

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/05/2023.

CAROLINE OLIVEIRA DA ROCHA

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

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa
Marques

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: CAROLINE OLIVEIRA DA ROCHA

ORIENTADOR: RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES

COORDINADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

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

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

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



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

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



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

Araraquara, 25 de maio de 2021

DADOS CURRICULARES

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

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

Formação acadêmica/titulação

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

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

Título: Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de biocatalisadores.

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

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

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

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

Orientador: Arnaldo Alves Cardoso

Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

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

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

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

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

Trabalhos que foram submetidos em jornais:

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

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

Participação em eventos científicos:

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

de Anais da SBQ, 2018.

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

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

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

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

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

Outros:

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

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

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

Dedico este trabalho a

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Pedagogia da Autonomia,
Paulo Freire.*

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GEE Gases do Efeito Estufa

UNCTAD Conferência das Nações Unidas para o Comércio e Desenvolvimento

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

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

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

CEL Celulase

PAM Produção Agrícola Municipal

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MM Michaelis-Menten

APTS 3-Aminopropiltriethoxysilano

RMN Ressonância magnética nuclear

2G Segunda Geração

AFEX Explosão a vapor de fibra de amônia

EG, E1 Endoglicanase

CBH, E2 Celobiohidrolase

BG, E3 β -glicosidase

DP Grau de polimerização

E12 Combinação de E1 e E2

E123 Combinação entre E1, E2 e E3

QSS Estado quase estacionário

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

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

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

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

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÕES FINAIS

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

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GAMA, F. M. P. Mecanismo bioquímico de ação de celulasas de *Trichoderma reesei*. Tese (Doutorado em Engenharia Biológica), Escola de Engenharia - Departamento de Engenharia Biológica - Universidade do Minho, 1996.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, an experimental study and mathematical modelling. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1003–1018, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

a review. p. 459–494, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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