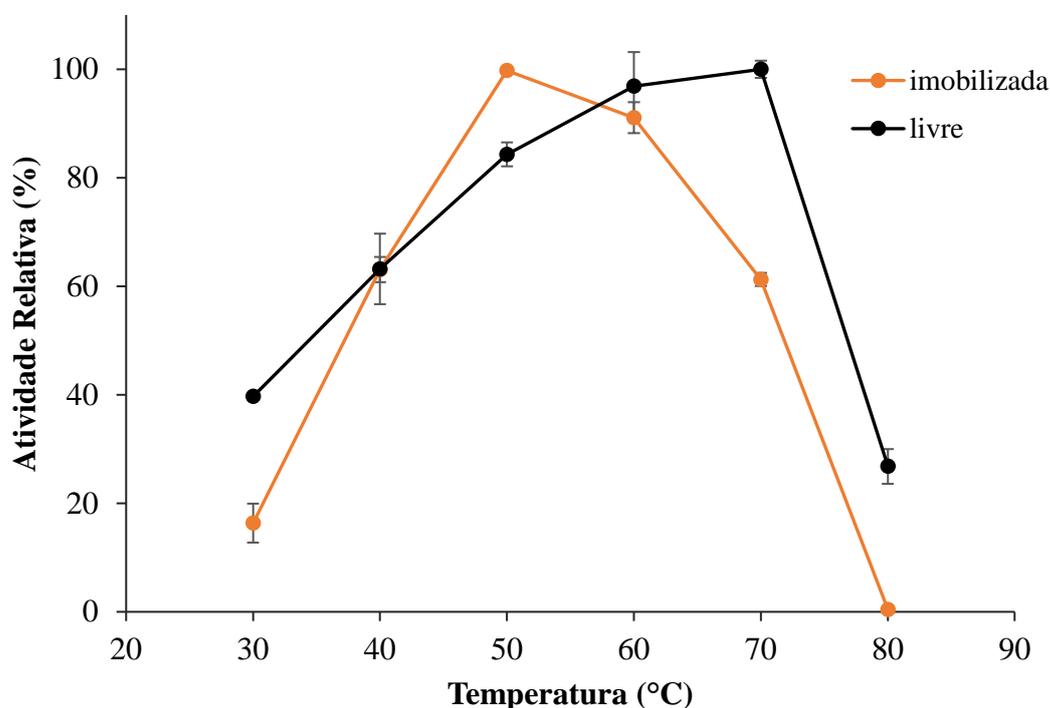
5.8. Avaliação das condições ideais para atividade enzimática de endoglucanase e xilanase imobilizadas em OGM

5.8.1. Endoglucanase

5.8.1.1. Temperatura ideal

A Figura 23 apresenta os resultados de atividade relativa de endoglucanase em diferentes temperaturas, a qual exibe as temperaturas ideais para a atividade de endoglucanase na sua forma livre e imobilizada em OGM.

Figura 23. Atividade relativa de endoglucanase, de preparado enzimático comercial, na forma livre e imobilizada em OGM, em função de diferentes valores de temperatura (°C).



Fonte: Próprio autor.

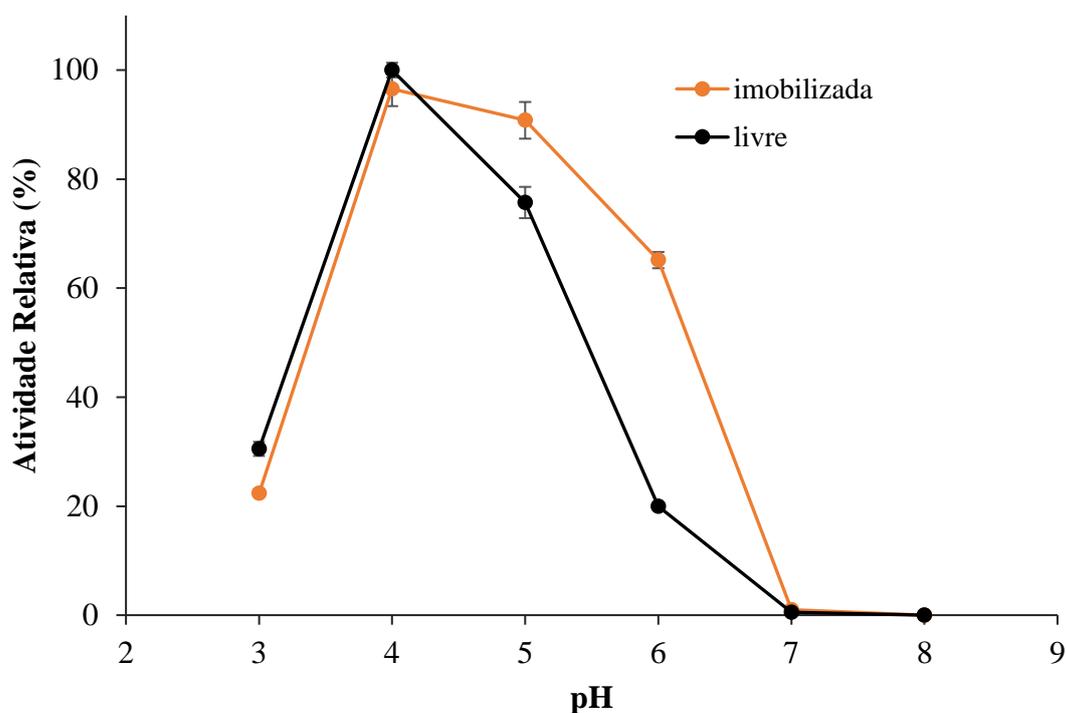
Desta forma, é possível afirmar que houve um deslocamento da temperatura ideal da enzima após sua imobilização no suporte OGM, deslocando-a para 50°C,

temperatura na qual se obteve uma atividade média igual a 206,0 U por grama de derivado. Ainda assim, optou-se por realizar o teste Tukey (software Bioestat), confirmando haver diferença significativa entre as atividades relativas, obtidas em triplicata, nas temperaturas 50 e 60°C. Sendo assim, para determinação do pH ideal para a atividade de endoglucanase imobilizada, fixou-se a temperatura de 50°C.

5.8.1.2. pH ideal

A Figura 24 apresenta os resultados de atividade relativa de endoglucanase em diferentes valores de pH, evidenciando-se os valores de pH ideais para a atividade de endoglucanase na sua forma livre e imobilizada em OGM.

Figura 24. Atividade relativa de endoglucanase, de preparado enzimático comercial, na forma livre e imobilizada em OGM, em função de diferentes valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

A partir do referido gráfico (Figura 24), é possível constatar que o valor de pH igual a 4 foi mantido como pH ideal para a atividade de endoglucanase após a imobilização em OGM, com atividade média igual a 289,5 U por grama de derivado. Contudo, também é possível constatar que a imobilização covalente no presente suporte permitiu a obtenção de maiores valores de atividade relativa média, em comparação com a enzima livre, nos valores de pH iguais a 5 e 6, as quais foram de 90,8 e 65,2%,

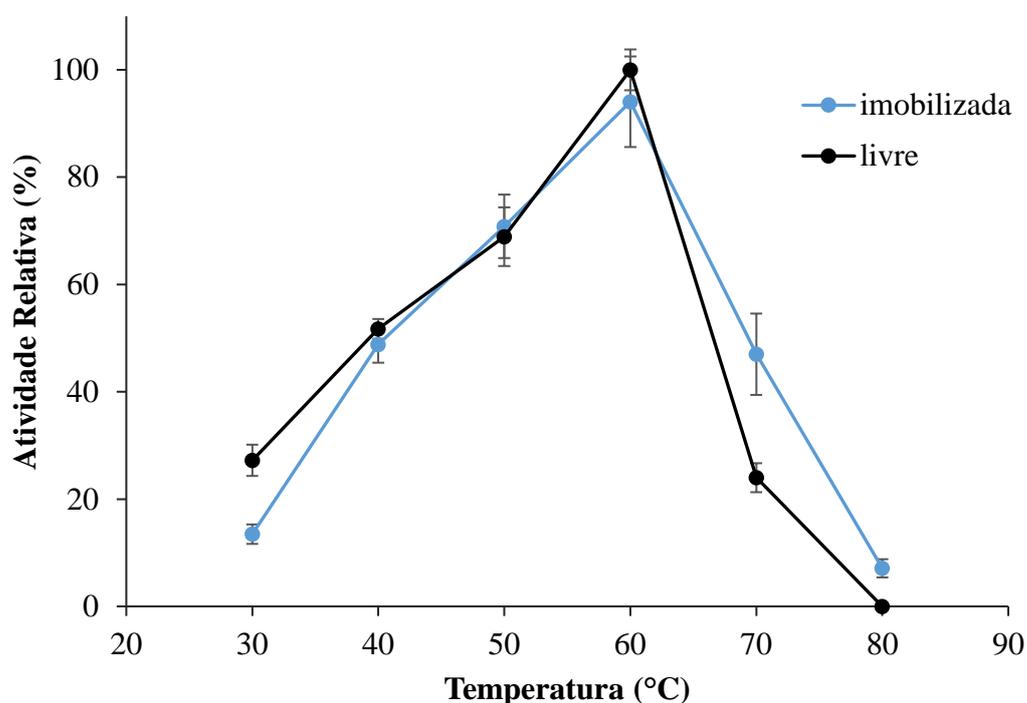
respectivamente. Por fim, assim como a enzima livre, o derivado imobilizado praticamente não apresentou atividade em valores de $\text{pH} > 7$.

5.8.2. Xilanase

5.8.2.1. Temperatura ideal

A Figura 25 apresenta os resultados de atividade relativa de xilanase em diferentes temperaturas, a qual exhibe as temperaturas ideais para a atividade de xilanase na sua forma livre e imobilizada em OGM.

Figura 25. Atividade relativa de xilanase, de preparado enzimático comercial, na forma livre e imobilizada em OGM, em função de diferentes valores de Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).



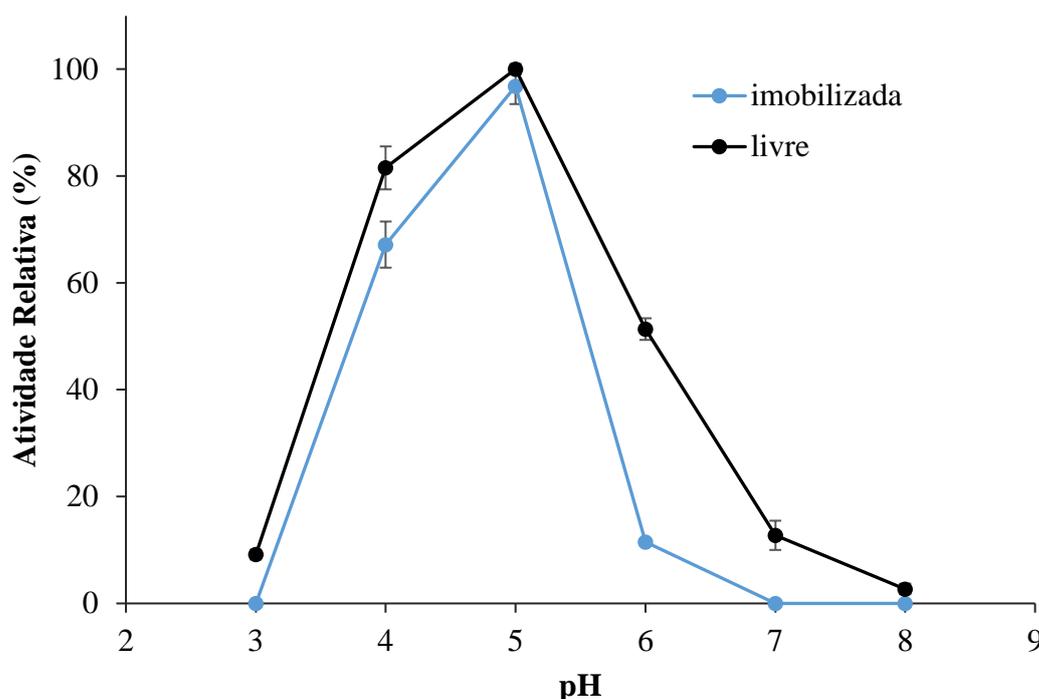
Fonte: Próprio autor.

A partir do gráfico exibido na Figura 25, é possível verificar que o perfil da atividade relativa em função das diferentes temperaturas da enzima imobilizada foi semelhante ao obtido com a enzima livre. Desta forma, é possível assegurar que a temperatura de 60°C foi mantida como ideal para a atividade de xilanase após a imobilização em OGM, com atividade média igual a 337,5 U por grama de derivado. Portanto, para determinação do pH ideal para a atividade de xilanase imobilizada, fixou-se a temperatura de 60°C .

5.8.2.2. pH ideal

A Figura 26 apresenta os resultados de atividade relativa de xilanase em diferentes valores de pH, evidenciando-se os valores de pH ideais para a atividade de xilanase na sua forma livre e imobilizada em OGM.

Figura 26. Atividade relativa de xilanase, de preparado enzimático comercial, na forma livre e imobilizada em OGM, em função de diferentes valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

Assim como observado na determinação da temperatura ideal, o perfil da atividade relativa em função dos diferentes valores de pH da enzima imobilizada foi semelhante ao obtido com a enzima livre. Contudo, é válido ressaltar que para a enzima imobilizada, a atividade relativa no pH igual a 6 diminuiu consideravelmente em relação à enzima livre. Portanto, é possível assegurar que o valor de pH igual a 5 foi mantido como ideal para a atividade de xilanase após a imobilização em OGM, com atividade média igual a 558,3 U por grama de derivado. Por fim, tendo em vista os valores de atividades enzimáticas em U por grama de derivado das enzimas estudadas, é importante destacar que podem haver diferenças nesses valores devido ao fato de que para a determinação do pH ideal foram utilizados tampões diferentes, conforme mencionado na seção de Material e Métodos.

5.8.3. Avaliação comparativa das condições ideais para a atividade de endoglucanase e xilanase em suas formas livres e imobilizadas

A Tabela 4 reúne os resultados obtidos a partir do estudo de determinação das condições ideais de temperatura e pH para as atividades de xilanase e endoglucanase, a fim de auxiliar a comparação e discussão dos mesmos.

Tabela 4. Condições ideais de temperatura e pH para as atividades de xilanase e endoglucanase, livres e imobilizadas.

Enzima	Forma	Condição ideal	
		pH	Temperatura (°C)
Endoglucanase	Livre	4	60-70
	Enz-OGM	4	50
Xilanase	Livre	5	60
	Enz-OGM	5	60

A partir dos gráficos apresentados (Figuras 23, 24, 25 e 26) e dos resultados reunidos na Tabela 4, é possível constatar que não houve alterações significativas nas condições ideais para a atividade de xilanase após a imobilização no suporte OGM através da rota EDAC-NHS. Todavia, para a atividade de endoglucanase houve alteração significativa na temperatura ideal, deslocando-se a faixa ideal de 60-70°C obtida para enzima livre, para uma temperatura mais amena e igual a 50°C, na forma imobilizada. De maneira geral, é possível afirmar que a ligação do tipo covalente entre a enzima e o suporte, através da rota de imobilização proposta, possa ter afetado a estrutura da enzima de modo que uma faixa de temperatura mais amena fosse mais favorável à sua medida de atividade. Contudo, é válido ressaltar que nas temperaturas de 60°C para a enzima imobilizada e 50°C para enzima livre, foram obtidos valores de atividade relativa de cerca de 91% e 85%, respectivamente. Nesse sentido, a mudança verificada é plausível e mantém-se nas faixas ideais de pH 4-6 e temperatura entre 50-60°C para atividade de enzimas do preparado Celluclast, segundo o NCBE.

A Tabela 5 apresenta os resultados de alguns trabalhos que avaliaram as condições ideais de temperatura e pH para as atividades de xilanasas e celulasas em diferentes suportes e rotas de imobilização.

Tabela 5. Condições ideais de temperatura e pH para as atividades de xilanase, endoglucanase e celulases totais na forma livre e imobilizadas em diferentes suportes.

Enzima	Suporte	Rota de imobilização	Condição ideal atividade (Livre/Imobilizada)		Referência
			pH	Temperatura (°C)	
Endoglucanase	OGM	EDAC-NHS	4 / 4	60-70 / 50	Este trabalho
Xilanase	OGM	EDAC-NHS	5 / 5	60 / 60	Este trabalho
Xilanase	OGM	PEGA	6,5 / 7,5	60 / 60	MEHNATI-NAJAFABADI et al. (2018)
Celulases totais	OGM	4arm PEG NH2	5 / 4	40 / 50	HAN et al. (2018)
Celulases totais	NPM	EDC	4 / 5	50 / 50	JORDAN et al. (2011)

OGM: Óxido de grafeno magnetizado; NPM: Nanopartículas magnéticas; NHS: N-Hidroxisuccinimida; EDAC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; EDC: 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimide hydrochloride; PEGA: polyethylene glycol bis amine; 4arm PEG NH2: dendritic polymer.

Tendo em vista os dados reunidos na Tabela 5, verifica-se novamente que existe uma faixa ideal de pH 4-6 e temperatura 40-60°C para a atividade ideal de xilanases e celulases, e que esta geralmente é respeitada após o processo de imobilização. Ou seja, com exceção do estudo de Mehnati-Najafabadi et al. (2018), que obtiveram valores ideais de pH mais alcalinos para a atividade de xilanases provenientes do fungo *Thermomyces lanuginosus*, as alterações nas condições ideais tendem a ser sutis e respeitarem a faixa ideal mencionada. As alterações nas condições ideais estão associadas ao suporte utilizado, o tipo de imobilização, a natureza da enzima, entre outros fatores. Em um contexto geral, pretende-se alcançar, através da imobilização, o melhoramento de alguns aspectos como a estabilidade da enzima frente a condições de pH e temperatura, bem como o seu reuso e facilidade de recuperação. Nesse sentido, se fazem necessários estudos que avaliem tais parâmetros mencionados e possíveis alterações após o processo de imobilização, comparando-se com a enzima em sua forma livre (SHELDON; VAN PELT, 2013).

5.9. Determinação dos parâmetros de imobilização

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos a partir do estudo de determinação dos parâmetros de imobilização conforme descrito na seção 4.7 do presente trabalho.

Tabela 6. Rendimento, eficiência e atividade recuperada no processo de imobilização de endoglucanase e xilanase de preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes) em óxido de grafeno magnetizado (OGM), e atividade de endoglucanase e xilanase reportada em unidades internacionais (U) por grama de suporte.

Enzima	Rendimento de imobilização (%)	Eficiência (%)	Atividade Recuperada (%)	Atividade enzimática (U.g ⁻¹)
Endoglucanase	25,6 ± 0,9	70,9 ± 4,1	18,1 ± 0,7	191,7 ± 7,6
Xilanase	40,0 ± 8,0	84,4 ± 9,6	35,5 ± 6,6	337,5 ± 58,0

Os ensaios foram realizados a partir de uma carga inicial de aproximadamente 60 mg de proteínas e nas respectivas condições ideais para a atividades das enzimas na forma livre e imobilizada, previamente determinadas.

Conforme apresentado na seção 5.6 deste trabalho, foi escolhida como carga inicial ideal de proteínas a faixa de 55-65 mg, na qual se obteve um rendimento médio de imobilização por proteínas de 68% e a maior atividade enzimática observada. Porém, como o preparado enzimático (Celluclast) é um complexo composto por xilanasas e celulases, é importante avaliar o processo de imobilização a partir da atividade de cada enzima estudada. Nesse sentido, determinaram-se os parâmetros de rendimento, eficiência e atividade recuperada, conforme descrito no tópico 4.7 do presente trabalho. Quanto ao rendimento de imobilização, o qual relaciona a atividade inicial e a atividade presente no sobrenadante após a imobilização, obteve-se valores de 25,6 % e 40,0 % para endoglucanase e xilanase, respectivamente. Sendo assim, é possível constatar que as enzimas estudadas não apresentaram boa interação com o suporte a partir da rota proposta. Contudo, em relação à eficiência, a qual relaciona a atividade teórica imobilizada ($U_{\text{inicial}} - U_{\text{sobrenadante}}$) com a atividade do derivado imobilizado, é possível verificar que a partir dos resultados obtidos de 70,9% e 84,4%, que o derivado imobilizado apresentou uma boa atividade de endoglucanase e xilanase em relação à atividade teórica imobilizada. Nesse sentido, vale ressaltar que o cenário ideal seria uma eficiência de 100%, contudo geralmente esses valores são menores devido às limitações de transferência de massa, dificuldade de acessibilidade de sítios ativos, possíveis alterações conformacionais na estrutura da enzima, entre outros fatores (SHELDON; VAN PELT, 2013; PAZ-CEDENO, 2021). Por sua vez, a atividade recuperada relaciona a atividade do derivado imobilizado com a atividade inicial. Sendo assim,

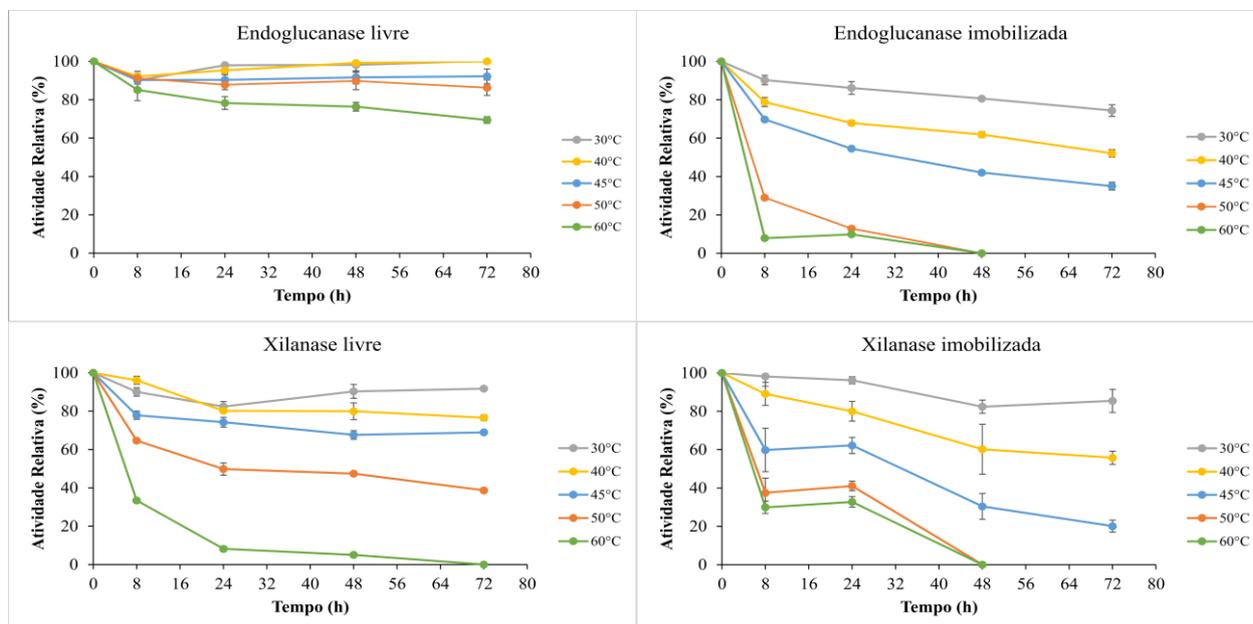
foram obtidos valores de 18,1% e 35,5% para endoglucanase e xilanase, respectivamente, e assim, verifica-se que em relação a atividade inicial adicionada, o derivado imobilizado apresentou uma atividade consideravelmente melhor. Porém, neste caso, é válido ressaltar que a diferença entre as referidas atividades pode ser intensificada devido às limitações de transferência de massa e a dificuldade de acessibilidade de sítios ativos em comparação com a enzima livre e imobilizada. Paz-Cedeno et al. (2021) determinou em seu estudo os mesmos parâmetros, contudo para a avaliação da imobilização de celulasas, incluindo endoglucanase e β -glicosidase, e xilanase do preparado enzimático Cellic CTec 2-Novozymes em OGM pela rota EDAC-NHS. Para a endoglucanase, foram obtidos valores de 63,4%, 37,6% e 23,8% para rendimento, eficiência e atividade recuperada, respectivamente. Neste caso, é possível verificar que houve uma melhor imobilização de endoglucanase em comparação com o presente estudo, contudo esta não foi traduzida em uma melhor eficiência, conforme os dados presentes na Tabela 6. Para a xilanase, foram obtidos valores de 27,0%, 55,2% e 14,9% para rendimento, eficiência e atividade recuperada, respectivamente. Neste caso, de acordo com a Tabela 6, todos os parâmetros obtiveram valores inferiores aos obtidos neste trabalho. O estudo de Paz-Cedeno et al. (2021) permite uma comparação interessante com o presente trabalho, uma vez que foram utilizados o mesmo suporte e a mesma rota de imobilização, variando-se apenas o preparado enzimático contendo atividades de celulasas e xilanases.

Por fim, outro parâmetro importante é a atividade das enzimas imobilizadas dadas em U por grama de suporte. No presente trabalho, foram obtidos valores de $191,7 \pm 7,6$ e $337,5 \pm 58,0$ U por grama de suporte, para endoglucanase e xilanase, respectivamente (Tabela 6). Nesse sentido, a atividade de endoglucanase obtida foi ligeiramente menor que a adquirida por Paz-Cedeno et al. (2021), a qual foi de $299,9 \text{ U.g}^{-1}$. No entanto, para a xilanase, o referido estudo obteve uma atividade aproximadamente três vezes maior ($1034,0 \text{ U.g}^{-1}$). Nesse caso, como o mencionado estudo utilizou o mesmo suporte e a mesma rota de imobilização, é possível atribuir essas variações às características intrínsecas aos preparados enzimáticos de celulasas e xilanases utilizados e às possíveis variações na metodologia empregada para tal avaliação.

5.10. Estabilidade térmica de endoglucanase e xilanase immobilizadas em OGM

Conforme mencionado na seção de materiais e métodos deste trabalho, avaliou-se a estabilidade térmica das enzimas estudadas em suas formas livres e immobilizadas em OGM. As temperaturas avaliadas foram de 30, 40, 45, 50 e 60°C e o tempo de exposição total de 72 h, sendo a atividade enzimática determinada nos intervalos de tempos pré-definidos de 8, 24, 48 e 72h. Conforme reforçado por Sheldon e Van Pelt (2013), a estabilidade térmica de enzimas é um parâmetro fundamental visando a aplicação industrial. Contudo, a Figura 27 apresenta os valores de atividade relativa das enzimas em função do tempo de exposição, bem como da Tabela 7, a qual apresenta os valores de tempo de meia vida ($t_{1/2}$) calculados, é possível constatar que a imobilização covalente de endoglucanase e xilanase em OGM não melhorou de maneira significativa a estabilidade térmica das enzimas estudadas considerando que ambas apresentaram maior estabilidade em relação a atividade enzimática, e conseqüentemente um maior tempo de meia vida, em suas formas livres.

Figura 27. Estabilidade térmica de endoglucanase e xilanase nas formas livres e immobilizadas em OGM.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 7. Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) dado em horas, de endoglucanase e xilanase em suas formas livre e imobilizada em OGM para cada temperatura avaliada.

Enzima	Forma	Tempo de meia vida (horas)				
		30°C	40°C	45°C	50°C	60°C
Xilanase	Livre	*	178,0 ± 7,7	90,7 ± 6,3	64,4 ± 1,4	6,8 ± 0,5
Xilanase	Imobilizada	235,3 ± 23,6	86,1 ± 10,8	38,1 ± 5,1	7,5 ± 0,2	7,7 ± 0,3
Endoglucanase	Livre	*	*	*	320,5 ± 16,6	156,8 ± 10,6
Endoglucanase	Imobilizada	191,4 ± 13,1	89,4 ± 4,6	51,0 ± 2,1	8,6 ± 0,1	5,4 ± 0,2

**Para os casos da xilanase livre (30°C) e endoglucanase livre (30, 40 e 45°C) não foi possível determinar o tempo de meia vida, uma vez que nesses casos em específico o modelo matemático não pôde ser determinado devido ao fato da atividade relativa se manter praticamente constante durante o tempo avaliado.*

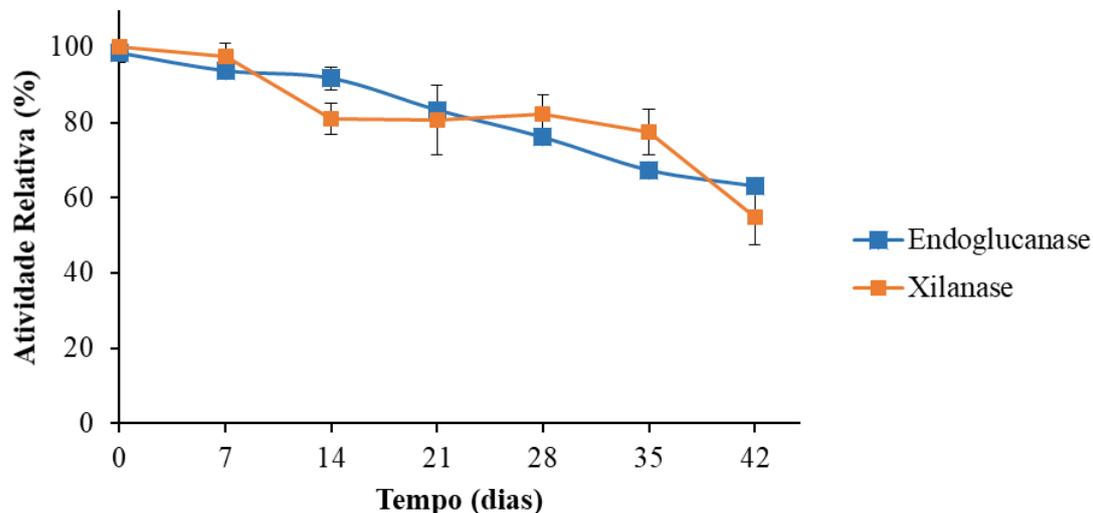
A partir da Figura 27 observa-se que após 48 h de exposição nas temperaturas de 50 e 60°C, o derivado imobilizado (OGM-Enzima) não apresentou atividade de endoglucanase e xilanase, ao passo que as enzimas em sua forma livres apresentaram atividade. Nesse sentido, vale reforçar que a endoglucanase em sua forma livre manteve aproximadamente 70% de atividade após 72 h de exposição a 60°C, conforme ilustrado na Figura 27. Nadar e Rathod (2019) desenvolveram um estudo o qual avaliou a estabilidade de um derivado enzimático obtido a partir da imobilização simultânea de pectinase e celulase comerciais (Pectinex e Celluclast) em nanopartículas magnéticas funcionalizadas, visando a aplicação na hidrólise de material celulósico celular para a liberação de compostos bioativos de plantas e frutas. No referido estudo, o derivado imobilizado apresentou uma melhora significativa na estabilidade na faixa de 50-70°C para ambas as enzimas, aumentando aproximadamente duas vezes o $t_{1/2}$ para a celulase imobilizada em relação à livre. É válido ressaltar que no caso explicitado, o tempo de exposição foi de 60 min e que a atividade enzimática foi determinada a partir da hidrólise de CMC (NADAR; RATHOD, 2019). No estudo de Martins (2007), no qual o autor avaliou a imobilização de celulasas comerciais (Celluclast 1.5L) em matrizes de géis de quitosana e quitosana-alginato visando a aplicação na hidrólise de bagado de cana-de-açúcar, também foi possível promover uma melhora na estabilidade da celulase a partir da imobilização proposta, aumentando cerca de três vezes o tempo de meia vida em relação a enzima livre para a temperatura de 65°C (MARTINS, 2007). Outros estudos que avaliaram a imobilização de celulase de diferentes origens em diferentes suportes, incluindo OG funcionalizado e nanopartículas magnéticas, também alcançaram melhoras significativas na estabilidade térmica em condições específicas (HAN et al., 2018; SELVAM et al., 2016; SIMON et al., 2018; SUI et al., 2019).

Apesar dos resultados obtidos, a estabilidade não é o único parâmetro capaz de comprovar o potencial e a viabilidade de aplicação de enzimas imobilizadas, no caso do presente estudo, endoglucanase e xilanase em OGM. A imobilização de enzimas em suportes sólidos geralmente permite a sua recuperação, bem como sua reutilização, permitindo, dessa forma, seu uso com boa relação custo-benefício. Além disso, com foco nas aplicações industriais, é válido mencionar que com uma formulação sólida ao invés de líquida, a separação da enzima e do bioproduto é facilitada de forma a diminuir drasticamente a contaminação de proteínas em bioprodutos, por exemplo, necessidade de precipitação das proteínas prévio a etapa de fermentação (etanol celulósico) (NADAR; RATHOD, 2019; SHELDON; VAN PELT, 2013). Além disso, é importante reforçar que no preparado enzimático utilizado no presente estudo, Celluclast 1.5L (Novozymes), estão presentes outras enzimas como β -glicosidase e exoglucanase, as quais poderiam ser investigadas com foco na avaliação do potencial de aplicação do derivado imobilizado obtido.

5.11. Estabilidade de armazenamento de endoglucanase e xilanase imobilizadas covalentemente em OGM

Também no presente trabalho foi desenvolvido um estudo sobre a estabilidade de armazenamento das enzimas endoglucanase e xilanase imobilizadas covalentemente em OGM. O derivado imobilizado foi armazenado em geladeira comum e as atividades enzimáticas foram dosadas, seguindo a metodologia já prescrita na seção de Material e Métodos, e amplamente citada no presente trabalho, durante 42 dias em intervalos regulares de 7 dias, ou seja, foram coletados sete pontos no total, considerando o ponto inicial. O gráfico abaixo (Figura 28) exhibe os resultados obtidos de Atividade Relativa (%) de cada uma das enzimas estudadas pelo tempo em dias.

Figura 28. Estabilidade de armazenamento de endoglucanase e xilanase imobilizadas em OGM, considerando-se a Atividade Relativa (%) do derivado em função do tempo de armazenamento (dias).



Fonte: Próprio autor.

A partir do referido gráfico, é possível constatar um decaimento na atividade enzimática de ambas as enzimas conforme a passagem dos dias. Após 42 dias, a atividade relativa, em porcentagem, de endoglucanase foi de $63,2 \pm 0,8$ e de xilanase $54,8 \pm 7,4$. A partir da linearização dos resultados obtidos, foi possível projetar o tempo de meia vida, ou seja, o tempo em que a atividade enzimática atinge 50%, comparando-se com o valor inicial, para a endoglucanase de aproximadamente 65 dias ($R^2 = 0,97$). Já para a xilanase, não foi possível chegar a uma linearização adequada para a realização da projeção. Dentre as potenciais causas para o decaimento da atividade enzimática conforme os dias, é possível destacar a exposição contínua do derivado ao tampão de imobilização (pH 4,8), o que pode causar deformações e a desnaturação enzimática, mesmo as enzimas estando imobilizadas. Nesse contexto, um outro interessante ensaio para o aprofundamento nesse estudo seria avaliar o armazenamento da enzima no formato sólido e seco, e a sua posterior suspensão quando for utilizá-la.

Avaliar a estabilidade de armazenamento de uma enzima, esteja ela imobilizada ou não, é muito importante para evidenciar a sua aplicação a longo prazo. Como as enzimas são proteínas que podem ser sensíveis às variações de temperatura e pH, é fundamental conhecer as condições ideais para a manutenção adequada da sua atividade enzimática. No estudo de Sui et. al (2019), foi avaliada, dentre outros ensaios, a estabilidade de armazenamento de celulasas imobilizadas covalentemente em

microesferas de poliuréia a 4°C durante 60 dias. Ao final do estudo, os autores constataram que a atividade relativa de celulase imobilizada foi de aproximadamente 50%, ou seja, metade, de sua atividade inicial após 60 dias. Em contrapartida, a atividade relativa da forma livre foi apenas 14% da atividade inicial após o mesmo período. Sendo assim, celulase imobilizada indicou atividade residual 3,6 vezes maior do que a forma livre, sugerindo que a celulase imobilizada é mais adequada para o armazenamento. No trabalho de Selvam et. al (2016), o qual avaliou a atividade e estabilidade de celulase bacteriana imobilizada em nanopartículas magnéticas (NPMs), também foi constatado que imobilização melhorou de maneira significativa a estabilidade de armazenamento. A celulase livre manteve 15% de sua atividade original, ao passo que a celulase imobilizada em NPMs manteve 70% de sua atividade inicial após 100 dias (SELVAM et al., 2016; SUI et al., 2019).

Por fim, é válido reforçar que a estabilidade de armazenamento das enzimas estudadas em suas formas livres não foi avaliada no presente trabalho uma vez que se assume a premissa de que por ser um preparado enzimático comercial, a sua composição deve garantir tal estabilidade para o uso e aplicação das enzimas a longo prazo.

6. CONCLUSÃO

- A síntese de OGM foi realizada com sucesso e o material sintetizado apresentou propriedades magnéticas como esperado;
- A partir do proposto processo de síntese de OGM foi possível obter um rendimento de aproximadamente 15,9 vezes em relação a massa inicial de OG utilizada;
- Constata-se que a partir de 1 grama de grafite é possível obter aproximadamente 24,7 gramas de OGM;
- As condições ideais para a atividade de endoglucanase e xilanase estão dentro da faixa de pH 4-6 e temperatura 50-70°C, geralmente reportadas;
- O proposto processo de imobilização das referidas enzimas em óxido de grafeno magnetizado (OGM) não gerou mudanças nas condições ideais para a atividade da xilanase, sendo 4 e 60°C o pH e a temperatura, respectivamente. Contudo, a imobilização deslocou a faixa ideal de temperatura de 60-70°C obtida para endoglucanase em sua forma livre, para uma temperatura mais amena e igual a 50°C, quando imobilizada;

- A faixa ideal para a quantidade de proteínas adicionadas na imobilização (carga inicial) de 55-65mg por grama de suporte, considerando a saturação do suporte e a estabilização da atividade enzimática, se apresentou coerente se comparado com alguns trabalhos mencionados. Por sua vez, o rendimento de imobilização por proteínas de 68%, representando cerca de 42 mg de proteína imobilizada por grama de suporte, se comparado com a literatura, encontra-se uma maior variação nos resultados, havendo estudos que reportaram quantidades menores, e outros maiores (de proteína imobilizada por grama de suporte). Nesse sentido, é possível atribuir tais variações as diferentes rotas de imobilização empregadas e aos preparados enzimáticos utilizados;

- Através dos parâmetros de imobilização (rendimento, eficiência e atividade recuperada) permite-se concluir que o processo de imobilização no presente suporte através da rota EDAC-NHS é regular (rendimento >50%), mas que o derivado imobilizado apresenta boa atividade enzimática se comparada com a atividade imobilizada teórica, a qual é obtida a partir das atividades iniciais e no sobrenadante;

- A partir do estudo de estabilidade térmica realizado, foi possível constatar que a imobilização covalente de endoglucanase e xilanase em OGM não melhorou de maneira significativa a estabilidade térmica das enzimas estudadas considerando que ambas apresentaram uma maior estabilidade em relação a atividade enzimática, e conseqüentemente um maior $t_{1/2}$ em sua forma livre.

- Por fim, a partir do presente estudo é possível confirmar que o óxido de grafeno (OG) é um material promissor para a imobilização de celulases e xilanases, atuando como suporte sólido. Além disso, é um material com processo de síntese relativamente simples e obtido com um bom rendimento;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEEL, M. et al. Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1430–1440, 2018.

AKBARZADEH, A. et al. Disulfide bonds elimination of endoglucanase II from *Trichoderma reesei* by site-directed mutagenesis to improve enzyme activity and thermal stability: An experimental and theoretical approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1572–1580, 2018.

ALFTRÉN, J.; HOBLEY, T. J. Immobilization of cellulase mixtures on magnetic particles for hydrolysis of lignocellulose and ease of recycling. **Biomass and Bioenergy**, v. 65, p. 72–78, 2014.

ARAGON, C. **Imobilização multipontual covalente de xilanases: seleção de derivados ativos e estabilizados**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2013.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257–270, 1992.

BAJPAI, P. Introduction. In: BAJPAI, P. **Xylanolytic Enzymes**. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2014. Chapter 1, p. 1-7. ISBN: 978-0-12-801020-4 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128010204/xylanolytic-enzymes#book-description>.

BAJPAI, P. Xylanases. In: SCHAECHTER, M. (editor). **Encyclopedia of Microbiology**. 3rd. ed. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2009. p. 600–612.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286–290, 1985.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3–4, p. 120–130, 2008.

CASTRO, A. M. DE; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

COLLINS, T.; GERDAY C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.3-23, 2005.

DOUSTKHAH, E.; ROSTAMNIA, S. Covalently bonded sulfonic acid magnetic graphene oxide: Fe₃O₄@GO-Pr-SO₃H as a powerful hybrid catalyst for synthesis of indazolophthalazinetriones. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 478, p. 280–287, 2016.

FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2011. 13 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/61175/1/DOC54-2011.pdf>.

FENGEL, D; WEGENER, G. Wood - chemistry, ultrastructure, reactions. **Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition**, v. 23, n. 11, p. 601–2, 1984.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082–1093, 2017.

FONSECA, A. M. **Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Eng. Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GAO, Jian et al. Rapid immobilization of cellulase onto graphene oxide with a hydrophobic spacer. **Catalysts**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal8050180>.

GELLERSTEDT, G.; EK, M.; HENRIKSSON, G. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009. 308 p. (Pulp and Paper Chemistry and Technology, v. 1). Disponível em: <https://doi.org/10.1515/9783110213409>.

GOKHALE, A. A.; LU, J.; LEE, I. Immobilization of cellulase on magnetoresponsive graphene nano-supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 76–86, 2013.

GONÇALVES, D. **Estudo sobre o modo de ação de enzimas hidrolíticas produzidas por fungos degradadores de madeira sobre substratos com elevado teor de lignina**. Universidade de São Paulo, 2013.

HAN, Juan et al. The development of nanobiocatalysis via the immobilization of cellulase on composite magnetic nanomaterial for enhanced loading capacity and catalytic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 692–700, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.176>.

HEIDARIZADEH, M. et al. Dithiocarbamate to modify magnetic graphene oxide nanocomposite (Fe₃O₄-GO): A new strategy for covalent enzyme (lipase) immobilization to fabrication a new nanobiocatalyst for enzymatic hydrolysis of PNPD. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 696–702, 2017.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, p. 1339–1339, 1958.

JOHN RALPH, K. et al. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. **Phytochemistry Reviews**, n. 3, p. 29–60, 2004.

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.

JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, p. 687-697, 2009.

LI, D. et al. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 101–105, 2008.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.; Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 63, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAFEI, T. D. T. et al. Extraction and Characterization of Hemicellulose from Eucalyptus By-product: Assessment of Enzymatic Hydrolysis to Produce Xylooligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 1, p. 197-217, 2019.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. RIA M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 44–49, 2015.

MARTINS, L. F. et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1417–1424, 2008.

MARTINS, Rafael Elias. **Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana**. Tese (Mestrado) - UFSCAR, 2007.

MEHNATI-NAJAFABADI, Vajihe; TAHERI-KAFRANI, Asghar; BORDBAR, Abdol Khalegh. Xylanase immobilization on modified superparamagnetic graphene oxide nanocomposite: Effect of PEGylation on activity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 418–425, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.013>.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. **Energy and Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848–889, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ef0502397>.

MONTES-NAVAJAS, P. et al. Surface area measurement of graphene oxide in aqueous solutions. **Langmuir**, v. 29, n. 44, p. 13443–13448, 2013.

MORAES, S. L. DE et al. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT | Tecnologia e Inovação**, p. 58–73, 2017.

NADAR, Shamraja S.; RATHOD, Virendra K. A co-immobilization of pectinase and cellulase onto magnetic nanoparticles for antioxidant extraction from waste fruit peels. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. January 2018, p. 470–479, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.015>.

NCBE, **Enzymes for education – Cellulase - Novozymes Celluclast®**. Disponível em: <<http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/celluclast.html>>. Acesso em: 24 de setembro de 2019.

NOVOSELOV, K. S. et al. Electric field in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666–669, 2004. Disponível em: doi: 10.1126/science.1102896.

PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature nanotechnology**, v. 4, p. 217–224, 2009.

PAZ-CEDENO, Fernando Roberto et al. Magnetic graphene oxide as a platform for the immobilization of cellulases and xylanases: Ultrastructural characterization and assessment of lignocellulosic biomass hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 164, p. 491–501, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.09.059>

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulasas e xilanasas por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. Universidade Federal de Goiás, 2013.

POLIZELLI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, (Mini-Review), v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

RAY, S. C. Application and Uses of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide. In: **Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials**. Oxford, UK: Elsevier; Academic Press, 2015. Chapter 2, p. 39–56.

ROSTAMNIA, S.; DOUSTKHAH, E. Synthesis of water-dispersed magnetic nanoparticles (H₂O-DMNPs) of β -cyclodextrin modified Fe₃O₄ and its catalytic application in Kabachnik-Fields multicomponent reaction. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 386, p. 111–116, 2015.

SAKATA, M. et al. Immobilization of Trypsin on Graphene Oxide Nanosheets for Increased Proteolytic Stability. **Chemistry Letters**, v. 41, n. 12, p. 1625–1627, 2012.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SBISSI, K. et al. Fe doping effects on the structural, magnetic, and magnetocaloric properties of nano-sized Pr_{0.6}Bi_{0.4}Mn_{1-x}Fe_xO₃ (0.1 ≤ x ≤ 0.3) manganites. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 313–323, 2015.

SELVAM, Kandasamy et al. Activity and stability of bacterial cellulase immobilized on magnetic nanoparticles. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 11, p. 1891–1898, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(16\)62487-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(16)62487-7)

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–35, 2013.

SHEN, J. et al. Covalent attaching protein to graphene oxide via diimide-activated amidation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 434–438, 2010.

SIMON, Patrícia et al. Cellulase immobilization on poly(methyl methacrylate) nanoparticles by miniemulsion polymerization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 649–657, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160094>

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-46, 2002.

SUI, Ying et al. A facile route to preparation of immobilized cellulase on polyurea microspheres for improving catalytic activity and stability. **Process Biochemistry**, v. 87, n. September, p. 73–82, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.09.002>

TANAKA, M. et al. Purification and Properties of Cellulases from *Eupencillium javanicum*: Studies on the Re-utilization of Cellulosic Resources (VII). **Journal of fermentation technology**, v. 59, p. 177–183, 1981.

TANG, F. et al. Improving the thermostability of *Trichoderma reesei* xylanase 2 by introducing disulfide bonds. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 26, p. 52–59, 2017.

UFFEN, R. L. Xylan degradation: A glimpse at microbial diversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 1997.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n.3, p. 295–299, 2009.

WILSON, D. B. Cellulases. In: SCHAECHTER, M. (editor). **Encyclopedia of Microbiology**, 3rd. ed. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2009. p. 252–258.

Yu EKC, Tan LUL, Chan MKH, Deschatelets L, Saddler JN. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Enzyme Microb Technol**, v. 9, n.1, p.16–24, 1987.

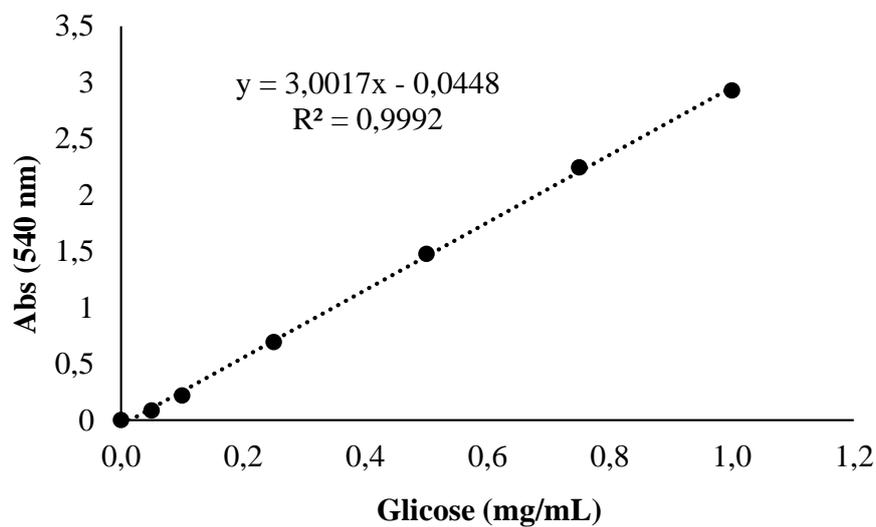
ZHANG, J. et al. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6083–6085, 2010.

ZHANG, Wenjuan et al. Increase in stability of cellulase immobilized on functionalized magnetic nanospheres. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 375, p. 117–123, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.09.067>.

8. APÊNDICE

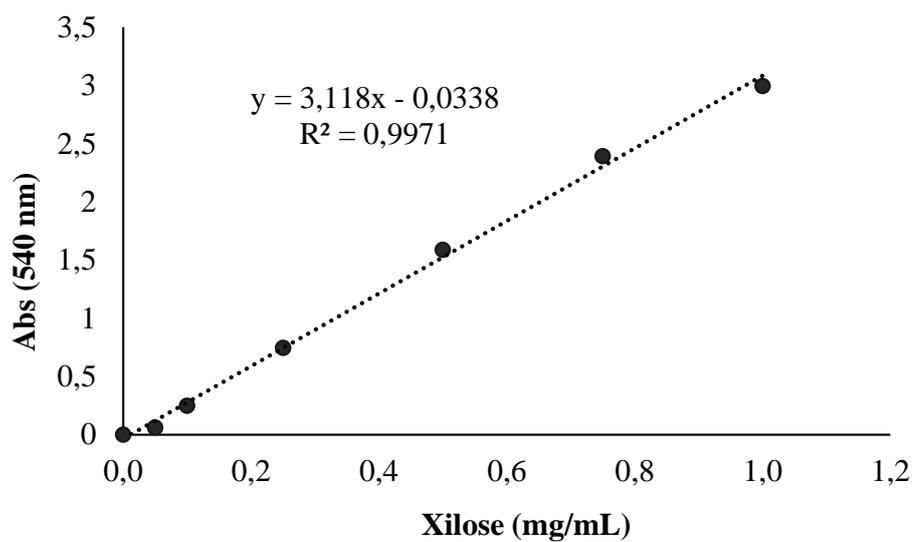
1. Curva analítica para determinação de glicose

Figura 29. Curva analítica para determinação da concentração de glicose.



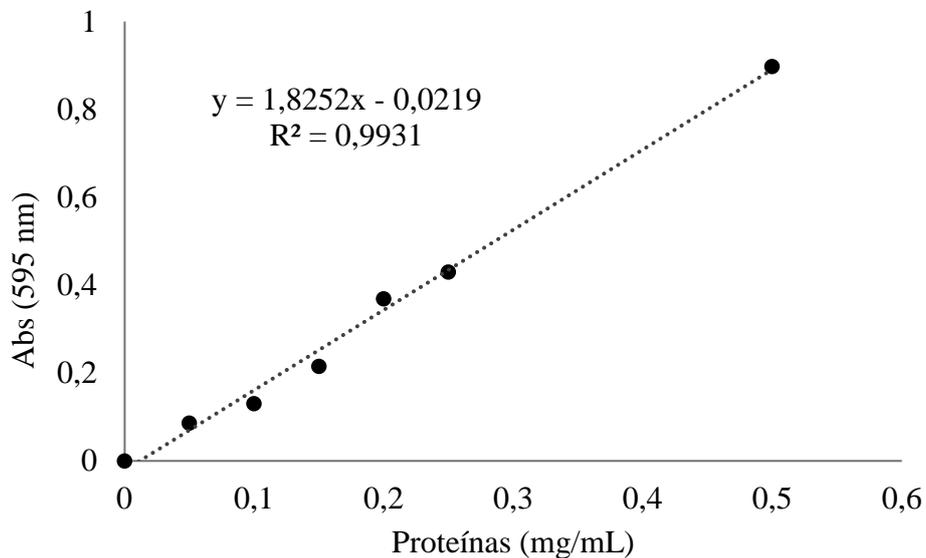
2. Curva analítica para determinação de xilose

Figura 30. Curva analítica para determinação da concentração de xilose.



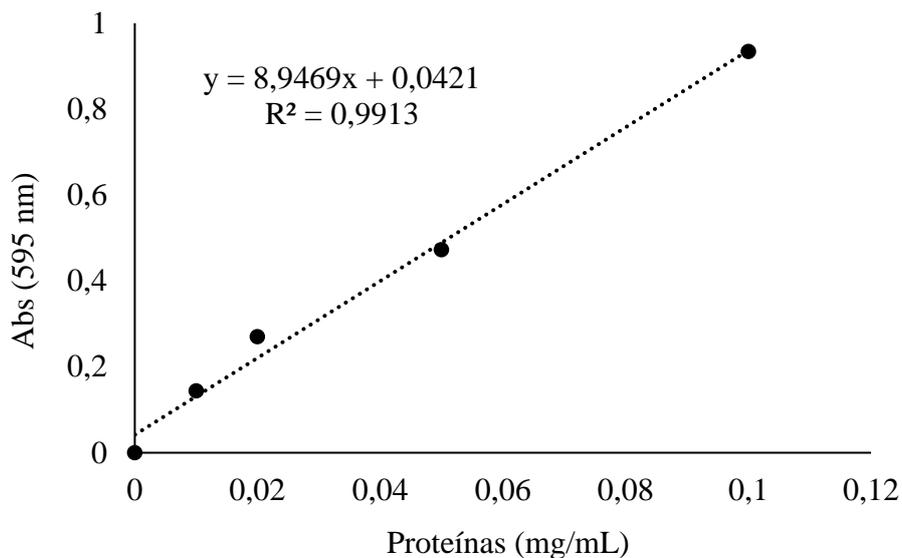
3. Curva analítica para quantificação de proteínas

Figura 31. Curva analítica para determinação da quantidade de proteínas totais, via método de Bradford.



4. Curva analítica para quantificação de proteínas (0,5 mL de amostra)

Figura 32. Curva analítica para determinação da quantidade de proteínas totais, via método de Bradford, utilizando-se 0,5 mL de amostra.



5. Curva analítica para determinação de p-nitrofenol

Figura 33. Curva analítica para determinação da concentração de p-nitrofenol (mg/mL)

