

Patricia Simon

**IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE EM NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE METILA) VIA  
POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora de Oliveira.

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Simon, Patricia

Imobilização de celulase em nanopartículas poliméricas de poli(metacrilato de metila) via polimerização em miniemulsão / Patricia Simon ; orientador, Selene M.A.Guelli Ulson de Souza - Florianópolis, SC, 2015.  
90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Celulase. 3. Imobilização. 4. Nanopartículas Poliméricas. 5. Miniemulsão. I. Souza, Selene M.A.Guelli Ulson de . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Patricia Simon

**IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE EM NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE METILA) VIA  
POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de maio de 2015.

---

Prof. Ricardo Antônio Francisco Machado, Dr.  
Coordenador do Programa

---

Prof.<sup>a</sup> Selene M. A. Guelli Ulson de Souza, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora

---

Prof. Antônio Augusto Ulson de Souza, Dr.  
Coorientador

---

Prof.<sup>a</sup> Débora de Oliveira, Dr.<sup>a</sup>  
Coorientadora

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.  
USFC/PósENQ

---

Alexsandra Valério, Dr.<sup>a</sup>  
UFSC/PósENQ

---

Prof. Marco Di Luccio, Dr.  
UFSC/PGEAL

Este trabalho é dedicado à toda minha família, em especial aos meus pais.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar discernimento e guiar meus passos.

A todos os professores que sempre se dispuseram a compartilhar seus conhecimentos, em especial à minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene M. A. Guelli Ulson de Souza, aos meus coorientadores Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora de Oliveira, e ao Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo.

Aos Laboratórios de Transferência de Massa e Simulação Numérica de Sistemas Químicos (LabMASSA & LabSIN) e ao Laboratório de Controle e Processos Poliméricos (LCP), não só pela infraestrutura cedida, mas principalmente pelas amigadas que me proporcionaram fazer.

À Dr.<sup>a</sup> Alexandra Valério, pela sua inestimável colaboração e atenção, essenciais para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus amigos, pelas colaborações nas mais diversas formas e por tornarem a caminhada mais prazerosa.

À Janaína de Souza Lima, minha amiga e parceira, pelas rotineiras discussões e imenso auxílio na condução dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química (PósENQ) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela estrutura e suporte concedidos à realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo aporte financeiro.

Aos meus pais, Marilaine e Silvério, pela educação, amor, auxílio e ternura ao longo de minha vida.

À minha irmã, Isabela, por alegrar meus dias e por sua amizade incondicional.

Ao meu namorado, Pablo, pelo incomensurável amor, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis.

Às minhas tias, Sirlaine, Roselaine e Zenaide, que mesmo distantes, sempre me deram forças para buscar meus objetivos.

Muito obrigada!





Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.

(Mahatma Gandhi)



## RESUMO

Celulases são enzimas altamente eficientes na conversão de celulose em glicose. Seu emprego na forma imobilizada viabiliza, por meio da possibilidade de sua reutilização em ciclos sucessivos, diversos processos biotecnológicos. Diferentemente dos métodos convencionais de imobilização por ligação covalente, os quais frequentemente requerem inúmeros e complicados procedimentos, a polimerização em miniemulsão permite imobilizar a enzima em nanopartículas poliméricas em uma única etapa de reação. Assim, com o objetivo de obter celulase imobilizada em nanopartículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA), foram conduzidas reações de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila (MMA). A formação das nanopartículas de PMMA mostrou-se dependente da quantidade de celulase adicionada, sendo a conversão de monômero tanto maior quanto maior a concentração de enzima. Sob condições otimizadas, foi possível produzir nanopartículas estáveis, com diâmetros de aproximadamente 134 nm, como também alcançar a máxima eficiência de imobilização (60,0%). Apesar de o processo de imobilização ter comprometido em até 36,0% a atividade enzimática, verificou-se que os valores ótimos de pH e temperatura (pH 6,0 e 55 °C), bem como a estabilidade térmica, se mantiveram. Ademais, a substituição da celulase livre pela imobilizada provou ser uma alternativa viável, tendo em vista que após dois ciclos operacionais a celulase imobilizada ainda manteve sua atividade. Em face dos resultados, a polimerização em miniemulsão como forma de imobilização de celulase em nanopartículas de PMMA, mostra ser uma técnica promissora, de fácil execução e que apresenta elevada aplicabilidade industrial.

**Palavras-chave:** Celulase. Imobilização. Nanopartículas poliméricas. Polimerização em miniemulsão.



## ABSTRACT

Cellulases are highly efficient enzymes for conversion of cellulose to glucose. Their use in immobilized form enables, through the ability to reuse in successive cycles, many biotechnological processes. Unlike conventional methods of immobilization by covalent bonding, which often require numerous and complicated procedures, miniemulsion polymerization allows immobilizing the enzyme in polymer nanoparticles in a one single-reaction step. Thus, in order to obtain immobilized cellulase on poly(methyl) methacrylate (PMMA) nanoparticles, methyl methacrylate (MMA) miniemulsion polymerization reactions were carried out. PMMA nanoparticles formation has shown to be dependent on the amount of added cellulase, being the monomer conversion greater the higher concentration of enzyme. Under optimized conditions, stable nanoparticles with diameter about 134 nm were obtained as well as the maximum immobilization efficiency (60.0%) was achieved. Although the immobilization process has compromised up to 36.0% the enzymatic activity, it was found that optimum values of pH and temperature (pH 6.0, 55 °C) and thermal stability were maintained. Moreover, the replacement of free cellulase by the immobilized one proved to be a viable alternative, since the immobilized cellulase activity after two hydrolysis cycles was maintained. Based on these results, miniemulsion polymerization as a method of immobilization of cellulases on PMMA nanoparticles shows to be a promising technique, easy to perform and with high possibility of industrial application.

**Keywords:** Cellulase. Immobilization. Polymeric nanoparticles. Miniemulsion polymerization.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral de um aminoácido e formação das ligações peptídicas da enzima .....	31
Figura 2 – Cadeia polimérica da celulose .....	34
Figura 3 – Mecanismo de ação da celulase na hidrólise da celulose.....	35
Figura 4 – Métodos para imobilização de enzimas .....	37
Figura 5 – Mecanismo da polimerização em miniemulsão .....	40
Figura 6 – Desestabilização da miniemulsão por coalescência e degradação difusional.....	42
Figura 7 – Procedimento para imobilização de celulase .....	50
Figura 8 – Mecanismo da imobilização de celulase em nanopartículas de PMMA via polimerização em miniemulsão .....	50
Figura 9 – Metodologia para reutilização da enzima .....	55
Figura 10 – Análise visual da atividade enzimática .....	59
Figura 11 – Distribuição de tamanho de partículas com 1,4%, 2,7% e 4,0% de surfactante Lutensol AT50 .....	61
Figura 12 – Influência da concentração de celulase na atividade relativa durante a polimerização em miniemulsão. A atividade no tempo zero corresponde à atividade da enzima livre ( $A_E = 727,77$ U/ml, correspondente à concentração de 6,0% de celulase).....	63
Figura 13 – Estudo do efeito do iniciador e temperatura de polimerização na atividade enzimática.....	64
Figura 14 – Influência da concentração de enzima na conversão do monômero .....	65
Figura 15 – Estabilidade das nanopartículas de PMMA a 4 °C e à temperatura ambiente .....	68
Figura 16 – Morfologia das nanopartículas de PMMA.....	69
Figura 17 – Efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada. Enzimas foram incubadas por 30 min a $(55 \pm 1)$ °C .....	70
Figura 18 – Efeito da temperatura na atividade da enzima livre e imobilizada. Enzimas foram incubadas por 30 minutos e em pH 6,0 ...	71
Figura 19 – Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a $(55 \pm 1)$ °C e pH 6,0.....	72
Figura 20 – Estabilidade de armazenamento da enzima livre e imobilizada a 4 °C.....	73
Figura 21 – Estabilidade de armazenamento da enzima livre e imobilizada a temperatura ambiente.....	73
Figura 22 – Reúso da celulase imobilizada em nanopartículas de PMMA .....	75

Figura 23 – Imagens de MEV do tecido antes e após tratamento  
enzimático ..... 77



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características da celulase utilizada neste trabalho .....	47
Tabela 2 – Lista de materiais utilizados neste trabalho .....	47
Tabela 3 – Formulação utilizada para o preparo da miniemulsão .....	48
Tabela 4 – Formulações utilizadas na obtenção do látex (suspensão coloidal de PMMA-CELULASE) para avaliação da influência do tipo de surfactante e do pH na atividade enzimática .....	58
Tabela 5 – Efeito da concentração do surfactante Lutensol AT50 no Dp e na atividade enzimática .....	60
Tabela 6 – Influência da concentração de enzima na eficiência de imobilização e no diâmetro de partícula.....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BG	$\beta$ -Glucosidase
c.m.c	Concentração Micelar Crítica
CBH	Celobiohidrolase
CMC	Carboximetilcelulose de sódio
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DNS	Ácido 3,5 - dinitrossalicílico
Dp	Diâmetro de partícula, nm
EG	Endoglucanase
IUMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
KPS	Persulfato de potássio
LabMASSA & LabSIN	Laboratório de Transferência de Massa e Simulação Numérica de Sistemas Químicos
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LCP	Laboratório de Controle e Processos Poliméricos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV –FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
MMA	Metacrilato de metila
P.A	Para análise
PDI	Índice de polidispersividade
pH	Potencial hidrogeniônico
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PUU	Poli(ureia-uretano)
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBHP	Terc-butil hidroperóxido
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
V-50	Dicloridrato de 2,2'- azobis(2-metilpropionamida)



## LISTA DE SÍMBOLOS

C	Carbono
O	Oxigênio
N	Nitrogênio
H	Hidrogênio
<i>I</i>	Molécula do iniciador
<i>M</i>	Molécula do monômero
<i>R</i> *	Radical livre
<i>P</i> <sub>1</sub> *, <i>P</i> <sub>2</sub> *, <i>P</i> <sub><i>n</i></sub> *, <i>P</i> <sub><i>n</i>+1</sub> *, <i>P</i> <sub><i>m</i></sub> *	Cadeia polimérica com centro ativo
<i>D</i> <sub><i>n</i></sub> , <i>D</i> <sub><i>m</i></sub> , <i>D</i> <sub><i>n</i>+<i>m</i></sub>	Cadeia polimérica inativa
<i>K</i> <sub><i>d</i></sub>	Constante da taxa de decomposição do iniciador
<i>K</i> <sub><i>i</i></sub>	Constante da taxa de iniciação
<i>K</i> <sub><i>p</i></sub>	Constante da taxa de propagação
<i>K</i> <sub><i>Tc</i></sub>	Constante da taxa de terminação por combinação
<i>K</i> <sub><i>Td</i></sub>	Constante da taxa de terminação por desproporcionamento
NaOH	Hidróxido de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
<i>A</i> <sub><i>E</i></sub>	Atividade enzimática
<i>c</i>	Concentração de glicose
<i>V</i> <sub><i>T</i></sub>	Volume total da solução
<i>F</i> <sub><i>d</i></sub>	Fator de diluição da solução de enzima
<i>t</i>	Tempo da reação
<i>V</i> <sub><i>E</i></sub>	Volume da solução de enzima
<i>Y</i> <sub>imob</sub>	Eficiência de imobilização
<i>A</i> <sub>livre</sub>	Atividade da enzima livre
<i>A</i> <sub>sobrenadante</sub>	Atividade do sobrenadante
<i>A</i> <sub><i>R</i></sub>	Atividade relativa
<i>A</i> <sub><i>R</i>(100%)</sub>	Maior valor de atividade
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Radical sulfato aniônico



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO .....	27
1.2 OBJETIVOS .....	28
<b>1.2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>29</b>
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	29
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>31</b>
2.1 ENZIMAS .....	31
2.2 FATORES QUE AFETAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	33
<b>2.2.1 pH .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.2 Temperatura .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.3 Força Iônica .....</b>	<b>33</b>
2.3 CELULASES .....	34
2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	36
<b>2.4.1 Métodos de Imobilização .....</b>	<b>37</b>
2.5 POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO .....	39
<b>2.5.1 Estabilidade da Miniemulsão .....</b>	<b>41</b>
<b>2.5.2 Polimerização em Miniemulsão via Radicais Livres .....</b>	<b>42</b>
<b>2.5.3 Iniciação por Par-Redox .....</b>	<b>44</b>
<b>2.5.4 Polimerização em Miniemulsão na Imobilização de Enzimas</b>	<b>44</b>
2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE .....	45
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 ENZIMA .....	47
3.2 MATERIAIS .....	47
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO .....	48

3.4	MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	51
3.5	EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO .....	52
3.6	ATIVIDADE RELATIVA ( $A_R$ ) .....	52
3.7	CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO .....	53
<b>3.7.1</b>	<b>Conversão Gravimétrica .....</b>	<b>53</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Diâmetro Médio das Nanopartículas (<math>D_p</math>).....</b>	<b>53</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Morfologia .....</b>	<b>53</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Estabilidade das Nanopartículas Poliméricas de PMMA.....</b>	<b>54</b>
3.8	PARÂMETROS QUE AFETAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	54
<b>3.8.1</b>	<b>Efeito do pH.....</b>	<b>54</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Efeito da Temperatura .....</b>	<b>54</b>
3.9	MEDIDAS DE ESTABILIDADE ENZIMÁTICA.....	54
<b>3.9.1</b>	<b>Estabilidade Térmica.....</b>	<b>54</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Estabilidade ao Armazenamento.....</b>	<b>55</b>
<b>3.9.3</b>	<b>Estabilidade Operacional - Reúso.....</b>	<b>55</b>
3.10	ESTUDO DE UMA POSSÍVEL APLICAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	56
<b>3.10.1</b>	<b>Aplicação em Substrato Sólido – Tecido de Algodão.....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>57</b>
4.1	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TIPO DE SURFACTANTE E DO pH DO LÁTEX NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	57
4.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTE.....	59
<b>4.2.1</b>	<b>Efeito da Concentração de Surfactante no Diâmetro de Partícula (<math>D_p</math>).....</b>	<b>59</b>



<b>4.2.2 Efeito da Concentração de Surfactante na Atividade Enzimática</b>	<b>61</b>
4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CELULASE	62
<b>4.3.1 Efeito da Concentração de Celulase na Atividade Enzimática</b>	<b>62</b>
<b>4.3.2 Efeito da Concentração de Celulase na Conversão de MMA.</b>	<b>65</b>
<b>4.3.3 Efeito da Concentração de Celulase na Eficiência de Imobilização e no Diâmetro de Partícula</b>	<b>67</b>
4.4 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PMMA	68
4.5 MORFOLOGIA	69
4.6 EFEITO DO pH E DA TEMPRATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	70
4.7 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA	72
<b>4.7.1 Estabilidade Térmica</b>	<b>72</b>
<b>4.7.2 Estabilidade ao Armazenamento</b>	<b>72</b>
<b>4.7.3 Estabilidade Operacional - Reúso</b>	<b>74</b>
4.8 APLICAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO - TECIDO DE ALGODÃO	76
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>79</b>
5.1 CONCLUSÕES	79
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A constante procura por tecnologias que permitam acelerar os processos de produção, reduzir custos e que, ao mesmo tempo, sejam mecanismos limpos de processamento, constitui estímulo para pesquisadores e cientistas de forma global. Nesse cenário, a substituição de catalisadores químicos convencionais por enzimas vem se tornando, cada vez mais, uma medida praticável.

Por apresentarem excelentes propriedades catalíticas, como alta atividade, seletividade, especificidade, e também por atuarem em condições operacionais mais brandas, as enzimas, ou biocatalisadores, contribuem para a obtenção de produtos com melhor qualidade e com consequentes benefícios para o meio ambiente.

Embora a utilização de enzimas seja difundida nas mais diversas áreas, seu uso na forma livre apresenta alguns aspectos desfavoráveis, tais como a baixa estabilidade em solução, altos custos de isolamento e purificação e, principalmente, a dificuldade de recuperação do meio reacional para posterior reutilização. Em decorrência disso, a aplicação industrial das enzimas ainda é um processo bastante oneroso, pois os biocatalisadores representam boa parcela dos custos operacionais. Com a imobilização das enzimas, muitos destes inconvenientes podem ser superados trazendo vantagens econômicas.

O grande trunfo da imobilização de enzimas está relacionado à facilidade de remoção do meio reacional e a possibilidade de reutilizá-las em vários ciclos de operação, sem que haja quedas bruscas de sua atividade catalítica. Sendo assim, o uso de enzimas imobilizadas contribui para o desenvolvimento de processos contínuos capazes de aumentar o volume de produção e, conseqüentemente, reduzir os custos.

As formas mais comuns de acoplar uma enzima ao suporte são por meio da adsorção física, ligação covalente e confinamento, tendo suas características e detalhes amplamente encontrados na literatura (ELNASHAR, 2010; FERNANDES, LIMA; LOPES, 2010; SHELDON; VAN PELT, 2013; SHULER; KARGI, 2002). Dentre esses métodos, a ligação covalente oferece como vantagem a forte ligação estabelecida entre os grupos funcionais do suporte e os grupos reativos superficiais da enzima. Assim, o inconveniente da perda de enzima para o meio, apresentado pelos demais métodos, é reduzido. Contudo, a frequente necessidade de funcionalização prévia do suporte com o uso de reagentes,

na maioria das vezes, tóxicos, e o elevado número de etapas envolvidas, acaba por tornar o método demorado e exaustivo.

Com o propósito de tornar tal método mais atraente, a imobilização de enzimas por meio da polimerização em miniemulsão desponta como uma técnica promissora. A partir deste processo é possível, em uma única etapa de reação, obter o suporte e, simultaneamente, ligá-lo de forma covalente à enzima.

Além disso, a polimerização em miniemulsão oferece a vantagem de se imobilizar enzimas em suportes poliméricos com tamanhos reduzidos, em torno de 50-500 nm, os quais, em razão da grande área superficial, reduzem as limitações difusionais e permitem obter um maior número de enzimas por partícula, conduzindo a uma maior eficiência do biocatalisador (ANSARI; HUSAIN, 2012; JIA; ZHU; WANG, 2003). Entretanto, no que diz respeito à imobilização de enzimas, esta técnica é ainda pouco explorada.

A celulase, enzima capaz de converter celulose em glicose, vem sendo, nas últimas décadas, alvo de diversas pesquisas tanto no âmbito acadêmico quanto industrial. Devido ao seu elevado potencial biotecnológico, a celulase contribui para a melhoria de numerosos processos, incluindo indústrias de alimentos, indústria de papel e celulose, indústria têxtil, na agricultura, e mais recentemente na produção de etanol de segunda geração.

Assim, visando colaborar com o desenvolvimento de processos mais sustentáveis e economicamente favoráveis, este trabalho teve como objetivo imobilizar celulase em nanopartículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) a partir da polimerização em miniemulsão. As vantagens apresentadas ao se imobilizar uma enzima, as inúmeras aplicações das celulasas e a inexistência na literatura de estudos que tratem da sua imobilização em nanopartículas poliméricas por meio da polimerização em miniemulsão, motivaram a realização deste trabalho. O grande desafio desta dissertação foi produzir nanopartículas poliméricas estáveis, sem, no entanto, comprometer demasiadamente a atividade enzimática.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi imobilizar a enzima celulase em nanopartículas poliméricas de poli(metacrilato de metila) via

polimerização em miniemulsão. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram foco de estudo:

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a influência do surfactante iônico e não-iônico, bem como o pH do látex<sup>1</sup>, na atividade enzimática;
- Verificar o efeito da concentração de surfactante na atividade enzimática e no diâmetro de partícula;
- Investigar o efeito da concentração de enzima quanto à atividade enzimática durante a reação de polimerização, eficiência de imobilização, diâmetro de partícula e conversão monomérica;
- Acompanhar a evolução do diâmetro de partícula a fim de verificar a estabilidade das nanopartículas poliméricas de PMMA;
- Conferir a morfologia das nanopartículas de PMMA por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG);
- Verificar o efeito do pH e da temperatura na atividade das enzimas livre e imobilizada;
- Analisar a estabilidade térmica e de armazenamento das enzimas livre e imobilizada;
- Averiguar o potencial de reúso da enzima imobilizada;
- Estudar uma possível aplicação para a enzima imobilizada na indústria têxtil.

## 1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Para melhor compreensão das atividades desenvolvidas, este trabalho foi dividido em cinco capítulos.

O Capítulo 1 contextualiza, juntamente com a motivação para sua realização, a problemática em que este trabalho se insere, apresenta os objetivos e delinea a estrutura do documento.

O Capítulo 2 apresenta, brevemente, alguns conceitos e definições dos principais temas abordados nesta dissertação. A fundamentação teórica inicia-se com a definição de enzimas, os fatores que afetam a

---

<sup>1</sup> Referido também neste trabalho como suspensão coloidal de PMMA-CELULASE

atividade enzimática e as características da celulase aqui utilizada. Na sequência, são apresentadas as vantagens do processo de imobilização, bem como seus efeitos adversos na atividade catalítica, e os principais métodos empregados. Também nesse capítulo, as principais características da polimerização em miniemulsão como meio de obtenção de nanopartículas poliméricas são mencionados.

O Capítulo 3 dedica-se a descrição dos métodos empregados na condução dos experimentos, como também dos materiais utilizados.

Os resultados e suas discussões, obtidos a partir da execução dos experimentos, são apresentados no Capítulo 4.

Por fim, o Capítulo 5 contém as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros.

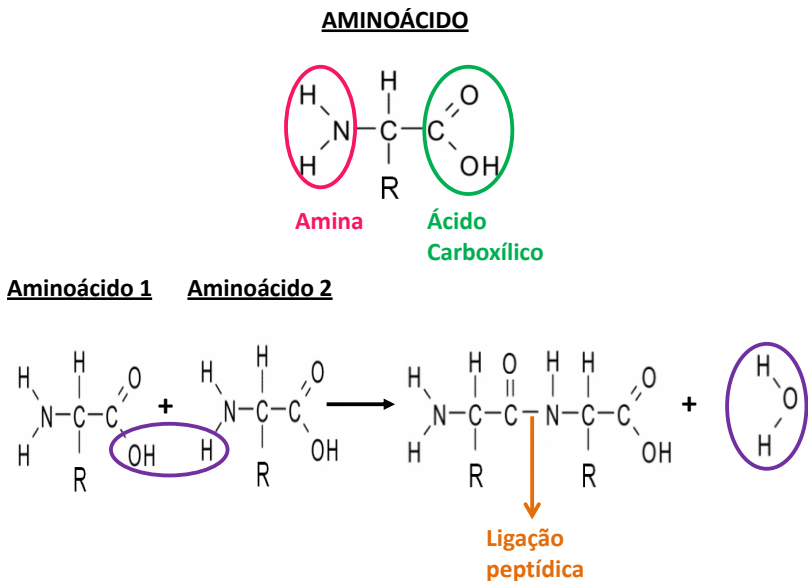
## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ENZIMAS

Enzimas são classes de proteínas as quais são capazes de acelerar a velocidade das reações químicas (catalisador). São biomoléculas com alta especificidade e alto poder catalítico.

Assim como outras proteínas, as enzimas são constituídas por longas cadeias de aminoácidos combinadas por ligações peptídicas, podendo ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos. A figura 1 ilustra a estrutura geral de um aminoácido e a formação de uma proteína.

Figura 1 – Estrutura geral de um aminoácido e formação das ligações peptídicas da enzima



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

O alto poder catalítico das enzimas está relacionado à capacidade de interação enzima-substrato, ou como proposto por Emil Fisher em 1894, ao modelo chave-fechadura. Neste modelo, o substrato, em orientações favoráveis, liga-se a uma região específica da enzima - o sítio ativo-, o qual possibilita a catálise enzimática.

Em sua maioria, as enzimas são altamente seletivas em sua ligação ao substrato. Como consequência disso, uma enzima geralmente catalisa uma só reação química ou um conjunto de reações intimamente relacionadas. Formações de subprodutos, oriundos de reações indesejadas, raramente ocorrem em reações enzimáticas. Dessa forma, o uso de enzimas possibilita a obtenção de produtos de melhor qualidade e consequente redução dos riscos de contaminação ambiental.

A distinção entre as enzimas se dá de acordo com as reações químicas que catalisam, sendo classificadas, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB*) em seis grandes grupos: óxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases:

- **Óxido-redutases:** são enzimas capazes de catalisar reações de redução/oxidação. Catalase e peroxidase são algumas das enzimas pertencentes a esta classe;
- **Transferases:** são responsáveis pela transferência catalítica de um grupo funcional a partir de um substrato para outro. Por exemplo, as metiltransferases transferem um grupo metila. Dentre as enzimas deste grupo, alanina aminotransferase e RNA polimerase estão presentes;
- **Liases:** são enzimas que catalisam a quebra das ligações C-C, C-O, C-N, entre outras, através de hidrólise ou oxidação. Exemplos de liase são a aldolase, descarboxilase e desidratase;
- **Isomerases:** essas enzimas catalisam alterações geométricas ou estruturais dentro de uma molécula, formando isômeros. De acordo com o tipo de isomerismo, elas podem ser chamadas de racemases, epimerases, cis-trans-isomerases, isomerases, tautomerases ou mutases, cicloisomerases;
- **Ligases:** catalisam reações de síntese de uma nova molécula a partir da ligação entre duas moléculas com a concomitante hidrólise de ATP ou outro composto trifosfatado. Exemplo de ligases são as carboxilases;
- **Hidrolases:** essas enzimas catalisam a reação de hidrólise de várias ligações covalentes, tais como C-O, C-N e C-C. Como exemplo, tem-se celulase, amilase, lipase, pectinase e glucosidase.

Para que a enzima apresente um bom desempenho, é primordial que a sua estrutura seja mantida. Dessa forma, os fatores capazes de



provocar uma mudança conformacional em tal estrutura, devem ser controlados e/ou evitados. Entre esses fatores, pH, temperatura e força iônica são os que apresentam maior relevância (BISSWANGER, 2014).

## 2.2 FATORES QUE AFETAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 2.2.1 pH

Devido às características de seus aminoácidos, as enzimas podem atuar em meios ácidos, básicos ou neutros. Variações na concentração de  $H^+$  do meio provocam mudanças no estado de ionização (carga) destes aminoácidos, e conseqüentemente na atividade enzimática.

O impacto que a alteração de carga gera na atividade enzimática deve-se a modificações nas características de adsorção, orientação e ligações eletrostáticas entre enzima-substrato. Do mesmo modo, mudanças de pH podem desestruturar o formato tridimensional da enzima, acarretando sua desativação (CAVACO; GUBITS, 2003; TALBERT; GODDARD; 2012). Por esse motivo, toda enzima é ativa somente em uma faixa de pH, na qual seu pH ótimo, correspondente à máxima atividade, é encontrado.

### 2.2.2 Temperatura

Assim como o pH, as enzimas também apresentam uma faixa de temperatura na qual são ativas, tendo sua atividade máxima em um valor de temperatura ótimo. Dentro desta faixa de temperatura na qual a enzima é ativa e estável, normalmente a atividade enzimática aumenta à medida que a temperatura aumenta. Entretanto, tal comportamento é observado até um certo limite de temperatura, a partir do qual a enzima pode sofrer alteração em sua conformação, desnaturando. Tal fato é observado, principalmente, em temperaturas acima da temperatura ótima (CAVACO; GUBITS, 2003; SHULER; KARGI, 2002).

### 2.2.3 Força Iônica

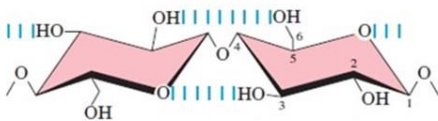
Tendo em vista que a maioria dos aminoácidos formadores das enzimas apresentam carga elétrica, a presença de uma solução com grande força iônica, isto é, grande quantidade de íons, pode influenciar não só na carga destes aminoácidos como também nas ligações estabelecidas nos níveis estruturais das enzimas. Além disso, a grande quantidade de íons na solução, provenientes de moléculas de sais, pode diminuir a

solubilidade da enzima, ocasionando sua precipitação (*salting-out*). Dependendo da natureza do íon, essa precipitação pode conduzir a uma redução da capacidade catalítica e até mesmo a desativação da enzima (BISSWANGER, 2014; CAVACO; GÜBITZ, 2003).

## 2.3 CELULASES

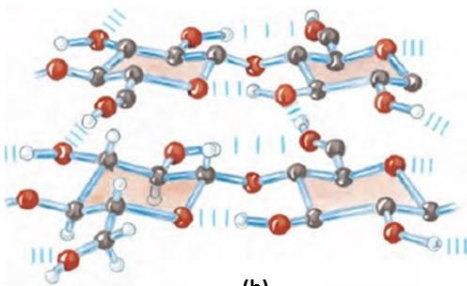
Celulases são um complexo enzimático multicomponente, composto basicamente por endoglucanases (EC,3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21), que, sinergicamente, hidrolisam as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da celulose, polímero presente em maior quantidade nas células vegetais. A figura 2 apresenta a cadeia polimérica da celulose.

Figura 2 – Cadeia polimérica da celulose



Ligação  $\beta$ -1,4 Unidades de D-glicose

(a)



(b)

**Legenda:** a) duas unidades de glicose acopladas pelas ligações  $\beta$ -1,4.

b) desenho de duas cadeias paralelas de celulose mostrando a conformação das unidades de glicose e as ligações de hidrogênio cruzadas. Na unidade inferior esquerda são mostrados todos os átomos de hidrogênio. Nas outras três unidades, os hidrogênios ligados ao carbono foram omitidos para melhor entendimento da figura, uma vez que estes não participam da ligação de hidrogênio.

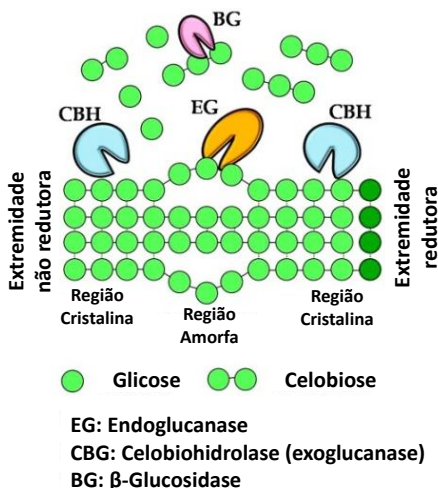
Fonte: Nelson & Cox (2004).

As fortes ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose formam áreas altamente ordenadas (cristalinas) alternando com áreas menos ordenadas (amorfas) (CAVACO; GÜBITZ, 2003). Por esse motivo, a completa conversão da celulose só é possível quando as enzimas constituintes do complexo celulolítico atuam em conjunto, pois cada qual atua em uma região específica do substrato:

- i) endoglucanases são responsáveis por iniciar o processo de hidrólise, atuando de forma aleatória na região amorfa da celulose, resultando em cadeias de oligossacarídeos de diferentes tamanhos;
- ii) exoglucanases atuam em ambas as extremidades (reduzora e não-reduzora) da cadeia de celulose, gerando celobiose ou glicose como produtos principais e
- iii)  $\beta$ -glucosidasas hidrolisam a celobiose, produzindo glicose (ALFTRÉN; HOBLEY, 2014; ZHANG; ZHANG, 2013).

A figura 3 ilustra o mecanismo de ação conjunta das celulases na hidrólise da celulose.

Figura 3 – Mecanismo de ação da celulase na hidrólise da celulose



Fonte: Adaptado de Ratanakhanokchai et al. (2013).

Por determinações prévias de atividade enzimática, verificou-se que a celulase utilizada nesta dissertação é constituída majoritariamente de endoglucanases (EC,3.2.1.4).

Pelo fato de a celulose apresentar um complexo sistema estrutural, a ruptura efetiva de suas ligações só ocorre quando elevadas quantidades de celulase são empregadas (LIAO et al., 2010). Assim, a sua utilização na forma nativa<sup>2</sup> inviabiliza, economicamente, uma série de processos biotecnológicos, sendo a imobilização uma medida cabível para contornar tal dificuldade.

## 2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Segundo Katchalski-Katzir (2000), “enzimas imobilizadas são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente”.

As vantagens em se imobilizar uma enzima residem no fato de que, na maioria das vezes, as propriedades do biocatalisador são melhoradas. Entre essas propriedades pode-se citar a seletividade, a atividade e a estabilidade, tanto operacional quanto de armazenamento. Além disso, o processo de imobilização pode tornar a enzima mais resistente a inibições provocadas pelas condições do meio, como exemplo, variações bruscas de pH e temperatura (SHELDON; VAN PELT, 2013; MATEO et al., 2007). Embora tais melhoras sejam percebidas, o principal motivo que conduz à imobilização diz respeito à facilidade de recuperação do meio reacional e à possibilidade de reutilização do biocatalisador. A melhora na performance da enzima atrelada ao seu uso repetido, implica maior produtividade com conseqüente redução do preço da enzima por quilograma de produto (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Entretanto, ao mesmo tempo em que a imobilização apresenta benefícios, alguns efeitos adversos podem ocorrer. A saber:

- **Efeitos estéricos-conformacionais:** a enzima pode sofrer alteração na sua estrutura tridimensional durante procedimento de imobilização, sendo este efeito característico do par enzima-suporte. Além disso, dependendo da forma como a enzima liga-se ao suporte, o seu centro ativo pode tornar-se mais ou menos acessível ao substrato, caracterizando assim, o

---

<sup>2</sup> Ou livre.

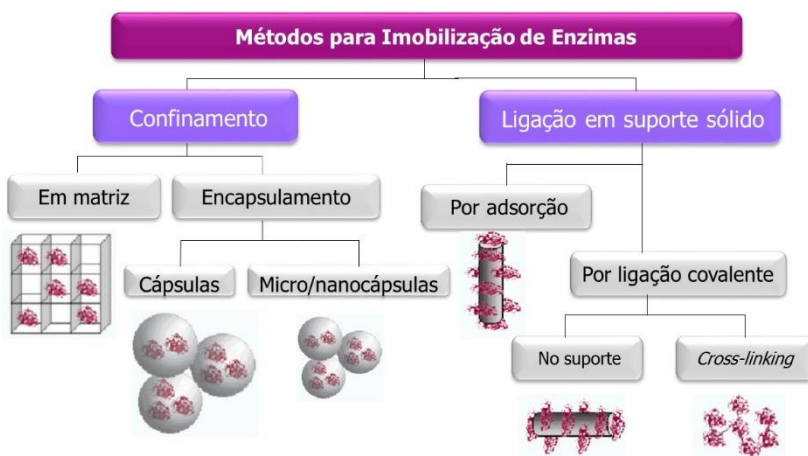
impedimento estérico. Tanto o efeito estérico como o conformacional, alteram as propriedades cinéticas da enzima.

- **Efeitos difusionais:** quando a enzima é imobilizada sobre ou dentro de um suporte, a atividade enzimática pode sofrer limitações devido à velocidade de difusão do substrato, tanto externamente quanto dentro dos poros do suporte. Assim, quando a velocidade de difusão do substrato é menor que a velocidade de transformação pela enzima, há uma aparente redução da atividade, visto que nem todas as moléculas do catalisador estarão em contato com o substrato.
- **Efeitos de microambiente:** devido às propriedades físico-químicas da enzima e do suporte, a concentração de espécies químicas (substrato, produto, íons  $H^+$ ) na região circunvizinha da enzima e no restante da solução torna-se diferente.

### 2.4.1 Métodos de Imobilização

Os principais métodos de imobilização podem ser classificados em dois grupos: ligações em suportes sólidos (adsorção e ligação covalente) e confinamento (matriz polimérica e encapsulamento). A figura 4 apresenta esquematicamente os principais métodos de imobilização.

Figura 4 – Métodos para imobilização de enzimas



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Dentre todos os métodos, a adsorção física é, provavelmente, o que apresenta maior potencial comercial, devido ao seu baixo custo, simplicidade e elevada retenção de atividade catalítica (KHARRAT et al., 2011). Consiste na adesão a um suporte sólido por forças de ligação de baixa energia, tais como interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (VILLENUEVE et al., 2000). Devido a esta fraca interação, a adsorção física apresenta como desvantagem a vulnerabilidade de perda de enzima para o meio reacional frente às variações de temperatura, pH, força iônica do meio, entre outros.

A técnica de confinamento consiste em reter a enzima na rede tridimensional de uma matriz polimérica e/ou aprisioná-la no interior de cápsulas ou micro/nanocápsulas delimitadas por um material semipermeável, o qual possibilite a entrada de substrato e saída de produtos e que, ao mesmo tempo, retenha o biocatalisador (ELNASHAR, 2010). Tem como vantagens o fato de proporcionar grande área superficial para contato entre enzima e substrato, não são estabelecidas ligações químicas ao suporte, mantendo dessa forma a estrutura da enzima, proteção da enzima ao uso de solventes orgânicos, mudanças bruscas de pH e temperatura e a possibilidade de imobilizar simultaneamente diferentes enzimas (CASTRO et al., 2008). Contudo, a imobilização por confinamento apresenta problemas intrínsecos, tais quais o escape da enzima do suporte e expressivas limitações difusionais (SHULER; KARGI, 2002).

No método de ligação covalente, a enzima é imobilizada através de ligações covalentes estabelecidas entre grupos funcionais presentes na superfície tanto do suporte quanto da enzima. Estas ligações podem ser diretas no suporte, ou a partir do uso de um agente reticulante (*cross-linking*). Imensas possibilidades de reações podem ser empregadas. Entretanto, deve-se ter cuidado para que grupos funcionais importantes à atividade catalítica não sejam envolvidos na reação.

Diferentemente dos outros métodos, a perda de enzima para o meio é minimizada com esta técnica, pois uma vez imobilizada, somente alterações muito bruscas são capazes de afetar a ligação formada. Outra vantagem é o favorecimento do contato entre enzima e substrato, tendo em vista a localização da enzima no suporte (ELNASHAR, 2010). O quadro 1 sintetiza as vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização.

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização

<b>Método de Imobilização</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Adsorção Física</b>	Simplicidade Ligação reversível Rápido e barato Sem mudanças químicas no suporte ou enzima Possibilidade de alta retenção da atividade	Possibilidade de dessorção Contaminação do produto Ligação não específica Sobrecarga no suporte Impedimento estérico pelo suporte
<b>Ligação Covalente</b>	Não há desprendimento da enzima do suporte Aumento da estabilidade A enzima pode estar facilmente em contato com o substrato devido à sua localização no suporte	Custo bastante elevado dos suportes Perda de atividade enzimática (orientação inadequada da enzima no suporte, tal como envolvimento do centro ativo na ligação) Inúmeras e complicadas etapas necessárias
<b>Confinamento</b>	Grande área superficial Proteção da enzima Possibilidade de coimobilização	Limitações difusionais Possível desativação durante polimerização Escape da enzima do suporte

Fonte: Adaptado de Elnashar (2010).

## 2.5 POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

“Miniemulsões monoméricas adequadas para polimerização em miniemulsão são dispersões submicrométricas de monômero em água, estabilizadas tanto contra a degradação difusional quanto à coalescência das gotas, utilizando um composto hidrofóbico de baixa massa molecular (coestabilizador) e um surfactante eficiente” (ASUA, 2002).

Devido ao reduzido tamanho das gotas, na faixa de 50-500 nm, o mecanismo da nucleação das gotas é predominante na miniemulsão. Em outras palavras, o *locus* de reação na polimerização em miniemulsão encontra-se nas próprias gotas do monômero, sendo esta uma das principais vantagens do método.

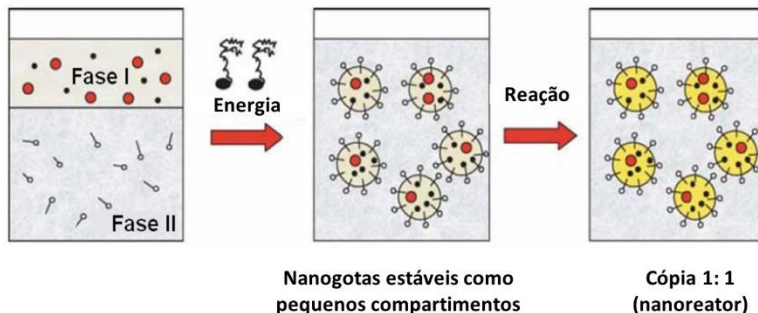
Na polimerização em emulsão convencional, a formação das partículas poliméricas ocorre nas micelas<sup>3</sup> (nucleação micelar) ou nas cadeias oligoméricas em crescimento (nucleação homogênea). Dessa forma, a difusão do monômero em meio aquoso até as micelas se faz necessária, implicando, em alguns casos, sérias limitações difusionais. Tendo em vista que na polimerização em miniemulsão as reações ocorrem diretamente nas gotas do monômero, tais limitações são praticamente inexistentes (MITTAL, 2010).

Em virtude disso, monômeros e iniciadores tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos podem ser utilizados na polimerização em miniemulsão, permitindo a obtenção de materiais que antes não eram possíveis com as outras técnicas de produção de partículas poliméricas.

Como exemplo, têm-se a formação de partículas poliméricas híbridas, a obtenção de polímeros hidrofóbicos a partir de monômeros hidrofóbicos, a produção de partículas com diferentes morfologias e a possibilidade de encapsulamento de sólidos inorgânicos (ASUA, 2002).

O mecanismo da polimerização em miniemulsão é ilustrado na figura 5.

Figura 5 – Mecanismo da polimerização em miniemulsão



Fonte: Adaptado de Landfester (2006).

A primeira etapa do processo da polimerização em miniemulsão inicia-se com a formação das nanogotas (50-500 nm) a partir da dispersão da fase orgânica (Fase I, a qual contém o coestabilizador), na fase dispersa (Fase II, onde se encontra o surfactante), com o auxílio de equipamentos de alto cisalhamento capazes de romper as gotas da emulsão para tamanhos submicrométricos. A adição de alta energia ao sistema pode ser

<sup>3</sup> Agregados coloidais formados quando a concentração de surfactante é superior a concentração micelar crítica (c.m.c).



fornecida por sonificadores<sup>4</sup>, homogeneizadores de alta pressão e sistemas do tipo rotor-estator.

Na segunda etapa, as nanogotas então formadas são polimerizadas sem alterar suas identidades, ou seja, as partículas poliméricas após polimerização possuem aproximadamente o mesmo tamanho e a mesma composição das gotas de monômero antes da polimerização (cópia 1:1<sup>5</sup>) (LANDFESTER et al., 1999).

Os fatores que determinam as características da miniemulsão, tais como a formulação e o mecanismo adotado para dispersão, estão intimamente relacionados à sua estabilidade, e conseqüentemente, das nanopartículas formadas. Dessa forma, a seleção adequada de surfactante e coestabilizador, bem como suas quantidades, e o tempo e intensidade do mecanismo de dispersão, são parâmetros que devem ser considerados a fim de se obter uma miniemulsão estável por longos períodos.

### 2.5.1 Estabilidade da Miniemulsão

A miniemulsão caracteriza-se como sendo um sistema termodinamicamente instável, porém cineticamente metaestável, podendo assim se manter por períodos de horas até meses (SAYER, ARAÚJO, 2010).

Devido ao seu estado metaestável, qualquer perturbação no sistema pode ocasionar a “quebra” da miniemulsão, levando a uma separação entre as fases. Entre as causas possíveis de desestabilização de um miniemulsão estão a coalescência e a degradação difusional de monômero (*Ostwald ripening*). A figura 6 representa esquematicamente estes dois fenômenos.

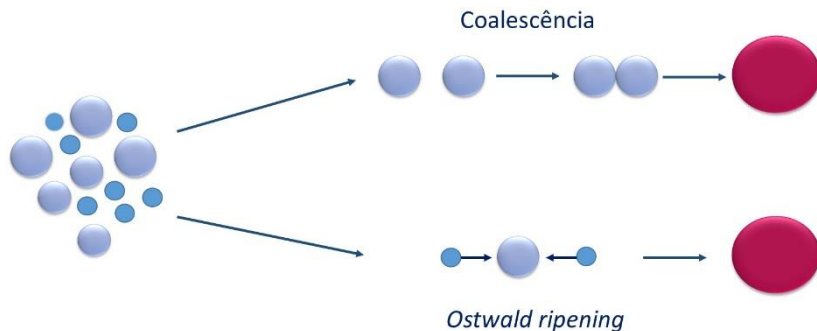
A coalescência resulta da fusão de duas ou mais partículas devido ao movimento Browniano e as forças atrativas de van der Waals. (ASUA, 2002). Pode ser minimizada adicionando quantidade suficiente de surfactante, o qual, por meio de repulsão eletrostática (surfactante iônico) ou estérica (surfactante não-iônico), mantém a estabilidade coloidal das partículas.

---

<sup>4</sup> Equipamento amplamente empregado para escala laboratorial (SCHORK et al., 2005).

<sup>5</sup> Esta questão não é um consenso no meio acadêmico, pois alguns autores afirmam que somente parte das gotas de monômero são nucleadas (ASUA, 2002).

Figura 6 – Desestabilização da miniemulsão por coalescência e degradação difusional



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

A degradação difusional do monômero é decorrente da diferença de potencial químico existente entre os diferentes tamanhos de gotas<sup>6</sup>, o qual é tanto maior quanto menor for o tamanho da gota. Assim, com o intuito de diminuir a diferença de potencial químico, o monômero se difunde, em meio aquoso, das gotas menores para as maiores. O controle deste fenômeno pode ser realizado com a adição de um composto orgânico de cadeia longa, agindo como coestabilizador (ASUA, 2002).

### 2.5.2 Polimerização em Miniemulsão via Radicais Livres

O mecanismo cinético das polimerizações via radicais livres apresenta três etapas: iniciação, propagação e terminação.

A etapa de iniciação consiste na decomposição da molécula do iniciador<sup>7</sup> ( $I$ ), formando um par de radicais livres ( $2R\bullet$ ). Posteriormente, um desses radicais liga-se a uma molécula de monômero ( $M$ ) formando um radical primário ( $P_1\bullet$ ).

A etapa de propagação consiste no crescimento da cadeia polimérica a partir da adição sucessiva de molécula de monômero ao radical primário proveniente da etapa anterior, formando radicais ativos com cadeias maiores ( $P_{n+1}\bullet$ ).

<sup>6</sup> A etapa de dispersão da miniemulsão não produz gotas do mesmo tamanho, mas sim, uma distribuição de tamanho de gotas.

<sup>7</sup> Composto capaz de gerar espécies químicas reativas.

O crescimento da cadeia polimérica ( $P_n\bullet$ ) é interrompido com a desativação do centro ativo na etapa de terminação, a qual pode ocorrer por combinação ou desproporcionamento. Na terminação por combinação, os dois radicais livres reagem, formando uma única molécula de polímero ( $D_{n+m}$ ). Na terminação por desproporcionamento, ocorre a transferência de um átomo de hidrogênio de uma cadeia em crescimento para outra, saturando uma extremidade e criando uma ligação dupla na extremidade da outra cadeia, formando assim duas moléculas de polímero inativas ( $D_n + D_m$ ) (BRESOLIN, 2013).

As Equações de 1 a 6 descrevem as etapas do mecanismo.

### Iniciação:



### Propagação:



### Terminação:

Combinação



Desproporcionamento



### 2.5.3 Iniciação por Par-Redox

Uma das formas de se obter radicais livres na etapa de iniciação é a partir de reações de oxirredução, na qual uma espécie química doa elétrons, oxidando, e outra espécie química reduz, recebendo elétrons.

A grande vantagem da iniciação por par redox é a rapidez com que a geração de radicais livre ocorre, além de poder conduzir reações de polimerização em menores temperaturas (LAMB; FELLOWS, GILBER, 2005; PARRA; ALBANO; GONZÁLEZ, 2008).

Usualmente compostos inorgânicos derivados de persulfato têm sido amplamente utilizados como agentes oxidantes (espécie receptora de elétrons) por dissociarem dois radicais aniônicos que atuam na iniciação tanto térmica quanto redox (DAL FARRA, 2010).

### 2.5.4 Polimerização em Miniemulsão na Imobilização de Enzimas

A polimerização em miniemulsão pode ser empregada na síntese de diversos materiais, incluindo adesivos, revestimentos, pigmentos têxteis, em sistemas de liberação de fármacos, entre outros (ASUA, 2014). Em relação ao demais métodos de polimerização, a polimerização em miniemulsão possibilita a obtenção de nanopartículas em uma única etapa de reação baseando-se nas diferenças da tensão interfacial e no processo de separação de fases durante a polimerização (ROMIO et al., 2009).

Dessa forma, o uso da polimerização em miniemulsão para imobilização de enzimas apresenta como vantagem o fato de estas serem obtidas em uma única etapa de reação e sem o uso de solventes orgânicos. Cipolatti et al. (2014), por meio da polimerização em miniemulsão, realizaram com êxito a imobilização da enzima lipase CalB em nanopartículas PEGuiladas de poli(ureia-uretano) (PUU), obtendo uma enzima com maior atividade enzimática e maior estabilidade térmica, quando comparada à sua forma livre. Analogamente, Valério et al. (2015) ao imobilizarem a mesma enzima (lipase CalB), produziram nanopartículas bem definidas do tipo casca-núcleo, sendo o núcleo constituído de PMMA e a casca de lipases distribuídas uniformemente. A partir desta técnica, foi possível obter uma eficiência de imobilização de 75,0% e uma enzima com maior estabilidade operacional.

Entretanto, apesar do sucesso nos referidos trabalhos, a polimerização em miniemulsão como forma de imobilização de enzimas ainda carece de estudos, uma vez que os efeitos que podem causar sob a atividade enzimática não são totalmente elucidados.

## 2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Perante o que foi exposto ao longo deste capítulo e a partir do levantamento de trabalhos relevantes sobre a polimerização em miniemulsão como forma de imobilização de enzimas, pôde-se notar o potencial de aplicação desta técnica. Entretanto, o que se observou são trabalhos mencionando somente a imobilização de enzimas lipases CalB, incentivando dessa forma, o estudo com outros tipos de enzima. Assim, o presente trabalho aborda a imobilização de celulase em nanopartículas de PMMA a partir da polimerização em miniemulsão visando contribuir com o desenvolvimento de novas técnicas de imobilização, com o esclarecimento de fatores relacionados à esta nova abordagem e também, com o aperfeiçoamento de diversos processos industriais, tendo em vista as inúmeras aplicações possíveis da celulase.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ENZIMA

A celulase utilizada nesta dissertação foi gentilmente cedida pela empresa Novozymes Brasil (Araucária, PR, Brasil) e suas principais características são mostradas na tabela 1.

Tabela 1 – Características da celulase utilizada neste trabalho

<b>Nome comercial</b>	Cellusoft CR Concentrada
<b>Origem/fonte</b>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<b>pH ótimo</b>	5,5 – 6,5
<b>Temperatura ótima</b>	50 – 60 °C

Fonte: Novozymes (2012).

#### 3.2 MATERIAIS

Os materiais utilizados e algumas de suas características são apresentados na tabela 2. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos e sem prévias purificações.

Tabela 2 – Lista de materiais utilizados neste trabalho

<b>MATERIAL</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>	<b>PUREZA</b>
Ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS)	Sigma-Aldrich	P.A
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich	P.A
Carboximetilcelulose de sódio (CMC)	Sigma-Aldrich	-
Crodamol GTCC <sup>a</sup>	Alfa Aesar	-
Dodecil sulfato de sódio (SDS) <sup>b</sup>	Sigma-Aldrich	90,0%
Filtros Amicon® Ultra - 0,5 mL (100.000 Da)	Millipore	-
Fosfato de potássio monobásico anidro	Sigma-Aldrich	P.A
Fosfato de sódio dibásico dihidratado	Sigma-Aldrich	P.A
Glucose D (+) anidra	Sigma-Aldrich	P.A

Continuação Tabela 2 – Lista de materiais utilizados neste trabalho

<b>MATERIAL</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>	<b>PUREZA</b>
Hidróxido de sódio (NaOH)	Lafan Ltda	P.A
Lutensol AT50 <sup>b</sup>	BASF	-
Papel filtro qualitativo (40x40)	-	-
Persulfato de potássio (KPS, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) <sup>c</sup>	Sigma-Aldrich	P.A
Tartarato de sódio e potássio	Synth	P.A
Tecidos de algodão pré-alvejados	Malwee	-

a) cossurfactante (triglicérido dos ácidos cáprico e caprílico); b) surfactante; c) iniciador;

Fonte: Acervo da autora (2015).

### 3.3 IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

A fim de obter celulase imobilizada em nanopartículas poliméricas de poli(metacrilato de metila) (PMMA), reações de polimerização em miniemulsão foram realizadas em um reator encamisado, construído em borossilicato sem tampa.

A obtenção das nanopartículas de PMMA seguiram metodologia previamente descrita na literatura (Valério et al., 2015), com modificações. A fase aquosa, composta por água destilada, surfactante e enzima foi inicialmente pesada e homogeneizada por meio de agitação magnética, de acordo com a formulação apresentada na tabela 3.

Tabela 3 – Formulação utilizada para o preparo da miniemulsão

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades (g)</b>
<b>Água</b>	24,000
<b>Lutensol AT50<sup>a</sup></b>	0,420 – 1,260
<b>Celulase<sup>b</sup></b>	0,061 – 0,300
<b>Crodamol GTCC</b>	3,030
<b>MMA</b>	3,090
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0,010
<b>KPS</b>	0,030

a) em relação à massa do meio reacional.

b) em relação à massa de monômero (MMA).



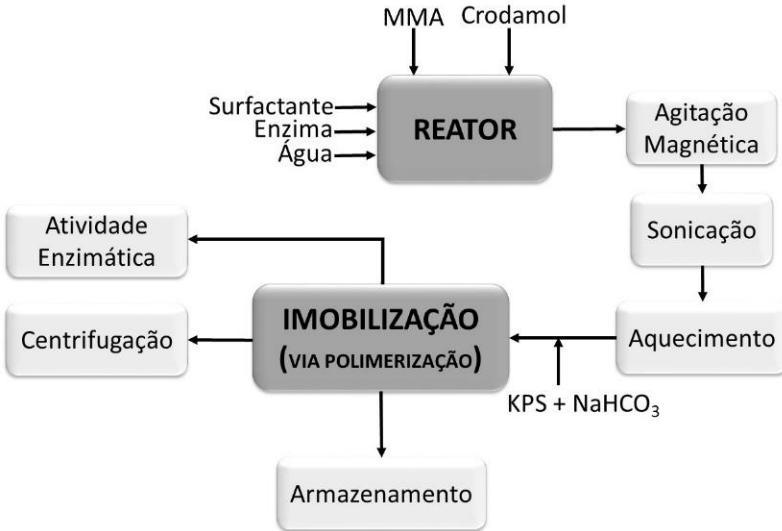
Crodamol e o monômero (MMA), constituintes da fase orgânica, foram então adicionados, separadamente, ao reator. A dispersão formada foi mantida sob agitação magnética por aproximadamente 5 min, sendo posteriormente sonicada em um dispersor ultrassônico (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500) por 2 min em uma amplitude de 70,0%, para o preparo da miniemulsão. Para evitar aumento excessivo de temperatura e a consequente perda de monômero durante a dispersão por ultrassom, o reator foi imerso em banho de gelo.

Após sonicação, o reator foi submetido a aquecimento em um banho ultratermostático (SP Labor, SP-152). Atingida a temperatura de  $(70 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , iniciador (KPS) e bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), dissolvidos em uma alíquota da água da formulação, foram adicionados à miniemulsão dando início ao processo de polimerização. As reações foram conduzidas sob agitação magnética e temperatura constantes  $(70 \pm 1) ^\circ\text{C}$  por 3 h. Encerrado o processo de imobilização, a suspensão coloidal de PMMA-CELULASE (látex) presente no reator foi: a)<sup>8</sup> utilizada para a determinação da atividade da enzima imobilizada ou b) centrifugada a 13.000 rpm e 30 min em um centrífuga Eppendorf – MiniSpin, fazendo uso de dispositivos para ultrafiltração (filtros Amicon® - 0,5 mL, 100.000Da), sendo o permeado empregado na determinação da eficiência de imobilização ou c) armazenada a  $4 ^\circ\text{C}$  e à temperatura ambiente, para a determinação da estabilidade das nanopartículas e estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada. A figura 7 apresenta esquematicamente o procedimento descrito e a figura 8 ilustra a formação das nanopartículas de PMMA-CELULASE.

---

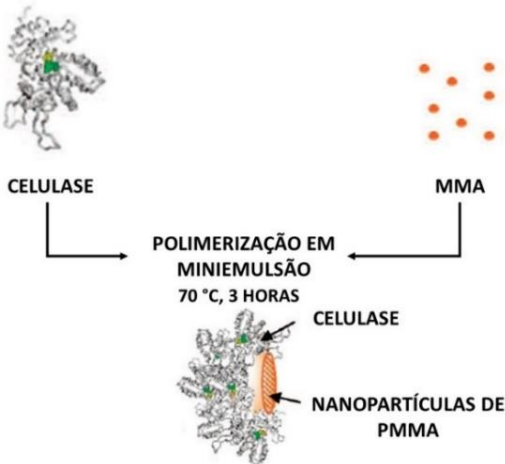
<sup>8</sup> A determinação da atividade da enzima imobilizada foi realizada com alíquotas da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE presente no reator (*bulk*), uma vez que o intuito desta dissertação é empregar todo o látex produzido.

Figura 7 – Procedimento para imobilização de celulase



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Figura 8 – Mecanismo da imobilização de celulase em nanopartículas de PMMA via polimerização em miniemulsão



Fonte: Adaptado de Ho et al. (2008).

### 3.4 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade celulolítica foi determinada de acordo com o método DNS (MILLER, 1959) para quantificação de glicose produzida após hidrólise enzimática. Neste método, o DNS (cor amarela) ao reagir com açúcares redutores, reduz-se a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, um composto de coloração alaranjada, o qual sofre forte absorvância em 540 nm.

900  $\mu\text{L}$  de solução 4% (m/v) de CMC, em tampão fosfato (0,05 M, pH 6,0), e 100  $\mu\text{L}$  da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE foram incubados a  $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$  durante 30 min. Após o tempo de incubação, 1,5 mL de DNS foi adicionado. A solução resultante foi aquecida em banho de água fervente por 5 min e resfriada em banho de gelo, seguida da adição de água para diluição das amostras. Estas amostras foram então filtradas em papel filtro qualitativo e em membranas de acetato de celulose, nessa ordem, para remoção de particulado. Finalmente, a quantidade de glicose produzida foi determinada por meio da leitura da absorvância em um comprimento de onda de 540 nm. A relação entre absorvância e concentração foi efetuada a partir de uma curva de calibração, tendo glicose como padrão.

Para evitar interferências, solução controle (branco) foi preparada, para todos os ensaios, adicionando 1,5 mL de DNS na solução de CMC e PMMA-CELULASE no início da hidrólise enzimática, seguindo as demais etapas. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de glicose gerada, em  $\mu\text{mol}$ , por min, por mL da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE) (U/mL) e determinada pela Equação 7.

$$A_E = \frac{c * V_T * F_d}{t * V_E} \quad (7)$$

Em que,

$A_E$  é a atividade enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{mL}.\text{min}$ );

$c$  é a concentração de glicose ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ );

$V_T$  é o volume total da solução (CMC + PMMA – CELULASE) (mL);

$F_d$  é o fator de diluição da solução contendo a enzima;

$t$  é o tempo de reação (min) e

$V_E$  é o volume da suspensão coloidal (mL).

A atividade da enzima livre foi determinada de acordo com procedimentos e condições semelhantes as estabelecidas para a enzima imobilizada, excluindo-se apenas as etapas de filtração e diluindo previamente a solução de enzima em tampão fosfato (0,05 M, pH 6,0).

Todas as medidas foram efetuadas, pelo menos, em duplicata.

### 3.5 EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO

A quantidade de enzima imobilizada ( $Y_{imob}$ ) nas nanopartículas de PMMA foi determinada a partir da Equação 8 (SILVA et al., 2012; VALÉRIO et al., 2015).

$$Y_{imob}(\%) = \frac{A_{livre} - A_{sobrenadante}}{A_{livre}} \quad (8)$$

Em que,

$A_{livre}$  é a atividade da enzima livre antes do processo de imobilização ( $\mu\text{mol/mL.min}$ );

$A_{sobrenadante}$  é a atividade do sobrenadante após imobilização ( $\mu\text{mol/mL.min}$ ).

O sobrenadante, ou o permeado, foi resultante da centrifugação da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE, realizada a 13.000 rpm e 30 min em uma centrífuga Eppendorf – MiniSpin, utilizando dispositivos de ultrafiltração (filtros Amicon®, 0,5 mL, 100.000Da).

Ambas as atividades (livre e sobrenadante) foram determinadas conforme procedimento descrito no item 3.4.

### 3.6 ATIVIDADE RELATIVA ( $A_R$ )

A atividade relativa (Equação 9), tanto para a enzima livre como para a enzima imobilizada, foi calculada definindo-se como 100% o maior valor de atividade enzimática encontrado para a determinada variável em estudo.

$$A_R(\%) = \frac{A_E}{A_{E(100\%)}} * 100 \quad (9)$$

Em que,

$A_R$  é a atividade relativa (%);

$A_E$  é a atividade enzimática ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ );

$A_{E(100\%)}$  é o maior valor de atividade enzimática encontrado ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ ).

### 3.7 CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO

#### 3.7.1 Conversão Gravimétrica

A conversão do monômero (MMA) em polímero (PMMA) foi determinada por gravimetria. Amostras da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE (látex) presente no reator foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e adicionadas em cápsulas de alumínio previamente pesadas, contendo cerca de 0,2 g de solução aquosa de hidroquinona 1% em massa, cujo objetivo é interromper imediatamente a reação. As cápsulas foram então secas em estufa a  $(60 \pm 2)$  °C por aproximadamente 24 h ou até massa constante. A conversão foi obtida pela relação entre a massa de polímero presente no reator, calculada pela subtração da massa de hidroquinona adicionada e fração de sólidos não poliméricos (surfactante, iniciador, bicarbonato de sódio, crodamol e enzima) da massa da cápsula seca, e a massa de monômero alimentada.

#### 3.7.2 Diâmetro Médio das Nanopartículas (Dp)

O diâmetro médio das nanopartículas foi determinado utilizando os equipamentos Zetasizer Nano S e Zetasizer Nano ZS, ambos da marca Malvern Instruments. Estes equipamentos utilizam a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) na medição do tamanho das partículas, bem como sua distribuição de tamanho (PDI). Para fazer a leitura, as amostras foram preparadas diretamente numa cubeta de vidro, diluindo-se a miniemulsão com água destilada.

#### 3.7.3 Morfologia

A morfologia das nanopartículas de PMMA – CELULASE, foi verificada por meio de análises de MEV-FEG. Para tal, o microscópio JEOL JSM-6701F situado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina, foi

utilizado. O preparo das amostras foi realizado gotejando a suspensão coloidal de PMMA-CELULASE (látex) diluída (1:23) em stubs previamente lixados e polidos. Após completa secagem, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e analisadas.

### **3.7.4 Estabilidade das Nanopartículas Poliméricas de PMMA**

A estabilidade das nanopartículas de PMMA foi determinada através do acompanhamento de seus diâmetros médios durante 60 dias, em intervalos de dias pré-estabelecidos, para amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 4 °C.

## **3.8 PARÂMETROS QUE AFETAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

### **3.8.1 Efeito do pH**

O efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada foi investigado conduzindo-se o ensaio de atividade enzimática em diferentes valores de pH (4,0-8,0). Para a enzima livre, alterou-se o pH da solução tampão (fosfato) tanto na diluição da enzima, quanto no preparo do substrato. Já para a enzima imobilizada, apenas o pH do substrato foi alterado.

### **3.8.2 Efeito da Temperatura**

O efeito da temperatura sob a atividade da enzima livre e imobilizada foi verificado variando a temperatura de incubação na faixa entre (45-75 °C). Para esses ensaios, o pH foi mantido constante e igual ao pH ótimo das enzimas, determinado no item 3.8.1.

## **3.9 MEDIDAS DE ESTABILIDADE ENZIMÁTICA**

### **3.9.1 Estabilidade Térmica**

A estabilidade térmica foi determinada pela medida da atividade enzimática de ambas as enzimas conforme procedimento previamente descrito (item 3.4), porém, em diferentes tempos de incubação (30-300 min). O pH e a temperatura para estes ensaios foram definidos a partir dos itens 3.8.1 e 3.8.2.

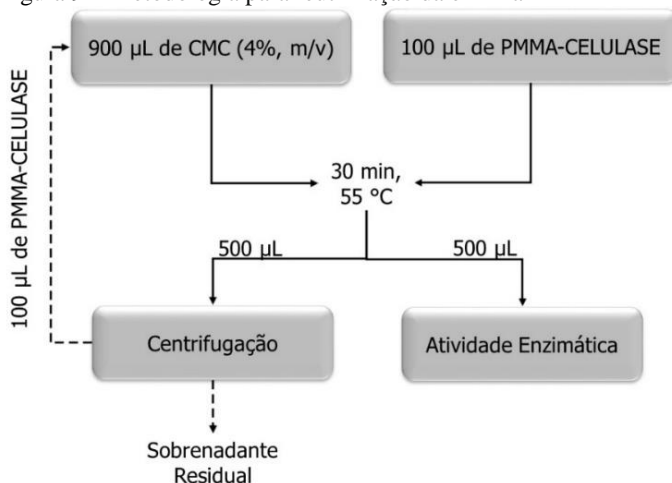
### 3.9.2 Estabilidade ao Armazenamento

A estabilidade da enzima livre e imobilizada durante armazenamento à temperatura ambiente e a 4 °C foi monitorada através da medição da atividade enzimática durante 60 dias, em intervalos de dias pré-definidos. Para tal, as enzimas livres e imobilizadas foram mantidas em tampão fosfato (0,05 M, pH 6,0) ou como preparadas (armazenamento da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE).

### 3.9.3 Estabilidade Operacional - Reúso

A reutilização da celulase imobilizada foi efetuada a partir da centrifugação, com filtros Amicon®, a 13.000 rpm e 30 minutos, de 500 µL da solução de substrato e PMMA-CELULASE, após 30 min de hidrólise a  $(55 \pm 1)$  °C. Após a centrifugação, o substrato residual e a suspensão coloidal de PMMA-CELULASE foram separados, sendo 100 µL desta adicionada a um substrato fresco, reiniciando um novo ciclo. Este procedimento foi assim conduzido até que não se observou mais a presença da enzima no filtro após a centrifugação. A solução de substrato e PMMA-CELULASE remanescente (500 µL) foi utilizada para a determinação da atividade enzimática de cada ciclo, seguindo o procedimento já descrito no item 3.4. A figura 9 apresenta esquematicamente a metodologia adotada.

Figura 9 – Metodologia para reutilização da enzima



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

## 3.10 ESTUDO DE UMA POSSÍVEL APLICAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

### 3.10.1 Aplicação em Substrato Sólido – Tecido de Algodão

A aplicação da enzima imobilizada em substrato sólido foi realizada em um equipamento para tingimento em canecos (Modelo ALT, Mathis). Amostras de aproximadamente 6,00 g de tecido de algodão pré-alvejado foram adicionados aos canecos contendo a suspensão de PMMA-CELULASE (látex), utilizando uma relação de banho (g de substrato/ mL de suspensão) de 1:8. Preparadas as soluções, os canecos foram submetidos a uma rotação de 40 rpm a  $(55 \pm 1)$  °C durante 40 min. Após a hidrólise enzimática, as amostras de tecido foram torcidas, para retirar o excesso de solução, e secas em estufa a  $(70 \pm 2)$  °C durante 4 h.

Para tornar a fibra do tecido mais susceptível ao ataque enzimático, todas as amostras foram previamente adicionadas aos canecos contendo somente água e submetidas a aquecimento a  $(60 \pm 1)$  °C durante 10 min com uma rotação de 40 rpm.

A atuação da enzima imobilizada foi verificada através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), comparando a estrutura das fibras antes e depois do tratamento enzimático.

Para tal, pequenos pedaços dos tecidos foram colados sobre um stub contendo fita de carbono e, após secagem, recobertos com uma fina camada de ouro. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME, da Universidade Federal de Santa Catarina, utilizando o microscópio JEOL JSM- 6390LV.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TIPO DE SURFACTANTE E DO pH DO LÁTEX NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Conforme apresentado no item 2.5.1, o uso de surfactantes nas reações de polimerização em miniemulsão é fundamental para evitar a coalescência das nanopartículas formadas, mantendo-se desta forma, a estabilidade coloidal das mesmas. Entretanto, no que tange à atividade enzimática, estudos mostram que a adição de surfactante ao substrato tem afetado de forma positiva ou negativa, dependendo das propriedades do surfactante, a taxa de hidrólise de materiais lignocelulósicos insolúveis (ERIKSSON; BÖRJESON; TJERNELD, 2002 e UEDA; KOO; WAKIDA, 1994). Assim como o tipo de surfactante, o pH do meio reacional também afeta a atividade enzimática, uma vez que variações de pH podem ocasionar mudanças na estrutura ativa da enzima (SHULER; KARGI, 2009).

Em face disso, o objetivo desta etapa foi avaliar a influência do pH do látex (suspensão coloidal de PMMA-CELULASE) resultante da polimerização em miniemulsão, bem como o tipo de surfactante (aniônico - SDS e não-iônico – Lutensol AT50) utilizado para o seu preparo, na atividade enzimática da celulase. Para tal, reações de polimerização com diferentes formulações foram realizadas e os resultados são apresentados na tabela 4.

Comparando os valores da atividade enzimática encontrados para os experimentos conduzidos com diferentes surfactantes, porém mantendo próximos os valores de pH (por exemplo, experimentos 2 e 4), verifica-se que ao utilizar Lutensol AT50 a atividade enzimática, foi quase 10 vezes maior que aquela quando SDS foi utilizado. Esse fato corrobora com os resultados obtidos por Eriksson, Börjeson, Tjerneld (2002) e Ueda, Koo, Wakida (1994), os quais afirmam que surfactantes iônicos, catiônicos e aniônicos, interferem negativamente na hidrólise enzimática.

Com relação ao pH, nota-se dos experimentos 1 e 2 que ao realizar a polimerização com a adição de apenas 0,01 g de agente tamponante, NaHCO<sub>3</sub>, o pH do látex manteve-se dentro da faixa ótima da atividade da enzima (tabela 1), resultando, conseqüentemente, em uma elevação de seu valor. Em comparação, quando não houve adição de NaHCO<sub>3</sub>, foi observado um decréscimo tanto no valor do pH quanto na atividade enzimática. Uma possível explicação para essa redução no valor da atividade deve-se ao fato de que o pH da suspensão obtida apresentou

valor abaixo da faixa de estabilidade da enzima, ocasionando, dessa forma, a desnaturação de grande parte da celulase utilizada.

Tabela 4 – Formulações utilizadas na obtenção do látex (suspensão coloidal de PMMA-CELULASE) para avaliação da influência do tipo de surfactante e do pH na atividade enzimática

Reagentes (g)	Experimento			
	1	2	3	4
Água	24,00	24,00	24,00	24,00
SDS <sup>a</sup>	-	-	0,06	0,06
Lutensol AT50 <sup>b</sup>	0,84	0,84	-	-
Celulase	0,30	0,30	0,30	0,30
Crodamol GTCC	3,03	3,03	3,03	3,03
MMA	3,09	3,09	3,09	3,09
NaHCO <sub>3</sub>	0,01	-	0,01	-
KPS	0,03	0,03	0,03	0,03
pH do látex	6,48	2,96	5,10	2,95
Atividade Enzimática (U/mL)*	368,89 ± 2,89	16,82 ± 3,15	37,83 ± 11,56	1,84 ± 0,26

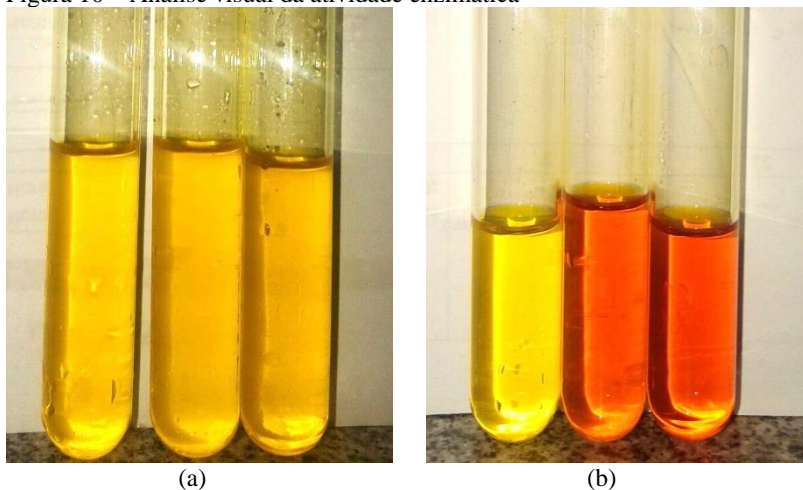
a) aniônico; b) não-iônico; \*valores são expressos como o valor médio ± desvio padrão

Por meio de uma análise visual (figura 10), uma vez que o método utilizado para a quantificação da atividade enzimática baseia-se na mudança de coloração do DNS (item 3.3), foi possível reforçar os resultados obtidos na tabela 4. Da figura 10a nota-se que quando SDS é utilizado na ausência de NaHCO<sub>3</sub> (experimento 4), a atividade enzimática é inexistente, ou muito baixa, tendo em vista que a cor original do DNS se manteve inalterada. Por outro lado, quando Lutensol AT50 e NaHCO<sub>3</sub> foram utilizados simultaneamente (experimento 1), a atividade enzimática é elevada, visto que a mudança de coloração do DNS é nitidamente perceptível a olho nu (figura 10b).

Portanto, verifica-se, tanto quantitativa como qualitativamente, que a utilização concomitante de surfactante não-iônico e NaHCO<sub>3</sub> se faz necessária para que elevadas taxas de hidrólise possam ser obtidas. Ou

seja, o surfactante não-iônico e o bicarbonato de sódio agem sinergicamente sobre a atividade da celulase.

Figura 10 – Análise visual da atividade enzimática



**Legenda:** a) SDS sem  $\text{NaHCO}_3$   
b) Lutensol AT50 com  $\text{NaHCO}_3$

Fonte: Acervo da autora (2015)

## 4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTE

Definido, a partir do item anterior, Lutensol AT50 como o melhor surfactante a ser utilizado nas reações de polimerização, investigou-se o efeito da sua concentração no diâmetro de partícula e na atividade enzimática. Assim, a concentração de surfactante foi variada de 1,4 a 4,0% em relação à massa do meio reacional. As demais concentrações dos reagentes foram mantidas constantes, conforme já apresentado na tabela 4 (experimento 1).

### 4.2.1 Efeito da Concentração de Surfactante no Diâmetro de Partícula (Dp)

Como esperado, ao aumentar a concentração de surfactante, o diâmetro da partícula, como também a sua distribuição de tamanho (PDI), foi reduzido (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; BECHTHOLD et al., 2000; VALÉRIO; ARAÚJO; SAYER, 2013; ZANETTI-RAMOS et

al., 2006). Tal resultado é atribuído ao fato de que partículas com menores diâmetros necessitam de uma maior quantidade de surfactante para que a tensão superficial seja reduzida (LANDFESTER, 2000; ANDERSON; SUDOL; EL-AASSER, 2002). Dessa forma, a adição de maiores quantidades de surfactante promove uma cobertura maior da superfície das nanopartículas, evitando assim a coalescência e, conseqüentemente, mantendo a estabilidade coloidal das mesmas (ABISMAIL et al., 1997).

Da tabela 5, verifica-se que a diminuição no Dp é mais pronunciada quando a concentração de surfactante aumenta de 1,4 para 4,0%, apresentando diâmetros de 193 e 112 nm e PDI de 0,398 e 0,185, respectivamente. Aumentando a concentração de 1,4 para 2,7%, e, posteriormente, de 2,7 para 4,0%, a redução no Dp foi de aproximadamente 37,0 e 9,0%, respectivamente, mantendo próximos os valores de PDI (0,177 e 0,185).

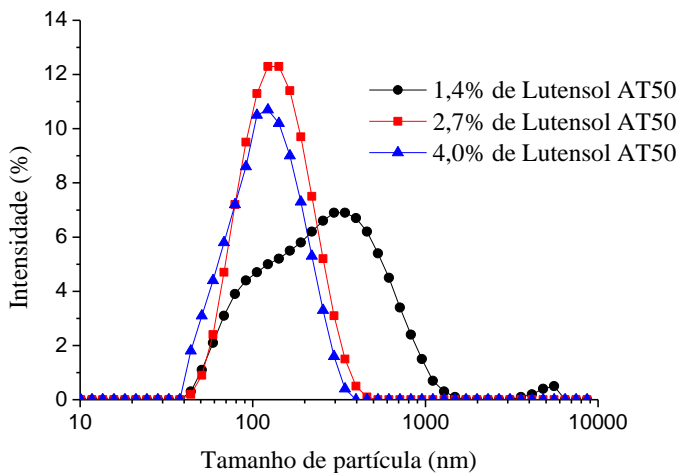
Tabela 5 – Efeito da concentração do surfactante Lutensol AT50 no Dp e na atividade enzimática

<b>% Surfactante (em relação ao meio reacional)</b>	<b>Massa de surfactante (g)</b>	<b>Dp médio (nm) *</b>	<b>PDI</b>	<b>Atividade Enzimática* (U/mL)</b>
1,4	0,42	194,0 ± 1,4	0,398	319,0 ± 3,0
2,7	0,84	122,0 ± 0,4	0,177	359,0 ± 4,0
4,0	1,26	112,0 ± 0,7	0,185	386,5 ± 6,0

\*valores são expressos como o valor médio ± desvio padrão

Ainda com relação ao Dp, o uso de apenas 1,4% de Lutensol AT50 resultou em uma curva de distribuição de tamanho bimodal, como pode ser observada na figura 11. Já para as demais concentrações um comportamento monomodal foi obtido, sendo a concentração de 2,7% a que apresentou diâmetro de partícula mais uniforme, visto que o pico da curva se apresentou ligeiramente mais estreito.

Figura 11 – Distribuição de tamanho de partículas com 1,4%, 2,7% e 4,0% de surfactante Lutensol AT50



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

#### 4.2.2 Efeito da Concentração de Surfactante na Atividade Enzimática

No que diz respeito à atividade enzimática, nota-se que esta apresentou comportamento inverso àquele obtido para o  $D_p$ , aumentando à medida que a concentração do surfactante aumenta. Novamente da tabela 5, verifica-se que houve um incremento de 21,0% no valor da atividade enzimática ao elevar a concentração de surfactante de 1,4 para 4,0%. Para as concentrações intermediárias, observa-se que o acréscimo no valor da atividade foi de 12,5% e 7,6%, respectivamente para o aumento de 1,4 para 2,7% e de 2,7 para 4,0% na concentração de surfactante. Comportamento semelhante foi obtido por Zhong Liu, Hui, Si (2011); Börjeson, Peterson, Tjerneld (2007); Ooshima, Sakata, Harano (1986) e Castanon e Wilke (1981).

Uma das explicações plausíveis para o mecanismo de ação do surfactante na atividade enzimática é atribuída ao fato deste diminuir a tensão interfacial do meio. Dessa forma, além de tornar o substrato mais acessível ao ataque enzimático, a redução da tensão interfacial favorece a transferência de massa. Conseqüentemente, a interação entre substrato-enzima é melhorada, levando a um aumento na velocidade de hidrólise

enzimática (ERIKSSON; BÖRJESON; TJERNELD, 2002; HELLE; DUFF; COOPER, 1993; KAAR; HOLTZAPPLE, 1998;). Entretanto, estudos recentes sugerem que a ação de surfactantes não-iônicos na melhora da atividade enzimática, além de ser influenciada pelas condições de hidrólise, estrutura da celulose e composição da celulase utilizada, deve-se à redução da desativação enzimática, causada por esta interação (ZHOU et al., 2015; YANG et al., 2011).

A elevação da atividade enzimática com o aumento da concentração de surfactante pode estar relacionada também ao aumento da área superficial das nanopartículas de PMMA (maior concentração de surfactante - partículas com menor diâmetro - maior área superficial). Em razão disso, um maior número de enzimas por partícula é obtido, levando, conseqüentemente, à um aumento na eficiência do biocatalisador (ANSARI, HUSAIN, 2012; HO et al., 2008; JIA; ZHU; WANG, 2003).

Contudo, apesar de o uso de surfactantes não-iônicos melhorar a velocidade de hidrólise, um aumento excessivo na sua concentração pode causar um efeito adverso, ou seja, uma redução da atividade enzimática, resultante, eventualmente, de uma alteração na conformação da enzima devido às características do tensoativo (SILVA et al., 2011; ZHANG, ZHANG, TANG, 2011).

Para a realização dos testes subsequentes, fixou-se a concentração de Lutensol AT50 em 2,7%. Embora na concentração de 4,0% tenham sido alcançados menores valores de Dp e maiores valores de atividade enzimática, 0,84 g de Lutensol AT50 foram suficientes para se obter uma suspensão estável, com Dp uniforme e em torno de 120 nm, assim como uma curva de distribuição de tamanho monomodal. Também, um bom valor para atividade enzimática foi encontrado. Portanto, a utilização de maiores concentrações de surfactante não se fez necessária.

### 4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CELULASE

O efeito da concentração de enzima na atividade relativa durante a polimerização em miniemulsão, eficiência de imobilização, diâmetro de partícula e conversão monomérica foi investigado. Para isso, três diferentes concentrações de celulase foram testadas, 2,0, 6,0 e 10,0%. Ambas as quantidades foram relacionadas à massa de monômero utilizada

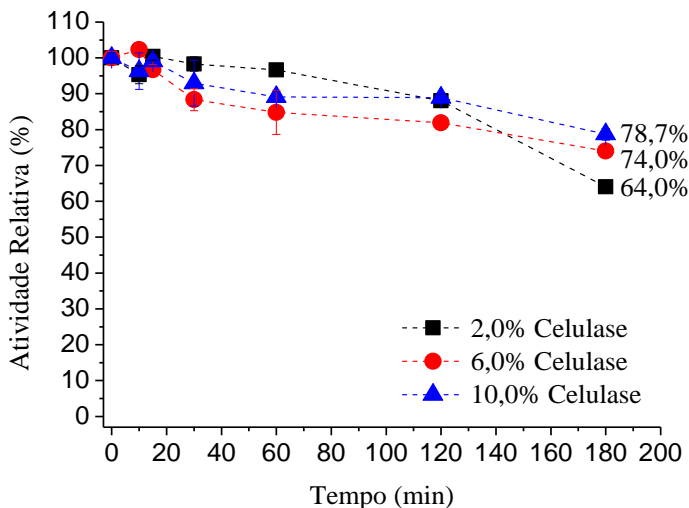
#### 4.3.1 Efeito da Concentração de Celulase na Atividade Enzimática

Com base na figura 12, verifica-se que a atividade relativa para as diferentes concentrações de enzima diminui com o decorrer da reação.

Entretanto, esta diminuição é tanto menor quanto maior for a quantidade de enzima. Isto pode ser evidenciado comparando os valores de atividade relativa ao final de 180 min de reação, onde os valores alcançados foram de 64,0% contra 78,7%, respectivamente para 2,0 e 10,0% de celulase. Igual comportamento foi constatado por Valério et al. (2015) ao utilizarem a técnica de polimerização em miniemulsão para imobilização da enzima lipase CalB.

Devido ao processo de imobilização, parte da atividade catalítica da enzima pode ser comprometida (item 2.2). Todavia, o valor de atividade relativa obtido pelo método de imobilização aqui apresentado (64,0-78,7%), mostrou-se igual ou superior a outros métodos de imobilização por ligação covalente encontrados na literatura (30,2% - JORDAN; KUMAR; THEEGALA, 2011; 62,2% - SILVA et al., 2012; 76,17% - ABD EL-GHAFFAR; HASHEM, 2010).

Figura 12 – Influência da concentração de celulase na atividade relativa durante a polimerização em miniemulsão. A atividade no tempo zero corresponde à atividade da enzima livre ( $A_E = 727,77$  U/ml, correspondente à concentração de 6,0% de celulase)

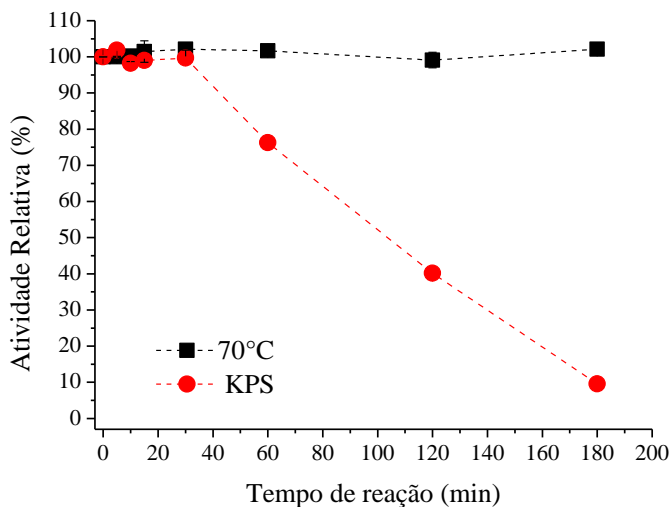


Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Para verificar os possíveis fatores da polimerização (iniciador e temperatura de polimerização) que afetam a atividade enzimática, dois experimentos foram conduzidos. No primeiro, o meio reacional foi

constituído de enzima,  $\text{NaHCO}_3$ , iniciador e água. Já no segundo, submeteu-se ao aquecimento ( $70 \pm 1$ ) °C somente enzima,  $\text{NaHCO}_3$  e água. Em ambas as situações, a atividade enzimática (determinada conforme condições do item 3.4) foi acompanhada ao longo do tempo e as quantidades foram mantidas iguais às utilizadas para a reação de polimerização (tabela 3).

Figura 13 – Estudo do efeito do iniciador e temperatura de polimerização na atividade enzimática



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Conforme os resultados apresentados na figura 13, é possível perceber que o iniciador exerce forte influência na atividade catalítica, pois a partir de 60 min de reação a atividade relativa é cerca de 75,0% da atividade inicial. Pressupõe-se que esta redução na atividade enzimática é provocada por dois motivos: i) a interação entre o iniciador e a celulase na formação de amino radicais (explicado adiante) pode ser dada entre uma molécula do iniciador e um grupo amina presente no sítio ativo da enzima, impedindo, dessa forma, a ligação do substrato. Ainda, a oxidação da enzima (agente redutor) provocada por essa interação pode levar a uma alteração conformacional da estrutura da celulase, tendo como resultado final, sua inativação, mesmo quando a amina reagente não pertence ao sítio ativo (CAVACO-PAULO; GÜBITZ, 2003). Dessa



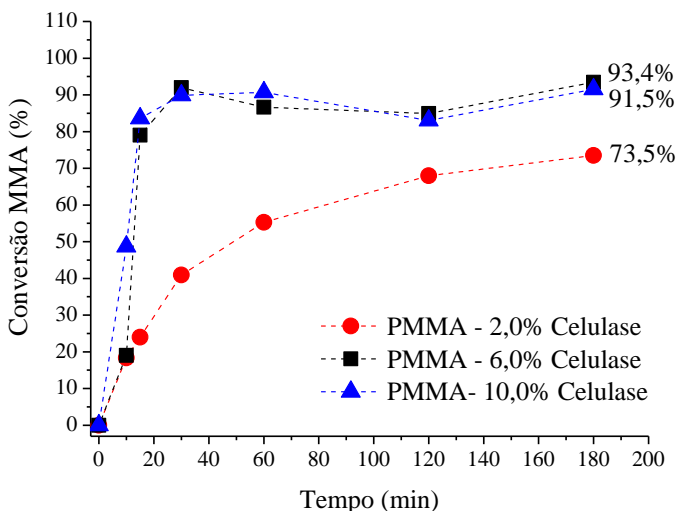
forma, um radical livre é gerado na estrutura da enzima, favorecendo a polimerização, porém, comprometendo a atividade catalítica; ii) o iniciador, ao dissociar-se, forma dois radicais sulfato aniônicos ( $\text{SO}_4^-$ ) (SARAC, 1999). Em decorrência, a força iônica do meio pode ser alterada, causando a desnaturação da enzima (item 2.2.3).

Em função do complexo sistema enzimático inerente à celulase, as reais mudanças que ocorrem na sua estrutura não são definidas com clareza. Sendo assim, as razões pela qual o iniciador reduz a atividade enzimática (iniciador e temperatura de polimerização) são possíveis explicações para o fenômeno observado. No entanto, devido à importância, recomenda-se um aprofundamento do assunto.

### 4.3.2 Efeito da Concentração de Celulase na Conversão de MMA

A figura 14 apresenta a evolução da conversão do MMA durante a reação de polimerização com diferentes concentrações de celulase.

Figura 14 – Influência da concentração de enzima na conversão do monômero



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Analogamente à atividade relativa, observa-se que quanto maior a quantidade de enzima, maior é a conversão obtida. Enquanto a utilização de 2,0% de celulase converteu apenas 75,0% do monômero, a adição de

6 e 10,0% de enzima proporcionou aumento considerável neste valor, sendo atingidas conversões superiores a 90,0%.

Segundo Li et al. (2003), biopolímeros hidrofílicos, contendo grupo funcional amina - tais quais as enzimas - quando submetidos a reações de polimerização radicalar de monômeros vinílicos, tendo o MMA como exemplo, estão sujeitos a formação de par redox entre a amina da enzima (agente redutor) e a molécula do iniciador (agente oxidante). A formação desse par redox gera radicais livres tanto na molécula do iniciador, como no nitrogênio da amina (radical amino), o qual é capaz de iniciar a copolimerização<sup>9</sup> do monômero. O radical proveniente do iniciador pode promover a homopolimerização do monômero e/ou abstrair um hidrogênio da cadeia polimérica da enzima, iniciando também a copolimerização. Um mecanismo possível para tal reação é proposto por Li et al. (2002). Vários tipos de iniciadores foram utilizados pelos autores na copolimerização de PMMA e polímeros contendo nitrogênio, sendo terc-butil hidroperóxido (TBHP), dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (V-50) e KPS os que apresentaram maiores taxas de conversão.

Seguindo a mesma linha, cinco anos mais tarde Ho e colaboradores (2008) obtiveram sucesso na imobilização de celulase em nanopartículas de PMMA a partir da polimerização em emulsão, afirmando, novamente, que biopolímeros contendo grupos amina podem submeter-se a reações de oxirredução com o iniciador. Nesse estudo, TBHP foi utilizado como agente oxidante.

Xinde (1986), ao estudar o sistema amina/persulfato na iniciação de reações de polimerização de monômeros vinílicos, verificou que todos os tipos de amina, cíclica ou alifática, formam par redox com KPS.

Portanto, tendo como base as referências acima citadas, conclui-se que a iniciação da polimerização realizada nesta dissertação se estabelece, possivelmente, a partir da formação de um par redox<sup>10</sup> (item 2.5.3) entre a enzima e o iniciador e que, maiores quantidades de enzima provêm um maior número de grupos amina disponíveis para a formação de radicais livres. Dessa forma, maiores conversões do monômero são observadas (figura 14).

---

<sup>9</sup> Formação de polímero contendo duas ou mais espécies de monômeros.

<sup>10</sup> Dada a temperatura de polimerização (70 °C), a iniciação também pode ocorrer via decomposição térmica do iniciador.

### 4.3.3 Efeito da Concentração de Celulase na Eficiência de Imobilização e no Diâmetro de Partícula

Por meio da determinação da atividade enzimática do sobrenadante (item 3.5) foi constatado que a maior eficiência de imobilização ocorreu quando 6,0% de celulase foi utilizada. Nessa concentração, aproximadamente 60,0% da enzima foi ligada às nanopartículas de PMMA.

A partir da análise da tabela 6, nota-se que ao utilizar 10,0% de enzima, uma expressiva redução na eficiência de imobilização foi observada. Tal resultado sugere que o aumento da concentração de enzima conduz à saturação da superfície das nanopartículas, bloqueando os sítios ativos para ligação (JORDAN; KUMAR; THEEGALA, 2011). Logo, a partir de 6,0% de celulase, maior quantidade de enzima não imobilizada é detectada no sobrenadante, levando a um maior valor da atividade enzimática e consequente queda da eficiência de imobilização.

Tabela 6 – Influência da concentração de enzima na eficiência de imobilização e no diâmetro de partícula

Concentração de Enzima (% em relação ao MMA)	Eficiência Imobilização (%)	Dp médio* (nm)	PDI
<b>2</b>	47,1	136,9 ± 0,6	0,197
<b>6</b>	59,5	133,9 ± 0,8	0,176
<b>10</b>	22,3	138,6 ± 0,5	0,168
<b>Somente PMMA</b>		132,6 ± 1,0	0,154

\*valores são expressos como o valor médio ± desvio padrão

Dado que menor quantidade de nanopartículas de PMMA foi produzida ao utilizar 2,0% de enzima (figura 14), menor é a quantidade de suporte disponível para a imobilização. Por esse motivo, não é possível fazer comparações efetivas, no que diz respeito à eficiência de imobilização, com as demais concentrações. Caso a conversão de MMA a 2,0% de enzima fosse similar àquela obtida para as concentrações de 6,0 e 10,0%, possivelmente, a eficiência de imobilização apresentada na tabela 6 atingiria maior valor.

Com relação ao tamanho das nanopartículas, verifica-se que a presença de enzima não apresentou mudança no diâmetro destas, visto

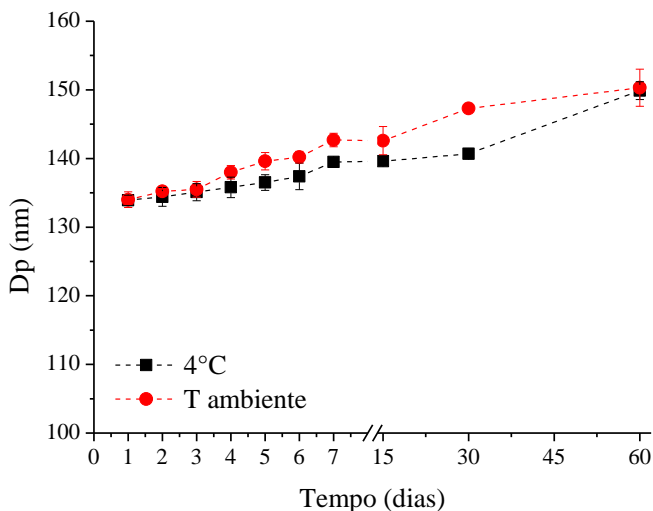
que o  $D_p$  para nanopartículas de PMMA sem a presença de enzima foi de 132 nm.

Assim, em função dos resultados obtidos para atividade relativa, conversão de MMA,  $D_p$  e eficiência de imobilização, os quais, excetuando este último, apresentaram comportamentos semelhantes à concentração de 10,0%, adotou-se a concentração de 6,0% de enzima para dar continuidade aos testes.

#### 4.4 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PMMA

A medida do diâmetro de partícula com o tempo é uma maneira de avaliar a estabilidade das nanopartículas poliméricas, tendo em vista que para sua obtenção, compostos capazes de impedir a coalescência e a degradação difusional são utilizados. Assim, o acompanhamento do diâmetro médio das nanopartículas de PMMA foi realizado durante 60 dias (Figura 15). Amostras da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE (látex) foram armazenadas à temperatura ambiente e a 4 °C com o intuito de verificar o efeito da temperatura na estabilidade.

Figura 15 – Estabilidade das nanopartículas de PMMA a 4 °C e à temperatura ambiente



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Como pode ser observado na figura 15, o comportamento das nanopartículas ao longo dos dias foi similar para ambas as condições de temperatura, havendo um pequeno aumento do Dp. Tal fato era previsto, uma vez que os motivos que levam à desestabilização, tal qual o movimento Browniano e a difusão do monômero (*Ostwald ripening*), são fatores intrínsecos - porém, controláveis - do sistema.

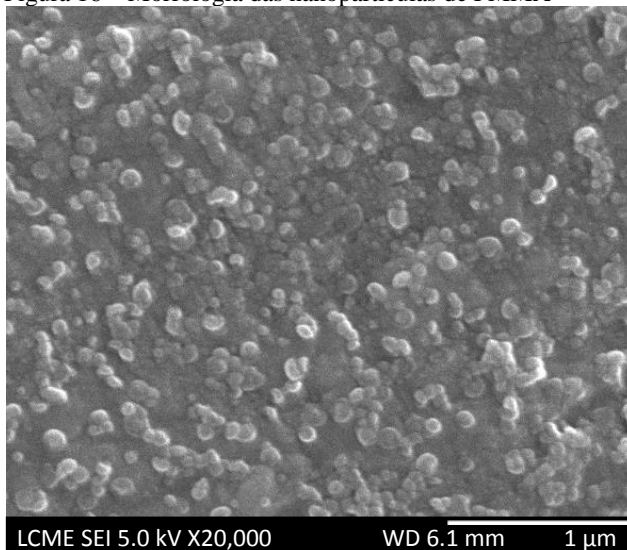
Entretanto, após 60 dias de armazenamento, verificou-se que o diâmetro das nanopartículas sofreu um aumento, observado igualmente para as duas temperaturas, de apenas 12,0% em seu valor, passando de 134 para 150 nm. Além disso, nenhuma alteração visual foi observada ao longo desse período.

Portanto, pode-se concluir que as nanopartículas produzidas de acordo com a formulação presente na tabela 3 apresentam elevada estabilidade.

#### 4.5 MORFOLOGIA

De acordo com a análise de MEV-FEG (figura 16), verifica-se a morfologia esférica das nanopartículas de PMMA produzidas sob as condições otimizadas de surfactante e enzima (tabela 3). Devido às características do polímero, não foram possíveis maiores aproximações.

Figura 16 – Morfologia das nanopartículas de PMMA

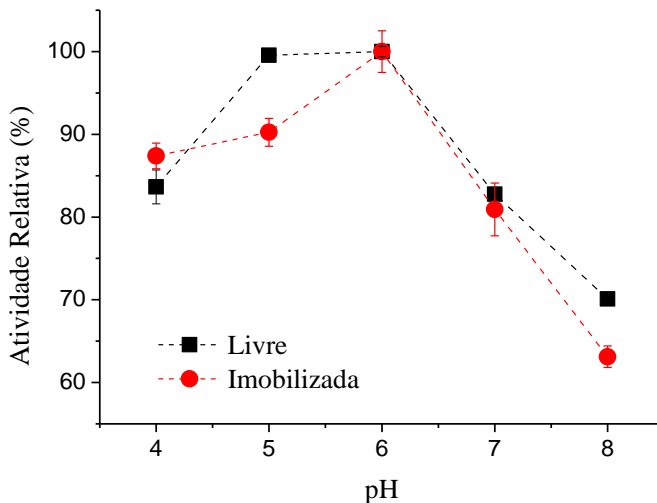


Fonte: LCME-UFSC (2015).

#### 4.6 EFEITO DO pH E DA TEMPRATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Conhecer como a enzima se comporta diante da alteração de pH e de temperatura é fundamental para se determinar a faixa de operação da enzima, isto é, em quais condições é possível obter um significativo valor de atividade enzimática. Para isso, a atividade relativa da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE (látex) e da enzima livre foi determinada em diferentes valores de pH e de temperatura (item 3.8). Os resultados são apresentados na figura 17 e figura 18.

Figura 17 – Efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada. Enzimas foram incubadas por 30 min a  $(55 \pm 1) ^\circ\text{C}$



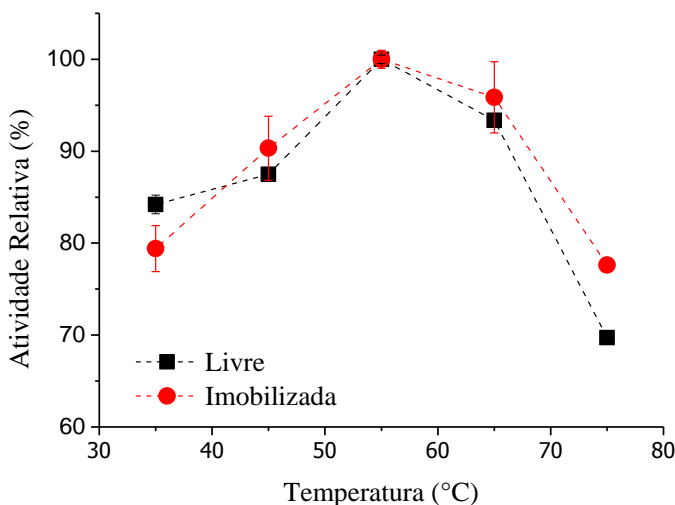
Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Como pode ser observado, tanto a enzima livre como a imobilizada são sensíveis a variações de pH e de temperatura, uma vez que a atividade relativa atinge diferentes valores diante da alteração destes parâmetros.

Após a imobilização, nota-se que o perfil de atividade relativa, tanto para pH como para a temperatura, foi similar ao da enzima livre. Isso indica que, apesar de o processo de imobilização ter comprometido a atividade enzimática (figura 12) a estabilidade da celulase em relação às variações destes parâmetros foi mantida. Em consequência, os valores

ótimos de pH e temperatura, os quais correspondem à máxima atividade, foram mantidos, sendo o pH 6,0 e temperatura de  $(55 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Observações similares foram relatadas por Liang e Cao (2012) e Zhou (2010) na imobilização de celulase em um copolímero de poliacrilato e em quitosana, respectivamente.

Figura 18 – Efeito da temperatura na atividade da enzima livre e imobilizada. Enzimas foram incubadas por 30 minutos e em pH 6,0



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

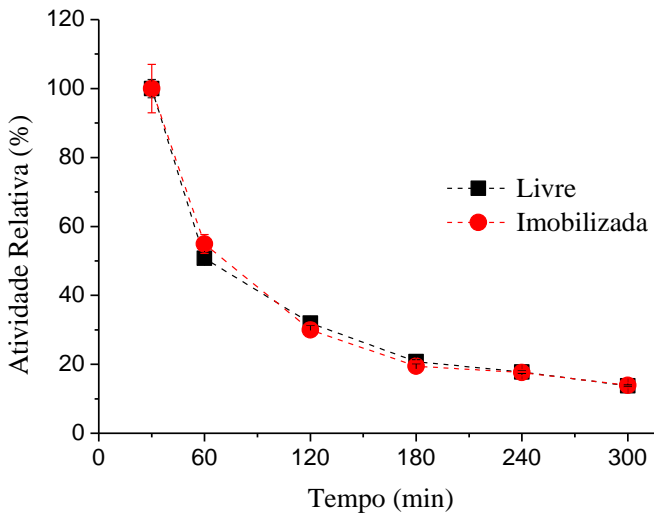
Há na literatura muitos estudos que reportam a alteração do valor ótimo de pH e temperatura, como também a estabilidade da enzima, frente às variações de pH e temperatura após a imobilização. (KHOSHNEVISAN et al., 2011; ABD EL-GHAFFAR; HASHEM, 2010; JORDAN; KUMAR; THEEGALA, 2011; CIPOLATTI et al., 2014). Contudo, como já mencionado, tal comportamento não foi observado neste trabalho. Isso se deve ao fato de que a celulase utilizada nesta dissertação já apresenta excelentes características em relação às variáveis em estudo, pois mesmo a  $(75 \pm 1) ^\circ\text{C}$  e/ou em pH 8, a enzima livre ainda mantém 70,0% de sua atividade máxima.

## 4.7 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

### 4.7.1 Estabilidade Térmica

Com relação à estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a  $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$  e pH 6,0, a figura 19 mostra que ambas as enzimas perdem igual e progressivamente sua atividade enzimática ao longo do tempo, sendo a atividade relativa da enzima imobilizada ligeiramente maior (54,91%) que a da enzima livre (50,79%) após 60 minutos.

Figura 19 – Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a  $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$  e pH 6,0



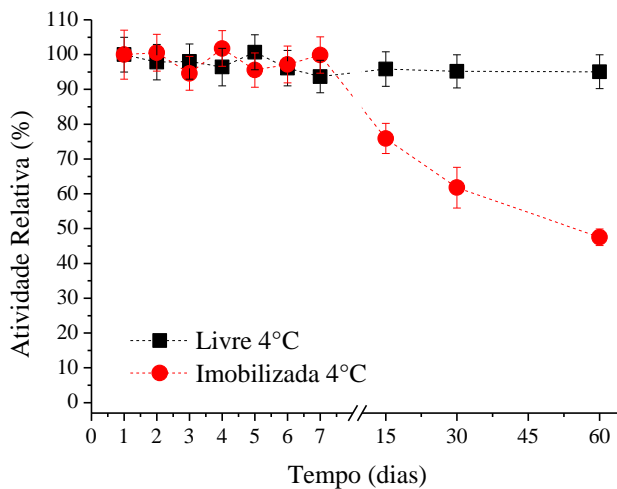
Fonte: Elaborada pela autora (2015).

### 4.7.2 Estabilidade ao Armazenamento

O comportamento da enzima livre e imobilizada durante período de armazenamento, à temperatura ambiente e a  $4^\circ\text{C}$ , foi analisado em termos de atividade relativa e os resultados podem ser observados na figura 20 e figura 21, respectivamente.

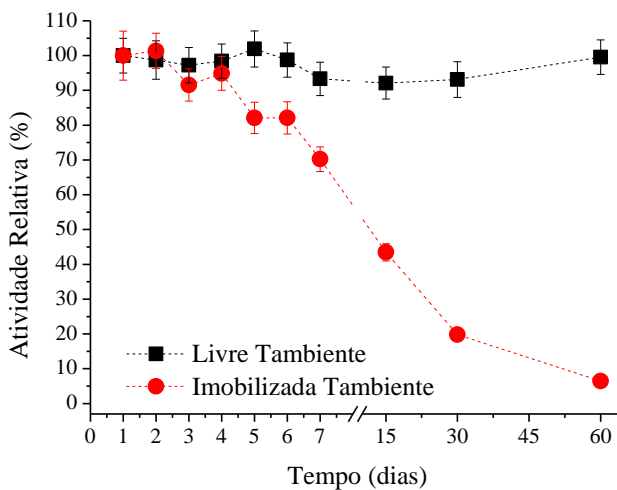


Figura 20 – Estabilidade de armazenamento da enzima livre e imobilizada a 4 °C



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Figura 21 – Estabilidade de armazenamento da enzima livre e imobilizada a temperatura ambiente



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Para ambas as temperaturas, é notória a maior estabilidade da enzima livre, tendo em vista que após 60 dias, a atividade relativa manteve-se constante. Já para a enzima imobilizada, observa-se que a temperatura exerce influência negativa durante o armazenamento. Enquanto a enzima imobilizada apresentou 50,0% de atividade relativa após 60 dias a 4 °C, apenas 6,5% da atividade relativa foi observada quando esta foi deixada na temperatura ambiente durante o mesmo período.

Além disso, da figura 20 é possível perceber que nenhuma mudança no valor da atividade relativa da enzima imobilizada foi constatada durante os 7 primeiros dias. Por outro lado, para o mesmo intervalo de tempo, a atividade relativa da enzima imobilizada armazenada à temperatura ambiente reduziu para 70,0% (figura 21).

A redução na estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada pode ser atribuída à presença de algum constituinte do meio no qual ela está inserida (monômero residual, iniciador, presença de íons, surfactante, entre outros), e/ou até mesmo a formação de um novo composto, capaz de alterar as características iniciais do látex, levando à perda da atividade enzimática. Além disso, a grande quantidade de água presente na formulação da miniemulsão pode ter sido o fator determinante para a queda na atividade enzimática. Por serem moléculas biológicas, em condições favoráveis e na presença de água, as enzimas se tornam vulneráveis ao ataque microbiológico e, conseqüentemente, à sua degradação. Em decorrência disso, a atividade enzimática é comprometida (CAVACO; GÜBITZ, 2003).

Com o intuito de reduzir o volume de água presente na suspensão coloidal de PMMA-CELULASE, efetuou-se a liofilização das amostras. Entretanto, após o procedimento, verificou-se que a enzima foi desativada, uma vez que nenhuma atividade enzimática foi detectada. Para testes futuros de liofilização, sugere-se a adição de substâncias crioprotetoras, como maltose, sacarose e trealose, à formulação da miniemulsão com o intuito de prevenir a desativação da enzima durante a etapa de congelamento, como também avaliar a influência da velocidade com que as amostras são congeladas na atividade enzimática.

### **4.7.3 Estabilidade Operacional - Reúso**

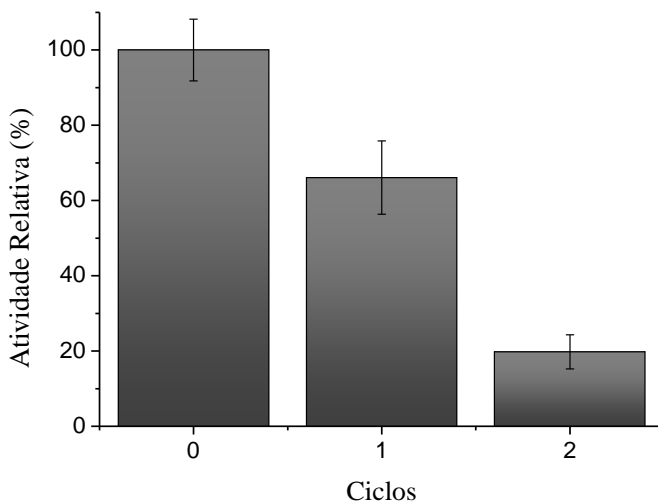
Dentre as vantagens em se imobilizar uma enzima, a possibilidade de reutilizá-la em mais de um ciclo de operação é a que proporciona maiores benefícios. A utilização repetidamente do catalisador acarreta menores custos de produção e também melhoria das características do

produto final, tendo em vista que a contaminação devido a presença da enzima pode ser minimizada (VALÉRIO et al., 2015). Além disso, a estabilidade operacional é uma medida da eficiência do biocatalisador.

O potencial de reuso da celulase imobilizada em nanopartículas de PMMA foi determinado conforme procedimento ilustrado na figura 9.

Tal como esperado (JORDAN; KUMAR; THEEGALA, 2011; SOHRABI; RASOULI; TORKZADEH, 2014) a atividade catalítica da enzima reduziu gradativamente em cada ciclo de operação (figura 22), sendo possível reutilizá-la duas vezes antes de a atividade relativa atingir 20,0% do seu valor inicial.

Figura 22 – Reuso da celulase imobilizada em nanopartículas de PMMA



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Em virtude da metodologia empregada para este experimento, a redução da atividade enzimática está associada mais ao fato de haver diminuição na quantidade de enzima presente no meio, do que na perda de atividade enzimática propriamente dita. Isso posto, sugere-se um aprimoramento da metodologia adotada, pois mesmo com as adversidades provenientes do método, tais como alta variabilidade e diluição da enzima a cada ciclo, verifica-se que a celulase aqui imobilizada é passível de reutilização.

#### 4.8 APLICAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO - TECIDO DE ALGODÃO

A escolha da indústria têxtil como modelo de aplicação para a enzima imobilizada se deu devido à extensa utilização das celulases nos processos de biopolimento, cuja finalidade é promover uma melhor aparência e acabamento às fibras.

A função das celulases nessa etapa é remover as microfibrilas<sup>11</sup> salientes dos tecidos de algodão, formadas, geralmente, após tratamentos mais agressivos (CAVACO; GÜBITZ, 2003).

Assim, com o objetivo de simular a etapa de biopolimento, amostras de tecidos pré-alvejados foram submetidas à ação das celulases imobilizadas (item 3.10.1). A eficácia da enzima foi analisada por meio da comparação da estrutura das fibras do tecido antes e após tratamento enzimático, as quais são mostradas na figura 23. Examinando as imagens (c) e (d), nota-se que as fibras do tecido após tratamento enzimático apresentaram pequenos aglomerados sob sua superfície. Contrastando as imagens (c) e (d) com (a) e (b), deduz-se que tais aglomerados são enzimas imobilizadas que ficaram aderidas ao tecido, uma vez que as fibras antes do tratamento enzimático se mostraram lisas e limpas.

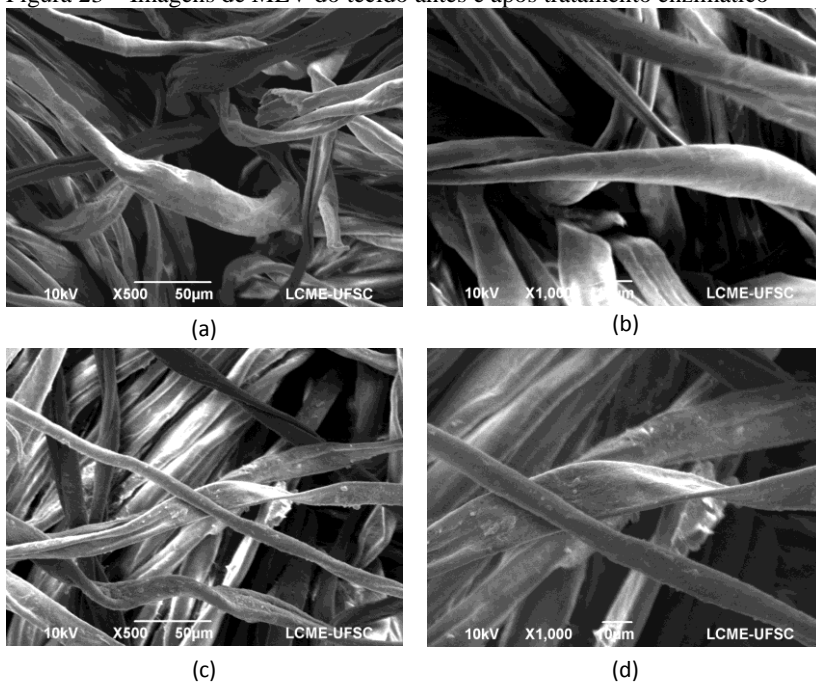
Contudo, embora tenha ocorrido uma afinidade entre a enzima imobilizada e o substrato (devido à presença dos aglomerados na superfície das fibras), verifica-se que não houve uma alteração relevante na estrutura das fibras, pois, mesmo após a atuação da celulase, ambas se mantiveram íntegras e sem rupturas. Tal resultado pode ser atribuído às características iniciais do tecido, uma vez que, a partir das imagens (a) e (b), não se observa a existência de microfibrilas aparentes.

Em face disso, conclusões concretas a respeito da atuação da enzima imobilizada na etapa de biopolimento não puderam ser alcançadas, dado que a escolha do substrato não se deu de maneira adequada.

---

<sup>11</sup> Espécie de penugem fina devido às pontas das fibras de algodão que emerge da superfície do fio.

Figura 23 – Imagens de MEV do tecido antes e após tratamento enzimático



**Legenda:** a) tecido antes do tratamento do enzimático. Ampliação de 500x  
b) tecido antes do tratamento do enzimático. Ampliação de 1000x  
c) tecido após tratamento enzimático. Ampliação de 500x  
d) tecido após tratamento enzimático. Ampliação de 1000x  
Fonte: LCME-UFSC (2015).



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 CONCLUSÕES

Nesta dissertação, celulase foi imobilizada em nanopartículas poliméricas de PMMA via polimerização em miniemulsão a partir do cumprimento dos objetivos específicos propostos, dos quais se pôde concluir que:

- Polimerizações realizadas com o surfactante aniônico (SDS) ou na ausência de  $\text{NaHCO}_3$  acarretaram baixos valores de atividade da celulase. Por outro lado, o uso concomitante de surfactante não-iônico (Lutensol AT50) e agente tamponante ( $\text{NaHCO}_3$ ), favoreceram a hidrólise enzimática, obtendo-se assim, elevados valores de atividade enzimática;
- A adição de maior quantidade de surfactante (Lutensol AT50) possibilitou a obtenção de partículas com menores diâmetros, como também a elevação da atividade do biocatalisador. Ao mesmo tempo em que o aumento na concentração de surfactante promove uma maior cobertura nas nanopartículas, a redução na tensão interfacial, além de facilitar a transferência de massa, torna o substrato mais acessível ao ataque enzimático. A concentração ideal de surfactante definida para a condução dos experimentos foi de 2,7% em relação à massa do meio reacional;
- O aumento da concentração de enzima nas reações de polimerização leva a um aumento tanto nos valores de atividade relativa ao longo da reação, quanto na conversão monomérica. Empregando 6,0 e 10,0% de celulase (em relação à massa de monômero), atividades relativas de 74,0 e 78,7% foram obtidas, assim como conversões de MMA superiores a 90,0%. O aumento na taxa de produção de nanopartículas de PMMA deve-se ao maior número de grupos aminas disponibilizados pela enzima à formação de radicais livres, elementos necessários para dar início às polimerizações;
- A máxima eficiência de imobilização, aproximadamente 60,0%, foi obtida quando 6,0% de celulase foi adicionada. Concentrações acima deste valor provocam uma saturação da superfície das nanopartículas, conduzindo a uma redução na eficiência de imobilização;

- A presença de celulase não apresentou mudança no Dp das nanopartículas, estando seu valor compreendido entre 132 e 138 nm;
- A suspensão coloidal de PMMA-CELULASE (látex) produzida com: 2,7% (em relação à massa do meio reacional) de Lutensol AT50; 6,0% de celulase (em relação à massa de monômero); 3,09 g de coestabilizador; 3,00 g de MMA; 0,01 g de KPS; 0,01 g de  $\text{NaHCO}_3$  e 24,00 g de água apresentou elevada estabilidade, uma vez que seu diâmetro de partícula (Dp) sofreu um aumento de apenas 12,0% ao longo de 60 dias.
- As nanopartículas de PMMA, quando produzidas sob condições otimizadas de enzima e surfactante, apresentaram-se no formato esférico;
- A estabilidade da enzima frente às variações de pH e temperatura foi mantida após processo de imobilização, visto que o perfil de atividade relativa para a enzima imobilizada foi similar ao da enzima livre. Como consequência, tanto a enzima livre como a imobilizada apresentaram os mesmos valores de pH e temperatura ótimos (pH 6,0 e 55 °C);
- Ambas as enzimas apresentaram o mesmo comportamento com relação à estabilidade térmica, tendo seus valores de atividade relativa reduzidos para 50,0% após 60 min de hidrólise a (55±1) °C e pH 6,0;
- Com relação à estabilidade de armazenamento, a enzima livre apresentou-se superior nas duas condições de temperatura estudadas (4 °C e temperatura ambiente), mantendo sua atividade durante 60 dias. Contudo, no tocante à enzima imobilizada, observou-se que esta apresenta melhor estabilidade quando armazenada a 4 °C, sendo possível manter sua atividade ao longo de sete dias. A grande quantidade de água presente na formulação da miniemulsão, como também seus vários constituintes, pode ter contribuído para a diminuição na estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada;
- Embora a metodologia adotada tenha apresentado alguns inconvenientes, a celulase imobilizada apresentou-se apta à reutilização, sendo capaz de resistir a dois ciclos operacionais antes de a atividade reduzir para 20,0% do seu valor inicial.
- Devido ao fato de o substrato (tecido de algodão pré-alvejado) selecionado não ter apresentado microfibrilas aparentes nas



imagens de MEV, não foi possível obter resultados efetivos no que diz respeito à atuação da celulase, muito embora se tenha notado sua afinidade com a enzima.

Considerando o êxito na execução dos referidos objetivos específicos, julga-se a imobilização de celulase em nanopartículas poliméricas de PMMA via polimerização em miniemulsão uma técnica promissora, exequível e inovadora, que visa suplantar as dificuldades encontradas pelos métodos de imobilização por ligação covalente convencionais, assim como cooperar com o aperfeiçoamento, no sentido econômico e ambiental, de inúmeros processos produtivos industriais.

## 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Dado o fato de a imobilização de celulase via polimerização em miniemulsão ter sido descrita pela primeira vez na literatura, muito ainda se tem a aperfeiçoar e a esclarecer a respeito desta abordagem. Em vista disso, propõe-se como sugestão para trabalhos futuros:

- Fazer o acompanhamento do diâmetro médio das nanopartículas no decurso da reação de polimerização em miniemulsão, com o intuito de assegurar a predominância da nucleação das gotas;
- Realizar as polimerizações em temperaturas mais baixas, bem como com outros iniciadores, e averiguar a conversão de monômero, a fim de ratificar e/ou verificar a formação de par-redox entre enzima e iniciador;
- Ainda com relação ao iniciador, confirmar a sua influência na redução da atividade enzimática durante o armazenamento. Para isso, sugere-se armazenar, nas mesmas condições do experimento realizado nesta dissertação (4 °C e temperatura ambiente, durante 60 dias), a enzima livre com água e NaHCO<sub>3</sub>.
- Acompanhar o pH da suspensão coloidal de PMMA-CELULASE (látex) durante período de armazenamento da enzima imobilizada, na intenção de investigar sua influência na redução da atividade enzimática.
- Melhorar a metodologia de reúso. Para tal, a separação das nanopartículas de PMMA e PMMA-CELULASE através de uma extração com solvente pode ser empregada; ou ainda,

- Incorporar material ferromagnético nas nanopartículas de PMMA, facilitando dessa forma a retirada do meio reacional;
- Utilizar tecido de algodão felpudo para os testes de aplicação da enzima em substrato sólido, como também verificar a atuação em outras aplicações.

## REFERÊNCIAS

ABD EL- GHAFAR, M.A.; HASHEM, M.S.. Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 507 – 516, 2010.

ABISMAIL, B.; CANSELIER, J.P.; WILHELM, A.M.; DELMAS, H.; GOURDON, C.. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, p. 75-83, 1997.

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.

ANDERSON, C.; SUDOL, E.D.; EL-AASSER, M.S.. 50 nm Polystyrene Particles via Miniemulsion Polymerization. **Macromolecules**, v. 35, p.574-576, 2002.

ANSARI, S.A.; HUSAIN, Q.. Potential Applications of enzymes immobilized on/in nano material: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 512-523, 2012.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K.. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 689 – 757, 2002.

ASUSA, J. M. Miniemulsion Polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 1283-1346, 2002.

ASUA, J.M. Challenges for industrialization of miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 1797-1826, 2014.

BECHTHOLD, N.; TIARKS, F.; WILLERT, M.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M.. Miniemulsion Polymerization: Applications and New Materials. **Macromolecular Symposia**, v. 151, p. 549-555, 2000.

BISSWANGER, H.. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, p. 41-55, 2014.

BÖRJESSON, J.; PETERSON, R.; TJERNELD, F.. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 754-762, 2007.

BRESOLIN, C.C.. **MODELAGEM MATEMÁTICA E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DE REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO COM INICIADOR ORGANOSSOLÚVEL**. 2013. 77 f.. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CASTANON, M.; WILKE, C.R.. Effects of the surfactant Tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1365-1372, 1981.

CASTRO; H.F.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F.; PEREIRA, A.S.. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: Bon, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.. **Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicação e Mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 123-151.

CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G.M.. **Textile processing with Enzymes**. 1.ed. England: Woodhead Publishing Ltd, 2003. 204 p.

CIPOLATTI, E.P.; VALÉRIO, A.; NICOLETTI, G.; THEILACKER, E.; ARAÚJO, P.H.H.; SAYER, C.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on PEGylatedpoly(urea-urethane) nanoparticles by step miniemulsion polymerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v, 109, p. 116-121, 2014.

DAL FARRA, O.S.. **ESTUDO CINÉTICO DA POLIMERIZAÇÃO DA ACRILAMIDA EM SOLUÇÃO AQUOSA VIA RADICAL LIVRE: USUAL E REDOX**. 2010. 37 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ELNASHAR, M.M.M.. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 1, p. 61-77, 2010.

ERIKSSON, T.; BÖRJESON, J.; TJERNELD, F.. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 353-364, 2002.

FERNANDES, K.F.; LIMA, C.S.; LOPES, F.M.. Técnicas de imobilização. **Revista Processos Químicos**, v. 4, p. 53-58, 2010.

HELLE, S.S.; DUFF, S.J.B.; COOPER, D.G.. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 611-617, 1993.

HO, K.M.; MAO, X.; GU, L.; LI, P.. Facile Route to Enzyme Immobilization: Core-Shell Nanoenzyme Particles Consisting of Well-Defined Poly(methyl methacrylate) Cores and Cellulase Shells. **Langmuir**, v.24, p. 11036-11042, 2008.

JIA, H.; ZHU, G.; WANG, P.. Catalytic Behaviors of Enzymes Attached to Nanoparticles: The Effect of Particle Mobility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 406-414, 2003.

JORDAN, J.; KUMAR, C.S.S.R.; THEEGALA, C.. Preparation and characterization of cellulose-bond magnetite nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 139-146, 2011.

KAAR, W.E.; HOLTZAPPLE, M.. Benefits from Tween during enzymatic hydrolysis of corn stover. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 419-427, 1998

KATCHAALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M.. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, v.10, p. 157-176, 2000.

KHARRAT, N.; YASSINE, A.; SANA, M.; YOUSSEF-TALEL, G.; M, K.. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1083-1089, 2011.

KHOSHNEVISA, K.; BORDBAR, A.; ZARE, D.; DAVOODI, D.; NORUZI, M.; BARKHI, M.; TABATABAEI, M.. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination

of its activity and stability. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, p. 669-673, 2011.

LAMB, D.J.; FELLOWS, C.M.; GILBERT, R.G.. Radical entry mechanisms in redox-initiated emulsion polymerizations. **Polymer**, v. 46, p. 7874-7895, 2005.

LANDFESTER, K.; BECHTOLD, N.; FÖRSTER, S.; ANTONIETTI, M.. Evidence for the preservation of the particle identity in Miniemulsion polymerization. **Macromolecular Rapid Communications**, v.20, p. 81-84, 1999.

LANDFESTER, K.. Recent developments in miniemulsions – formation and stability mechanisms. **Macromolecular Symposia**, v. 150, p. 171-178, 2000.

LANDFESTER, K.. SYNTHESIS OF COLLOIDAL PARTICLES IN MINIEMULSIONS. **Annual Review of Material Research**, v. 36, p. 231-279, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, P. 1451-1463, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M.. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4.ed. W. H. Freeman, 2004. 1130 p.

LI, P.; ZHU.; SUNINTABOON, P.; HARRIS, W.F.. New Route to Amphiphilic Core-Shell Polymer Nanospheres: Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate from Water-Soluble Polymer Chains Containing Amino Groups. **Langmuir**, v. 18, p. 8641-8646, 2002.

LI, P.; ZHU, J.M.; HARRIS, F.W.. **Amphiphilic core-shell latexes inventors**. Int Cl<sup>7</sup> CO8L 83/00. US. 6573313 B2. 16 jan. 2001, 3 jun. 2003.

LIANG, W.; CAO, X.. Preparation of a pH-sensitive polyacrylate amphiphilic copolymer and its application in cellulase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 140-146, 2013.

LIAO, H.; DING, C.; LI, Y.; MANG, Z.; YONGHUA, Z.; XUANMING, L.. Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticle to degrade microcrystalline cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 600-6604, 2010.

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

MITTAL, V.. Miniemulsion Polymerization: An Overview. In: MITTAL V.. **Miniemulsion Polymerization Technology**. Massachusetts: Scrivener Publishing LLC, 2010. p.1-23.

OOSHIMA, H.; SAKATA, M.; HARANO, Y.. Enhancement of enzymatic-hydrolysis of cellulose by surfactant. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 1727–1734, 1986.

PARRA, C.; ALBANO, C.; GONZÁLEZ, G.. **Effect of Surfactant Type on the Synthesis of PMMA Using Redox Initiation and High Frequency Ultrasound**, v. 48, p. 2066-2073, 2008.

RATANAKHANOKCHAI, K.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAIKOON, C.; KYU, K.L.; SAKKA, K.; KOSUGI, A.; MORI, Y.. **Biomass Now – Cultivation and Utilization**. Publicado online em 2013.

ROMIO, A.P.; BERNARDY, N.; SENNA, E.L.; ARAÚJO, P.H.H.; SAYER, C.. Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation. **Materials Science and Engineering: C**, v.29, p. 514-518, 2009.

SARAC, A.S.. Redox Polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 24, p. 1149-1204, 1999.

SAYER, C; ARAUJO, P.H.H.. Synthesis of Polymer Particles with Core-Shell Morphologies. In: MITTAL, V.. **Advanced Polymer Nanoparticles: Synthesis and Surface Modifications**. Londres: Taylor & Francis Group, CRC Press, 2010. p. 29-59.

SHULER, M.L.; KARGI, F.. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, 2009. 553 p.

SCHORK, F.J.; LUO, Y.; SMULDERS, W.; RUSSUM, J.P.; BUTTE, A.; FONTENOT, K.. Miniemulsion Polymerization. **Advanced Polymer Science**, v. 175, p. 129-255, 2005.

SILVA, J. A.; MACEDO, G.P.; RODRIGUES, D.S.; GIORDANO, R.L.C.; GONÇALVES, L.R.B.. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24, 2012.

SILVA, L.; SILVEIRA, M.H.L.; AGUIAR, R.S.; RAMOS, L.P.. Efeito de um surfactante não iônico na estabilidade de celulases do *Trichoderma reesei*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2011, Florianópolis. **Resumos**. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T2158-2.pdf>>. Acesso em: 8 abril 2015.

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

SOHRABI. N.; RASOULI. N.; TORKZADEH. M.. Enhanced stability and catalytic activity of immobilized  $\alpha$ -amylase on modified  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 240, p. 426-433, 2014.

TALBERT, J.N.; GODDARD, J.M.. Enzymes on material surfaces. **Colloidal and Surfaces B: Biointerfaces**. V, 93, p. 8-19, 2012.

UEDA, M.; KOO, H.; WAKIDA, T.. Cellulase treatment of cotton fabrics. Part II: Inhibitory Effect of Surfactants on Cellulase Catalytic Reaction. **Textile Research Journal**, v. 64, p. 615-618, 1994.

VALÉRIO, A.; NICOLETTI, G.; CIPOLATTI, E. P.; NINOW, J.L.; ARAÚJO, P. H.H.; SAYER, C.; OLIVEIRA, D.. Kinetic Study of *Candida antarctica* Lipase B Immobilization Using Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles Obtained by Miniemulsion Polymerization as Support. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p. 2961-2971, 2015.



VALÉRIO, A.; ARAÚJO, P.H.H.; SAYER, C.. Preparation of Poly(Urethane-urea) Nanoparticles Containing Açai Oil by Miniemulsion Polymerization. **Polímeros**, v. 23, p. 451-455, 2013.

VILLENUEVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J.. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p.113-148, 2000.

XINDE, F.. Role of aminium radical in the initiation of vinyl polymerization. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 2, p. 109 - 118, 1986.

ZANETTI-RAMOS, B.G.; LEMOS-SENNA, E.; SOLDI, V.; BORSALI, R.; CLOUTEL, E.; CRAMAIL, H.. Polyurethane nanoparticles from a natural polyol via miniemulsion technique. **Polymer**, v. 47, p. 8080-8087, 2006.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; TANG, L.. Effect of PEG4000 on cellulase catalysis in the lignocelluloses saccharification processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 115-120, 2011.

ZHANG, X.; ZHANG, Y.P.. CELLULASES: CHARACTERISTICS, SOURCES, PRODUCTION, AND APPLICATIONS. In: Y, S.; EL-ENSAHNY, H.; THONGCHUL, N.. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymer**. 1. ed. New York City: John Wiley & Sons, Inc, 2013. p. 131-146.

ZHOU, Y.; CHEN, H.; QI, F.; ZHAO, X.; LIU, D.. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 136-134, 2015.

ZHOU, J.. Immobilization of Cellulase on a Reversibly Soluble-Insoluble Support: Properties and Application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6741-6746, 2010.

ZHONG LIU, L.C.; HUI, L.; SI, C.. Effect of cellobiase and surfactant supplementation on the enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Bioresources**, v. 6, p. 3850 – 3858, 2011.

YANG, M.; ZHANG, A.; LIUA, B.; LI, W.; XINGA, J.. Improvement of cellulose conversion caused by the protection of Tween-80 on the adsorbed cellulose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 125-129, 2011.