

Janaina de Souza Lima

**IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS EM POLI(METACRILATO
DE METILA)**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Débora de
Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique
Hermes de Araújo

Florianópolis
2016

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

Lima, Janaina de Souza

Imobilização de Celulase em Nanopartículas Magnéticas Encapsuladas em Poli(metacrilato de metila) / Janaina de Souza Lima ; orientadora, Débora de Oliveira ; coorientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo - Florianópolis, SC, 2016.

85 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 de enzimas. 4. Nanopartículas magnéticas. 5. Hidrólise de bagaço de cana. I. De Oliveira, Débora. II. De Araújo, Pedro Henrique Hermes. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Janaina de Souza Lima

**IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS EM
POLI(METACRILATO DE METILA)**

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

Florianópolis, 09 de março de 2016.

Prof.^a Cíntia Soares, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a
Orientadora

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Coorientador

Banca Examinadora:

Prof. Antônio Augusto Ulson de Souza, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Jorge Luiz Ninow, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Aleksandra Valério
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a Deus e à
minha família.

AGRADECIMENTOS

Dirijo meus sinceros agradecimentos:

A Deus por iluminar a minha caminhada e tornar os meus sonhos possíveis.

À minha orientadora Débora de Oliveira pela confiança, dedicação, conselhos, incentivo e apoio.

Ao meu coorientador Pedro Henrique Hermes de Araújo pela inestimável contribuição e atenção.

Aos membros do Laboratório de Transferência de Massa e Simulação (Labmassa & Labsin) que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho e dividiram os momentos de desespero e alegrias. Ao Laboratório de Controle e Processos Poliméricos (LCP) pela infraestrutura cedida e auxílio técnico.

À minha família por me auxiliar em todos os momentos, pelo enorme carinho e por compreenderem a minha ausência. Com certeza essa conquista também é de vocês!

Ao meu namorado, Kaio, por dividir seu conhecimento, amizade e carinho imensuráveis. É um enorme prazer tê-lo como colega de profissão.

Aos amigos de toda a vida e àqueles que conheci nesse período pelas colaborações nas mais diversas formas e por tornarem a caminhada mais prazerosa.

E a todos que contribuíram na minha trajetória acadêmica.

“Lembre-se de Deus em tudo o que fizer de todo o coração e Ele lhe mostrará o caminho certo.”

(Provérbios 3:6)

RESUMO

As celulases têm sido amplamente empregadas em diversos segmentos industriais. Apesar das inúmeras vantagens, a aplicação dessas enzimas ainda é limitada devido ao seu elevado custo. A principal alternativa estudada para contornar esse problema é a imobilização em suportes sólidos. As nanopartículas magnéticas têm se mostrado uma excelente alternativa, pois apresentam propriedades ideais para imobilização de enzimas. As nanopartículas são facilmente oxidadas e tendem a se aglomerar ao longo do tempo. Assim, é necessário que as mesmas sejam revestidas para evitar contato com o meio reacional. O presente trabalho teve como objetivo estudar a imobilização da celulase em nanopartículas magnéticas encapsuladas em poli(metacrilato de metila). A caracterização das nanopartículas foi realizada por meio de análises de morfologia, diâmetro médio, comportamento magnético e decomposição térmica. As nanopartículas magnéticas encapsuladas apresentaram comportamento superparamagnético e diâmetro médio de 150 nm. Para concentração de 5% (v/v) de glutaraldeído e 100 mg/mL de enzima, foi obtido 49% de eficiência de imobilização, o que corresponde a 0,180 U/mL. Comparando com a enzima na forma livre, a celulase imobilizada apresentou a mesma faixa de pH ótimo, comportamento semelhante para a estabilidade térmica e ampliação da faixa ótima de temperatura. A capacidade de reuso foi testada e 69% da atividade enzimática inicial foi mantida após oito ciclos de uso. Os resultados de aplicação na hidrólise de bagaço de cana e biopolimento de fios de algodão comprovaram o elevado potencial de aplicação da celulase imobilizada. A metodologia de imobilização desenvolvida nesse trabalho se mostrou promissora e importante para a consolidação da tecnologia.

Palavras-chave: Celulase. Imobilização de enzimas. Nanopartículas magnéticas. Hidrólise de bagaço de cana. Biopolimento de tecidos.

ABSTRACT

Cellulases have been widely used in serious industrial process. Despite numerous advantages, the cellulase application is still limited due to its high cost. The main alternative studied to circumvent this problem is immobilization on solid supports. Magnetic nanoparticles have been shown excellent properties for enzymes immobilization. The nanoparticles are easily oxidized and tend to agglomerate in a long term. Thus, magnetic nanoparticles should be coated with materials that prevent their contact with the reaction medium. This study aimed to investigate the immobilization of cellulase on magnetic nanoparticles encapsulated in poly (methyl methacrylate). The characterization of these nanoparticles was performed by morphology, average diameter, magnetic behavior and thermal decomposition analysis. The magnetic nanoparticles encapsulated showed superparamagnetic behavior and average diameter of 150 nm. When 5% (v/v) of glutaraldehyde and 100 mg/mL of enzyme was applied, the immobilization efficiency reached 49%. This percentage corresponds to 0.18 U/mL. Compared to the free enzyme, immobilized cellulase showed the same range of optimum pH, similar behavior to the thermal stability and expansion of the optimal temperature range. The reuse capacity was tested and 69% of the initial enzyme activity was maintained after eight cycles of use. The application results in sugarcane bagasse hydrolysis and biopolishing of cotton yarn confirmed the high potential for application of immobilized cellulase. Immobilization methodology developed in this work was promising and important for the consolidation of this technology.

Keywords Cellulase. Enzymes immobilization. Magnetic nanoparticles. Sugarcane bagasse hydrolysis. Biopolishing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação da ligação peptídica.....	27
Figura 2 – Principais métodos de imobilização de enzimas.....	31
Figura 3 – Estrutura cristalina da magnetita.	34
Figura 4 – Comportamento magnético de materiais ferromagnéticos e superparamagnéticos na ausência e na presença de um campo magnético externo.	34
Figura 5 – Curva da magnetização (M) em função do campo magnético (H) para materiais multi-domínio.....	35
Figura 6 – Curva da magnetização (M) em função do campo magnético (H) para materiais mono-domínio.	36
Figura 7 – Mecanismo de polimerização em miniemulsão.	38
Figura 8 – Estrutura química da celulose.	39
Figura 9 – Sinergismo do complexo celulolítico.	39
Figura 10 – Metodologia aplicada para quantificação da atividade enzimática.	47
Figura 11 – Síntese das NPM estabilizadas com AO.....	48
Figura 12 – Metodologia utilizada para analisar a estabilidade operacional da enzima imobilizada.	52
Figura 13 – Ensaio de tração dos fios de algodão.	54
Figura 14 – Imagens de TEM das nanopartículas de PMMA contendo magnetita.	56
Figura 15 – Análise termogravimétrica das amostras de magnetita pura (1) e magnetita encapsulada (2).	57
Figura 16 – Curva de magnetização das amostras de magnetita pura (1) e magnetita encapsulada (2).	58
Figura 17 – Nanopartículas de magnetita encapsuladas no momento que o campo magnético foi aplicado (a) e instantes após a aplicação (b).....	59
Figura 18 – Reações entre glutaraldeído e as nanopartículas de PMMA.....	60
Figura 19 – Espectro do FTIR-ATR das amostras de celulase imobilizada, celulase livre e suporte (nanopartículas magnéticas encapsuladas).	62
Figura 20 – Influência do pH na atividade da enzima livre e imobilizada a 55 °C por 30 min.....	64
Figura 21 – Influência da temperatura na atividade da enzima livre e imobilizada por 30 min em pH 6,0.	65
Figura 22 – Perfis de atividade da enzima livre e imobilizada ao longo do tempo a 55 °C e pH 6,0.....	66
Figura 23 – Atividade enzimática após ciclos sucessivos de 30 min, 55 °C, pH 6,0 e concentração de substrato de 4% (m/v).....	67
Figura 24 – Análises de MEV do fio sem tratamento enzimático (a), tratado com a celulase livre (b) e tratado com a celulase imobilizada (c).....	71
Figura 25 – Amostras do fio de algodão após o tratamento com enzima livre e imobilizada.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Reagentes e materiais utilizados neste trabalho.	45
Tabela 2 - Formulação utilizada para encapsulação das NPM em PMMA.....	48
Tabela 3 – Propriedades magnéticas das NPM-AO e NPM-AO-PMMA a temperatura ambiente.....	58
Tabela 4 – Efeito da concentração de GA na eficiência de imobilização	60
Tabela 5 – Eficiência de imobilização em função da concentração de enzima. .	61
Tabela 6 – Efetividade da enzima livre e imobilizada na hidrólise do bagaço de cana.....	69
Tabela 7 – Concentração de açúcares redutores liberados durante o biopolimento e resistência à ruptura das amostras tratadas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO – ácido oleico
DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz
Ef – Efetividade da celulase na hidrólise do bagaço de cana
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto férrico
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato ferroso
FTIR-ATR – Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada
GA – Glutaraldeído
H – Campo magnético
Hr – Campo coercivo
MAV – Magnetometria de Amostra Vibrante
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
Mr – Magnetização remanente
Ms – Magnetização de saturação
NPM – Nanopartículas magnéticas
NPM-AO – Nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oleico
NPM-AO-PMMA – Nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oleico encapsuladas em poli(metacrilato de metila)
NPM-AO-PMMA-GA – Nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oleico encapsuladas em poli(metacrilato de metila) ativadas com glutaraldeído
PMMA – Poli(metacrilato de metila)
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
TGA – Termogravimetria
Y – Eficiência de imobilização

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO	25
1.2 OBJETIVOS	26
1.2.1 Objetivo Geral.....	26
1.2.2 Objetivos Específicos	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 ENZIMAS	27
2.1.1 Fatores que afetam a atividade enzimática.....	28
2.1.1.1 pH	28
2.1.1.2 Temperatura	28
2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	29
2.2.1 Métodos de imobilização	30
2.2.2 Suportes para a imobilização de enzimas	32
2.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	33
2.3.1 Encapsulação de magnetita via polimerização em miniemulsão.....	37
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 MATERIAIS E REAGENTES	45
3.2 CELULASE.....	46
3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
3.4 SÍNTESE E ATIVAÇÃO DO SUPORTE.....	47
3.4.1 Síntese das nanopartículas magnéticas estabilizadas com AO	47
3.4.2 Encapsulação das NPM em nanopartículas de PMMA via polimerização em miniemulsão.....	48
3.4.3 Ativação das nanopartículas com glutaraldeído	49
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE.....	49
3.5.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	49
3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	49
3.5.3 Termogravimetria (TGA)	49
3.5.4 Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV)	50
3.6 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO E SEUS PARÂMETROS	50
3.6.1 Imobilização da celulase	50

3.6.2	Eficiência de imobilização	50
3.6.3	Efeito da concentração de glutaraldeído na eficiência de imobilização	51
3.6.4	Efeito da concentração de enzima na eficiência de imobilização	51
3.6.5	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR).....	51
3.7	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	51
3.7.1	Determinação da faixa de pH ótimo.....	51
3.7.2	Determinação da faixa de temperatura ótima.....	52
3.7.4	Estabilidade térmica e ao armazenamento	52
3.7.5	Estabilidade operacional - Reuso	52
3.8	POTENCIAL PARA APLICAÇÕES	53
3.8.1	Hidrólise de bagaço de cana.....	53
3.8.2	Biopolimento de fio de algodão.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE	55
4.1.1	Morfologia e tamanho	55
4.1.2	Análise termogravimétrica.....	56
4.1.3	Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV).....	57
4.2	PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO	59
4.2.1	Efeito da concentração de glutaraldeído na eficiência de imobilização	59
4.2.2	Efeito da concentração de enzima na eficiência de imobilização	61
4.2.3	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR).....	62
4.3	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	63
4.3.1	Influência do pH na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada	63
4.3.2	Influência da temperatura na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada	64
4.3.3	Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada	65
4.3.4	Estabilidade operacional - Reuso	67
4.4	POTENCIAL PARA APLICAÇÕES	68
4.4.1	Hidrólise de bagaço de cana.....	68

4.2.2 Biopolimento do fio de algodão.....	69
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
5.1 CONCLUSÕES	73
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A constante busca por tecnologias de processamento ambientalmente corretas e que ao mesmo tempo sejam de baixo custo e permitam acelerar os processos de produção, constitui um estímulo para pesquisadores e cientistas de forma global. Neste contexto, a substituição de catalisadores químicos convencionais por enzimas vem se mostrando uma alternativa atraente e promissora.

As celulasas, enzimas capazes de converter celulose em glicose, têm sido amplamente empregadas em diversos segmentos industriais, tais como alimentos e bebidas, têxtil, ração animal, papel e celulose, bem como em pesquisa e desenvolvimento (BHAT, 2000). Além disso, essas enzimas têm se mostrado potenciais tecnicamente na hidrólise de materiais lignocelulósicos em glicose, que é utilizada para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol um dos produtos de maior interesse (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Apesar das inúmeras vantagens oferecidas pela catálise enzimática e dos grandes avanços alcançados em relação à eficiência das celulasas, o seu elevado custo ainda limita sua aplicação. Para contornar esse problema, o desenvolvimento de novas tecnologias que reduzem a quantidade de enzima necessária para a hidrólise da celulose tem sido alvo de inúmeros estudos. Neste cenário, a imobilização em suportes sólidos tem se mostrado uma excelente alternativa, uma vez que a enzima pode ser reutilizada e sua estabilidade melhorada, diminuindo o custo da enzima.

Dentre os diferentes suportes utilizados, as nanopartículas magnéticas vêm ganhando grande destaque por apresentarem características ideais para imobilização de enzimas, incluindo elevada área superficial, eficiente retenção de atividade, além de permitir que os biocatalisadores imobilizados sejam recuperados de forma rápida e simples, mesmo na presença de sólidos (CHO et al., 2012).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas, porém poucos deles comprovaram a eficácia da tecnologia em processos reais. Na maioria dos estudos envolvendo a celulase foram utilizadas partículas magnéticas sem qualquer tipo de revestimento, o que torna esses materiais altamente susceptíveis à oxidação, com consequente perda da resposta magnética.

Dessa forma, é possível observar que essa tecnologia ainda carece de estudos para se tornar uma alternativa viável e atraente.

Com o intuito de contribuir para o avanço da tecnologia de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas e de consolidação de aplicação das celulases, esse trabalho teve como objetivo estudar a imobilização da celulase em nanopartículas magnéticas encapsuladas em matriz polimérica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo estudar a imobilização da celulase em nanopartículas magnéticas revestida com poli(metacrilato de metila).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as nanopartículas obtidas em relação ao seu tamanho e propriedades magnéticas;
- Investigar os efeitos da concentração do agente ativador (glutaraldeído) e da enzima na eficiência de imobilização;
- Avaliar os efeitos da imobilização nas características da enzima em relação ao pH, temperatura e estabilidade térmica;
- Averiguar a capacidade de reuso da enzima imobilizada;
- Analisar o potencial de aplicação das enzimas imobilizadas simulando os processos reais de hidrólise de bagaço de cana e biopolimento de tecidos.

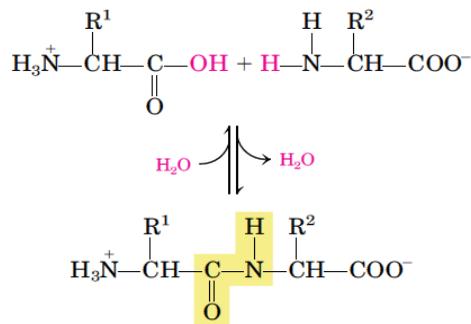
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre assuntos relevantes para compreensão e contextualização do trabalho. Na primeira seção será apresentada uma abordagem geral sobre enzimas. Na seção seguinte, serão discutidos os principais aspectos relacionados à imobilização de enzimas. Na terceira seção, serão apresentadas informações sobre nanopartículas magnéticas e suas propriedades. Por fim, será discutido o mecanismo de atuação das celulases, a importância da imobilização para aplicação industrial dessas enzimas e alguns trabalhos relacionados à imobilização em nanopartículas magnéticas.

2.1 ENZIMAS

Enzimas são biomoléculas que atuam como catalisadores, aumentando a velocidade de reações químicas sem alterar o equilíbrio e sem serem consumidos. Com exceção de um pequeno grupo de RNA catalítico, todas as enzimas são de natureza proteica, sendo constituídas por longas cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Essas ligações são resultantes da reação de condensação entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro (Figura 1) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Figura 1 - Formação da ligação peptídica.



Fonte: LEHNINGER; NELSON; COX (2008).

Ao contrário da maioria dos catalisadores químicos, as enzimas apresentam elevado poder catalítico, atuam em condições brandas (temperatura e pressão) e sua atividade pode ser regulada de acordo com as condições operacionais. Além disso, são altamente específicas e

seletivas, o que significa que cada enzima catalisa um tipo de reação para um dado substrato em particular ou para um pequeno grupo de substratos intimamente relacionados. Essa característica é atribuída a uma região denominada sítio ativo. Para que uma molécula seja reconhecida como substrato, ela precisa ter a forma adequada para se acomodar no sítio ativo, além de grupos químicos capazes de estabelecer ligações com os grupos R presentes (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008; MARZZOCO; TORRES, 2007).

2.1.1 Fatores que afetam a atividade enzimática

Cada enzima tem uma estrutura tridimensional específica que lhe permite exercer sua função, denominada de conformação nativa. Trata-se da conformação mais estável que uma proteína pode assumir, refletindo um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula e entre esta e o seu meio ambiente. Logo, a estrutura e a forma do sítio ativo da enzima podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de alterar esse equilíbrio, tornando a atividade enzimática dependente das características do meio, como pH e temperatura (BON et al., 2008; MARZZOCO; TORRES, 2007).

2.1.1.1 pH

Variações de pH podem provocar mudanças no estado de ionização dos aminoácidos que constituem a enzima, afetando a afinidade do sítio ativo pelo substrato e/ou causando mudanças na estrutura tridimensional. Em alguns casos, pode ocorrer também a ionização da molécula de substrato, diminuindo sua afinidade com o sítio ativo. Por essas razões, o poder catalítico é mantido apenas em uma faixa de pH, conhecida como faixa de estabilidade. Valores de pH fora dessa faixa causam a desnaturação da enzima com perda permanente da atividade. A estreita faixa onde a atividade catalítica é máxima é denominada como faixa de pH ótimo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008; LIU, 2013; MURRAY; HARPER, 2004; SHULER; KARGI, 1992).

2.1.1.2 Temperatura

Assim como os catalisadores químicos, o aumento da temperatura favorece a atividade catalítica das enzimas devido ao aumento da energia cinética. No entanto, o aumento da temperatura também aumenta a energia vibracional das moléculas causando o

rompimento de ligações fracas, especialmente as ligações de hidrogênio. A quebra dessas ligações provoca alterações conformacionais que levam à desnaturação da enzima, causando queda brusca da atividade. Tal fato é observado, geralmente, em temperaturas acima da faixa de temperatura ótima, onde a atividade catalítica é máxima (GARCIA; OH; ENGLER, 1989; LIU, 2013; MARZZOCO; TORRES, 2007).

2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A hidrólise enzimática fornece muitas vantagens em relação aos processos catalíticos convencionais, como elevada seletividade e especificidade, ocorre em condições brandas, é ambientalmente segura e gera menor quantidade de subprodutos, e sua aplicação é difundida nas mais diversas áreas. No entanto, a consolidação da tecnologia ainda é limitada pelo elevado custo, baixa estabilidade do biocatalisador e, principalmente, pela dificuldade de recuperação da enzima do meio reacional para posterior reutilização. Para contornar esses problemas a imobilização de enzimas tem sido a alternativa mais estudada.

A imobilização oferece como principais vantagens a fácil separação e a possibilidade de reutilização da enzima. Além disso, o desempenho da enzima, como atividade, seletividade e estabilidade operacional e ao armazenamento, também pode ser melhorado. A facilidade de separação simplifica a etapa de purificação do produto, minimiza os problemas com o manejo do efluente, facilita a interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão, além de permitir a operação em modo contínuo. O uso repetido da enzima proporciona maior produtividade e diminui o custo de aplicação, podendo tornar um processo catalisado por enzima economicamente viável (DE CASTRO et al., 2008; KATCHALSKI-KATZIR, 1993; SHELDON; VAN PELT, 2013; SHULER; KARGI, 1992; TISCHER; KASCHE, 1999). Em alguns casos, pode haver perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização, a enzima imobilizada pode sofrer restrições difusionais e o custo pode ser elevado. No entanto, como as vantagens superam as limitações, essas desvantagens devem ser consideradas como pontos a serem evitados (DE CASTRO et al., 2008).

A imobilização de enzimas deve considerar diversos aspectos e integrar o conhecimento em diversas áreas, incluindo enzimologia, reações químicas, ciência dos materiais e superfícies. O desenvolvimento de um processo de imobilização deve almejar os seguintes aspectos: (i) resistência mecânica da enzima imobilizada; (ii) simplicidade do protocolo de imobilização; (iii) possibilidade de acoplar a imobilização

com a purificação da enzima; (iv) impacto da imobilização na atividade catalítica; (v) estabilização da enzima através da prevenção de interações intermoleculares pelo enrijecimento estrutural da enzima ou pela prevenção da dissociação de subunidades da enzima; (vi) modulação da seletividade e/ou especificidade da enzima; (vii) redução dos problemas de inibição (GARCIA-GALAN et al., 2011).

2.2.1 Métodos de imobilização

Os principais métodos de imobilização podem ser classificados em dois grupos (Figura 2): ligação em suportes sólidos (adsorção e ligação covalente) e confinamento (em matriz polimérica, cápsulas ou membranas) (SHULER; KARGI, 1992). Embora exista uma grande diversidade de métodos para imobilizar enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. Assim, ao desenvolver um processo de imobilização é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e elevada estabilidade operacional (MENDES et al., 2011).

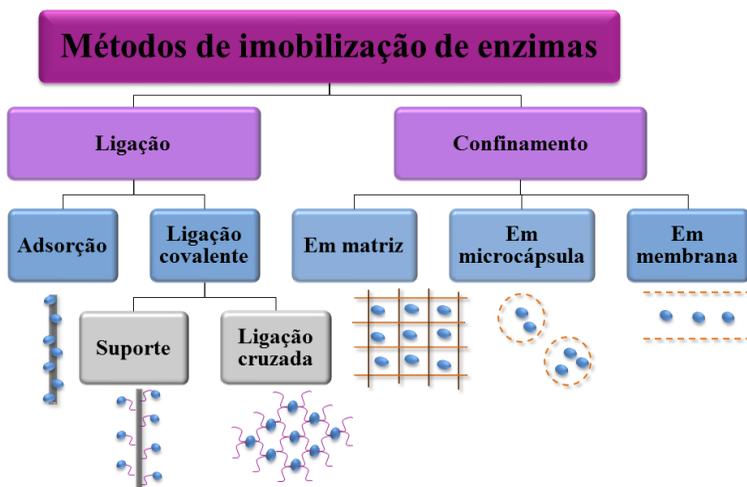
Os métodos de confinamento consistem no aprisionamento da enzima dentro de um pequeno espaço, que pode ser nos poros de uma matriz polimérica, no interior de cápsulas ou entre membranas (SHELDON, 2007; SHULER; KARGI, 1992). A principal vantagem desses métodos é não haver ligações químicas entre o suporte e a enzima, fazendo com que a estrutura da mesma seja mantida (DUTTA, 2008). Ademais, as enzimas são protegidas de condições inadequadas de pH, temperatura e presença de solventes orgânicos no meio reacional. Contudo, a imobilização por confinamento apresenta problemas intrínsecos, tais como o escape da enzima do suporte e significativas limitações difusionais (SHULER; KARGI, 1992).

A imobilização por meio de ligação pode ser realizada por adsorção, interações iônicas ou através de ligações covalentes entre grupos reativos do suporte e do biocatalisador (TISCHER; KASCHE, 1999).

A ligação por meio de adsorção e/ou interações iônicas consiste na adesão da enzima no suporte por meio de ligações fracas, como interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e/ou interações iônicas. Trata-se de uma técnica simples, rápida, de baixo custo e, geralmente, causa pouca ou nenhuma mudança conformacional na enzima, preservando sua atividade catalítica. Contudo, devido à natureza fraca das ligações, as enzimas podem ser lixiviadas

durante sua aplicação (DE CASTRO et al., 2008; SHELDON; VAN PELT, 2013; SHULER; KARGI, 1992).

Figura 2 – Principais métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Acervo da autora.

Os métodos de ligação covalente se baseiam na formação de ligações fortes entre grupos funcionais presentes na superfície da enzima e do suporte (DE CASTRO et al., 2008). Estas ligações podem ocorrer diretamente no suporte ou através de um agente ativador (DUTTA, 2008). Os grupos funcionais da enzima que participam dessa ligação, grupamento amino, carboxila, hidroxila e/ou sulfidrílo, não devem fazer parte do sítio ativo para que a atividade seja mantida (SHULER; KARGI, 1992). Essa técnica reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas, evitando o desdobramento e desnaturação da proteína. A ligação covalente tem a vantagem de fixar a enzima firmemente ao suporte, evitando sua lixiviação. Porém, a modificação química da enzima pode acarretar em perdas de atividade (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003; SHELDON, 2007).

Outro método de imobilização de enzimas é a ligação cruzada entre enzimas por meio de agentes reticulantes, formando agregados insolúveis sem a presença de um suporte sólido. Essa técnica pode causar mudanças significativas no sítio ativo de enzima e também pode resultar em limitações de difusionais (DE CASTRO et al., 2008; SHULER; KARGI, 1992).

Uma desvantagem de utilizar enzimas ligadas a suportes, independente do método utilizado, é a introdução de uma grande proporção de massa não-catalítica, ou seja, grande parte da massa total não é enzima, geralmente de 90 a 99%. Como consequência, são obtidos produtividades e rendimentos volumétricos e de espaço-tempo menores (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003; SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005).

2.2.2 Suportes para a imobilização de enzimas

As propriedades das enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades da enzima e do suporte. A interação entre os dois fornece uma enzima imobilizada com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. As características do suporte são de importância primordial no desempenho do sistema de enzima imobilizada (TISCHER; KASCHE, 1999). A escolha adequada do suporte pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, porém a escolha incorreta pode afetar não só a estabilidade, mas o desempenho global do sistema (DE CASTRO et al., 2008; MENDES et al., 2011).

A seleção de um suporte deve considerar suas propriedades físicas e químicas, sua capacidade de reter atividade e a possibilidade de regeneração do material. A escolha também deve avaliar as características de processo, como o tipo de reator utilizado (batelada, tanque agitado, coluna e fluxo pistonado), características do meio reacional (aquoso, solvente orgânico ou sistema de duas fases), o sistema de reação (pasta, líquido-líquido, as condições do líquido-sólido ou sólido para sólido) e as condições do processo (pH, temperatura e pressão) (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003).

As principais características do suporte a serem observadas para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, dentre outras (DE CASTRO et al., 2008; TISCHER; KASCHE, 1999).

Na literatura são encontrados suportes de diferentes composições, formas, estruturas e tamanhos (BLANCO et al., 2004; CHEN; CHING; XU, 2009; INCE et al., 2012; KAMEI; OKUBO; MATSUMOTO, 1987; KHOSHNEVISAN et al., 2011; KIM et al., 2006; MOHY ELDIN et al., 2000; PASCOAL; MITIDIERI; FERNANDES, 2011; PHADTARE et al., 2003). Dentre eles, as

nanopartículas vêm ganhando destaque por apresentarem características ideais para imobilização de enzimas, incluindo elevada área superficial, eficiente retenção de atividade, baixa limitação difusional do biocatalisador imobilizado.

2.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

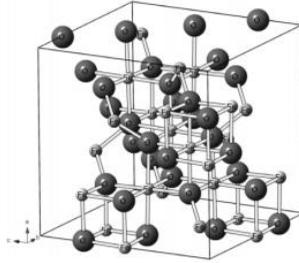
Há alguns anos, as nanopartículas magnéticas têm sido alvo de estudos em várias áreas de aplicação, em especial, na imobilização de enzimas, devido à sua baixa toxicidade, boas propriedades mecânicas, estabilidade térmica, elevada área superficial, resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano, e, principalmente, devido à rápida separação do meio reacional simplesmente pela aplicação de um campo magnético externo (LIU et al., 2004; TARTAJ et al., 2003; TISCHER; KASCHE, 1999). Alguns estudos de imobilização de enzimas mostraram que esses materiais podem ser uma alternativa de baixo custo e capaz de manter eficientemente a atividade catalítica (ALAM et al., 2015; ALTUN et al., 2015; FENG et al., 2016; KIM et al., 2016; LIAO et al., 2010; PARK et al., 2011; XIE; ZANG, 2016).

Dentre os materiais magnéticos estudados, a magnetita (Fe_3O_4) é o que tem atraído maior interesse tecnológico, especialmente sob a forma de ferrofluido, devido às excelentes propriedades magnéticas, facilidade de síntese e biodegradabilidade.

A magnetita é um óxido de ferro e sua estrutura cristalina consiste de uma rede de íons de oxigênio coordenados tanto a íons ferrosos (Fe^{2+}) e íons férricos (Fe^{3+}), nos interstícios octaédricos, quanto a íons Fe^{3+} , em interstícios tetraédricos (Figura 3) (TEJA; KOH, 2009). Como os íons Fe^{3+} estão divididos igualmente entre as posições tetraédricas e octaédricas, não existe momento magnético resultante da presença dos mesmos. Assim, o comportamento magnético do material é proveniente apenas dos íons Fe^{2+} , que estão localizados apenas nos interstícios octaédricos (KLOTZ et al., 2008; OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013).

O comportamento, ou magnetização (M), de um material em relação a um campo magnético externo (H) é a soma vetorial da magnetização de cada um de seus domínios por unidade de volume (TEJA; KOH, 2009).

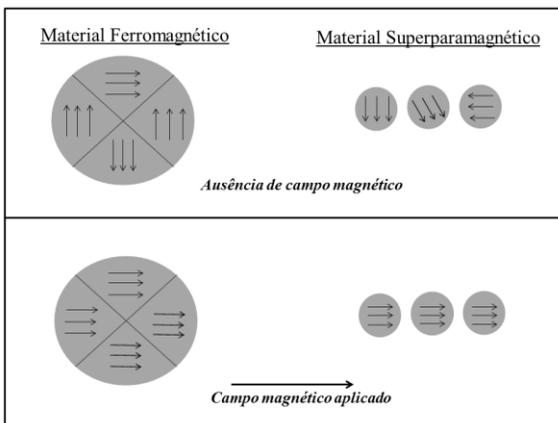
Figura 3 – Estrutura cristalina da magnetita.



Fonte: OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA (2013).

De acordo com a orientação dos domínios na ausência de um campo magnético, os materiais podem ser classificados como: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos, antiferromagnéticos e superparamagnéticos. A magnetita apresenta propriedades ferromagnéticas em escala micrométrica e propriedades superparamagnéticas em escala nanométrica. Isto ocorre porque à medida que o tamanho do material diminui, o número de domínios diminui até que haja um único domínio, fazendo com que a resposta ao campo magnético seja diferente. O comportamento dos materiais ferromagnéticos e superparamagnéticos são representados na Figura 4.

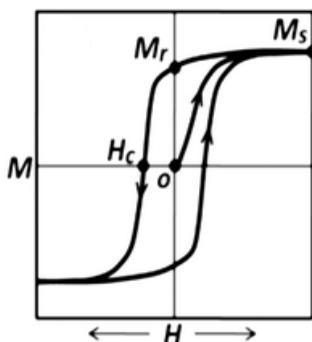
Figura 4 – Comportamento magnético de materiais ferromagnéticos e superparamagnéticos na ausência e na presença de um campo magnético externo.



Fonte: Acervo da autora.

Os materiais ferromagnéticos são facilmente magnetizados e tem como resposta um ciclo de histerese, como o mostrado na Figura 5, quando um campo magnético é aplicado. Observa-se que a magnetização pode ir de zero ao valor máximo, ou magnetização de saturação (M_s), com uma pequena mudança de campo aplicado. Esse comportamento é resultado do gradativo alinhamento dos domínios magnéticos, até que o valor máximo seja atingido, onde todos os domínios estão alinhados paralelamente com o campo. Ao reduzir o campo a zero, depois de alcançado a M_s , nem todos os domínios voltam para as suas orientações originais, resultando em um valor residual de magnetização remanente ou residual (M_r). Para que a M se anule, é necessário a aplicar um campo magnético em sentido contrário, cujo valor é denominado campo coercivo ou coercividade (H_c). Variando o módulo do campo, chega-se novamente à região de saturação e o ciclo é repetido no sentido inverso (EASOM et al., 1994; RIBEIRO, 2000).

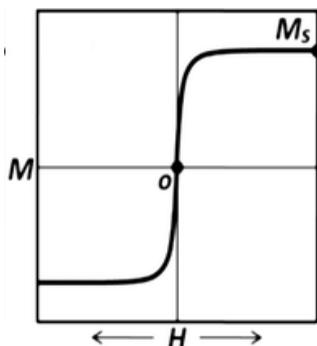
Figura 5 – Curva da magnetização (M) em função do campo magnético (H) para materiais multi-domínio.



Fonte: FREY et al. (2009)

Nos materiais superparamagnéticos, por outro lado, não há histerese, sendo a resposta uma curva como mostrada na Figura 6. Como todos os momentos magnéticos estão alinhados na mesma direção, eles não apresentam magnetização remanente e a magnetização de saturação é alcançada com menores campos magnéticos comparado com materiais macroscópicos análogos, implicando em maior resposta. Além disso, como a reversão da magnetização é dependente da rotação coerente dos momentos magnéticos, esses materiais também apresentam maior coercividade (MATHEW; JUANG, 2007).

Figura 6 – Curva da magnetização (M) em função do campo magnético (H) para materiais mono-domínio.



Fonte: FREY et al. (2009).

Um problema inevitável das nanopartículas é a sua instabilidade intrínseca em longo prazo. As partículas tendem a se aglomerarem para diminuir a energia livre de superfície. Além disso, como são muito reativas, as partículas magnéticas são facilmente oxidadas e sua estrutura pode ser alterada quando expostas ao meio reacional, resultando em perda de magnetismo e dispersibilidade. Portanto, para muitas aplicações é crucial que as nanopartículas sejam revestidas com surfactantes, polímeros ou material inorgânico, como sílica ou carbono, para prevenir sua possível oxidação e, ao mesmo tempo, sua aglomeração. Além disso, o material de revestimento pode fornecer grupos funcionais para ligação de outras moléculas, como enzimas e drogas (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007; TARTAJ et al., 2003).

Na literatura são encontradas diversas técnicas para estabilização de partículas magnéticas com polímeros, como precipitação *in situ* do material magnético na presença do polímero, adsorção física ou química do polímero sobre o material magnético e encapsulação do material em polímeros por meio de processos de polimerização (CHIARADIA et al., 2015; DUMAZET-BONNAMOUR; LE PERCHEC, 2000; FEUSER et al., 2015; VEIGA et al., 2000).

A encapsulação de compostos insolúveis, como a magnetita, por meio de técnicas convencionais de polimerização, como precipitação e emulsão, é muitas vezes difícil ou impossível devido ao processo de difusão. Nesse contexto, a técnica em miniemulsão se mostra a mais adequada, pois a polimerização ocorre na própria gota de monômero onde os compostos insolúveis ficam dispersos. Assim, os problemas com difusão são eliminados e a encapsulação ocorre facilmente. Alguns

estudos reportaram encapsulação eficiente da magnetita através dessa técnica e as partículas obtidas apresentaram distribuição estreita de tamanho médio e comportamento superparamagnético (CHIARADIA et al., 2015; FEUSER et al., 2015; LIU et al., 2004; RAMÍREZ; LANDFESTER, 2003; RAMOS; FORCADA, 2011).

2.3.1 Encapsulação de magnetita via polimerização em miniemulsão

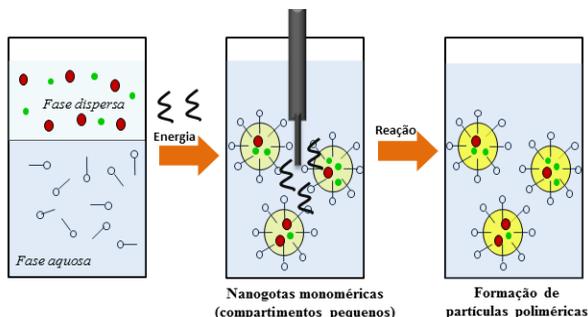
Miniemulsões são classicamente definidas como dispersões aquosas de gotículas de óleo altamente estáveis, de tamanho entre 50,0 e 500 nm, que são formadas pela aplicação de elevada energia de cisalhamento (LANDFESTER, 2000).

Um sistema de miniemulsão é formado por uma fase dispersa, monômero e co-surfactante, e uma fase contínua, água e surfactante em concentração abaixo da concentração micelar crítica. Todos esses componentes são homogeneizados sob elevada pressão para se obter gotas homogêneas e monodispersas. Em seguida, estas gotas são polimerizadas pela adição de iniciador e/ou aumento da temperatura (LANDFESTER, 2001; LANDFESTER, 2000). O mecanismo de polimerização em miniemulsão está representado na Figura 7.

A elevada estabilidade das partículas poliméricas que são obtidas é resultado dos efeitos combinados do surfactante e do co-surfactante, que suprimem a coalescência e a maturação de Ostwald, respectivamente. O co-surfactante é um composto solúvel na fase dispersa e é responsável por diminuir a energia livre das gotículas, reduzindo assim a força motriz para a difusão (CRESPY; LANDFESTER, 2010; LANDFESTER; WEISS, 2010; LIU et al., 2004).

A ausência de micelas e o pequeno tamanho das gotas resultam na supressão da difusão e solubilização do monômero na fase aquosa. Como resultado, a polimerização ocorre nas próprias gotas de monômero. Em outras palavras, o lócus de reação na polimerização em miniemulsão encontra-se nas próprias gotas do monômero, sendo essas consideradas nanorreatores, sendo esta uma das principais vantagens do método (LANDFESTER, 2001; LANDFESTER, 2000; LIU et al., 2004; ROMIO et al., 2009). É essa característica que permite que compostos insolúveis sejam encapsulados com elevada eficiência e em uma única etapa.

Figura 7 – Mecanismo de polimerização em miniemulsão.



Fonte: Acervo da autora.

Dentre os diversos polímeros sintéticos e naturais, o poliestireno e poli(metacrilato de metila) (PMMA) são os mais utilizados para encapsulação de partículas magnéticas e, em geral, apresentam elevada resistência mecânica e estabilidade química (LIU et al., 2004).

FEUSER et al. (2015) apresentaram bons resultados para a encapsulação de nanopartículas de magnetita em PMMA via polimerização em miniemulsão. As nanopartículas obtidas apresentaram comportamento superparamagnético e tamanho aproximado de 100 nm.

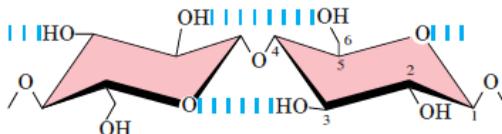
2.4 IMOBILIZAÇÃO DE CELULASES

As celulases constituem um complexo enzimático capaz de hidrolisar a celulose em oligossacarídeos e glicose. De acordo com seu local de atuação no substrato, as enzimas desse complexo são divididas em três grandes grupos: endoglucanases, que atuam de forma aleatória na região interna da fibra celulósica; exoglucanases, que clivam ligações na região externa da celulose; e β -glicosidasases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (BON et al., 2008; LYND et al., 2002; POLAINA; MACCABE, 2007).

A celulose é um homopolímero formado por unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas (Figura 8). Apesar da sua simplicidade química, a estrutura física e morfológica da celulose é complexa e heterogênea, apresentando regiões amorfas (localizadas internamente) e regiões altamente cristalinas (localizadas nas extremidades da fibra celulolítica). Em virtude da complexa estrutura, a completa conversão da celulose em glicose depende da atuação sinérgica

das enzimas do complexo celulolítico (Figura 9) (MANSFIELD; MEDER, 2003).

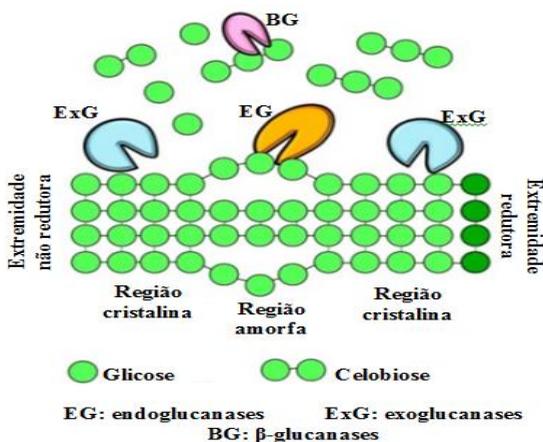
Figura 8 – Estrutura da química da celulose.



Fonte: LEHNINGER; NELSON; COX (2008).

As endoglucanases são responsáveis por iniciar a hidrólise. Esse grupo de enzimas atua de forma aleatória na região amorfa liberando oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização. As exoglucanases atuam nas extremidades da fibra de celulose e dos oligossacarídeos liberados pelas endoglucanases, gerando celbiose ou glicose como produtos principais. As β -glucanases hidrolisam os oligossacarídeos e celbiose, liberados pelas outras enzimas, em glicose. Além de finalizar a despolimerização, a ação dessas enzimas também é importante para evitar a inibição das endoglucanases devido ao acúmulo de celbiose (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; LYND et al., 2002; MANSFIELD; MEDER, 2003; POLAINA; MACCABE, 2007).

Figura 9 – Sinergismo do complexo celulolítico.



Fonte: Adaptada de (RATANAKHANOKCHAI et al., 2013).

As celulasas são amplamente utilizadas em diversos segmentos industriais, tais como alimentos e bebidas, têxtil, ração animal, papel e celulose, bem como em pesquisa e desenvolvimento (BHAT, 2000). Além disso, essas enzimas têm se mostrado atraentes na hidrólise de materiais lignocelulósicos em glicose, que é utilizada para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol um dos produtos de maior interesse (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Apesar de a hidrólise enzimática ocorrer sob condições suaves, oferecer produtos com melhor qualidade e ser um mecanismo ambientalmente limpo, os custos elevados e os problemas com inibição pelos produtos finais ainda limitam a aplicação das celulasas em escala industrial. Na indústria têxtil, aplicação das celulasas causa perda de peso e resistência à tração do tecido devido à facilidade de penetração da enzima no interior da fibra celulósica. Para superar esses problemas, a imobilização em suportes sólidos tem sido a principal abordagem estudada, pois permite que a enzima seja facilmente recuperada e reutilizada, podendo inclusive melhorar o desempenho da mesma em termos de atividade, estabilidade e/ou seletividade.

A fácil separação da enzima simplifica os processos de purificação do produto e permite que os produtos finais sejam removidos continuamente, eliminando os problemas com inibição e evitando a contaminação do produto por proteína. Esses benefícios associados às vantagens econômicas proporcionadas pela reutilização da enzima podem ajudar na implantação ou consolidação de um processo de hidrólise enzimática. Ademais, a imobilização promove a aproximação das enzimas do complexo celulolítico, permitindo que as mesmas tenham mais acesso, em relação à sua forma solúvel, ao seu respectivo substrato (GARCIA; OH; ENGLER, 1989).

Diferentes métodos têm sido estudados na imobilização de celulasas em diferentes suportes (BOLIVAR et al., 2009; DAOU; KADDOUR; SADOUN, 2010; DINÇER; TELEFONCU, 2007; KUMAKURA, 1997; PALJEVAC et al., 2007; PAZARLIOĞLU; SARIŞIK; TELEFONCU, 2005; UNGUREAN; PAUL; PETER, 2013; WANG et al., 2013; XU et al., 2011; ZANG et al., 2014). No entanto, a reutilização da enzima ainda é limitada porque, na maioria dos trabalhos desenvolvidos, a sua recuperação ocorre através de operações unitárias comuns, como centrifugação ou filtração. Logo, a sua recuperação do meio reacional é na maioria das vezes uma tarefa difícil ou até mesmo impossível quando se trata de matérias-primas sólidas, como os materiais lignocelulósicos. Nesse contexto, as nanopartículas magnéticas vêm

ganhando destaque por apresentarem características ideais para imobilização de enzimas, incluindo elevada área superficial, eficiente retenção de atividade, além de permitir que os biocatalisadores imobilizados sejam recuperados de forma rápida e simples, mesmo na presença de sólidos (CHO et al., 2012).

A imobilização da celulase tem sido estudada em nanopartículas com diferentes características e bons resultados têm sido reportados.

LIAO et al. (2010) utilizaram um sistema em microemulsão para imobilizar a celulase em nanopartículas de PVA/magnetita de 270 nm. A enzima imobilizada foi aplicada na hidrólise de celulose microcristalina, apresentando eficiência próxima à da enzima livre. Após quatro ciclos de reuso, 40% da atividade da celulase imobilizada foi mantida.

XU et al. (2011) estudaram a imobilização da celulase em nanopartículas de magnetita de 11,5 nm ativadas com glutaraldeído. Em relação à sua forma livre, a celulase imobilizada apresentou maior tolerância ao pH e temperatura, maior estabilidade de armazenamento e maior afinidade pelo substrato.

JORDAN; KUMAR; THEEGALA (2011) investigaram a imobilização do complexo celulolítico em nanopartículas de magnetita funcionalizadas com carbodiimida. O diâmetro das partículas utilizadas foi de 13,3 nm. Não foram apresentados resultados sobre o comportamento magnético das nanopartículas magnéticas. A eficiência de imobilização foi de aproximadamente 90%. No entanto, durante os ensaios de reuso, 47,5% da atividade catalítica da enzima foi perdida e, ao final de seis ciclos de reuso, apenas 10% da atividade foi mantida. As enzimas imobilizadas apresentaram estabilidade térmica em faixa mais ampla de temperatura.

KHOSHNEVISAN et al. (2011) relataram elevada eficiência de imobilização da celulase, por meio de adsorção física, em nanopartículas de magnetita com revestimento iônico. Embora a celulase imobilizada tenha apresentado atividade mais elevada que a livre em pH elevado, sua atividade foi inferior para pH ácido e para quase toda a faixa de temperatura estudada. Não foram apresentados testes de reuso, mas de acordo com alguns pesquisadores, as técnicas de imobilização que envolve ligação fraca entre a celulase e o suporte não recomendadas porque a enzima pode se soltar facilmente do suporte devido sua elevada afinidade pelo substrato (HIRSH et al., 2010; LINDER et al., 1995).

No trabalho desenvolvido por ABRAHAM et al. (2014), a celulase foi imobilizada em nanopartículas de magnetita dopadas com zinco e funcionalizadas com glutaraldeído. A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica para temperaturas mais elevadas.

Após 10 ciclos de uso na hidrólise do substrato solúvel, aproximadamente 40% da atividade enzimática ainda foi mantida. Os resultados de eficiência de hidrólise da celulase imobilizada na hidrólise de um substrato celulósico natural, o cânhamo, foram tão bons quanto os obtidos pela celulase livre.

ZANG et al. (2014) reportaram 72,4% de eficiência de imobilização da celulase em nanopartículas de magnetita recobertas com quitosana e funcionalizadas com glutaraldeído. As enzimas imobilizadas apresentaram estabilidade térmica em faixa mais ampla de temperatura. Após dez ciclos de reuso, 50% da atividade foi mantida. Apesar dos bons resultados, esse suporte não pode ser utilizado para celulases ácidas porque a quitosana pode ser dissolvida, impossibilitando a recuperação da enzima. Além disso, a quitosana pode ter sua estrutura afetada durante períodos longos de uso.

ZHANG et al. (2015a) avaliaram as propriedades da celulase imobilizada em nanopartículas de magnetita funcionalizadas com três tipos diferentes de silanos. A imobilização da enzima no suporte ocorreu por adsorção eletrostática. A maior eficiência de imobilização obtida foi de 87%.

A maioria dos estudos de imobilização de celulases utiliza nanopartículas sem revestimento, porém isso faz com que elas estejam altamente susceptíveis à oxidação, diminuindo sua resposta ao campo magnético. Como consequência, o suporte apresenta uma vida útil curta, diminuindo o potencial de reuso da enzima. Ademais, o produto pode ser contaminado devido à perda de magnetização da amostra, gerando problemas de processo, principalmente quando aplicados em indústria de alimentos, bebidas e têxtil.

2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Diante do que foi exposto ao longo deste capítulo e a partir do levantamento de trabalhos relevantes sobre a imobilização de celulases em nanopartículas magnéticas, nota-se o potencial dessa tecnologia para superar os problemas de recuperação e reuso da enzima. Na maioria dos trabalhos, a imobilização da celulase foi realizada em partículas magnéticas puras ou revestidas com materiais com propriedades indesejáveis para aplicação industrial, o que as tornam altamente susceptíveis à oxidação, diminuindo drasticamente sua vida útil. Além disso, o revestimento é importante para evitar a aglomeração das nanopartículas, mantendo a elevada área superficial para imobilização. Assim, o presente trabalho aborda a imobilização em nanopartículas

magnéticas encapsuladas em poli(metacrilato de metila) visando contribuir com o desenvolvimento e consolidação da tecnologia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os equipamentos, reagentes e procedimentos experimentais utilizados neste trabalho. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os reagentes e materiais utilizados neste trabalho estão apresentados na Tabela 1. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos sem prévias purificações.

Tabela 1- Reagentes e materiais utilizados neste trabalho.

Reagentes	Fornecedor
Ácido 3,5-Dinitrosalicílico P.A. ($C_7H_4N_2O_7$)	Vetec
Ácido oleico P.A. ($C_{18}H_{34}O_2$)	Vetec
Ácido sulfúrico P.A. (H_2SO_4)	Synth
Álcool polivinílico (PVA) 80% hidrolisado	Poly-Sciences, Inc
Carboximetilcelulose de sódio (90.000 Daltons) ($C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$)	Sigma-Aldrich
Cloreto de Ferro III ($FeCl_3 \cdot 7H_2O$) P.A.	Vetec
Crodamol GTCC	Alfa Aesar
Glutaraldeído P.S. (sol. 25% em H_2O) ($C_5H_8O_2$)	Vetec
Fosfato de potássio monobásico	Vetec
Anidro P.A. (K_2HPO_4)	
Fosfato de sódio dibásico dihidratado P.A. ($Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$)	Vetec
Glicose D (+) anidra P.A. ($C_6H_{12}O_6$)	Vetec
Hidróxido de amônia (NH_4OH) P.A.	Synth
Hidróxido de sódio perolado P.A. ($NaOH$)	Lafan
Lauril Sulfato de Sódio (SDS) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)	Vetec
Membranas de acetato de celulose 0,45 μ	Unifil
Metacrilato de metila (MMA) (min. 99,5%) ($C_5H_8O_2$)	Vetec
Persulfato de potássio (KPS) P.A. ($K_2S_2O_8$)	Vetec
Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) P.A.	Vetec
Tartarato de sódio e potássio P.A. ($KNaC_4H_4O_8 \cdot 4H_2O$)	Dinâmica

3.2 CELULASE

Nesse trabalho foi utilizado o preparado enzimático Cellusoft CR (rico em endoglucanases), gentilmente cedido pela Novozymes Brasil (Araucária, PR, Brasil).

Como a concentração de proteína presente no preparado enzimático era muito baixa, o mesmo foi dialisado e liofilizado para que fosse possível trabalhar com concentrações maiores de enzima. A diálise foi realizada em tampão fosfato 0,02 M (pH 7,3) por 96 horas à temperatura ambiente. Após a liofilização, a enzima foi armazenada em frasco hermeticamente fechado à temperatura ambiente.

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade foi medida através da quantidade de glicose liberada após a hidrólise do substrato carboximetilcelulose (CMC).

A quantificação da glicose foi determinada pelo método do DNS, descrito por MILLER (1959). Ao entrar em contato com açúcares redutores, o DNS, que apresenta coloração amarela, é reduzido a um composto de coloração alaranjada, o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, o qual sofre forte absorvância em 540 nm.

Na hidrólise, 900 μL de solução 4% (m/v) de carboximetilcelulose em tampão fosfato (0,05 M, pH 6,0), e 100 μL da amostra contendo enzima (livre ou imobilizada) foram incubados a $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$. Ao completar 30 min, foi adicionado 1,5 mL de DNS para parar a reação de hidrólise. A solução resultante foi aquecida em banho de água fervente por cinco minutos e resfriada em banho de gelo. As amostras foram diluídas com água destilada e filtradas em membranas de acetato de celulose para remoção dos particulados. Finalmente, a absorvância das amostras foi medida no comprimento de onde de 540 nm e a quantidade de glicose produzida foi determinada por meio de uma curva de calibração, tendo glicose como padrão.

Para evitar interferências, em todos os ensaios foram preparadas amostras controle (branco), que continham os mesmos componentes do ensaio de hidrólise, mas o DNS foi adicionado juntamente à amostra contendo enzima, ou seja, tempo de reação zero. A Figura 10 representa a metodologia aplicada para quantificação da atividade enzimática.

Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de glicose produzida, em μmol por minuto. A atividade, em U/mL, foi determinada de acordo com a Equação 1.

$$AE = \frac{M_{\text{glicose}}}{t \times V_A} \quad (1)$$

Em que,

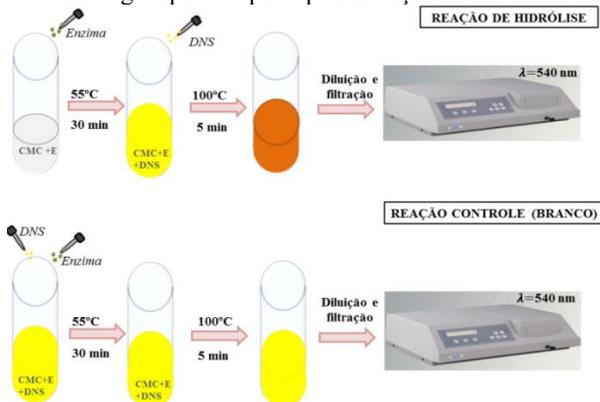
AE é atividade enzimática em (U/mL);

M_{glicose} é a quantidade de glicose liberada em (μmols);

t é o tempo reacional (min);

V_A é o volume de amostra contendo enzima (mL).

Figura 10 – Metodologia aplicada para quantificação da atividade enzimática.



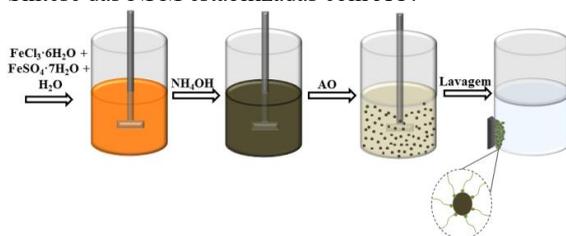
Fonte: Acervo da autora.

3.4 SÍNTESE E ATIVAÇÃO DO SUPORTE

3.4.1 Síntese das nanopartículas magnéticas estabilizadas com AO

A síntese das NPM foi baseada no método de co-precipitação utilizado por FEUSER et al. (2015), como mostra a Figura 11. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 g) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6 g) foram dissolvidos em água destilada (240 mL) utilizando agitador mecânico (800 rpm) e, em seguida, foi adicionado NH_4OH (11 mL) rapidamente. Após uma hora, foi adicionado AO (20 mL) e a agitação foi mantida por trinta minutos. O AO foi utilizado para prevenir a agregação das NPM e modificar a superfície das mesmas para posterior encapsulação. As NPM-AO produzidas foram separadas através de um campo magnético e lavadas com etanol para remoção do excesso de AO.

Figura 11 – Síntese das NPM estabilizadas com AO.



Fonte: Acervo da autora.

3.4.2 Encapsulação das NPM em nanopartículas de PMMA via polimerização em miniemulsão

Para encapsular as NPM em PMMA foi utilizada a técnica de polimerização em miniemulsão via radicais livres, de acordo com a metodologia empregada por FEUSER et al. (2015), com modificações. A reação de polimerização foi preparada de acordo com a formulação descrita na Tabela 2. As NPM-AO foram dispersas na fase orgânica (MMA e crodamol) através de ultrassom por cinco minutos. A fase aquosa (água, KPS e PVA), previamente preparada, foi adicionada à fase orgânica formando uma dispersão, que foi sonicada em dispersor ultrassônico (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500, localizado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC) por três minutos em amplitude de 70%. Para evitar a perda de monômero devido ao aumento de temperatura durante a sonicção a dispersão foi mantida sob banho de gelo. As NPM-AO-PMMA foram separadas através de um campo magnético, congeladas em freezer e liofilizadas.

Tabela 2 - Formulação utilizada para encapsulação das NPM em PMMA

Reagentes	Quantidade
H ₂ O	20 mL
KPS	1% ^a
PVA	10% ^a
MMA	2 g
Crodamol	5% ^a
NPM-AO	30% ^a

^a Em relação ao monômero (MMA).

3.4.3 Ativação das nanopartículas com glutaraldeído

Para viabilizar a ligação da celulase ao suporte e evitar a sua desorção, as NPM-AO-PMMA foram ativadas com glutaraldeído a 25 °C, sob agitação branda e teor de sólidos de 5% ($m_{\text{NPM-AO-PMMA}}/V_{\text{glutaraldeído}}$). Após doze horas, as NPM-AO-PMMA-GA foram lavadas com água destilada para remover o excesso de glutaraldeído.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE

3.5.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O tamanho médio das nanopartículas poliméricas contendo as partículas de magnetita foi determinado através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano S ZEN1600, da Malvern Instruments, alocado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC. As análises foram realizadas diluindo uma amostra do látex obtido no final do processo de polimerização.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das NPM-AO-PMMA-GA foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão. O equipamento utilizado foi o TEM 100kV- JEM-1011, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para realizar a análise, as amostras foram diluídas e gotejadas sobre um grid contendo parlódio. Após completa secagem, as amostras foram recobertas com carbono e analisadas.

3.5.3 Termogravimetria (TGA)

A decomposição térmica das NPM-AO-PMMA-GA foi estudada por meio de análise termogravimétrica. O equipamento utilizado foi o STA 449 F3 Júpiter, Netzsch, localizado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. As análises foram realizadas com 10 mg de amostra liofilizada, na faixa de temperatura de 25 a 800 °C, a taxa de aquecimento 10 °C/min e fluxo de nitrogênio 20 mL/min.

3.5.4 Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV)

As características magnéticas das NPM-AO, NPM-AO-PMMA-GA e NPM-AO-PMMA-GA-E foram analisadas utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (VSM) modelo EZ9, MicroSens. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Magnetismo (LAM) do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com cooperação do professor Alexandre Cas Viegas.

Uma quantidade de amostra conhecida foi colocada no interior de uma cápsula de vidro, que foi fixada verticalmente sobre duas bobinas. O campo magnético aplicado foi variado entre 20 a -20 KOe e medido à temperatura ambiente.

3.6 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO E SEUS PARÂMETROS

3.6.1 Imobilização da celulase

A enzima liofilizada, suspensa em tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0), foi adicionada às NPM-AO-PMMA-GA lavadas, e a suspensão resultante foi mantida sob agitação branda a 25 °C. Após 24 horas, as NPM-AO-PMMA-GA-E foram recuperadas com um ímã, lavadas exaustivamente para remoção de enzima residual, ressuspensas em tampão e armazenadas a 4 °C.

3.6.2 Eficiência de imobilização

A eficiência de imobilização foi definida de acordo com a Equação 2.

$$Y = \frac{AE_R}{AE_0} \times 100 \quad (2)$$

Em que,

Y corresponde à eficiência de imobilização (%);

AE_R corresponde à atividade enzimática retida no suporte (U/mL);

AE_0 corresponde à atividade enzimática antes do processo de imobilização (U/mL).

As atividades foram quantificadas conforme o procedimento descrito no item 3.3.

3.6.3 Efeito da concentração de glutaraldeído na eficiência de imobilização

Para determinar a concentração de glutaraldeído a ser empregada foram realizados ensaios de imobilização mantendo a concentração de enzima fixa e variando a concentração de glutaraldeído (2,5 – 7,5% (v/v)). A atividade enzimática e a eficiência de imobilização foram determinadas seguindo os itens 3.3 e 3.6.2, respectivamente.

3.6.4 Efeito da concentração de enzima na eficiência de imobilização

A concentração ideal de enzima livre a ser empregada foi determinada através de ensaios de imobilização variando a concentração de enzima e mantendo a concentração de glutaraldeído fixa de acordo com a melhor condição determinada no item 3.6.3. A atividade enzimática e a eficiência de imobilização foram determinadas seguindo os itens 3.3 e 3.6.2, respectivamente.

3.6.5 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)

As análises espectroscópicas no infravermelho foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Compósitos, do Departamento de Engenharia Mecânica (Policon) da Universidade Federal de Santa Catarina. Os espectros de absorção na região do infravermelho da enzima livre, enzima imobilizada (NPM-AO-PMMA-GA-E) e do suporte (NPM-AO-PMMA-GA) foram obtidos no equipamento da marca Bruker modelo TENSOR 27, em intervalo de comprimento de onda de 4000 a 600 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

3.7 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

3.7.1 Determinação da faixa de pH ótimo

A faixa de pH ótimo da enzima livre e imobilizada foi determinada através de ensaios de atividade enzimática (item 3.3) em diferentes valores de pH (4,0 a 8,0), sob temperatura e concentração de substrato constantes, 55 °C e 4% (m/v), respectivamente. Para a faixa de

pH de 6 a 8 foi utilizado o tampão fosfato e para os valores de 4 e 5 foi utilizado o tampão acetato.

3.7.2 Determinação da faixa de temperatura ótima

A faixa de temperatura ótima da enzima livre e imobilizada foi determinada pela medida da atividade enzimática (item 3.3) em diferentes temperaturas (35 a 75 °C), mantendo o pH e concentração do substrato constantes e iguais a 6,0 e 4% (m/v), respectivamente.

3.7.4 Estabilidade térmica e ao armazenamento

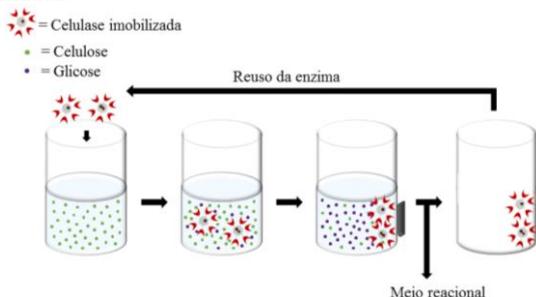
Para comparar a estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foram realizados ensaios de atividade enzimática (item 3.3) em diferentes tempos de incubação (30 a 300 minutos). A temperatura e o pH foram definidos a partir dos itens 3.7.1 e 3.7.2 e a concentração de substrato foi de 4% (m/v).

A enzima livre e imobilizada foi armazenada em tampão fosfato pH 6,0 a 4 °C e sua atividade foi monitorada por 75 dias.

3.7.5 Estabilidade operacional - Reuso

A estabilidade operacional da celulase imobilizada foi avaliada pela medida da atividade enzimática (item 3.3) em ciclos sucessivos. Ao final de cada ciclo, a enzima foi recuperada pela aplicação de um campo magnético, lavada e reutilizada. Esse procedimento foi repetido até completar 8 ciclos. A metodologia empregada está representada na Figura 12.

Figura 12 – Metodologia utilizada para analisar a estabilidade operacional da enzima imobilizada.



Fonte: Acervo da autora.

3.8 POTENCIAL PARA APLICAÇÕES

3.8.1 Hidrólise de bagaço de cana

Antes da etapa de hidrólise, o bagaço de cana lavado, seco, moído e separado em peneira de 1,4 mm. Como os materiais lignocelulósicos são altamente recalcitrantes devido à presença de lignina, celulose cristalina e ligações cruzadas entre hemicelulose e lignina, antes da hidrólise foi aplicado um pré-tratamento em duas etapas baseado na metodologia de Rezende et al. (2011). A primeira etapa consistiu no tratamento do bagaço com ácido sulfúrico diluído (1% v/v) para a remoção da hemicelulose. Essa etapa foi conduzida a 120 °C, 1,0 bar e 40 min em autoclave e fração de sólido/líquido de 1:10. O bagaço foi filtrado e lavado até o pH da água de lavagem se aproximar do pH neutro para garantir a remoção completa do ácido. Em seguida, o bagaço foi levado à estufa a 60 °C por 24 horas. A segunda etapa foi conduzida como a primeira, mas utilizando hidróxido de sódio diluído (1% m/v) para remoção da lignina.

A hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foi conduzida a 55 °C, 250 rpm, por 24 h. O teor de substrato utilizado foi de 2,5% (m/v). Foram realizados ensaios em duplicata com a enzima livre e imobilizada e apenas com tampão (ensaio controle). A quantidade de glicose liberada foi quantificada em duplicata pelo método do DNS descrito no item 3.3. A taxa de hidrólise da enzima livre e imobilizada foram comparadas por meio do parâmetro efetividade (Ef), que foi determinado pela Equação 3.

$$Ef = \frac{CG}{AE} \quad (3)$$

Em que,

Ef é a efetividade ($\mu\text{mol/mL}$);

CG é a concentração de glicose liberada durante a hidrólise ($\mu\text{mol/mL}$);

AE é a atividade enzimática empregada na hidrólise (U/mL).

3.8.2 Biopolimento de fio de algodão

Os ensaios de biopolimento com enzima livre e imobilizada foram realizados em um equipamento para tingimento em canecos (Modelo ALT, Mathis) localizado Laboratório de Transferência de massa (LabMassa) da UFSC. Primeiramente, os fios de algodão em forma de meadas, com massa total de 1 g, foram lavados com solução de surfactante aniônico SDS (1% m/v) em uma razão de banho (g de

substrato/ mL de suspensão) de 1:50, a 55 °C , por 40 minutos. O excesso de solução foi retirado e a solução contendo a enzima (livre ou imobilizada) foi adicionada em uma razão de banho 1:50. Os canecos contendo as amostras foram submetidos a uma rotação de 40 rpm (55 ± 1) °C durante 2 horas. Ao final, as meadas de fio foram separadas da solução, lavadas e secas em estufa a (70 ± 2) °C por 24 horas.

Para avaliar a atuação da enzima livre e imobilizada, a concentração de glicose contida no banho do biopolimento foi quantificada pelo método do DNS descrito no item 3.3. Para comparação, os resultados foram apresentados em termos de quantidade de açúcar liberado por unidade de atividade enzimática empregada no processo.

3.8.2.1 Ensaio de tração dos fios após o biopolimento

Para verificar o efeito do tratamento enzimático na resistência dos fios à ruptura foram realizados ensaios de tração mecânica de acordo com a metodologia empregada por IMMICH et al. (2011). As amostras de fio foram milimetricamente posicionadas em um molde de papel para evitar possíveis deslizamentos do fio no suporte de tração. Após o ajuste do molde no equipamento, as laterais do mesmo foram cortadas para não haver influência na ruptura do fio durante o ensaio, como ilustram a Figura 13. Para cada amostra (tratamento sem enzima, com enzima livre e com enzima imobilizada) foram realizadas 15 replicatas. Foi utilizado o equipamento TA HD plus Texture Analyser, Stable Micro Systems com uma célula de carga de 50 N, localizado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Figura 13 – Ensaio de tração dos fios de algodão.



Fonte: Acervo da autora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na imobilização da celulase. Para melhor compreensão, primeiro será apresentada a caracterização das nanopartículas magnéticas encapsuladas em PMMA. Em seguida, serão apresentados os resultados relacionados ao processo de imobilização e caracterização parcial da celulase imobilizada. Por fim, serão mostrados os resultados de aplicação da enzima imobilizada.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE

Depois de sintetizadas, as nanopartículas magnéticas foram encapsuladas em matriz polimérica de poli(metacrilato de metila) (PMMA) para prevenir sua aglomeração e oxidação. Além disso, o revestimento polimérico foi utilizado para fornecer grupos funcionais (hidroxila (OH)) que pudessem reagir com o agente ativador (glutaraldeído) responsável por ligar a enzima ao suporte. Os grupos funcionais foram introduzidos na superfície da matriz polimérica por enxertia com o PVA, que também foi utilizado para estabilizar as nanopartículas.

Antes de serem encapsuladas, as nanopartículas de magnetita foram recobertas com ácido oleico para torná-la hidrofóbica e, assim, se dispersar no polímero. A seguir serão apresentadas e discutidas as propriedades da magnetita encapsulada em PMMA.

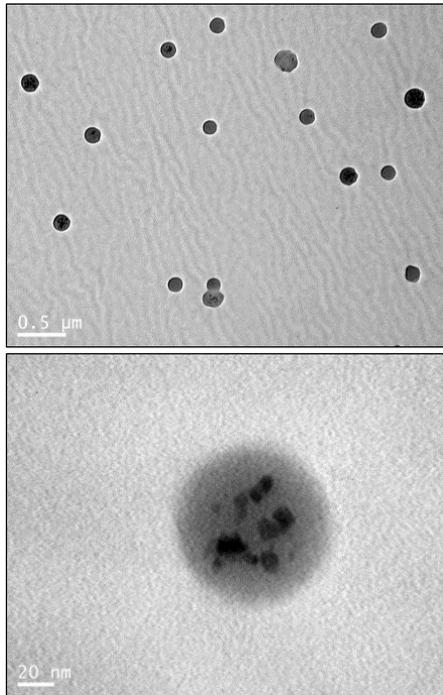
4.1.1 Morfologia e tamanho

Como pode ser observado pelas imagens da Figura 14, as nanopartículas de PMMA apresentaram morfologia esférica, com matriz definida contendo pontos escuros, atribuídos às partículas magnéticas. Essas imagens comprovam o encapsulamento das nanopartículas de magnetita. Isso significa que não houve contato entre o núcleo magnético e o meio reacional. Logo, é possível que as nanopartículas sintetizadas sejam aplicadas em diferentes processos sem que percam suas propriedades magnéticas.

É possível observar algumas esferas de PMMA vazias e outras contendo magnetita, mas em quantidade diferente, o que era esperado, pois as partículas magnéticas tendem a se agregar fazendo com que a sua distribuição não seja uniforme. O tamanho das nanopartículas de PMMA

contendo a magnetita foi de aproximadamente 150 nm com distribuição estreita de tamanho.

Figura 14 – Imagens de TEM das nanopartículas de PMMA contendo magnetita.



Fonte: Acervo da autora.

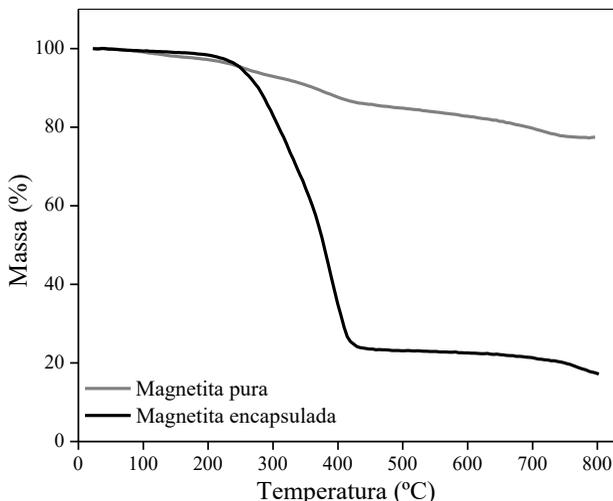
4.1.2 Análise termogravimétrica

A Figura 15 mostra o resultado da análise de decomposição termogravimétrica da magnetita pura e encapsulada. De acordo com a análise, o teor de água da amostra de magnetita pura foi 2%, de ácido oleico foi 21% e óxido de ferro foi de 77%.

Em relação à amostra de magnetita encapsulada, observa-se que até 150 °C não houve nenhuma perda de massa, indicando a ausência de impurezas na amostra. A partir dessa temperatura a perda de massa foi gradual até a completa degradação do PMMA a 410 °C. A massa residual de óxido de ferro foi de 17% e os outros 83% correspondem ao polímero

e ao ácido oleico (HONG et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por Feuser et al. (2015).

Figura 15 – Análise termogravimétrica das amostras de magnetita pura e magnetita encapsulada.



Fonte: Acervo da autora.

4.1.3 Magnetômetria de Amostra Vibrante (MAV)

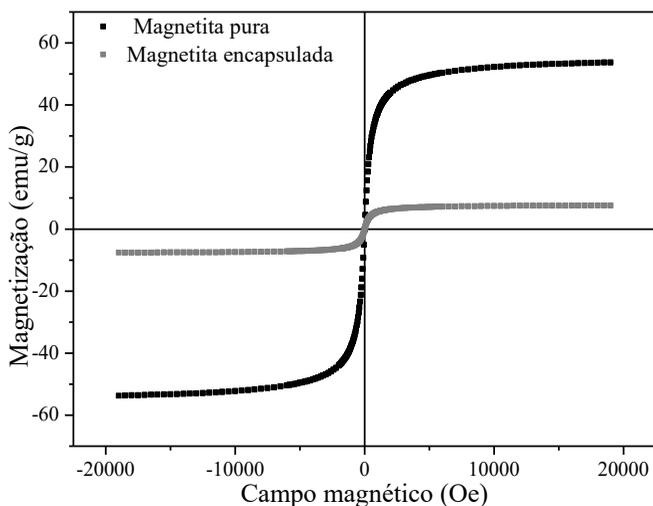
Para avaliar as características magnéticas, as NPM-AO e as NPM-AO-PMMA foram submetidas a um campo externo variável e a magnetização total foi acompanhada à medida que o campo aplicado foi alterado à temperatura ambiente, obtendo a curva mostrada na Figura 16. Os principais parâmetros magnéticos, coercividade (H_c), magnetização remanente (m_r), magnetização de saturação (M_s) estão apresentados na Tabela 3.

A grande diferença entre os valores de magnetização de saturação das amostras de magnetita pura e encapsulada está associada com a massa do polímero. Como essa medida é dada em função da massa total de amostra, materiais encapsulados tendem a apresentar menor valor de magnetização de saturação devido à massa do polímero. Ao normalizar as curvas de magnetização observou-se que elas são semelhantes, o que confirma que as duas amostras possuem as mesmas propriedades. Se considerar o teor de PMMA e ácido oleico obtido pela análise de TGA, o

valor de magnetização se torna igual a 44,5 emu/g. Esse valor ainda é inferior ao da magnetita pura, porém esperava-se esse resultado porque durante o processo de sonicação e polimerização, a magnetita pode ser oxidada a outras formas com baixa ou nenhuma magnetização, como hematita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e ferrita ($\alpha\text{-Fe}$). (LANDFESTER; RAMÍREZ, 2003).

A ausência de histerese associada aos valores de campo coercivo e magnetização remanescente quase nulos comprova que as amostras apresentaram comportamento superparamagnético. Esse comportamento comprova que o suporte obtido para imobilização da celulase responde rapidamente à aplicação de um campo magnético, mas não retém nenhum magnetismo após a remoção do campo. A Figura 17 mostra a fácil separação das NPM-AO-PMMA da fase aquosa quando um campo magnético foi aplicado.

Figura 16 – Curva de magnetização das amostras de magnetita pura e magnetita encapsulada.

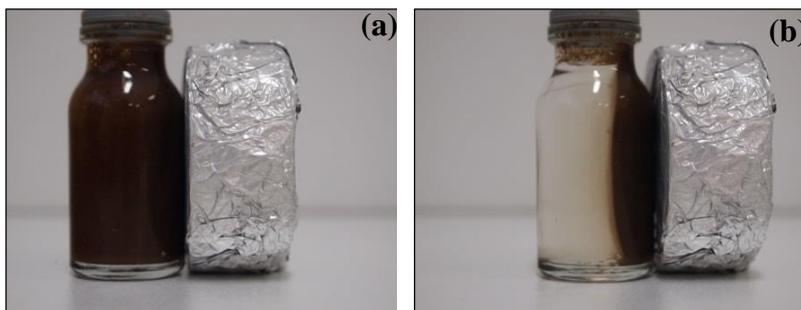


Fonte: Acervo da autora.

Tabela 3 – Propriedades magnéticas das NPM-AO e NPM-AO-PMMA a temperatura ambiente.

Amostra	Hc (Oe)	Ms (meu/g de amostra)	mr ($\times 10^{-4}$)
NPM-AO	0,130	55,2	2,37
NPM-AO-PMMA	0,255	7,59	6,26

Figura 17 – Nanopartículas de magnetita encapsuladas no momento que o campo magnético foi aplicado (a) e instantes após a aplicação (b).



Fonte: Acervo da autora.

4.2 PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO

Em estudos preliminares, foram testados os métodos de imobilização por adsorção e via polimerização em miniemulsão desenvolvido por Simon (2015). No entanto, a eficiência de imobilização em ambos os métodos foi inferior a 10%. Na literatura é reportado que as técnicas de ligação fraca não são adequadas para a imobilização de endoglucanases, pois as mesmas podem facilmente se desprender do suporte devido à sua elevada afinidade pelo substrato (LINDER et al., 1995). Assim, em busca de melhores resultados, optou-se pelo método de imobilização covalente com glutaraldeído para evitar a lixiviação da enzima. O glutaraldeído é o agente ativador mais utilizado na imobilização de enzimas devido à elevada reatividade dos grupos aldeídos, que reagem facilmente com os grupos amina das enzimas formando ligações iminas (WANG; TURHAN; GUNASEKARAN, 2004).

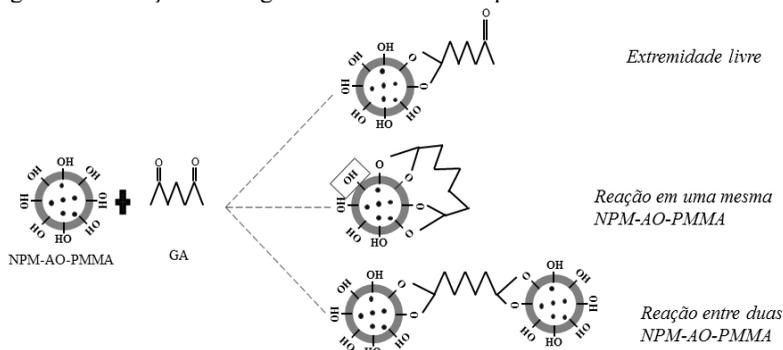
4.2.1 Efeito da concentração de glutaraldeído na eficiência de imobilização

A ligação entre o GA e as NPM-AO-PMMA foi promovida pela formação de ligações acetal entre os grupos OH e a molécula de aldeído bifuncional do GA. Para a imobilização da enzima é de interesse que uma das extremidades do GA se ligue à nanopartícula e a outra fique livre para ligação da enzima. No entanto, uma mesma molécula de GA pode se ligar

a duas nanopartículas ou se ligar a outros grupos OH de uma mesma nanopartícula. Essas duas situações não são de interesse, pois não restaria extremidade livre para reagir com a enzima. As possíveis ligações entre as NPM-AO-PMMA e o GA estão representadas na Figura 18.

Para determinar a concentração de GA a ser empregada no processo de imobilização, as NPM-AO-PMMA foram funcionalizadas com concentrações diferentes do agente ativador e a eficiência de imobilização foi avaliada. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Figura 18 – Reações entre glutaraldeído e as nanopartículas de PMMA.



Fonte: Acervo da autora.

Tabela 4 – Efeito da concentração de GA na eficiência de imobilização

Concentração de GA (% v/v)	Eficiência de imobilização (%)*
2,5	39 ± 1
5,0	49 ± 1
7,5	54 ± 2

*Valores em duplicata.

Ao aumentar a concentração de GA de 2,5 para 5%, a eficiência de imobilização foi aproximadamente 26% maior. No entanto, essa diferença foi de apenas 10% quando a concentração de GA foi aumentada de 5 para 7,5%. As reações indesejadas citadas anteriormente (Figura 18) podem ter contribuído para tal resultado. Outra possível explicação é que à medida que a concentração de GA aumenta, a quantidade de grupos OH disponíveis diminuem, fazendo com que a eficiência de imobilização não aumente na mesma proporção. Além disso, de acordo com ADRIANO et al. (2005), concentrações elevadas de glutaraldeído podem resultar na perda de atividade catalítica em consequência da interação multipontual

com o suporte. No entanto, não é possível afirmar que isso ocorreu nesse trabalho, pois seria necessário avaliar também a estabilidade da enzima em diferentes concentrações de GA. Para trabalhos futuros, sugere-se avaliar o efeito da concentração de glutaraldeído na eficiência de imobilização, na estabilidade da enzima imobilizada e no diâmetro de partícula, para verificar possíveis aglomerações.

4.2.2 Efeito da concentração de enzima na eficiência de imobilização

Esperava-se que a eficiência de imobilização aumentasse com o aumento da concentração de enzima até atingir um patamar constante, onde não haveria mais extremidades livres de glutaraldeído para se ligar à enzima, como reportado por alguns pesquisadores (ABRAHAM et al., 2014; ZHANG et al., 2015b). De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, foi observado esse comportamento entre as concentrações de celulase de 50 e 100 mg/mL. No entanto, para as concentrações acima de 100 mg/mL, a eficiência de imobilização foi inferior (150 mg/mL) ou pouco superior (200 mg/mL). Esse comportamento é, provavelmente, resultado da formação de aglomerados durante o processo de imobilização, o que pode estar associado à ausência de estabilizantes, removidos durante a diálise, essenciais para manter as enzimas em suspensão. Dessa forma, para trabalhos futuros sugere-se que a eficiência de imobilização seja avaliada em relação à variação do teor de sólidos.

Tabela 5 – Eficiência de imobilização em função da concentração de enzima.

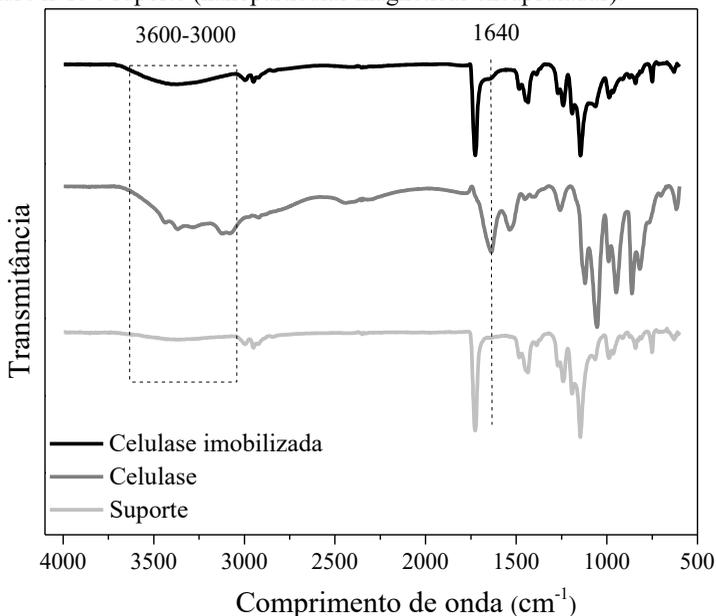
Concentração de enzima (mg/mL)	Eficiência de imobilização (%)
50	31
100	49
150	45
200	50

Diante do que foi exposto nesta seção, optou-se por utilizar a concentração de GA de 5% (v/v) e concentração de enzima de 100 mg/mL para as etapas seguintes. Sob essas condições, a eficiência de imobilização foi de 49% para teor de sólidos de 5% (m/v), que corresponde a 0,180 U/mL.

4.2.3 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)

O FTIR é uma importante técnica utilizada para a análise química de grupos funcionais de uma molécula, sendo muito utilizado para identificar possíveis ligações entre enzimas e suportes. Os espectros de absorção da celulase livre, celulase imobilizada e suporte (NPM-AO-PMMA-GA) estão apresentados na Figura 19. O espectro da celulase imobilizada apresentou duas regiões de absorção que não foram observadas no espectro das nanopartículas. O leve decaimento observado no comprimento de onda de 1640 cm^{-1} corresponde ao estiramento de grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) de amidas ($\text{C}=\text{O}-\text{NH}$), que são ligações típicas de proteínas (BANDEKAR, 1992). A larga banda de absorção na faixa de $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ é atribuída às ligações de hidrogênio entre grupos hidroxila ($\text{O}-\text{H}$) e amina ($\text{N}-\text{H}$) da celulase (MISHRA; SARDAR, 2015; SANGHI; VERMA, 2009). Esses resultados comprovam a ligação da celulase às nanopartículas.

Figura 19 – Espectro do FTIR-ATR das amostras de celulase imobilizada, celulase livre e suporte (nanopartículas magnéticas encapsuladas).



Fonte: Acervo da autora.

4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

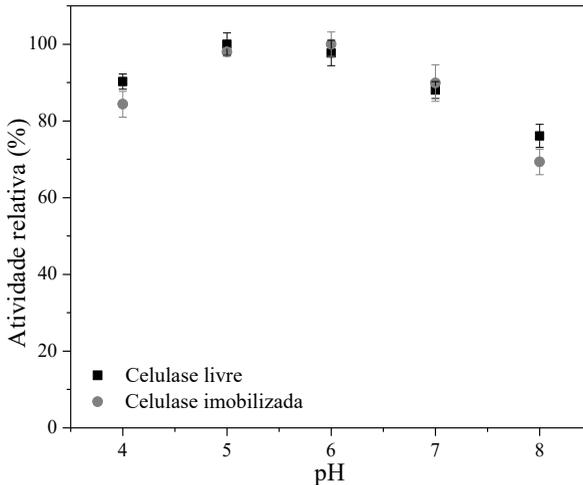
Durante a imobilização, a estrutura terciária da enzima pode sofrer algumas modificações que podem afetar sua estabilidade e especificidade e/ou acessibilidade do sítio ativo. Como resultado, a enzima imobilizada pode adquirir novas propriedades cinéticas e apresentar comportamento diferente sob determinadas condições de pH e temperatura em relação à enzima livre. Assim, para cada novo protocolo de imobilização, a enzima imobilizada deve ser cuidadosamente caracterizada e testada (GARCIA; OH; ENGLER, 1989).

4.3.1 Influência do pH na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada

A predição teórica da influência do pH na atividade catalítica de uma enzima requer o conhecimento das características do sítio ativo e de sua estrutura química, que são muito difíceis de serem obtidas (LIU, 2013). Dessa forma, essa informação é geralmente obtida experimentalmente pela determinação da atividade enzimática em diversos valores de pH.

A Figura 20 mostra o efeito do pH na atividade da celulase livre e imobilizada. Assim como sua forma livre, a enzima imobilizada apresentou excelente estabilidade diante a faixa de pH estudado. Na faixa de pH entre 5,0 e 7,0, enzima livre e imobilizada apresentaram comportamento semelhante em relação ao pH. De acordo com o teste de Tukey, é possível afirmar com 95% de confiança que a atividade de ambas as enzimas no pH 5 e 6 foram iguais, sendo essa a faixa de pH ótimo, já que nesses pontos foram obtidos os maiores valores de atividade. ZHANG et al. (2015a) também não observaram mudança no pH ótimo da celulase imobilizada em magnetita funcionalizada com silano. Apesar da atividade relativa da enzima imobilizada ser inferior à da enzima livre em pH 4 e 8, pode-se afirmar que sua atividade se manteve elevada nesses pontos (84 e 69% para o pH 4 e 8, respectivamente). Comportamento semelhante foi relatado por JORDAN; KUMAR; THEEGALA (2011) para celulase imobilizada em nanopartículas de magnetita funcionalizadas com carbodiimida. Para valores de pH 3,0 e 7,0 a enzima imobilizada alcançou menores atividades que a enzima livre.

Figura 20 – Influência do pH na atividade da enzima livre e imobilizada a 55 °C por 30 min.



Fonte: Acervo da autora.

4.3.2 Influência da temperatura na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada

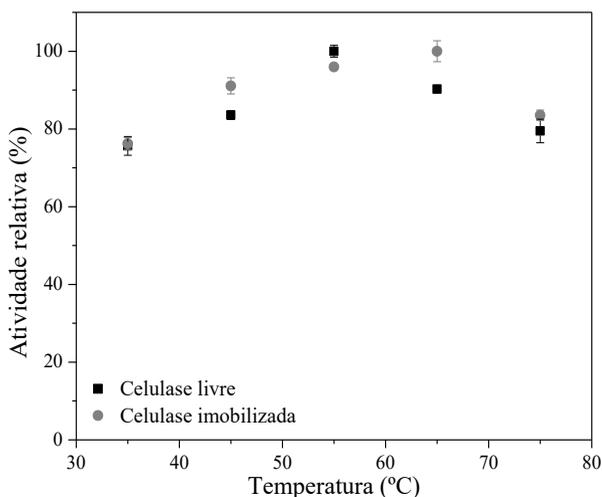
A imobilização de uma enzima pode causar alterações em suas características térmicas, resultando, na maioria das vezes, em uma aparente melhoria em termos de estabilidade. Para avaliar o efeito da imobilização sobre as características térmicas da enzima foram realizados ensaios de atividade com a enzima livre e imobilizada em diferentes temperaturas e os resultados estão apresentados na Figura 21. Para os valores de temperatura estudados, a atividade ótima da enzima livre foi de 55 °C. De acordo com o teste de Tukey, em um intervalo de confiança de 95%, a média das atividades da enzima imobilizada nos pontos 55 e 65 °C foram iguais. Logo, pode-se afirmar que a enzima imobilizada apresenta uma faixa de temperatura ótima entre 55 e 65 °C. Esse comportamento era esperado porque o aumento da temperatura causa rompimento de forças intermoleculares fracas e subsequente desdobraimento da cadeia proteica (GARCIA; OH; ENGLER, 1989). Porém, a ligação covalente entre enzima e suporte restringe as mudanças conformacionais durante o aquecimento, ampliando a faixa ótima de atuação da enzima.

É importante ressaltar que a 45 °C a atividade da enzima imobilizada foi de aproximadamente 90% de sua atividade máxima. Em

contrapartida, nessa mesma temperatura, a atividade da enzima solúvel foi inferior a 85% de sua atividade máxima. Esses resultados sugerem que a enzima imobilizada apresenta maior estabilidade em relação a variações de temperatura, oferecendo maior flexibilidade operacional.

Resultados semelhantes foram observados por ZHANG et al. (2015a) na imobilização de celulase em nanopartículas de magnetita funcionalizadas com silano.

Figura 21 – Influência da temperatura na atividade da enzima livre e imobilizada por 30 min em pH 6,0.



Fonte: Acervo da autora.

4.3.3 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada

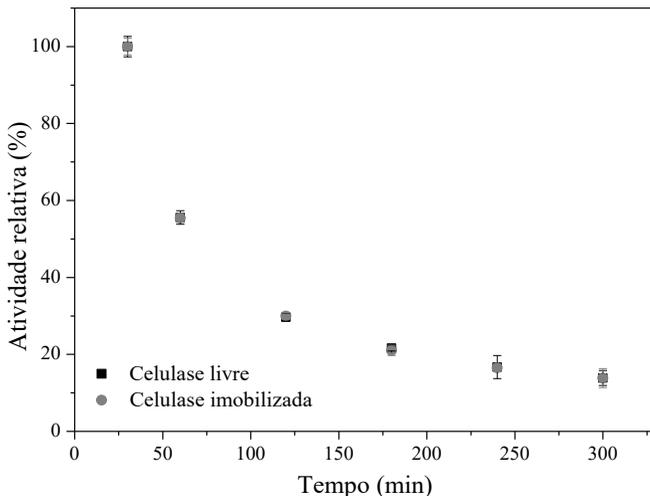
Os perfis de atividade enzimática da enzima livre e imobilizada ao longo do tempo, à temperatura de 55 °C, em pH 6,0 e concentração de substrato de 4% (m/v), são apresentados na Figura 22. Observa-se que a atividade de ambas as enzimas diminuiu de forma similar, mostrando que para o intervalo de tempo estudado, a imobilização não influenciou na estabilidade da enzima. Esse comportamento pode estar associado à elevada estabilidade da própria enzima livre, como mostrado por SIMON (2015), que ao incubá-la na presença de água e bicarbonato de sódio por 3 h a 70 °C não houve perda de atividade.

É importante ressaltar que o decréscimo observado nos valores de atividade não está relacionado apenas com a perda da atividade, mas

também com a limitação da concentração do substrato. Como o objetivo do presente trabalho era apenas comparar o comportamento das duas enzimas em longo prazo, foram realizados ensaios na presença do substrato. No entanto, para determinar por quanto tempo a atividade da enzima pode ser mantida em determinada temperatura deve-se incubar a enzima em tampão e, em intervalos de tempo pré-definidos, a sua atividade deve ser quantificada. Assim, os efeitos da limitação da concentração de substrato são eliminados.

Durante o período de 75 dias, a atividade da enzima livre e imobilizada foi monitorada e não houve perda de atividade catalítica de ambas as enzimas. Esse resultado mostra que o processo de imobilização não afeta a estabilidade da enzima e que as condições utilizadas para o armazenamento, tampão fosfato pH 6,0 a 4 °C, foram ideais para conservação da enzima. Esses resultados são superiores aos obtidos por Simon (2015), que observou, nas mesmas condições de armazenamento, queda de 50% de atividade da celulase imobilizada em PMMA pela técnica de miniemulsão. Zhang et al. (2016) observaram retenção de apenas 48% da atividade da celulase imobilizada na superfície de sílica em gel funcionalizada com silanos depois de quatro dias.

Figura 22 – Perfis de atividade da enzima livre e imobilizada ao longo do tempo a 55 °C e pH 6,0.



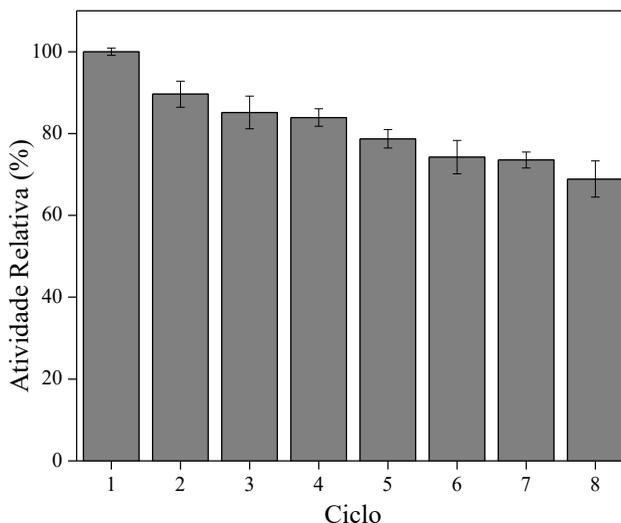
Fonte: Acervo da autora.

4.3.4 Estabilidade operacional - Reuso

A estabilidade operacional ou capacidade de reutilização é um dos fatores mais importantes para o sucesso da aplicação de uma enzima imobilizada, podendo inclusive determinar a sua viabilidade econômica.

O potencial de reuso da celulase imobilizada nas NPM-AO-PMMA-GA foi avaliado através da quantificação da atividade enzimática em ciclos sucessivos de hidrólise de 30 minutos (Figura 23). Após oito ciclos de uso, a atividade da enzima imobilizada foi de aproximadamente 69% da atividade inicial. Esses resultados são superiores aos obtidos por Abraham et al. (2014), em que aproximadamente 60% da atividade da celulase imobilizada em nanopartículas magnéticas foi perdida após oito ciclos de uso em condições semelhantes das utilizadas nesse trabalho.

Figura 23 – Atividade enzimática após ciclos sucessivos de 30 min, 55 °C, pH 6,0 e concentração de substrato de 4% (m/v).



Fonte: Acervo da autora.

Tal como observado em outros trabalhos de imobilização de celulase em nanopartículas magnéticas (ABRAHAM et al., 2014; JORDAN; KUMAR; THEEGALA, 2011; ZANG et al., 2014; ZHANG et al., 2015b), a atividade catalítica da enzima diminuiu gradativamente em cada ciclo, sendo a maior queda (cerca de 10%) observada após o primeiro reuso. Durante os experimentos, foi observado que nem todas as

nanopartículas foram recuperadas quando o campo magnético foi aplicado. A perda dessas nanopartículas pode estar associada à elevada viscosidade do substrato e à presença de cápsulas com baixa magnetização. Em menor proporção, o decaimento da atividade pode ser decorrente à desativação da enzima.

Ao comparar esse resultado com o obtido por Simon (2015), em que após três ciclos de uso apenas 20% da atividade da celulase imobilizada em PMMA puro foi mantida, nota-se que nanopartículas de PMMA com núcleo magnético melhoram a capacidade de reuso da enzima, além de permitir a fácil separação.

4.4 POTENCIAL PARA APLICAÇÕES

Com o intuito de avaliar o potencial de aplicação da enzima imobilizada foram realizados ensaios de hidrólise do bagaço de cana e de biopolimento de fio de algodão.

4.4.1 Hidrólise de bagaço de cana

Para avaliar o potencial de aplicação da celulase imobilizada foi realizado ensaio de hidrólise enzimática do bagaço de cana. As enzimas do complexo celulolítico são fundamentais na produção de etanol a partir do bagaço de cana, pois são responsáveis por hidrolisar a celulose em açúcares fermentescíveis, que são convertidos por leveduras em etanol em uma etapa posterior.

É importante ressaltar que para esse tipo de substrato é necessário empregar todas as enzimas do complexo celulolítico. No entanto, como o objetivo desse estudo foi apenas mostrar o potencial da celulase imobilizada em nanopartículas magnéticas foi utilizado o preparado enzimático rico em endoglucanases.

O tempo de hidrólise desses ensaios foi determinado por meio de ensaios prévios. A quantidade de açúcares redutores liberados em 48 h de hidrólise foi apenas 30% maior em comparação ao tempo de hidrólise de 24 h. Esse resultado pode ser justificado pela presença de apenas uma enzima do complexo celulolítico. Assim, para os experimentos seguintes adotou-se o tempo de hidrólise de 24h.

Após o tratamento do bagaço de cana com enzima livre e imobilizada, a efetividade de atuação da enzima livre e imobilizada foi calculada e está apresentada na Tabela 6. A enzima imobilizada apresentou efetividade 24% menor que a enzima livre. Para obter a mesma concentração de açúcares redutores obtidos pela enzima livre,

seria necessário utilizar uma concentração mais elevada de enzima imobilizada, aumentando o custo. No entanto, como essa diferença foi pequena, o custo pode ser superado pela reutilização da enzima.

Jordan; Kumar; Theegala (2011) reportaram atividade 30,2% menor da celulase imobilizada em nanopartículas na hidrólise de celulose microcristalina. O menor rendimento da enzima imobilizada pode estar associado à menor acessibilidade ao substrato devido à ligação ao suporte ou pela diminuição da afinidade pelo substrato causada por mudanças estruturais da enzima durante o processo de imobilização.

A atividade da enzima imobilizada após a hidrólise foi 10% menor que a atividade inicial. Essa redução também foi observada durante os ensaios de reuso.

Apesar de ter sido realizado um estudo preliminar, os resultados foram promissores e importantes já que não foram encontrados na literatura estudos relevantes sobre hidrólise de bagaço de cana com celulase imobilizada.

Tabela 6 – Efetividade da enzima livre e imobilizada na hidrólise do bagaço de cana.

Enzima	Efetividade ($\mu\text{mol}/\text{U}$)
Livre	$36,6 \pm 0,789$
Imobilizada	$27,8 \pm 0,341$

4.2.2 Biopolimento do fio de algodão

Para avaliar o potencial de aplicação da celulase imobilizada na indústria têxtil foi utilizada como modelo a etapa de biopolimento, cuja finalidade é promover uma melhor aparência e acabamento aos tecidos. A função das celulasas nessa etapa é remover as microfibrilas salientes das fibras de algodão, resultando em artigos mais macios e “limpos” e sem o aspecto desbotado, principalmente, após a lavagem.

O biopolimento de fios de algodão foi realizado com a celulase livre e imobilizada e os efeitos do tratamento foram avaliados em relação à concentração de açúcares redutores liberados e à resistência à ruptura, apresentados na Tabela 7. Um ensaio sem enzima foi realizado como controle.

Tabela 7 – Concentração de açúcares redutores liberados durante o biopolimento e resistência à ruptura das amostras tratadas.

Tratamento	Açúcares redutores ($\mu\text{mol/U}$)	Força máxima (N)
Sem enzima	-	$6,40 \pm 0,58$
Enzima livre	0,0613	$4,29 \pm 0,71$
Enzima imobilizada	0,0557	$4,86 \pm 0,73$

Apesar da atividade da enzima livre empregada no processo ter sido 30% menor que a da enzima imobilizada, a quantidade de açúcares redutores liberados por ambas foi próxima. Em comparação com a amostra controle, é possível notar que ambas as enzimas afetaram a resistência ao rompimento dos fios. No entanto, através do teste de Tukey com nível de confiança de 95%, pode-se afirmar que a amostra tratada com enzima livre apresentou menor resistência em relação à amostra tratada com a enzima imobilizada.

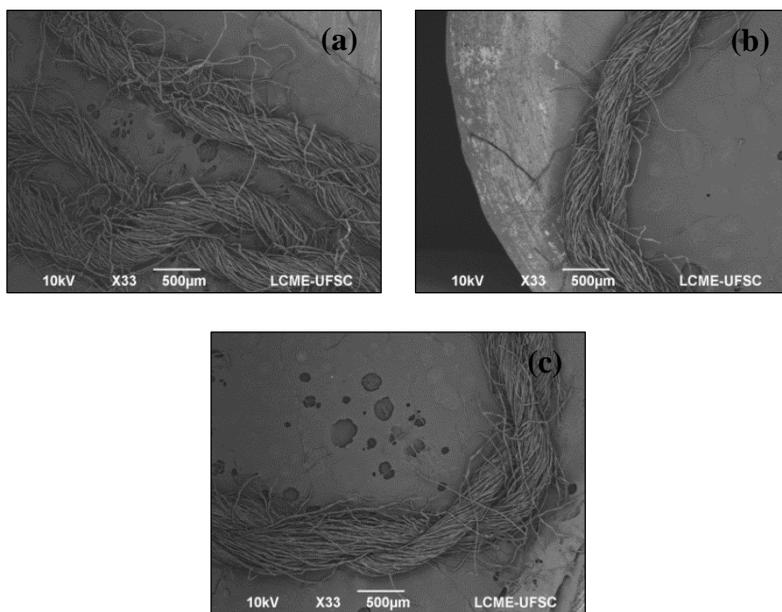
Os resultados obtidos sugerem que a enzima imobilizada pode alcançar resultados semelhantes ou até mesmo superiores aos da enzima livre na remoção de microfibrilas e causar menor perda de resistência da fibra de celulose. Yu et al. (2013), ao estudar o efeito da celulase imobilizada na lavagem de tecido de sarja de algodão resistente, também observaram uma atuação próxima à da enzima livre e menor perda de resistência para a amostra tratada com a enzima imobilizada.

Através das imagens de microscopia de varredura (Figura 24) é possível observar menor quantidade fibrilas na superfície do fio tratado com celulase em comparação com a amostra controle. Porém, não foi possível notar diferença entre a amostra tratada com celulase livre e imobilizada.

Ao final do processo de biopolimento, a solução contendo as enzimas foi removida, as amostras foram lavadas exaustivamente e levadas para secagem em estufa. No entanto, a amostra tratada com a enzima imobilizada apresentou uma coloração alaranjada, indicando a presença das nanopartículas, como pode ser visto na Figura 25. Essa coloração provavelmente está associada à presença das nanopartículas no material. Esse resultado pode ser proveniente da retenção das nanopartículas no interior das fibras celulósicas ou pela formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH das nanopartículas poliméricas e a celulose, fazendo com que as mesmas ficassem aderidas à amostra. Essa coloração também pode ser resultado da oxidação das partículas de magnetita que não foram encapsuladas. Assim, para trabalhos futuros é necessário investigar o que pode ter causado a coloração dos fios de

algodão e propor alternativas para que esse problema possa ser contornado. Caso o problema esteja associado à adsorção das nanopartículas, propõe-se a substituição dos grupos OH da superfície das nanopartículas de PMMA por outros grupos funcionais. Em relação à retenção, é possível que o problema seja minimizado com a utilização de partículas maiores. Para a oxidação das nanopartículas puras é necessário estudar métodos para que elas possam ser separadas das que estão encapsuladas.

Figura 24 – Análises de MEV do fio sem tratamento enzimático (a), tratado com a celulase livre (b) e tratado com a celulase imobilizada (c).



Fonte: Acervo da autora.

Figura 25 – Amostras do fio de algodão após o tratamento com enzima livre e imobilizada.



Fonte: Acervo da autora.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

As nanopartículas poliméricas contendo a partículas magnéticas encapsuladas apresentaram tamanho de 150 nm e comportamento superparamagnético.

Para concentração de 5% (v/v) de glutaraldeído e de 100 mg/mL de enzima foi obtido eficiência de imobilização de 49%, que corresponde a 0,18 U/mL.

Em relação à sua forma livre, a enzima imobilizada apresentou ampliação da faixa ótima de temperatura e não teve sua atividade alterada durante 75 dias de armazenamento a 4 °C em tampão fosfato pH 6,0. A celulase imobilizada apresentou excelentes resultados de reuso, tendo 69% de sua atividade inicial retida após oito ciclos de uso.

No estudo da hidrólise do bagaço de cana, a quantidade de açúcares redutores liberados pela enzima imobilizada foi menor que a obtida pela enzima livre. Assim, para obter o mesmo rendimento que sua forma livre, seria necessário empregar concentrações mais elevadas da enzima imobilizada, implicando em maiores custos. No entanto, os mesmos podem ser compensados pela capacidade de reuso.

No biopolimento dos fios de algodão, a quantidade de açúcares liberados pelas duas enzimas foi próxima, mas as amostras tratadas com a celulase livre apresentaram menor resistência ao rompimento. Esses resultados sugerem que a enzima imobilizada penetra menos nas fibras de algodão, podendo obter resultados iguais ou superiores em relação à remoção de microfibrilas.

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho é possível concluir que a metodologia de imobilização da celulase em nanopartículas magnéticas desenvolvida nesse trabalho se mostrou promissora. Porém, ainda é necessário realizar muitos estudos para tornar a imobilização de celulasas em nanopartículas magnéticas uma tecnologia aplicável.

Esse trabalho se mostrou inovador, pois não há relatos na literatura de aplicação de celulasas imobilizadas em nanopartículas magnéticas no biopolimento de tecidos e hidrólise do bagaço de cana. Assim, é possível concluir que esse trabalho abre perspectivas para novos estudos para o desenvolvimento da tecnologia e pode contribuir para a consolidação de processos de hidrólise enzimática em geral, tornando-os mais atraentes e economicamente mais viáveis.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada;
- Aplicar a metodologia desenvolvida nesse trabalho para imobilização de todas as enzimas do complexo celulolítico, bem como para outras enzimas;
- Otimizar os parâmetros de imobilização, como tempo de reação e teor de sólidos;
- Comparar a estabilidade térmica da celulase livre e imobilizada em tempos mais longos;
- Avaliar o efeito da concentração de glutaraldeído na eficiência de imobilização, na estabilidade da enzima imobilizada e no diâmetro de partícula, para verificar possíveis aglomerações;
- Avaliar a capacidade de reuso da enzima imobilizada em processos de hidrólise mais longos para simular processos reais;
- Realizar análises de *peeling* para verificar se a enzima imobilizada pode ter maior eficácia na remoção das microfibrilas no processo de biopolimento;
- Desenvolver outras estratégias de funcionalização da matriz polimérica para evitar que as nanopartículas fiquem adsorvidas na material celulósico;
- Realizar estudo de imobilização com partículas de diferentes tamanhos e avaliar os efeitos sob as propriedades da enzima e em relação aos resultados de aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, R. E.; VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; PURI, M. Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2014.

ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 529-538, 2005.

ALAM, M. F.; LASKAR, A. A.; ZUBAIR, M.; BAIG, U.; YOUNUS, H. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on polyaniline coated silver nanoparticles formed by green synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 119, p. 78-84, 2015.

ALTUN, S.; ÇAKIROĞLU, B.; ÖZACAR, M.; ÖZACAR, M. A facile and effective immobilization of glucose oxidase on tannic acid modified CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 963-970, 2015.

BANDEKAR, J. Amide modes and protein conformation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1120, n. 2, p. 123-143, 1992.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 83-93, 2004.

BOLIVAR, J. M.; ROCHA-MARTIN, J.; MATEO, C.; CAVA, F.; BERENQUER, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Coating of Soluble and Immobilized Enzymes with Ionic Polymers: Full Stabilization of the Quaternary Structure of Multimeric Enzymes. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 4, p. 742-747, 2009.

BON, E. P. S.; JUNIOR, N. P.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C. R.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzima

In: (Ed.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 5, p.95-122.

CAO, L.; LANGEN, L. V.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387-394, 2003.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHEN, Y. Z.; CHING, C. B.; XU, R. Lipase immobilization on modified zirconia nanoparticles: Studies on the effects of modifiers. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 11, p. 1245-1251, 2009.

CHIARADIA, V.; VALÉRIO, A.; FEUSER, P. E.; OLIVEIRA, D. D.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Incorporation of superparamagnetic nanoparticles into poly(urea-urethane) nanoparticles by step growth interfacial polymerization in miniemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 596-603, 2015.

CHO, E. J.; JUNG, S.; KIM, H. J.; LEE, Y. G.; NAM, K. C.; LEE, H.-J.; BAE, H.-J. Co-immobilization of three cellulases on Au-doped magnetic silica nanoparticles for the degradation of cellulose. **Chemical Communications**, v. 48, n. 6, p. 886-888, 2012.

CRESPY, D.; LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 6, p. 1132-1148, 2010.

DAOUD, F. B.-O.; KADDOUR, S.; SADOUN, T. Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 93-99, 2010.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; DE MOARES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização In: (Ed.). **Enzimas em**

Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6, p.123-150.

DINÇER, A.; TELEFONCU, A. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 1–2, p. 10-14, 2007.

DUMAZET-BONNAMOUR, I.; LE PERCHEC, P. Colloidal dispersion of magnetite nanoparticles via in situ preparation with sodium polyoxyalkylene di-phosphonates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, n. 1–3, p. 61-71, 2000.

DUTTA, R. **Fundamentals of Biochemical Engineering.** Springer Berlin Heidelberg, 2008. ISBN 9783540779001.

EASOM, K. A.; KLABUNDE, K. J.; SORENSEN, C. M.; HADJIPANAYIS, G. C. Nanoscale magnetic particles. New methods to surface protected metallic and immiscible bimetallic clusters/particles. **Polyhedron**, v. 13, n. 8, p. 1197-1223, 1994.

FENG, J.; YU, S.; LI, J.; MO, T.; LI, P. Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 286, p. 216-222, 2016.

FEUSER, P. E.; BUBNIAK, L. D. S.; SILVA, M. C. D. S.; VIEGAS, A. D. C.; CASTILHO FERNANDES, A.; RICCI-JUNIOR, E.; NELE, M.; TEDESCO, A. C.; SAYER, C.; DE ARAÚJO, P. H. H. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 355-365, 2015.

FREY, N. A.; PENG, S.; CHENG, K.; SUN, S. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 9, p. 2532-2542, 2009.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme

Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GARCIA, A.; OH, S.; ENGLER, C. R. Cellulase immobilization on Fe₃O₄ and characterization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, n. 3, p. 321-326, 1989.

HIRSH, S. L.; BILEK, M. M. M.; NOSWORTHY, N. J.; KONDYURIN, A.; DOS REMEDIOS, C. G.; MCKENZIE, D. R. A Comparison of Covalent Immobilization and Physical Adsorption of a Cellulase Enzyme Mixture. **Langmuir**, v. 26, n. 17, p. 14380-14388, 2010.

HONG, R. Y.; FENG, B.; CAI, X.; LIU, G.; LI, H. Z.; DING, J.; ZHENG, Y.; WEI, D. G. Double-mini-emulsion preparation of Fe₃O₄/poly(methyl methacrylate) magnetic latex. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, n. 1, p. 89-98, 2009.

IMMICH, A. P. S.; DE ARAÚJO, P. H. H.; CATALANI, L. H.; DE SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Crosslinking of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) in the coating of cotton yarn. **Polymer Engineering & Science**, v. 51, n. 3, p. 445-453, 2011.

INCE, A.; BAYRAMOGLU, G.; KARAGOZ, B.; ALTINTAS, B.; BICAK, N.; ARICA, M. Y. A method for fabrication of polyaniline coated polymer microspheres and its application for cellulase immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 189-190, p. 404-412, 2012.

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

KAMEI, S.; OKUBO, M.; MATSUMOTO, T. Adsorption of trypsin onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/polystyrene composite microspheres and its enzymatic activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 34, n. 4, p. 1439-1446, 1987.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes — learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 471-478, 1993.

KHOSHNEVISAN, K.; BORDBAR, A.-K.; ZARE, D.; DAVOODI, D.; NORUZI, M.; BARKHI, M.; TABATABAEI, M. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. **Chem Eng J**, v. 171, 2011.

KIM, M. I.; HAM, H. O.; OH, S.-D.; PARK, H. G.; CHANG, H. N.; CHOI, S.-H. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 62-68, 2006.

KIM, S.; LEE, J.; JANG, S.; LEE, H.; SUNG, D.; CHANG, J. H. High efficient chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase immobilized magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, Part B, p. 406-411, 2016.

KLOTZ, S.; STEINLE-NEUMANN, G.; STRÄSSLE, T.; PHILIPPE, J.; HANSEN, T.; WENZEL, M. J. Magnetism and the Verwey transition in Fe_3O_4 under pressure. **Physical Review B**, v. 77, n. 1, p. 012411, 01/31/2008.

KUMAKURA, M. Preparation of immobilized cellulase beads and their application to hydrolysis of cellulosic materials. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 555-559, 1997.

LANDFESTER, K. Recent developments in miniemulsions — formation and stability mechanisms. **Macromolecular Symposia**, v. 150, n. 1, p. 171-178, 2000.

_____. The Generation of Nanoparticles in Miniemulsions. **Advanced Materials**, v. 13, n. 10, p. 765-768, 2001.

LANDFESTER, K.; RAMÍREZ, L. P. Encapsulated magnetite particles for biomedical application. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 15, n. 15, p. S1345, 2003.

LANDFESTER, K.; WEISS, C. Encapsulation by Miniemulsion Polymerization. In: CARUSO, F. (Ed.). **Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-reactions**: Springer Berlin Heidelberg, v.229, 2010. cap. 43, p.1-49. (Advances in Polymer Science). ISBN 978-3-642-12872-1.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman, 2008.

LIAO, H.; CHEN, D.; YUAN, L.; ZHENG, M.; ZHU, Y.; LIU, X. Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe₂O₃ magnetic nanoparticle to degrade microcrystalline cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 600-604, 2010.

LINDER, M.; MATTINEN, M.-L.; KONTELINEN, M.; LINDEBERG, G.; STÅHLBERG, J.; DRAKENBERG, T.; REINIKAINEN, T.; PETTERSSON, G.; ANNILA, A. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. **Protein Science**, v. 4, n. 6, p. 1056-1064, 1995.

LIU, S. **Bioprocess Engineering: Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design**. Elsevier, 2013. ISBN 9780444595256.

LIU, X.; GUAN, Y.; MA, Z.; LIU, H. Surface Modification and Characterization of Magnetic Polymer Nanospheres Prepared by Miniemulsion Polymerization. **Langmuir**, v. 20, n. 23, p. 10278-10282, 2004.

LU, A.-H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. **Cellulose**, v. 10, n. 2, p. 159-169, 2003.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATHEW, D. S.; JUANG, R.-S. An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in

microemulsions. **Chemical Engineering Journal**, v. 129, n. 1–3, p. 51-65, 2007.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

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

MISHRA, A.; SARDAR, M. Cellulase assisted synthesis of nano-silver and gold: Application as immobilization matrix for biocatalysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 105-113, 2015.

MOHY ELDIN, M. S.; SCHROËN, C. G. P. H.; JANSSEN, A. E. M.; MITA, D. G.; TRAMPER, J. Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 4, p. 445-451, 2000.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MURRAY, R. K.; HARPER, H. A. **Harper: bioquímica ilustrada**. El Manual Moderno, 2004. ISBN 9789707291447.

OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Química Nova**, v. 36, p. 123-130, 2013.

PALJEVAC, M.; PRIMOŽIČ, M.; HABULIN, M.; NOVAK, Z.; KNEZ, Ž. Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulase immobilized on silica gels at low and high pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 1, p. 74-80, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARK, H. J.; MCCONNELL, J. T.; BODDOHI, S.; KIPPER, M. J.; JOHNSON, P. A. Synthesis and characterization of enzyme–magnetic nanoparticle complexes: effect of size on activity and recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 2, p. 198-203, 2011.

PASCOAL, A. M.; MITIDIERI, S.; FERNANDES, K. F. Immobilisation of α -amylase from *Aspergillus niger* onto polyaniline. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 300-306, 2011.

PAZARLIOĞLU, N. K.; SARIİŞİK, M.; TELEFONCU, A. Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 767-771, 2005.

PHADTARE, S.; KUMAR, A.; VINOD, V. P.; DASH, C.; PALASKAR, D. V.; RAO, M.; SHUKLA, P. G.; SIVARAM, S.; SASTRY, M. Direct Assembly of Gold Nanoparticle “Shells” on Polyurethane Microsphere “Cores” and Their Application as Enzyme Immobilization Templates. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 10, p. 1944-1949, 2003.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. Springer Netherlands, 2007. ISBN 9781402053771.

RAMÍREZ, L. P.; LANDFESTER, K. Magnetic Polystyrene Nanoparticles with a High Magnetite Content Obtained by Miniemulsion Processes. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 204, n. 1, p. 22-31, 2003.

RAMOS, J.; FORCADA, J. Surfactant-Free Miniemulsion Polymerization as a Simple Synthetic Route to a Successful Encapsulation of Magnetite Nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 11, 2011.

RATANAKHANOKCHAI, K.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAIKOON, C.; KYU, K. L.; SAKKA, K.; KOSUGI, A.; MORI, Y. **Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization**. 2013.

REZENDE, C. A.; DE LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; DEAZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification

process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2011.

RIBEIRO, G. A. P. As Propriedades Magnéticas da Matéria: um Primeiro Contato. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, 2000.

ROMIO, A. P.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H.; AL-HAYDARI, M.; WU, L.; DA ROCHA, S. R. P. Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, n. 9, p. 747-751, 2009.

SANGHI, R.; VERMA, P. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 501-504, 2009.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 3-4, p. 141-147, 2005.

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

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: basic concepts**. Prentice Hall, 1992. ISBN 9780134782157.

SIMON, P. **Imobilização de celulase em nanopartículas polimérica de poli(metacrilato de metila) via polimerização em miniemulsão**. 2015. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

TARTAJ, P.; MORALES, M. D. P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZÁLEZ-CARREÑO, T.; SERNA, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R182, 2003.

TEJA, A. S.; KOH, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 55, n. 1–2, p. 22-45, 2009.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 326-335, 1999.

UNGUREAN, M.; PAUL, C.; PETER, F. Cellulase immobilized by sol-gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose. **Bioprocess Biosys Eng**, v. 36, 2013.

VEIGA, V.; RYAN, D. H.; SOURTY, E.; LLANES, F.; MARCHESSAULT, R. H. Formation and characterization of superparamagnetic cross-linked high amylose starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 4, p. 353-357, 2000.

WANG, S.; SU, P.; DING, F.; YANG, Y. Immobilization of cellulase on polyamidoamine dendrimer-grafted silica. **J Mol Catal B Enzym**, v. 89, 2013.

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, n. 7, p. 911-918, 2004.

XIE, W.; ZANG, X. Immobilized lipase on core–shell structured Fe₃O₄–MCM-41 nanocomposites as a magnetically recyclable biocatalyst for interesterification of soybean oil and lard. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1283-1292, 2016.

XU, J.; HUO, S.; YUAN, Z.; ZHANG, Y.; XU, H.; GUO, Y.; LIANG, C.; ZHUANG, X. Characterization of direct cellulase immobilization with superparamagnetic nanoparticles. **Biocatal Biotransform**, v. 29, 2011.

YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X.; NI, X.; WANG, P.; CUI, L. Cellulase immobilization onto the reversibly soluble methacrylate copolymer for denim washing. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 2, p. 675-680, 2013.

YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X.; WANG, P.; CUI, L. Noncovalent immobilization of cellulases using the reversibly soluble polymers for biopolishing of cotton fabric. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 4, p. 494-501, 2015.

ZANG, L.; QIU, J.; WU, X.; ZHANG, W.; SAKAI, E.; WEI, Y. Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles As Support for Cellulase Immobilization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 9, p. 3448-3454, 2014.

ZHANG, D.; HEGAB, H. E.; LVOV, Y.; DALE SNOW, L.; PALMER, J. Immobilization of cellulase on a silica gel substrate modified using a 3-APTES self-assembled monolayer. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2016.

ZHANG, W.; QIU, J.; FENG, H.; ZANG, L.; SAKAI, E. Increase in stability of cellulase immobilized on functionalized magnetic nanospheres. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 375, p. 117-123, 2015a.

ZHANG, W.; QIU, J.; ZANG, L.; SAKAI, E.; FENG, H. Preparation of Functionalized Magnetic Silica Nanospheres for the Cellulase Immobilization. **Nano**, v. 10, n. 01, p. 1550013, 2015b.