



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

EVA GOMES MORAIS

**IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE COMERCIAL DE *Trichoderma reesei* EM
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MISTAS VISANDO A APLICAÇÃO NA
HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

FORTALEZA

2017

EVA GOMES MORAIS

IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE COMERCIAL DE *Trichoderma reesei* EM
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MISTAS VISANDO A APLICAÇÃO NA
HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Co-orientadora: Mestre Nathalia Saraiva Rios

FORTALEZA

2017

EVA GOMES MORAIS

IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE COMERCIAL DE *TRICHODERMA REESEI* EM
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MISTAS VISANDO A APLICAÇÃO NA
HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Universidade Federal do Ceará

Mestre Nathalia Saraiva Rios

Universidade Federal do Ceará

Profa Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa

Universidade Federal do Ceará

FORTALEZA

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos diárias.

Aos meus pais pelo amor, esforço e doação dedicados a mim e a minhas irmãs. Pelo apoio incondicional durante minha formação acadêmica e por serem exemplos de honestidade, integridade e perseverança.

As minhas irmãs pelo companheirismo e cumplicidade.

À Professora Luciana Rocha Barros Gonçalves pela confiança depositada, pelo exemplo de profissional e por ser uma admirável pessoa e profissional.

A minha co-orientadora Nathalia Saraiva Rios por toda dedicação, paciência, incentivo e constante disponibilidade para com a minha orientação.

A todos os professores que me proporcionaram conhecimento, valores e admiração durante toda minha vida estudantil.

Aos amigos conquistados durante a faculdade, que foram excelentes companheiros durante essa jornada acadêmica e em quem eu me espelho.

A todos os membros do GPBio por serem sempre tão prestativos e por tornarem a rotina do laboratório descontraída e agradável.

A meu querido Bruno, que me deu a alegria de seu companheirismo durante os bons e maus momentos dessa jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fomento a esta pesquisa.

"Os desafios não são difíceis porque tentamos;
é por que não tentamos que são difíceis"

Sêneca

RESUMO

Técnicas de reciclo enzimático têm se mostrado um grande atrativo para diminuição dos custos de produção de bioetanol de segunda geração. O reciclo enzimático ao final do processo de hidrólise da biomassa deve ser conduzido de forma a garantir a fácil recuperação do biocatalisador e a manutenção de sua eficiência catalítica e estabilidade operacional. Nesse cenário, a aplicação de nanopartículas magnéticas (NPMs) como suporte para imobilização de enzimas tem sido bastante estudada devido às seguintes características das NPMs: rápida recuperação enzimática pela simples aplicação de um campo magnético externo; capacidade de imobilização de grandes quantidades de proteína devido sua elevada área superficial; e baixos custos de obtenção dependendo do tipo de síntese da nanopartícula. Neste trabalho, avaliou-se o uso de nanopartículas magnéticas mistas Ni-Zn como suporte de imobilização de celulase comercial de *Trichoderma reesei*. Adotou-se o método de co-precipitação para sintetizar nanopartículas do tipo ferritas, e a estratégia de funcionalização da superfície das NPMs com 3-aminopropiltrióxido. Uma vez funcionalizadas e, as nanopartículas magnéticas mistas foram ativadas na presença de glutaraldeído (NPM-APTES-GA), possibilitando que a imobilização ocorresse por meio de ligação covalente entre enzima e suporte. Nanopartículas ativadas na presença de 25% de glutaraldeído obtiveram rendimento de imobilização em torno de 85%, e a atividade do derivado de 6,71 U/g. Ensaio de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar resultaram em 15,6% de celulose e hemicelulose e 84,4% de açúcares redutores. Portanto, a avaliação dos parâmetros de imobilização e os resultados de hidrólise enzimática demonstraram que celulase de *T reesei* foi covalentemente imobilizada a NPMs mistas, e que o biocatalisador proposto possui potencial promissor para uso na hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Palavras chave: celulase; nanopartículas magnéticas; reciclo enzimático; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Enzyme recycling techniques have been shown to be a great attraction in lowering the production costs of second generation bioethanol. The enzymatic recycle at the end of the biomass hydrolysis process should be conducted in a manner that ensures easy recovery of the biocatalyst and the maintenance of its catalytic efficiency and operational stability. In this scenario, the application of magnetic nanoparticles (MNPs) as support for enzyme immobilization has been extensively studied because of the following MNPs' characteristics: rapid enzymatic recovery by the simple application of an external magnetic field; ability of loading large amounts of protein due to their high surface area; and low fabrication costs depending on the type of nanoparticle synthesis. In this work, the use of Ni-Zn mixed magnetic nanoparticles as a support of commercial cellulase immobilization of *Trichoderma reesei* was evaluated. The co-precipitation method was used to synthesize nanoferrites, and the surface functionalization was conducted in the presence of 3-aminopropyltriethoxysilane. Once functionalized, the mixed magnetic nanoparticles were activated with glutaraldehyde (MNP-APTES-GA), allowing the immobilization to occur through covalent attachment of the enzyme in the support. Activated nanoparticles in the presence of 25% of glutaraldehyde obtained immobilization yield of about 85%, and immobilized enzyme activity of 6.71 U/g. Pre-treated sugarcane bagasse hydrolysis assays resulted in 15.6% conversion of cellulose and hemicellulose to reducing sugars. Therefore, evaluating the immobilization parameters and the enzymatic hydrolysis results, it was demonstrated that *T. reesei* cellulase was covalently immobilized to mixed MNPs and that the proposed biocatalyst has a promising potential for application in lignocellulosic materials hydrolysis.

Keywords: cellulase; magnetic nanoparticles; enzyme recycling; enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação da estrutura da celulose, mostrando a celobiose como unidade básica de repetição e as ligações β -1,4 glicosídicas entre os monômeros de glicose..... 5
- Figura 2** - Esquema representando a ação sinérgica das celulasas na hidrólise de materiais lignocelulósicos7
- Figura 3** - Esquema ilustrando os diversos métodos de imobilização enzimática.....9
- Figura 4** - Esquema representado a ligação de APTES à superfície de nanopartículas magnéticas10
- Figura 5** - Esquema representativo da estrutura em espinel invertido de ferritas Ni-Zn. Legenda: Sítios octaédricos representados em azul, e sítios tetraédricos representados em vermelho.....13
- Figura 6** - Espectros de FTIR de amostras de NPMs funcionalizada, ativadas e de amostras de enzima imobilizada. Legenda: nanopartículas funcionalizadas (NANO-APTES); nanopartículas ativadas (NANO-APTES-GA); enzima imobilizada (NANO-APTES-GA-CTR).....27
- Figura 7** - Espectros de FTIR de amostras de NPMs funcionalizada, ativadas e de amostras de enzima imobilizada. Legenda: nanopartículas funcionalizadas (NANO-APTES); nanopartículas ativadas (NANO-APTES-GA); enzima imobilizada (NANO-APTES-GA-CTR).....28
- Figura 8** - Efeito da diluição enzimática no processo de catálise da celulase.....29
- Figura 9** - Efeito da força iônica na eficiência de imobilização. Legenda: molaridade de 5mM (valores em verde), 25mM (valores em vermelho), 50 mM (valores em azul) e de 100mM (valores em preto).....31
- Figura 10** - Efeito do pH na eficiência de imobilização. Legenda: pH 4,8 (valores em vermelho), pH 7,0 (valores em verde) e pH 9,0 (valores em azul).....32

Figura 11 – Gráfico mostrando influência da carga oferecida sobre o rendimento de imobilização e sobre a atividade relativa do biocatalisador. Legenda: Valores azuis correspondem ao rendimento de imobilização, enquanto valores em preto representam a atividade relativa do derivado.....	34
Figura 12 - Gráfico demonstrado o efeito da carga enzimática oferecida sobre a atividade teórica relativa.	
Figura 13 - Efeito do pH sobre atividade da enzima livre e imobilizada. Legenda: Valores em azul representam a atividade relativa da enzima imobilizada, enquanto que valores em preto representam a atividade relativa da enzima solúvel.....	35
Figura 14 - Influência da temperatura sobre eficiência catalítica da enzima livre imobilizada. Legenda: valores em azul correspondem à atividade relativa do derivado, e valores em preto correspondem a atividade relativa da enzima solúvel.....	36
Figura 15 - Ensaio eletroforese SDS-PAGE de amostras de branco e remanescente de imobilização e enzima imobilizada. Legenda: MM (KDa) corresponde ao marcador molecular de baixa massa molar, faixa 3, 4 e 5 correspondem respectivamente a amostras de branco de imobilização, remanescente de imobilização e amostra de enzima imobilizada.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de imobilização para NPMs ativadas em diferentes concentrações de glutaraldeído. Legenda: atividade do derivado (Atv d), atividade recuperada (Atv r) e rendimento de imobilização em termos de atividade (R atv). (Elaborada pela autora)30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS – Absorbância

APTES – 3-Aminopropiltriétoxosilano

Ar - Concentração de açúcares redutores, mg/mL

Atv D – Atividade enzimática do derivado, U/g

Atv E - Atividade do extrato enzimático, U/mL

Atv f - Atividade do remanescente após o período de imobilização, U/mL

Atv i- Atividade do branco de imobilização, U/mL

Atv of – Atividade oferecida, U/g

Atv R – Atividade recuperada do derivado, U/g

Atv T – Atividade teórica do derivado, U/g

Cel – Celulose

Cel7A - Celobiohidrolase I

Cel7B - Celobiohidrolase II

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLEAs – Cross Linked Enzyme Aggregates

CMC – Carboximetilcelulose

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira

CTR – Celulase de *Tridhoderma reesei*

DNS – Ácido 3,5 dinitrosalicílico

FD - Fator de diluição,

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformadas de Fourier

GA – Glutaraldeído

H - Campo magnético, Oe

HCell – Hemicelulose

LIA – Lignina insolúvel em ácido, %

LSA - Lignina solúvel em ácido, %

M - Magnetização, Emu

M_{Ar} - Massa de açúcares redutores, mg

M_B - Massa de biomassa, mg

M_S – Massa de suporte de imobilização, g

NANO – Nanopartícula magnética

NPM – Nanopartículas magnética

NREL - National Renewable Energy Laboratory

P_B - Concentração proteica do branco de imobilização, mg/mL

P_D - Concentração de proteínas aderida ao derivado, mg/mL

P_R – Concentração proteica do remanescente de imobilização, mg/mL

R_{ATV} - Rendimento de imobilização em termos de atividade, %

SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

ST - Sólidos totais,

t - tempo de reação de hidrólise, min

TS - Teor de sólidos, %

V_h - Volume final de hidrólise

V_{de} - volume de diluição enzimática, mL

V_i - Volume final de solução de imobilização, mL

V_r - Volume reacional, mL

ϵ - Absortividade molar, $L g^{-1}cm^{-1}$

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Bioetanol.....	18
3.2 Materiais lignocelulosícos.....	19
3.3 Celulases de <i>Trichoderma reesei</i>	20
3.4 Imobilização de enzimas	22
3.5 Nanopartículas magnéticas como suporte de imobilização	25
3.5.1 Nanopartículas magnéticas: propriedades gerais.....	25
3.5.2 Propriedades magnética das nanoferritas	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Materiais	29
4.2 Metodologia	29
4.2.1 Atividade hidrolítica da enzima solúvel	29
4.2.2 Síntese de Nanopartículas Magnéticas Mistas Ni-Zn.....	30
4.2.3 Funcionalização das nanopartículas magnética Ni-Zn.....	30
4.2.4 Ativação das NPMs com glutaraldeído.....	30
4.2.5 Imobilização de celulase de <i>T. reesei</i> em NMP-APTES-GA	31
4.2.6 Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.....	33
4.2.7 Caracterização das nanopartículas magnéticas mistas NiZnFe ₂ O ₄	33
4.2.8 Otimização da imobilização da celulase.....	33
4.2.8.1 Efeito da molaridade do tampão na imobilização.....	34

4.2.8.2 Efeito do pH no rendimento de imobilização.....	34
4.2.9 Ensaio de Carga Máxima.....	34
4.2.10 Efeito temperatura e pH na atividade da enzima livre e imobilizada.....	34
4.3 Preparo de amostra da biomassa de cana-de-açúcar.....	35
4.4 Determinação Composicional da Biomassa.....	35
4.4.1 Determinação de Teor de Sólidos.....	35
4.4.2 Determinação Extraíveis.....	36
4.4.3 Determinação de Lignina Solúvel em Ácido.....	36
4.4.4 Determinação de Lignina Insolúvel em Ácido.....	37
4.4.5 Determinação Celulose e Hemicelulose.....	37
4.5. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas.....	40
5.1.1 Análise de espectro por FTIR.....	40
5.1.2 Análise de magnetização das nanopartículas magnéticas.....	41
5.2 Atividade hidrolítica do extrato enzimático de <i>Trichoderma reesei</i>	42
5.3 Efeito da concentração de glutaraldeído na ativação das NPMs.....	43
5.4 Efeito da concentração iônica e do pH sobre rendimento de imobilização.....	44
5.5 Efeito de carga enzimática máxima.....	47
5.6 Influência do pH e temperatura sobre atividade da enzima solúvel e imobilizada....	49
5.6.1 Efeito do pH sobre atividade de enzima livre e imobilizada.....	49
5.6.2 Efeito da temperatura sobre atividade enzima livre e imobilizada.....	50
5.7 Ensaio de eletroforese SDS-PAGE.....	51
5.8 Hidrólise enzimática da biomassa de cana-de-açúcar.....	52

<i>5.8.1 Determinação composicional da biomassa.....</i>	<i>52</i>
<i>5.8.2 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....</i>	<i>53</i>
6. CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

As celulases são enzimas classificadas como hidrolases glicosídicas que atuam na clivagem de ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos (GUPTA *et al.*, 2016). Essas enzimas são alvos constante de pesquisas porque podem ser aplicadas na hidrólise de materiais lignocelulósicos, visando a produção de bioetanol de segunda geração. Por conta do seu elevado custo de produção, estratégias de reuso enzimático são alternativas para tornar o bioetanol de segunda geração competitivo no mercado de fontes de combustível.

Uma estratégia de reuso enzimático é a utilização de métodos de imobilização enzimática. A imobilização de enzimas consiste em ligar ou incorporar moléculas de enzimas sobre ou dentro de grandes superfícies por meio de ligação a um carreador, ligação cruzada ou encapsulamento (ANSARI *et al.*, 2012). Além de permitir o reuso da enzima ao final do processo de hidrólise, a imobilização enzimática pode ainda melhorar algumas propriedades enzimáticas, como atividade, estabilidade operacional e sensibilidade (MOHAMAD *et al.*, 2015; VAGHARI *et al.*, 2016)

A aplicação de nanopartículas magnéticas (NPMs) como suporte de imobilização têm sido bastante estudadas devido às seguintes características das nanopartículas: facilidade de obtenção, elevada capacidade de carregamento enzimático, facilidade de recuperação por uso de campo magnético externo, etc. (MOHAMAD *et al.*, 2015, MOHAMMED *et al.*, 2017; HWANG *et al.*, 2013, AHMAD *et al.*, 2015). As nano ferritas são um exemplo de NPMs bastante utilizadas em pesquisas de imobilização enzimática devido sua versatilidade de aplicações, tais como análise proteômicas, clarificação de sucos, análises de colesterol totais, síntese verde de etanol celulósico, etc . A incorporação de metais de transição divalentes à estrutura de nanoferritas pode melhorar suas propriedades magnéticas, como aumentar a saturação de magnetização (THAKUR *et al.*, 2009; CLABORN; 2014) e melhorar a estocagem desses materiais, devido a propriedades anticorrosivas (MISZCZYK *et al.*, 2011).

Diante do exposto, este trabalho propõe a imobilização de celulase comercial de *Trichoderma reesei* em nanopartículas magnéticas mistas Ni-Zn por meio de ligação covalente como intuito de aplicar o biocatalisador na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a imobilização de celulase do fungo *Trichoderma reesei* em nanopartículas magnéticas Ni-Zn por meio de ligação covalente visando aplicar o biocatalisador na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas mistas Ni-Zn;
- Estudar a concentração de glutaraldeído na ativação das nanopartículas;
- Determinar melhores condições de imobilização (força iônica e pH de imobilização);
- Estudar a eficiência catalítica do biocatalisador proposto em diferentes condições de pH e temperatura;
- Estudar a capacidade máxima de ligação de enzima ao suporte;
- Determinar a eficiência catalítica da enzima imobilizada na hidrólise de matéria-prima lignocelulósica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bioetanol

Nos últimos anos, o biocombustível tem surgido como alternativa de grande importância na substituição do uso de combustíveis fósseis. Apesar de Estados Unidos e Brasil liderarem a produção de biocombustíveis sendo responsáveis por cerca de 85% da produção mundial em 2015, de acordo com Renewable Fuels Association (Associação de Combustíveis Renováveis), os investimentos transferidos para pesquisas na área demonstram o crescente interesse mundial no bioetanol. Mais de 64 países já possuem programas para tornar o bioetanol sua principal fonte de combustível, e até 2020 a União Europeia almeja que seus países membros substituam 10% dos seus combustíveis para transporte por combustíveis renováveis como o biocombustível (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2016)

Atualmente, a geração de bioetanol mundial ocorre principalmente em plataformas de etanol de primeira geração. Nessas usinas, a matéria prima para a produção do etanol são açúcares e amido facilmente fermentescíveis presentes, por exemplo na cana-de-açúcar e no milho (DIAS *et al.*, 2011). Os açúcares são metabolizados por leveduras, geralmente *Saccharomyces cerevisiae*, gerando etanol como subproduto da fermentação. Apesar de cada vez mais integrado ao mercado consumidor e com sólidos investimentos governamentais, o bioetanol de primeira geração ainda precisa superar alguns obstáculos para que possa se tornar mais economicamente atrativo frente aos combustíveis fósseis. Por exemplo, o bioetanol produzido no Brasil é gerado a partir de cana-de-açúcar, cujas plantações competem com o uso de terras para cultivos alimentares e cuja produção pode ainda estar sujeita a condições climática (DIAS *et al.*, 2011)

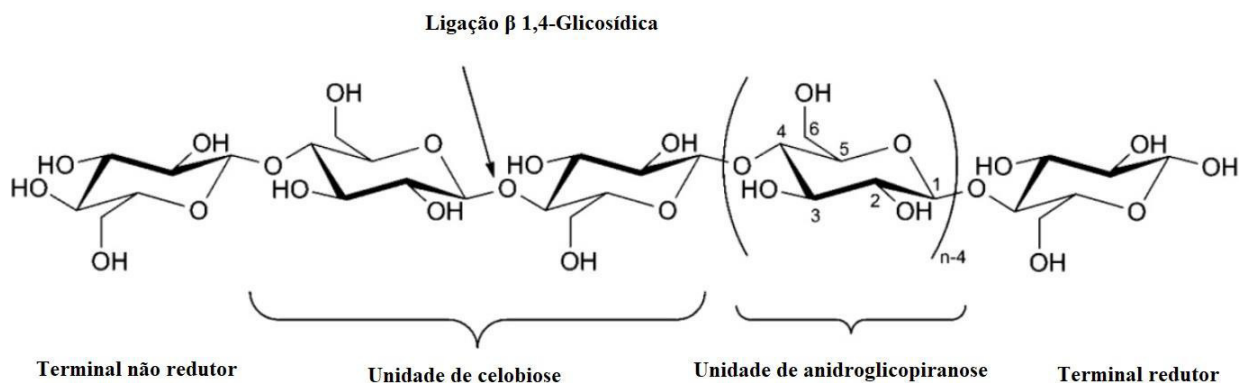
Considerando esse cenário, é possível perceber a importância no desenvolvimento de plataformas de bioetanol de segunda geração, a qual consiste em utilizar fontes lignocelulósicas, compostas basicamente de celulose, hemicelulose e lignocelulose, como matéria prima para fermentação alcoólica. Ao final do processo de extração de açúcares da cana-de-açúcar e do amido de milho, há a geração de resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana e da palha de milho. Portanto, esses resíduos, que geralmente são utilizados para alimentar as caldeiras das usinas de bioetanol de primeira geração, podem servir como matéria prima para as plataformas de bioetanol celulósico. Além disso, outros resíduos lignocelulósicos também podem ser reaproveitados tais como: os resíduos de serrarias, da indústria de papel e outros resíduos agrícolas como a palha de trigo. (ALFTRÉN, 2014). Vale ressaltar que a

facilidade de obtenção de matéria prima para produção de etanol de segunda geração é uma grande vantagem para essa plataforma energética, uma vez que o custo com matérias primas ocupa o primeiro lugar dentre todos custos de produção de bioetanol (ADEN *et al.*,2009).

3.2 Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são compostos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, os quais são os principais constituintes da parede celular das plantas, embora possam estar presentes em algumas algas, bactérias e fungos. Dentre esses compostos orgânicos, a celulose se destaca como a matéria prima renovável mais abundante da natureza (CHEN, 2014) e é o alvo de ação das enzimas celulolíticas utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração. A celulose é um polímero orgânico composto por monômeros de glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas e cuja unidade básica de repetição é a celobiose, um dímero de glicose (CHEN, 2014), e o esquema de sua estrutura pode ser observado na Figura 1. Assim, longas cadeias de glicose se organizam paralelamente de forma a possibilitar a interação entre cadeias. Essas interações correspondem a ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas da glicose, ou ainda interações hidrofóbicas e Van der Waals (ALFTRÉN, 2014). Quando as cadeias de glicose se agregam há a formação de regiões em que a tais interações são mais fortes (principalmente ligações de hidrogênio) ou menos fortes, criando regiões de celulose cristalina ou amorfa, respectivamente (ALFTRÉN, 2014; CHEN, 2014).

Figura 1 – Representação da estrutura da celulose, mostrando a celobiose como unidade básica de repetição e as ligações β -1,4 glicosídicas entre os monômeros de glicose.



Fonte: Adaptado de EYLEY *et al.*, 2014.

A unidade organizacional mais básica da celulose é a fibrila elementar, que se organiza para formar as fibrilas com cerca de 12 nm de diâmetro. O próximo nível de

organização é a microfibrila, constituída de quatro fibrilas e com diâmetro de 25 nm. E, por fim, quando mais de uma microfibrila se unem, diz-se que tem uma macrofibrila (CHEN, 2014). Cerca de 5 a 20% da microfibrila é correspondente a regiões de celulose amorfa, onde o acesso a enzimas é mais fácil quando em comparação a regiões cristalinas. A recalcitrância da celulose não é consequência somente do grau de cristalinidade, mas também advém do seu grau de polimerização, ou seja, do número de monômeros de glicose em sua cadeia, podendo conter de 500 a 15 000 unidades de glicose (CHANDEL *et al.*, 2014).

Moléculas não-celulósicas como a hemicelulose e a pectina também interagem com a celulose. Por exemplo, a hemicelulose participa da estrutura das fontes lignocelulósicas ao se posicionar entre as fibras elementares de celulose e sua composição química é caracterizada como um copolímero de diferentes moléculas de sacarídeos com ramificações contendo D-xylose, D-manose, D-glicose e D-galactose, entre outros sacarídeos. Os monômeros de açúcar das cadeias principais de hemicelulose são unidos por ligações β -1,4-glicosídicas, enquanto os açúcares presentes nas ramificações são unidos por ligações β -1,3 e β -1,6 glicosídicas (CHEN, 2014). Assim, açúcares com 6 carbonos (ex.: glicose) ou com 5 carbonos (ex.: xilose e arabinose) podem ser obtidos da degradação da celulose e da hemicelulose.

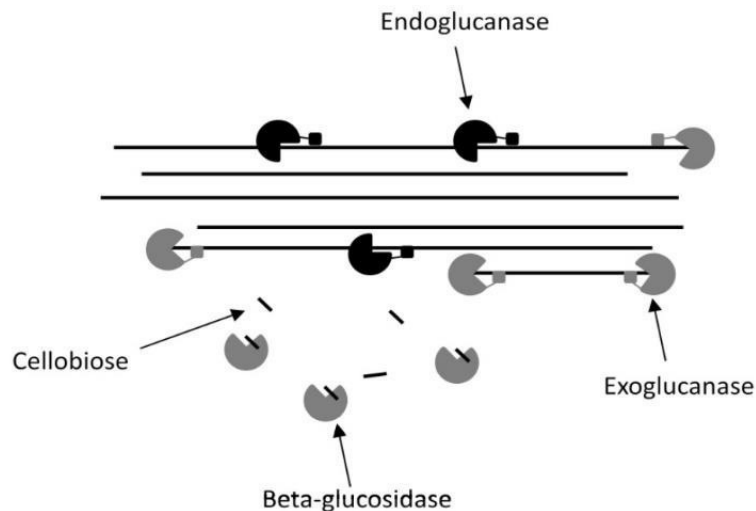
3.3 Celulases de *Trichoderma reesei*

Celulases são enzimas hidrolíticas que agem de forma sinérgica para catalisar a conversão completa da celulose a monômeros de glicose (YANG *et al.*, 2013; GUPTA, 2016; ALFTRÉN, 2014). Essas hidrolases podem ser produzidas por bactérias, algumas algas, mas principalmente por fungos, cujas celulases têm menor custo de produção e purificação, além de apresentarem maiores atividades hidrolíticas (GUPTA, 2016). O processo enzimático de metabolização da celulose a glicose é complexo e ocorre na presença de três principais hidrolases: endoglucanases (3.2.1.4), celobiohidrolases ou exoglucanases (3.2.1.91.) e β -glucosidasas (3.2.1.21.) (ALFTRÉN, 2014; YANG *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2008; GUPTA, 2016).

O mecanismo de ação sinérgica das celulases está ilustrado na Figura 2. As endoglucanases iniciam o processo de conversão diminuindo o grau de polimerização da celulose uma vez que quebram aleatoriamente as ligações β -1,4 glicosídicas entre as unidades de glicose nas regiões menos cristalinas da celulose. Com isso há o aumento no número de oligossacarídeos e, conseqüentemente, de terminações reductoras e não reductoras das cadeias de glicose. Esses são os alvos das celobiohidrolases (também chamadas de exoglucanases), que

são mais ativas em regiões de celulose cristalina (LIU *et al.*, 2011). Estas hidrolases agem liberando moléculas de celobiose: celobiohidrolase I (Cel7A) agindo sobre terminações reductoras, e celobiohidrolase II (Cel7B) agindo sobre as não reductoras. O último passo para a obtenção de glicose é ação das β -glucosidases, que agem rompendo a ligação β -1,4 glicosídica das moléculas de celobiose liberadas pelas celobiohidrolases, de modo a liberar duas moléculas de glicose (ALFTRÉN, J. 2014; YANG *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2008; GUPTA, V. 2016). Embora esta última enzima não haja diretamente sobre a celulose (e sim sobre a celobiose), é comum classifica-la como uma celulase, uma vez que é essencial para a conversão total da celulose à glicose.

Figura 2 – Esquema representando a ação sinérgica das celulases na hidrólise de materiais lignocelulósicos.



Fonte: ALFTRÉN, 2014.

Trichoderma reesei é um fungo ascomiceto mesofílico filamentososo com alto teor de produção de celulases extracelulares. Ele foi primeiramente isolado durante a Segunda Guerra Mundial, quando foi descoberto nas lonas de algodão do exército americano nas Ilhas Salomão, Oceania. A cepa isolada na época viria a ser o que hoje é a cepa referência para a espécie e da qual vários dos mutantes utilizados atualmente foram obtidos (BERNARDES, 2011; BISCHOF *et al.*, 2016).

Desde sua descoberta, *T. reesei* tem sido constantemente estudado em pesquisas de melhoramento genético devido ao seu potencial de aplicação na conversão total de celulose a glicose. Em duas décadas de pesquisas, o volume de celulases excretadas pela cepa de referência aumentou cerca de 20 vezes (BISCHOF *et al.*, 2016). Além do melhoramento da

cepa, outras estratégias também têm se mostrado fundamental no desenvolvimento do bioetanol de segunda geração, como pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, consolidação da engenharia de bioprocessos, estratégias para evitar a inibição enzimática pelo produto, etc (GOMES *et al.*, 2015).

Estudos revelam *T. reesei* como uma cepa de grande produção de celobiohidrolases, com cerca de 60 % das proteínas excretadas correspondendo a celobiohidrolase I (Cel7A), e 20 % correspondendo a celobiohidrolase II (Cel7B) (KARHUNEN *et al.*, 1993), sendo estas as únicas celobiohidrolases produzidas pela espécie. Neste microorganismo, as celobiohidrolases possuem dois domínios distintos: um catalítico e um de ligação ao substrato (YANG *et al.*, 2013). O domínio de ligação se fixa ao substrato de forma eficiente, uma vez que após a quebra da ligação glicosídica pelo domínio catalítico a enzima não se dissocia do substrato, mas ‘desliza’ nele até o próximo sítio de ação (GOMES *et al.*, 2015).

Em menores quantidades, *T. reesei* também excreta endoglucanases, que podem ou não apresentar estrutura com dois domínios. Por fim, a celulase menos excretada por *T. reesei* são as β -glucosidases, que representam cerca de 0,5% das proteínas excretadas (GOMES *et al.*, 2015). Por conta da baixa produção de β -glucosidase, pode haver maior acúmulo de celobiose, a qual é um inibidor para as endoglucanases e celobiohidrolases. Portanto, é comum que as preparações enzimáticas de *T. reesei* resultem em hidrólises incompletas, sendo muitas vezes necessária a complementação com β -glucosidases de outros microorganismos (ALFTRÉN, 2014).

3.4 Imobilização de enzimas

Depois do custo com matérias primas, o custo com a obtenção de enzimas lignocelulolíticas é o mais elevado no processo de produção de bioetanol (ADEN *et al.*, 2009). Considerando esse cenário, várias estratégias foram estudadas visando contornar esse problema como, por exemplo, o uso de estratégias de reciclo enzimático.

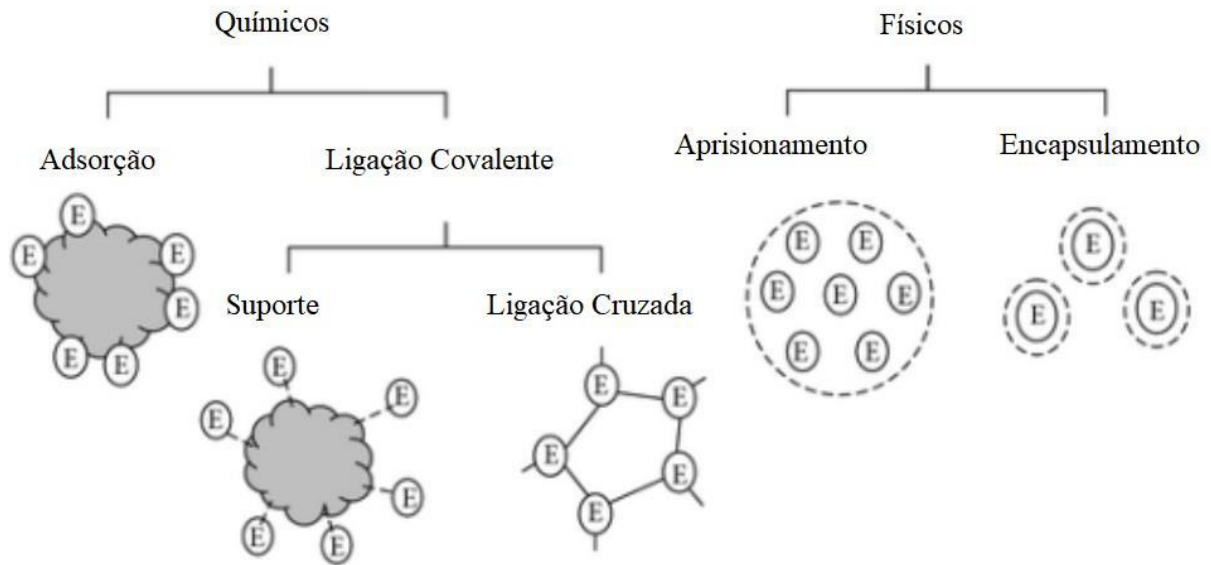
O reciclo enzimático permite a recuperação da enzima ao final do processo de catálise, de modo a reutilizar o biocatalisador em reações subsequentes. Nesse contexto, a imobilização de enzimas é uma alternativa bastante estudada porque, além de permitir a recuperação da enzima, também pode melhorar algumas propriedades enzimáticas, tais como estabilidade, atividade, seletividade, especificidade e diminuição de inibição (MATEO *et al.*, 2007). Desse modo, a imobilização enzimática é tanto uma alternativa para a diminuição de custos de produção, quanto uma estratégia para superar algumas limitações no uso de enzimas

livres nos processos industriais, tais como sensibilidade às condições do processo, baixa estabilidade em operações de longa duração, estrutura instável, etc (MOHAMAD *et al.*, 2015; VAGHARI *et al.*, 2016).

Segundo ANSARI *et al.*, (2012), imobilização enzimática consiste em ligar ou incorporar moléculas de enzimas sobre ou dentro de grandes superfícies por meio de ligação a um carreador, ligação cruzada ou encapsulamento. A interação entre enzima e suporte vai depender tanto da composição da enzima, ou seja, qual o tipo de interação vai ser facilitado de acordo com as propriedades dos grupos funcionais de seus resíduos de aminoácidos (MOHAMAD *et al.*, 2015), quanto da composição da superfície do suporte. O tipo de suporte e suas modificações pós-síntese irão ditar a forma de interação com a enzima, influenciando diretamente as propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas da enzima imobilizada (VAGHARI *et al.*, 2016).

De forma geral, os métodos de imobilização podem ser divididos em: adsorção física, ligação covalente, encapsulamento e ligação cruzada (BEZERRA *et al.*, 2015), como ilustrado na Figura 3. Métodos que envolvem adsorção física são caracterizados por interações fracas entre enzima e suporte, tais como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligação iônica. É o método mais simples de imobilização, contudo, tem a desvantagem de apresentar maior lixiviação enzimática em decorrência das interações fracas entre enzima e carreador (DATTA *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2015). Métodos de imobilização por ligação covalente geram biocatalisadores com maior resistência mecânica e que, portanto, possuem menor desprendimento enzimático. A imobilização por encapsulamento é caracterizada pela síntese de um suporte polimérico na presença da enzima, de forma a aprisionar a enzima na estrutura interna do suporte. Este tipo de estratégia pode provocar limitações difusionais, dificultando o acesso do substrato à enzima, o que resulta em menor atividade enzimática. Por último, a imobilização por ligação cruzada utiliza um agente de acoplamento bi o multifuncional para aderir as moléculas de enzimas umas às outras através dos grupos amino de sua superfície (BEZERRA *et al.*, 2015; KARTHICK *et al.*, 2012; DATTA *et al.*, 2013).

Figura 3 – Esquema ilustrando os diversos métodos de imobilização enzimática.



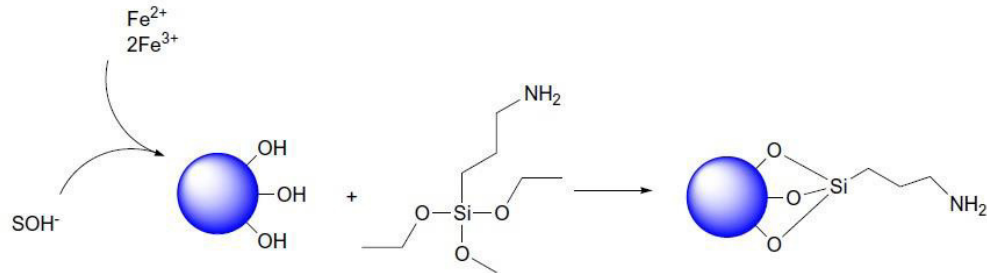
Fonte: TAHER *et al.*, 2011.

Dentre esses métodos, a estratégia de imobilização por ligação covalente permite interação mais forte entre enzima e suporte, diminuindo ou evitando lixiviação enzimática por desprendimento do suporte, além de permitir mais ciclos de reuso da enzima imobilizada (MOHAMAD *et al.*, 2015; VAGHARI *et al.*, 2016). A ligação covalente pode ocorrer entre os grupos funcionais de resíduos de aminoácidos como a lisina, a cisteína, o ácido aspártico e glutâmico, entre outros, e os grupos reativos no suporte (MOHAMAD *et al.*, 2015; DATTA *et al.*, 2013).

Os grupos reativos podem ser adicionados ao suporte sem a modificação do mesmo, ou o suporte pode passar por modificações para apresentar tais grupos (MOHAMAD *et al.*, 2015). Em ambos os casos, diz-se que a superfície do suporte foi funcionalizada, ou seja, passou a apresentar grupos funcionais que permitem a interação com a enzima. A adição de grupos amino à superfície do suporte é um exemplo de adição de grupos reativos sem a modificação do suporte. Esse tipo de funcionalização pode ocorrer por meio da reação de silanização, que consiste em recobrir uma superfície com grupos silanos (SiH_4). Considerando a imobilização de enzimas, a silanização com aminosilanos tem grande importância porque esses compostos funcionam como uma interface entre suportes inorgânicos e as enzimas (BINI *et al.*, 2012). O 3-aminopropiltrióxido (APTES) é um aminosilano, cujo grupo orgânico é uma amina primária ou secundária, bastante utilizado nos processos de funcionalização por sua elevada biocompatibilidade e quantidade de grupos amino livre (TANG *et al.*, 2011). O APTES se liga

a superfícies contendo grupos hidroxila, como ilustrado na Figura 4, de modo a deixar livre o grupo amino.

Figura 4 – Esquema representado a ligação de APTES à superfície de nanopartículas magnéticas.



Fonte: Netto *et al.* (2009).

O glutaraldeído é um agente bifuncional de acoplamento que permite ligação cruzada entre enzima-enzima (MOHAMAD *et al.*, 2015). É bastante vantajoso porque pode ser utilizado em diversas condições (MATEO *et al.*, 2007) e porque pode permitir ligações multipontuais entre os vários resíduos de lisina na enzima e grupos amino da superfície do suporte. A interação entre o glutaraldeído e os grupos amino dos resíduos de lisina ocorre por meio da formação de bases de Schiff ou através de Adição de Michael (MOHAMAD *et al.*, 2015). Por se ligar a diversos resíduos de lisinas, o glutaraldeído pode aumentar a estabilidade da enzima ao promover uma rigidificação em sua estrutura (MATEO *et al.*, 2007) e ainda evitar o desprendimento da enzima no suporte.

3.5 Nanopartículas magnéticas como suporte de imobilização

3.5.1 Nanopartículas magnéticas: propriedades gerais

Como exposto anteriormente, o tipo de suporte vai influenciar diretamente várias das propriedades da enzima imobilizada, tais como: características químicas, bioquímicas, mecânicas, etc (VAGHARI *et al.*, 2016). Portanto, a escolha do tipo de suporte é primordial para a imobilização enzimática. Um suporte considerado ideal para imobilização apresenta as seguintes características: estabilidade mecânica, rigidez, capacidade de suportar altas cargas enzimáticas, facilidade de regeneração, disponibilidade de grupos funcionais (para que possam reagir diretamente com a enzima ou que possibilitem a modificação química do suporte), além de apresentar baixa toxicidade e biocompatibilidade (FORESTI *et al.*, 2007).

Considerando tais características, torna-se fácil entender porque materiais nanoestruturados têm recebido cada vez mais destaque como suporte de imobilização (MOHAMAD *et al.*, 2015; MOHAMMED *et al.*, 2017). Os nanomateriais (materiais que possuem ao menos uma dimensão em escala nano) apresentam vantagens como elevada área superficial (o que permite maior capacidade de carga enzimática), não há resistência à transferência de massa interna, aumentando a eficiência de imobilização (MOHAMAD *et al.*, 2015; HWANG *et al.*, 2013; AHMAD *et al.*, 2015).

A vantagem dos materiais nanoestruturados sobre os demais suportes torna-se ainda maior quando os mesmos apresentam propriedades magnéticas, uma vez que a recuperação da enzima imobilizada ocorre simplesmente pela aplicação de um campo eletromagnético externo (YIU *et al.*, 2012). Partículas cujas dimensões variam entre 1 e 100 nm são chamadas nanopartículas e, dentre suas diversas aplicações, também podem atuar como carreadores enzimáticos. Uma das nanopartículas mais usadas para tal fim são as nanoferritas.

3.5.2 Propriedades magnética das nanoferritas

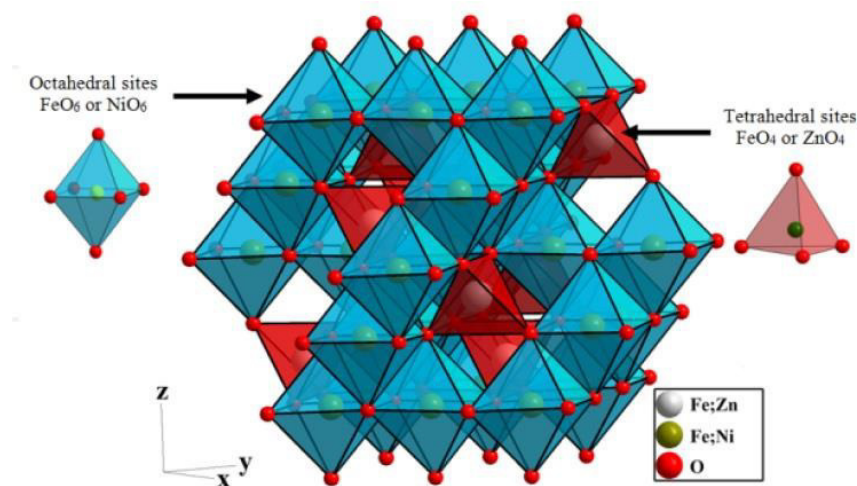
As propriedades magnéticas de um material são definidas pela sua suscetibilidade magnética, que consiste no grau de magnetização de um material em virtude da aplicação de um campo magnético externo (INDIRA *et al.*, 2010). Materiais ferromagnéticos possuem regiões ou domínios de magnetização geral, os quais se imantam fortemente na presença de um campo magnético externo (LAURENT *et al.*, 2016; AKBARZADEH *et al.*, 2012). Incrementos na força do campo magnético externo levam a uma maior magnetização. Essa tendência continua até que todos os domínios do material estejam alinhados com o campo externo. Diz-se então que foi atingida a saturação de magnetização do material. Se o campo magnético externo é anulado, a magnetização do material é mantida por um momento, até que diminua e apresente uma magnetização remanescente. Essas propriedades magnéticas caracterizam materiais ferromagnéticos.

Ferritas são compostos químicos obtidos em forma de pó ou corpos cerâmicos com propriedades ferromagnéticas e cujos principais componentes são os óxidos de ferro: Fe_2O_3 e FeO , os quais podem ser parcialmente substituídos por outros metais de transição, tais como níquel, zinco e cobalto (FARZAD, 2012). Em ferritas com dimensões menores que 20 nm, o cristal de óxido de ferro é visto como um domínio único. Assim, quando o campo magnético externo é retirado, essas nanoferritas perdem totalmente sua magnetização (LAURENT *et al.* 2016; INDIRA *et al.*, 2010, AKBARZADEH *et al.*, 2012; HASANY *et al.*, 2012). Esse

fenômeno é característico de materiais superparamagnéticos, os quais apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo (VAGHARI *et al.*, 2016). O superparamagnetismo em nanopartículas magnéticas evita aglomeração das nanopartículas (BINI *et al.*, 2012), o que diminuiria a área superficial disponível para imobilização enzimática e para acesso do substrato à enzima imobilizada.

Como exposto anteriormente, óxidos de ferro das nanoferritas podem ser parcialmente substituídos por metais de transição como níquel e zinco. A incorporação desses metais na composição das ferritas têm influência sobre suas propriedades físicas, magnéticas e estruturais (RAGHAVENDER *et al.*, 2011; VELMURUGAN *et al.*, 2010; EL-SAYED *et al.*, 2002). Por exemplo, é sabido que a incorporação de Zn aumenta a saturação máxima das ferritas (VIRDEN *et al.*, 2005). Nanoferritas contendo níquel e zinco (nanoferritas NiZn) são um dos tipos mais versáteis de ferritas para uso geral (EL-SAYED *et al.*, 2002, GHASEMI *et al.*, 2014). Sua estrutura cristalina é classificada como um espinel invertido, onde os sítios octaédricos são ocupados por átomos de Zn ou Fe (ZnO_6 ou FeO_6), e sítios tetraédricos são ocupados por átomos de Ni ou Fe (NiO_4 ou FeO_4) (Figura 5) (GHASEMI *et al.*, 2014; CLABORN; 2014).

Figura 5 – Esquema representativo da estrutura em espinel invertido de ferritas Ni-Zn. Legenda: Sítios octaédricos representados em azul, e sítios tetraédricos representados em vermelho



Fonte: CLARBON, 2014.

Ferritas Ni-Zn nanoestruturadas têm atraído atenção nas mais diversas áreas devido a propriedades como alta resistividade elétrica, elevados valores de magnetização de saturação e valores baixos de coercividade, que consiste na força magnética necessária para remover o

magnetismo residual de um material (THAKUR *et al.*, 2009; CLABORN; 2014). A aplicação de nanoestrutura de ferritas Ni-Zn como suportes para imobilização enzimática traz mais uma vantagem, uma vez que esses carreadores possuem propriedades anti-corrosivas, o que contribui para maior tempo de estocagem. (MISZCZYK *et al.*, 2011). Nanoferritas mistas Ni-Zn foram utilizadas como suporte de imobilização de celulase de *Tichoderma reesei*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

A enzima utilizada nesse trabalho foi produzida pela empresa Sigma-Aldrich® e corresponde a celulase (E.C. 3.2.1.4) de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Celluclast® 1.5L. A biomassa utilizada como substrato nos ensaios de hidrólise enzimática corresponde a bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão à vapor de baixa severidade (temperatura e pressão) e foi gentilmente cedida pelo Centro de Tecnologia Canaveira (CTC, Piracicaba - SP). Todos os outros reagentes utilizados possuem grau analítico.

Os resultados apresentados correspondem à média aritmética e ao desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.

4.2 Metodologia

4.2.1 Atividade hidrolítica da enzima solúvel

A atividade enzimática da celulase foi obtida de acordo com o protocolo de GHOSE (1987), com modificações. De acordo com esse protocolo, 0,5 mL da enzima diluída em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 reage a 50 °C por 30 min com 0,5 mL 2% de carboximetilcelulose (v/v) dissolvida também em tampão citrato. Após esse período, 3mL do reagente de ácido 3,5 dinitrosalicílico, preparado de acordo como o protocolo de (MILLER, 1959), são adicionados ao volume reacional, e a reação de coloração é conduzida em água fervente durante 5 min. Os tubos nos quais a reação ocorre são submersos em banho de gelo e a eles são adicionados 20 ml de água deionizada. A coloração avermelhada que se formou como resultado da ação do DNS é lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Foi construída uma curva padrão de glicose com o intuito de relacionar a os valores de absorbância obtidos e a concentração de açúcares redutores dissolvidos nas amostras. A atividade de diferentes diluições enzimáticas foi determinada segundo a Equação 1, onde A_r corresponde à concentração em mg/mL de açúcares redutores liberados por ação da celulase, 5,55 é o fator que converte mg/mL a $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de açúcar redutor, V_r é o volume reacional de 1 mL, t é o tempo de reação em min e V_{de} é o volume de diluição enzimática utilizado na reação de hidrólise.

$$Atv = \frac{Ar * 5,55 * Vr}{t * Vde} \quad (1)$$

4.2.2 Síntese de nanopartículas magnéticas mistas Ni-Zn

A síntese das nanopartículas magnéticas mistas foi conduzida por meio da técnica de co-precipitação e segundo a metodologia descrita por Freire *et al* (2013). Sais de ferro, níquel e zinco ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 e $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram solubilizados em água deionizada nas proporções adequadas para se obter nanoferritas com a seguinte composição: $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$. Na presença de NaOH e sob agitação constante de 6000 rpm, os sais metálicos foram co-precipitados a hidróxidos de metais. Posteriormente, a solução foi transferida para uma autoclave de Teflon com uma camisa de aço inoxidável, a qual foi submetida a 250°C durante 30 min em forno tipo mufla. Por ação da elevada temperatura em meio alcalino, os hidróxidos de metais são convertidos a ferritas mistas. Por fim, o material foi lavado com água destilada até que o pH se mantivesse neutro. Após secagem em dessecador (-360 mmHg), as nanopartículas magnéticas mistas foram maceradas com *chariot* para que se obtivesse uma homogeneidade no tamanho do material.

4.2.3 Funcionalização das nanopartículas magnética Ni-Zn

A sinalização da superfície das NPMs foi conduzida na presença de tolueno, etanol absoluto P.A. e do material de recobrimento utilizado, nesse caso, o 3-aminopropil trietoxilano (APTES). Um volume de 300 μL de APTES foi utilizado para cada 100 mg de nanopartículas magnéticas. O recobrimento foi possibilitado por meio de agitação em ultrassom de ponteira em 3 ciclos de 5 min. O material funcionalizado foi lavado uma vez com metanol e duas vezes com etanol e armazenado em dessecador (BEZERRA *et al.*, 2017).

4.2.4 Ativação das NPMs com glutaraldeído

As nanopartículas magnéticas recobertas com APTES (NPM-APTES) foram preparadas para o processo de imobilização através da ativação com glutaraldeído. Soluções com 5, 10, 15 e 25% de glutaraldeído foram preparadas em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,0 e mantidas em contato com 10 mg de NPM-APTES por duas horas. Após esse tempo, o suporte ativado (NMP-APTES-GA) foi lavado 2 vezes com tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 4,8.

4.2.5 Imobilização de celulase de *T. reesei* em NMP-APTES-GA

10 mg de NPM-APTES-GA foram mantidas em contato com 1 mL solução de imobilização por 24 horas. Esta solução consiste em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, adicionado de um volume de enzima suficiente para oferecer uma atividade de 25 U para cada 1 g de suporte. No tampão de imobilização, a atividade da celulase é de 1519,2 U/mL, e o cálculo para determinação da carga enzimática é ilustrado na Equação 2. Na Equação 2, $Atv E$ corresponde à atividade do extrato enzimático; V_i corresponde ao volume final de solução de imobilização, e M_s corresponde à massa de suporte utilizada.

$$Carga\ Enzimática = \frac{Atv\ E * V_i}{M_s} \quad (2)$$

Foram testados os seguintes tempos de imobilização: 1, 3, 5, 8 e 24 horas. Ao final de cada um desses períodos calculou-se a atividade do remanescente, ou seja, a atividade das enzimas em solução que não se ligaram ao suporte. A atividade do remanescente foi determinada segundo a Equação 1. Também foi calculada a atividade do derivado, o qual corresponde à enzima imobilizada no suporte. Ao fim da imobilização, o derivado foi lavado duas vezes com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, de forma a garantir que toda enzima não ligada ou ligada fracamente ao suporte não interferisse na atividade do derivado. Foi adicionado ao derivado 0,5 mL de tampão de atividade, e sua atividade foi medida segundo GHOSE (1987). A Equação 3 determina a atividade do derivado, onde Ar corresponde à concentração em mg/mL de açúcares redutores liberados por ação da celulase, 5,55 é o fator que converte mg/mL a $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de açúcar redutor, V_r é o volume reacional de 1 mL, t é o tempo de reação em min e M_s é a massa de suporte utilizada.

$$Atv\ D = \frac{Ar * 5,55 * V_r}{t * M_s} \quad (3)$$

A partir dos valores de atividade do remanescente e derivado foi possível obter os parâmetros utilizados na avaliação da imobilização. O primeiro parâmetro a ser avaliado é o rendimento de imobilização em termos de atividade (R_{atv}), o qual é demonstrado de acordo com a Equação 4, onde At_i é a atividade do branco de imobilização (enzima diluída no tampão de imobilização na ausência do suporte), e At_f é a atividade do remanescente após o período de imobilização.

$$R_{atv} = \frac{At_i - At_f}{At_f} * 100 \quad (4)$$

A atividade oferecida (Atv_{of}) é calculada considerando a At_i , o volume de imobilização e a massa de suporte, como demonstrado na Equação 5. A partir da atividade oferecida é calculada a atividade teórica da enzima imobilizada (Equação 6).

$$Atv_{of} = \frac{At_i * V_i}{M_s} \quad (5)$$

$$Atv_T = R * At_{of} \quad (6)$$

A Equação 7 determina a atividade recuperada (Atv_R), que corresponde ao percentual da atividade teórica que é mantido no derivado após a imobilização (RIOS, 2016).

$$Atv_R = \frac{Atv_D}{Atv_T} * 100 \quad (7)$$

Por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976)), foi determinada a quantidade de celulasas aderida às NPMs (P_d) a partir dos valores de concentração proteica do branco de imobilização (P_b) e do remanescente (P_r), utilizando a metodologia exposta por (BRÍGIDA *et al.*, 2007). Os resultados de concentração foram obtidos a partir de uma curva padrão da proteína albumina de soro bovino. A equação 8 demonstra a quantidade de proteínas aderidas ao derivado, onde V_i corresponde ao volume em mL de imobilização e M_s corresponde à massa em gramas do suporte:

$$P_d = \frac{(P_b - P_r) * V_i}{M_s} \quad (8)$$

4.2.6 Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

Os derivados obtidos a partir da imobilização de 300 U/g de carga enzimática, assim como amostras de branco de imobilização e remanescente, foram submetidos a análise qualitativa em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em gel de 12% de concentração de poliacrilamida utilizando célula tetra-Miniprotein (Biorad). Dez miligramas de amostras de enzimas imobilizadas foram suspensos em 100µL de tampão de ruptura (preparado segundo protocolo de GARCIA-GALAN *et al.*, 2014) e fervidos durante 10 minutos. Para as amostras de branco e imobilização e remanescente a proporção de tampão de ruptura e amostra foi de 1:1. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 3 min em minicentrífuga de eppendorfs e uma alíquota de 17 µL do sobrenadante foi utilizada nos experimentos. Foram utilizados marcadores moleculares de baixo peso molecular (SDS Marker – GE Healthcare Life Sciences). Os géis foram corados com Azul de Coomassie.

4.2.7 Caracterização das nanopartículas magnéticas mistas NiZnFe₂O₄

Com o intuito de investigar a composição do biocatalizador proposto, análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) foram realizadas em Espectrômetro Perkin Elmer. O preparo das amostras para a análise se deu com diluição em KBr, e os dados foram coletados em espectro de 400 a 4000 cm⁻¹.

As propriedades magnéticas das nanopartículas foram analisadas por meio de Magnetometria por Amostra Vibrante em Magnetômetro Lakeshore 7400, com amplitude máxima do campo magnético de 17 kOe. A calibração do instrumento foi realizada usando amostras de nitrogênio puro. Após a medição de massa de cada uma das amostras, os valores de magnetização são dados em emu/g.

4.2.8 Otimização da imobilização da celulase

Uma vez constatado a ocorrência da imobilização das celulasas nas NPMs, a próxima etapa de experimentação visou a otimização do processo de imobilização e a obtenção de um derivado com a eficiência catalítica necessária para ensaios hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Portanto, foram realizados testes para determinar qual a molaridade e o pH ideais para um maior rendimento de imobilização. Com o intuito de melhorar a eficiência catalítica do derivado, também foi testada qual a maior carga enzimática possível suportada nas NPMs, e em quais condições de pH e temperatura se obtém maiores valores de atividade do derivado

4.2.8.1 Efeito da molaridade do tampão na imobilização

A força iônica do meio onde ocorre a imobilização tem influência sobre como enzima e suporte irão interagir. Com o intuito de avaliar essa interação, a imobilização foi testada nas seguintes molaridades do tampão de imobilização: 5, 25, 50 e 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,0. Foram mantidas as mesmas condições de imobilização e de medida de atividade de derivado citadas no item 4.2.5.

4.2.8.2 Efeito do pH no rendimento de imobilização

Após determinada a força iônica ideal para a imobilização da celulase, foi testado qual o melhor pH para imobilização. Para isso foram utilizados os seguintes tampões: tampão citrato de sódio 5 mM, pH 4,8; tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e tampão carbonato-bicarbonato 5 mM, pH 9,0. Novamente, a imobilização e as medidas de atividade se deram nas mesmas condições citadas no item 4.2.6.

4.2.9 Ensaio de Carga Máxima

Uma vez definido qual o ambiente reacional que melhor favorece a imobilização, testes foram realizados para saber qual a capacidade enzimática máxima suportada pelas nanopartículas mistas. Para tanto, mantiveram-se as mesmas condições de imobilização em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 por 24 horas, sendo alterado somente a quantidade de enzima oferecida ao suporte. Portanto, os parâmetros de imobilização foram mensurados para nanopartículas carregadas com as seguintes cargas enzimáticas: 50, 100, 150, 250, 300 e 400 U/g.

4.2.10 Efeito temperatura e pH na atividade da enzima livre e imobilizada

A eficiência do biocatalisador foi analisada frente a diferentes condições de temperatura e pH. Medições de atividade de enzima livre e imobilizada com 300 U/g de carga enzimática foram testadas em tampões com diferentes pHs: tampão citrato de sódio pHs 4, 4,8 e 6,0; tampão fosfato de sódio pHs 7,0 e 8,0; tampão carbonato-bicarbonato pHs 9,0 e 10,0. Todos os tampões utilizados nesse teste tinham molaridade de 50 mM e as demais condições

do experimento se deram de acordo com o protocolo de GHOSE (1987). Também foi testada qual a temperatura ideal para a atividade da enzima solúvel e imobilizada. Para isso, a atividade enzimática foi testada nas seguintes temperaturas: 30, 40, 50, 55 e 60°C.

4.3 Preparo de amostra da biomassa de cana-de-açúcar

A biomassa pré-tratada foi preparada para análise segundo protocolo de ROCHA (2010), com algumas modificações. O bagaço foi seco em estufa à 60 ° C durante o período de 24 horas. O material seco foi triturado e peneirado em sistemas granulométrico entre 20 e 80 mesh, sendo posteriormente lavado três vezes com água deionizada para remoção de qualquer açúcar presente na biomassa. Posteriormente, esse material foi filtrado em funil de Buchner com o auxílio de papel de filtro de celulose de gramatura de 80 g/m² e permitido secar na estufa a 60°C. A biomassa seca foi então acondicionada a temperatura ambiente e utilizada nos ensaios de caracterização composicional e hidrólise enzimática da biomassa.

4.4 Determinação Composicional da Biomassa

A determinação do percentual de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa foi realizada com amostras de bagaço livre de extraíveis e a partir do percentual de sólidos totais de cada amostra de bagaço, de acordo com protocolos de National Renewable Energy Laboratory (NREL).

4.4.1 Determinação de teor de sólidos

Para a determinação de teor de sólidos totais, utilizou-se como referência o protocolo National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008b), com algumas modificações. Cadinhos de porcelana foram secados na estufa a 105°C por 24 horas, deixados esfriar em dissecador por cerca de 1 h e tiveram seus pesos anotados. Um grama de amostra de bagaço foi adicionado a cada cadinho, e foram anotados os pesos exatos de biomassa adicionada e os pesos dos cadinhos com a biomassa (massa úmida). Cadinhos com biomassa permaneceram secando a 105°C na estufa por 24 horas. Após esse período, foram esfriados durante 1 h no dissecador e tiveram seus pesos anotados (massa seca). O Teor de Sólidos (%TS) foi obtido a partir da seguinte equação:

$$\%TS = \frac{\text{massa seca} - \text{massa cadinho}}{\text{massa bagaço adicionada}} * 100 \quad (9)$$

4.4.2 Determinação de Extraíveis

O teor de extraíveis foi obtido a partir do protocolo NREL/TP-510-42619 (SLUITER, 2008a), com algumas modificações. A remoção de extraíveis foi realizada em um determinador de gorduras. Emboilers foram deixados secar a 60°C por 24 h na estufa e depois de esfriarem por 1 h em dessecador, seus pesos foram anotados. Cinco gramas de biomassa foram pesados, embalados em papel filtro e acoplados aos emboilers, onde ficaram submersos em 80 mL de etanol 95% a 80 °C durante 8 h. Posteriormente, a amostra de bagaço livre de extraíveis foram deixadas secar ao ar livre, e os emboilers contendo o solvente foram mantidos na estufa a 60°C. Após a evaporação completa do etanol, os emboilers foram esfriados por 1 hr no dessecador e seus pesos foram anotados (emboiler com extraíveis). O percentual de extraíveis em cada amostra de biomassa foi obtido a partir da seguinte equação:

$$\%Extraíveis = \frac{\text{Emboiler com extraíveis} - \text{Emboiler vazio}}{\%TS} * 100 \quad (10)$$

4.4.3 Determinação de lignina solúvel em ácido

A determinação de lignina e a análise estrutural de carboidratos seguiu o protocolo NREL-TP-510-42618 (SLUITER *et al.*, 2008c), utilizando as modificações de ROCHA (2010). Filtros Buchner de porosidade 2 foram mantidos em estufas a 105 °C, resfriados em dessecador por 1h e tiveram seus pesos registrados. Um grama de biomassa livre de extraíveis foi pesado e adicionado a tubos de pressão. Adicionou-se 3mL de H₂SO₄ 72% a cada tubo, com posterior homogeneização em vórtex por 1 min, seguida de hidrólise ácida em banho-maria a 30 °C por 1 hora. Diluiu-se o ácido sulfúrico de 72% para 4 % com a adição de 84 mL de água destilada em cada tubo, e uma segunda hidrólise ácida foi conduzida em autoclave a 121°C por 1h. Após esse período, o conteúdo dos tubos foi filtrado em filtros Buchner. O material filtrado foi utilizado na determinação do percentual de lignina solúvel em ácido em ensaio conduzido em espectrofotômetro com leituras a 240nm e tendo água deionizada como branco. O percentual de Lignina Solúvel em Ácido (%LSA) foi determinado conforme a equação 11; onde ABS é a leitura a 240nm, V h corresponde ao volume final de hidrólise (0,087 L), FD é o fator de diluição,

ε é o valor de absorvidade molar para a lignina ($25 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e ST é a quantidade de sólidos totais definida pela equação 12.

$$\%LSA = \frac{(ABS * V * h * FD)}{\varepsilon * ST} * 100 \quad (11)$$

$$ST = \frac{(\%TS * Biomassa adicionada)}{100} \quad (12)$$

4.4.4 Determinação de Lignina Insolúvel em Ácido

Após a filtração do material utilizado na determinação do percentual de lignina solúvel em ácido, resíduos sólidos retidos no filtro foram utilizados para determinação da lignina insolúvel em ácido. Para isso, os filtros contendo os resíduos sólidos permaneceram por 24 hr em estufa a 105°C . Após esse período, foram submetidos a calcinação em mufla conforme o seguinte programa: 12 min a 105°C , de 105°C para 250° com rampa ascendente de temperatura de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, permanecer a 250°C por 30 min, de 250°C a 575° com rampa de $20^\circ/\text{min}$, permanecer a 575°C durante 3 hr, diminuição de temperatura para 105°C e remoção dos filtros da mufla enquanto a temperatura permanecer em 105°C (ROCHA, 2010). Depois de uma hora de estabilização de temperatura em dissecador, registrou-se o peso dos filtros com as cinzas. O percentual de Lignina Insolúvel em Ácido é determinado conforme a equação 13. O percentual de lignina na biomassa é definido pela equação 14.

$$\%LIA = \frac{(m \text{ filtros com resíduos} - m \text{ filtros vazios}) - (m \text{ filtro com cinzas} - m \text{ filtros vazios})}{ST} * 100$$

(13)

$$\%Lignina = \%LIA + \%LSA \quad (14)$$

4.4.5 Determinação Celulose e Hemicelulose

Após as duas etapas de hidrólise ácida, seguidas de filtração com o filtro de Buchner, o material hidrolisado foi utilizado também na determinação dos carboidratos estruturais. Para isso, alíquotas de cerca de 1 mL do filtrado foram filtradas em membrana de celulose e submetidas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna SUPELCOGEL C-610H para análises de carboidratos e ácidos orgânicos. O ensaio foi conduzido com ácido sulfúrico 0,1% como fase móvel, em fluxo de $0,6\text{mL}/\text{min}$ e sob

temperatura de 35°C. Previamente a esta análise, foi preparada uma curva de padrão com concentrações conhecidas dos analitos (glicose, xilose, arabinose e ácido acético) com o intuito de gerar uma função linear capaz de prever a concentração dos mesmos a partir dos valores das áreas dos picos do cromatograma.

O percentual de celulose e hemicelulose foi obtido a partir das massas de açúcares e ácidos orgânicos encontradas na análise por CLAE e a partir dos fatores de conversão desses biopolímeros em seus respectivos monômeros precursores (equações 15 e 16). Assim, a partir da metodologia de ROCHA (2010), os fatores de conversão dos monômeros constituintes da celulose são, respectivamente, 0,95, 0,90, 3,09 e 1,29 para celobiose, glucana, ácido fórmico e hidroximetilfurfural. Para a determinação do percentual de hemicelulose os fatores de conversão utilizados foram 0,88, 0,88, 1,37 e 0,72, respectivamente para xilose plus, arabinose, furfural e ácido acético.

$$\%Cel = \frac{m_{celobiose} * 0,95 + m_{glicose} * 0,90 + m_{ácido\ fórmico} * 3,09 + m_{HMF} * 1,29}{ST} * 100$$

(15)

$$\%H Cel = \frac{m_{xilose\ plus} * 0,88 + m_{arabinose} * 0,88 + m_{furfural} * 1,37 + m_{ácido\ acético} * 0,32}{ST} * 100 \quad (16)$$

4.5. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

A partir da constituição composicional da biomassa é possível determinar a quantidade de enzima necessária no ensaio de hidrólise. As condições experimentais para a reação de hidrólise foram planejadas de acordo com o protocolo NREL/TP-5100-63351 (RESCH *et al.*, 2015), com algumas modificações. A hidrólise enzimática foi conduzida com 1% e de sólidos e de forma que fosse oferecido 20 mg de celulase para cada 1 g de glucana das amostras de bagaço. Os ensaios de hidrólise foram conduzidos com a enzima imobilizada e com o branco de hidrólise (sem adição de enzima). A reação de hidrólise a 1% de sólidos ocorreu em eppendorfs a uma temperatura de 55°C sob agitação de 180 rpm durante 48 horas. Após esse período, utilizou-se um imã para reter as NPMs no fundo dos tubos, e o sobrenadante foi centrifugado e utilizado para determinação de concentração de açúcares por reação com DNS (GHOSE *et al.*, 1987). A conversão de celulose e hemicelulose a açúcares redutores é dada segundo a Equação 17, onde M_{Ar} corresponde à massa de açúcares redutores; M_B corresponde à massa de biomassa, %Cel corresponde à porcentagem de celulose na biomassa, e %H Cel corresponde à porcentagem de hemicelulose na biomassa.

$$\text{Convers\~{a}o (\%)} = \frac{M_{Ar}}{M_b * (\%Cel + \%HCel)} \quad (17)$$

5. RESULTADOS E DISCUSS\~{A}O

5.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas

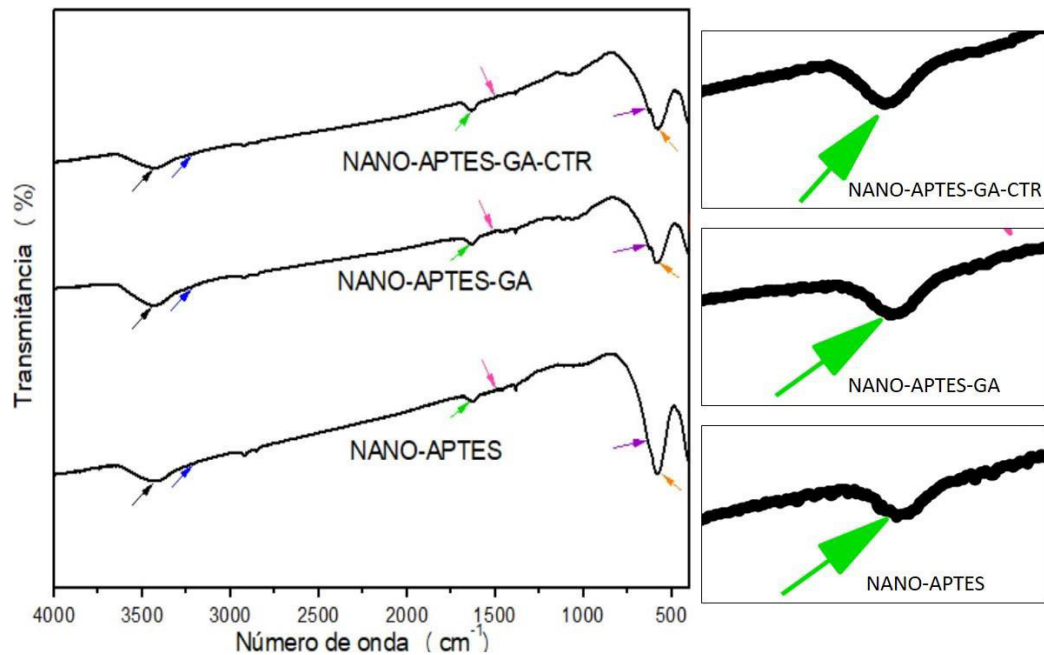
5.1.1 Análise de espectro por FTIR

As modificações pós-síntese das NPMs podem ser avaliadas através de análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformadas de Fourier. Esse tipo de análise detecta a presença de padrões de vibração característicos de determinadas ligações, de forma a indicar as consecutivas modificações na superfície das NPMs. A Figura 6 apresenta os padrões vibracionais encontrados nas análises de NPMs funcionalizadas, ativadas e com celulases imobilizadas. Todas as amostras apresentam um padrão vibracional no limite entre 3441,4 e 3219,9 cm^{-1} , correspondendo ao alongamento de grupos hidroxila unidos por ligação de hidrogênio à superfície das nanopartículas e das moléculas de água adsorvidas no suporte (VELMURUGAN *et al.*, 2010; BEZERRA *et al.*, 2017).

Óxidos de ferro superparamagnéticos, tais como a magnetita (Fe_3O_4), apresentam ligação Fe-O, que é detectada em comprimentos de onda variando de 621,4 a 574,2 cm^{-1} . Quando o APTES é adicionado à superfície de nanoferritas, a vibração de Fe-O é detectada em um outro limite de comprimento de onda, entre 628,7 e 577,9 cm^{-1} , como pôde ser observado em todas as amostras. Essa mudança de limite de detecção pode ser explicada pela formação da ligação Fe-O-Si (BINI *et al.*, 2012). Entre os comprimentos de onda de 635 e 573 cm^{-1} também é possível detectar padrões de vibração característica das ligações Zn-O e Ni-O (VELMURUGAN *et al.*, 2010).

A ligação das celulases ao suporte pode ser sugerida pela presença de padrões vibracionais por volta de 1640 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} nas amostras de enzima imobilizada. Nesses comprimentos de onda as vibrações detectadas correspondem a vibração de alongamento de C=O e C-O de grupos amida (LIMA *et al.*, 2016, KHOSHNEVISAN *et al.*, 2011), ABRAHAM *et al.*, 2014). Vibrações em torno de 1500 cm^{-1} podem sugerir também a ligação de grupos carboxila da enzima com grupos amino das NPMs (JORDAN *et al.*, 2011). Contudo, em torno de 1500 cm^{-1} , o padrão vibracional característico dessas ligações não é facilmente visível nas amostras, o que pode ser explicado pela baixa proporção de enzima:suporte usada no processo de imobilização.

Figura 6 – Espectros de FTIR de amostras de NPMs funcionalizada, ativadas e de amostras de enzima imobilizada. As imagens em torno de 1640 cm^{-1} foram amplificadas para melhor visualização. Legenda: nanopartículas funcionalizadas (NANO-APTES); nanopartículas ativadas (NANO-APTES-GA); enzima imobilizada (NANO-APTES-GA-CTR); setas em preto ($3441,4\text{ cm}^{-1}$); setas em azul ($3219,9\text{ cm}^{-1}$); setas em verde (164 cm^{-1}); setas em rosa (1500 cm^{-1}); setas em lilás (635 cm^{-1}); setas em laranja (573 cm^{-1}).



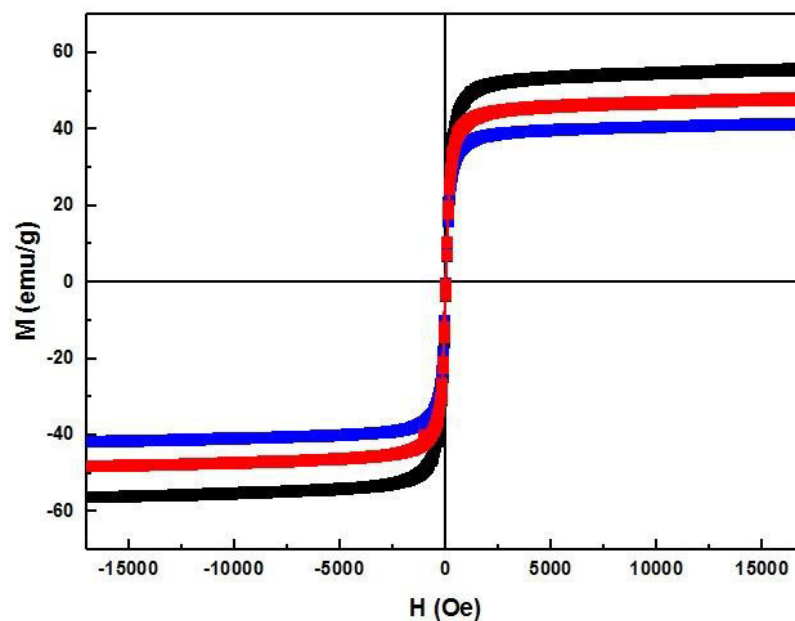
Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 Análise de magnetização das nanopartículas magnéticas

A Figura 7 mostra o padrão de magnetização de amostras de NPMs funcionalizadas, ativadas e de enzima imobilizada. A análise da Figura 7 demonstra que todas as amostras continuam com propriedades superparamagnéticas, uma vez que todas possuem valor de magnetização igual quando o valor do campo magnético também se anula. Isso significa que não há magnetização remanescente em nenhuma das amostras. Logo, o valor de coercividade também é nulo, considerando que não há necessidade de aplicação de um campo magnético de direção contrária para que os materiais sejam desmagnetizados (LAURENT *et al.*, 2016). A análise da Figura 7 também mostra como as modificações nas NPMs influenciam a magnetização de saturação do material. Foram encontrados os seguintes valores para magnetização de saturação: de 55,76; 41,51 e 48,03 emu/g correspondendo respectivamente a NPM funcionalizada com APTES, NPM ativada com GA e a enzima imobilizada. GHASEMIN

et al., (2014) reportaram valor de saturação de magnetização igual a 83,4 emu/g para ferritas mistas $\text{Ni}_{0,6}\text{Zn}_{0,4}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sob campo magnético de 10 KOe. A saturação de magnetização para a nanopartícula funcionalizada neste trabalho apresentou valor menor do que o da NPM não funcionalizada reportada por GHASEMIN *et al.*, (2014). Apesar de funcionalização com APTES não alterar a estrutura NPMs, pode haver diminuição da saturação de magnetização devido a incorporação de material não magnético.

Figura 7 – Curvas de magnetização de amostras de nanopartículas funcionalizadas, ativadas e de enzima imobilizada. Legenda: nanopartícula funcionalizada (valores em azul), nanopartícula ativada (valores em preto), enzima imobilizada (valores em vermelho).



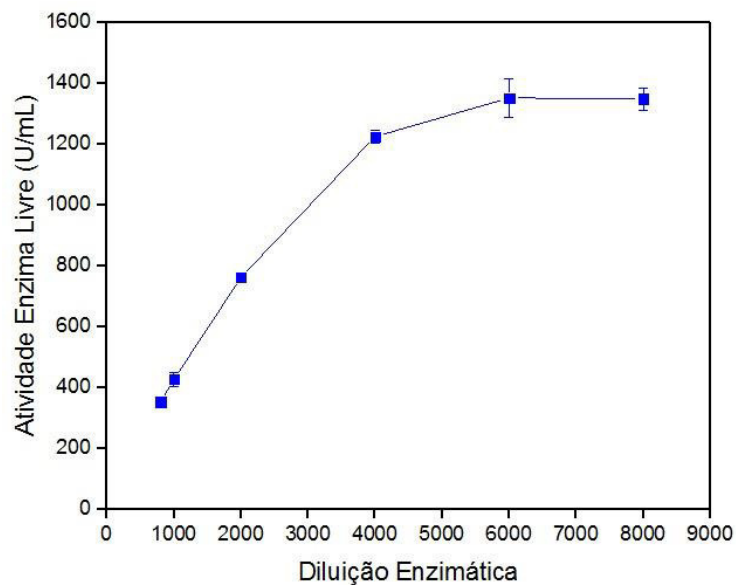
Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Atividade hidrolítica do extrato enzimático de *Trichoderma reesei*.

Muitos dos parâmetros que avaliam a eficiência de imobilização e do catalisador estão relacionados a medidas de atividade enzimática. Com isso, é de fundamental importância a determinação da atividade do extrato enzimático com que se trabalha. A Figura 8 mostra o valor de atividade da celulase em diferentes ensaios de diluição enzimática. Como pode ser observado, quanto maior a diluição enzimática a partir do extrato enzimático comercial, maior também é a atividade. Essa tendência se aplica até o momento em que aumentos na diluição da enzima (diluições acima de 6000 vezes) não correspondem mais a aumentos na atividade. Neste

momento, é dito que houve uma estabilização da atividade enzimática, e é nessa situação que se determina a atividade do extrato da enzima. A explicação para esse fenômeno recai sobre o fato de que quanto maior a concentração da enzima, maior a probabilidade de ocorrência de efeito estérico devido à grande quantidade de moléculas de enzima. Ou seja, a aproximação entre as moléculas de enzima é tão grande que as mesmas não teriam espaço suficiente para realizar as mudanças conformacionais necessárias para a hidrólise do substrato. Considerando esse fenômeno, determinou-se que a atividade enzimática do extrato de celulase de *Trichoderma reesei* é igual a 1352,71 U/mL, onde U corresponde a unidade internacional de atividade enzimática, correspondendo a quantos μmol de substrato são convertidos a produto no intervalo de um minuto. Ensaio de determinação de concentração proteica por Bradford mostraram que a atividade específica é de 541,62 U/mg de proteína no extrato.

Figura 8. Efeito da diluição enzimática no processo de catálise da celulase



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Efeito da concentração de glutaraldeído na ativação das NPMs

De acordo com a Tabela 1, o maior rendimento de imobilização, cerca de 85,2 %, foi obtido em derivados ativadas com 25% de glutaraldeído. É possível perceber a tendência de que o rendimento aumenta de acordo com o aumento na concentração de glutaraldeído, assim como a atividade do derivado e atividade recuperada. Em maiores concentrações de

glutaraldeído, mais moléculas desse agente acoplador podem se ligar à superfície funcionalizada das NPMs. Com isso, há também mais sítios de ligação para os grupos amino dos resíduos de aminoácido da enzima, resultando em elevado rendimento de imobilização. É importante ressaltar que a alta concentração de glutaraldeído não foi suficiente para induzir a desnaturação da enzima, uma vez que a maior atividade de derivado foi também encontrada em NPMs ativadas com 25% de glutaraldeído.

Tabela 1. Parâmetros de imobilização para NPMs ativadas em diferentes concentrações de glutaraldeído. Legenda: atividade do derivado (Atv D), atividade recuperada (Atv R) e rendimento de imobilização em termos de atividade (R atv).

Glutaraldeído %	Atv D (U/g)	Atv R (%)	R atv (%)
5	2,75 ± 0,18	23,16 ± 0,42	43,06 ± 1,78
10	2,26 ± 0,14	25,53 ± 6,73	33,35 ± 9,68
15	4,12 ± 0,83	19,22 ± 2,9	77,48 ± 2,98
25	6,71 ± 0,18	28,64 ± 1,91	85,23 ± 0,38

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível encontrar na literatura diversos resultados de rendimento de imobilização de celulasas em NPMs. KHOSHNEVISANA *et al.*, (2011) reportaram 95% de eficiência de imobilização em termos de concentração de proteínas para celulase de *T. viride* imobilizada em suspensão de nanoferritas (Fe₃O₄). No estudo realizado por LIMA *et al.*, (2016), preparações de Cellusoft CR (Novozymes, Brasil) imobilizadas em NPMs encapsuladas em polimetilmetacrilato (PMMA) obtiveram 49% de eficiência de imobilização. Neste trabalho, os melhores resultados de rendimento de imobilização foram encontrados quando se utilizou tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 como tampão de imobilização

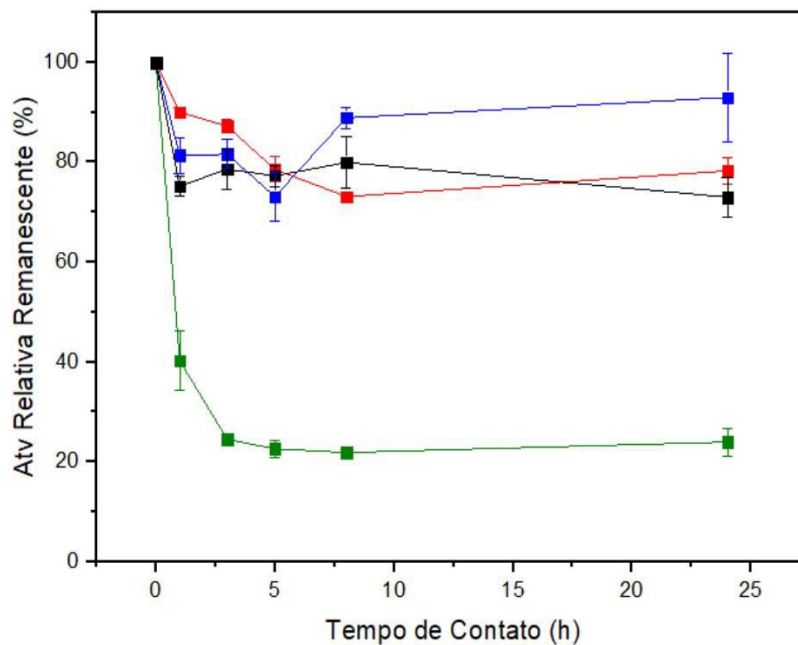
5.4 Efeito da concentração iônica e do pH sobre rendimento de imobilização

Uma vez determinada a melhor condição e ativação das NPMs, foram testadas também quais as melhores condições de imobilização. Logo, o rendimento de imobilização foi avaliado variando o tempo de contato entre enzima e suporte, o pH e a molaridade do tampão de imobilização. A Figura 9 ilustra como o rendimento de imobilização é afetado em diferentes forças iônicas. Os resultados são dados em termos de atividade relativa do remanescente, que representa a porcentagem de um valor específico de atividade de remanescente com relação à

atividade máxima obtida. É possível perceber que a atividade relativa do remanescente diminui ao longo do tempo, indicando que mais moléculas de enzima se ligam ao substrato com o passar do tempo. Essa tendência continua até que haja uma estabilização na atividade relativa do remanescente, indicando que, o rendimento máximo de imobilização foi obtido. Após 1 hora de contato entre enzima e suporte na presença de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, cerca de 60% da quantidade inicial de proteína se encontra aderida ao suporte. No mesmo período, imobilização em molaridades maiores do tampão não apresentaram mais que cerca de 25% de eficiência de imobilização.

A Figura 9 mostra uma grande diferença de eficiência entre a imobilização em baixa força iônica (5 mM) e concentrações mais elevadas de íon. Isso pode ser explicado pelo fato de que em condições de alta força iônica, a maior concentração de íon dificulta a interação entre enzima e suporte. Por outro lado, em molaridades menores, as superfícies da enzima e do substrato encontram-se mais facilmente acessíveis, aumentando as chances de que os choque entre enzima e suporte resultem em interação covalente.

Figura 9 - Efeito da força iônica na eficiência de imobilização. Legenda: molaridade de 5 mM (valores em verde), 25 mM (valores em vermelho), 50 mM (valores em azul) e de 100 mM (valores em preto).

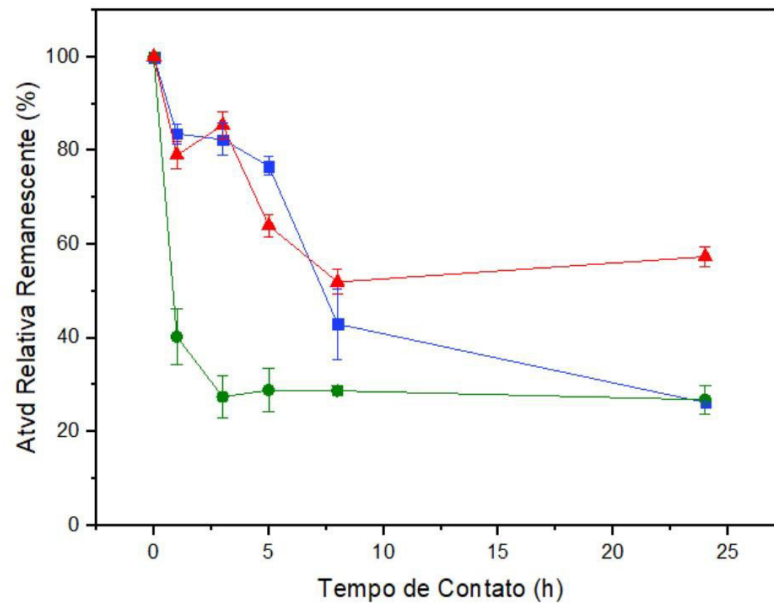


Fonte: Elaborada pela autora.

Uma vez determinada qual a melhor condição de força iônica para imobilização, foi testado o efeito do pH sobre a imobilização. A Figura 10 mostra como a atividade relativa do remanescente é afetada em diferentes pHs. É possível perceber que o tampão de pH 7 é o que mais favorece a imobilização uma vez que já na primeira hora de contato, a atividade relativa do remanescente tem a maior queda em comparação aos demais pHs, indicando que mais moléculas de enzimas conseguiram se ligar ao suporte. Os melhores resultados de imobilização são encontrados em pH 7,0 e pH 9,0 possivelmente porque em nesses pHs a maioria dos grupos amino dos resíduos de aminoácidos encontram no estado de ionização -NH₂. Este estado de ionização favorece a formação de ligação covalente entre enzima e suporte. Por outro lado, em pH 5,0, os grupos aminos encontram-se, em sua maioria, protonados (-NH³⁺). A ligação entre esses grupos protonados e o suporte extrapolaria o número de elétrons na camada de valência do nitrogênio, e, portanto, a imobilização não é favorecida.

É possível encontrar na literatura diversas condições de imobilização de celulases em NPMs. Na imobilização de celulase de *T. viride* em uma suspensão de nanoferritas (Fe₃O₄), KHOSHNEVISANA *et al.*, (2011) utilizaram tampão acetato pH 5 como tampão de imobilização e obtiveram cerca de 95% de eficiência de imobilização em termos de concentração e proteínas. No estudo realizado por LIMA *et al.* (2016), preparações de Cellusoft CR (Novozymes, Brasil) imobilizadas em NPMs encapsuladas em polimetilmetacrilato (PMMA) foram imobilizadas na presença de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6, obtendo-se 49% de eficiência de imobilização. Neste trabalho, os melhores resultados de rendimento de imobilização foram encontrados quando se utilizou tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 como tampão de imobilização.

Figura 10. Efeito do pH na eficiência de imobilização. Legenda: pH 4,8 (valores em vermelho), pH 7,0 (valores em verde) e pH 9,0 (valores em azul).

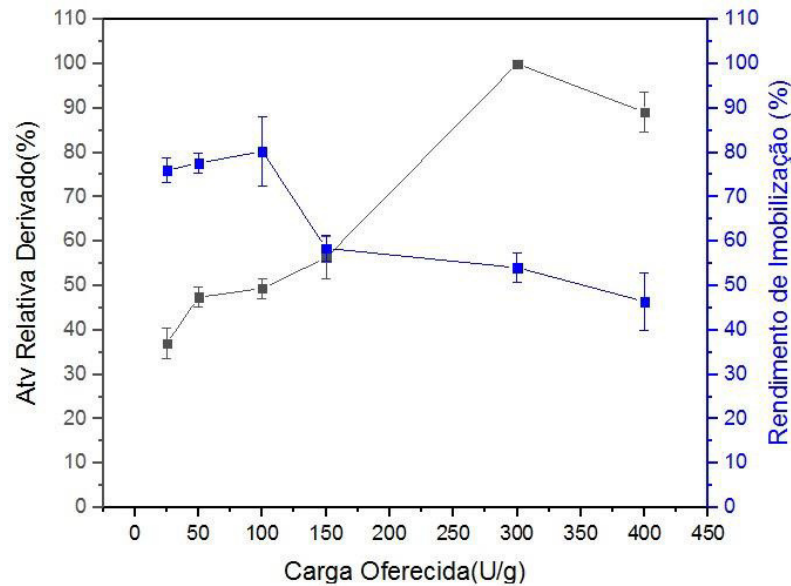


Fonte: Elaborada pela autora.

5.5 Efeito de carga enzimática máxima

A carga enzimática máxima corresponde a maior quantidade de enzima suportada pelo carreador da imobilização enzimática, sem que a atividade final do biocatalisador seja prejudicada. A Figura 11 ilustra como a quantidade de carga oferecida pode influenciar a atividade do biocatalisador e o rendimento de imobilização. É possível perceber que à medida que a carga oferecida aumenta, há uma tendência de diminuição do rendimento de imobilização. Quando elevadas quantidades de enzimas são colocadas em contato com o suporte, a frequência de interação entre enzima-enzima é maior que entre enzima e suporte, o que provoca limitações difusionais.

Figura 11 – Gráfico mostrando influência da carga oferecida sobre o rendimento de imobilização e sobre a atividade relativa do biocatalisador. Legenda: Valores azuis correspondem ao rendimento de imobilização, enquanto valores em preto representam a atividade relativa do derivado



Fonte: Elaborado pela autora.

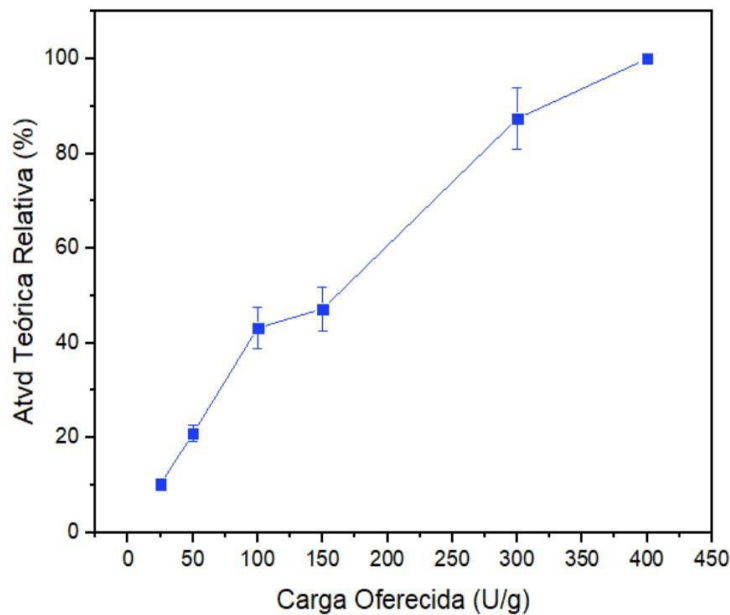
Como ilustrado na Figura 11, essas limitações difusionais se tornaram mais evidentes em cargas enzimáticas maiores que 100 U/g, devido à drástica redução no rendimento de imobilização. É sabido que imobilizações em altas cargas enzimáticas faz com que as primeiras interações entre enzima e suporte ocorra nos grupos ativos mais externos no suporte. Assim, há uma saturação de enzimas próximo à superfície do suporte, dificultando o acesso das moléculas de enzima a sítios de imobilização mais internos na estrutura do carreador (COSTA *et al.*, 2016; ADRIANO *et al.*, 2014). A Figura 11 também ilustra que valores de carga oferecida superiores a 300 U/g não resultam em aumento na atividade relativa do derivado. Portanto, pode-se afirmar que a essa é a carga máxima de imobilização.

O efeito de diminuição de rendimento de imobilização em maiores concentrações de proteína também foi reportado na literatura. ABRAHAM *et al.*, (2014) reportaram 94% de rendimento de imobilização de celulase em Zn ferritas quando a imobilização ocorreu com proporção de 1:1 (enzima: NPM). Em maiores concentrações de enzima, houve diminuição na eficiência de imobilização enzimática.

O aumento na atividade do derivado acompanhado pela diminuição do rendimento de imobilização pode levantar dúvidas sobre qual a melhor carga enzimática que pode ser

oferecida ao suporte. A análise da Figura 12 mostra que há um aumento na atividade teórica com o aumento da carga oferecida, ou seja, ainda que o rendimento de imobilização seja baixo, a atividade do derivado é compensada pelo aumento na atividade teórica do biocatalisador. Portanto, os dados mostrados na Figura 12 corroboram com o resultado encontrado de que a melhor carga enzimática oferecida é de 300 U/g.

Figura 12 - Gráfico demonstrado o efeito da carga enzimática oferecida sobre a atividade teórica relativa.



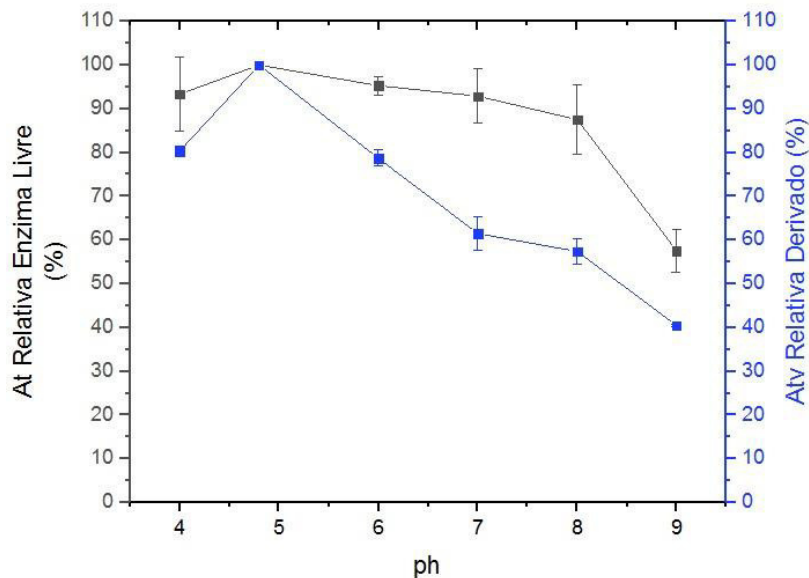
Fonte: Elaborada pela autora.

5.6 Influência do pH e temperatura sobre atividade da enzima solúvel e imobilizada

5.6.1 Efeito do pH sobre atividade de enzima livre e imobilizada

A **Figura 13** ilustra como o pH influencia a capacidade catalítica da enzima livre e da enzima imobilizada sob carga enzimática máxima. Tanto enzima livre como enzima imobilizada apresentaram melhores resultados de eficiência catalítica em pH 4,8. Todas as amostras apresentam desvio padrão menor que 10%.

Figura 13 – Efeito do pH sobre atividade da enzima livre e imobilizada. Legenda: Valores em azul representam a atividade relativa da enzima imobilizada, enquanto que valores em preto representam a atividade relativa da enzima solúvel.

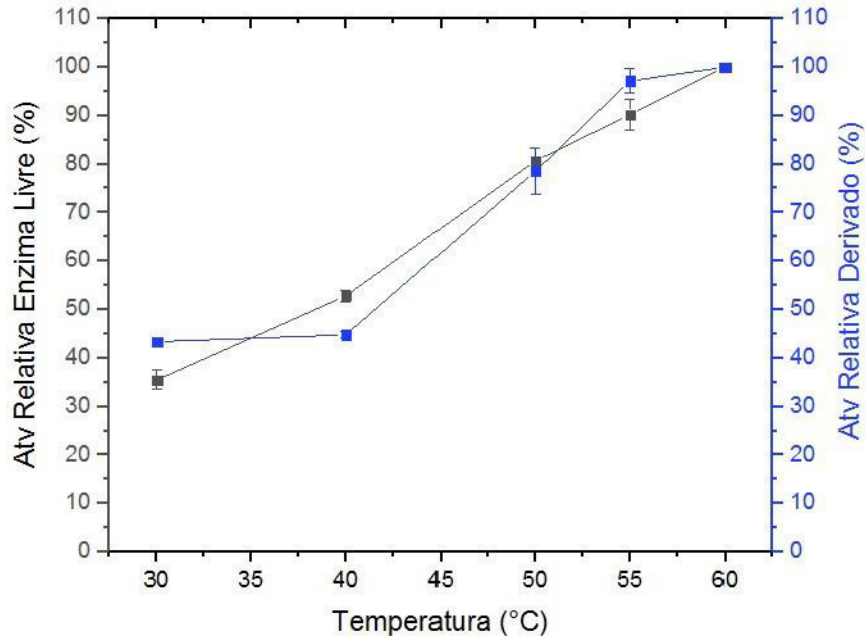


Fonte: Elaborado pela autora.

5.6.2 Efeito da temperatura sobre atividade enzima livre e imobilizada

Atividade da enzima livre e imobilizada também foi testada em diferentes temperaturas, como ilustrado na Figura 14. Essa figura mostrou que aumentos na temperatura resultam em aumentos na capacidade de hidrólise tanto da enzima livre quanto da enzima imobilizada. Apesar de as maiores atividades terem sido obtidas a 60 °C, análises estatísticas usando o teste de Anova de Fator único demonstraram que não há diferença significativa entre os valores de atividade encontrados nas temperaturas de 50, 55 e 60 °C ($\alpha = 0,05$). A não variação entre valores de atividades nessas temperaturas também foi observado para enzima livre.

Figura 14 – Influência da temperatura sobre eficiência catalítica da enzima livre imobilizada. Legenda: valores em azul correspondem à atividade relativa do derivado, e valores em preto correspondem a atividade relativa da enzima solúvel.



Fonte: Elaborado pela autora.

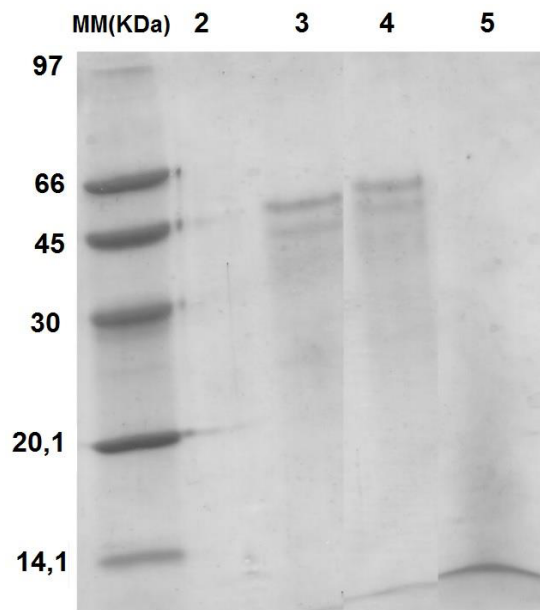
Estudos realizados por ABHARAM *et al.*, (2014) reportaram o efeito do pH e temperatura sobre as atividades de celulase de *T. reesei* livre e imobilizada em Zn ferritas ativadas com GA. Como resultado do trabalho citado anteriormente, os maiores valores de atividade de enzima livre e imobilizadas foram encontrados em pH 4,8 sob temperatura de 50 °C para enzima livre, e de 60°C para enzima imobilizada.

5.7 Ensaio de eletroforese SDS-PAGE

O ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida foi conduzido em condições desnaturantes (SDS-PAGE) afim de que fosse analisado o tipo de interação entre a enzima e o suporte de imobilização. As bandas identificadas no gel de eletroforese (Figura 15) correspondem a endoglucanase, de tamanho aproximado de 41 KDa (MATTINEM *et al*, 1998). É possível notar que a banda correspondente a essa endoglucanase está presente nas faixas 3 e 4, que correspondem, respectivamente, ao branco e remanescente de imobilização, mas não é vista na faixa 5, correspondente à amostra de derivado. Esse resultado indica que as condições desnaturantes da eletroforese não foram capazes de dissociar a enzima do suporte, ou seja, a enzima continua aderida ao suporte por meio de uma ligação forte, como a ligação covalente.

Assim, pode-se afirmar que o resultado de eletroforese SDS-PAGE confirma a presença de ligação covalente entre enzima e suporte.

Figura 15 – Ensaio eletroforese SDS-PAGE de amostras de branco e remanescente de imobilização e enzima imobilizada. Legenda: MM (KDa) corresponde ao marcador molecular de baixa massa molar, faixa 3, 4 e 5 correspondem respectivamente a amostras de branco de imobilização, remanescente de imobilização e amostra de enzima imobilizada.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.8 Hidrólise enzimática da biomassa de cana-de-açúcar

5.8.1 Determinação composicional da biomassa

O percentual de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa pré-tratada de cana-de-açúcar corresponde respectivamente a 49,38; 23,27; e 23,35%, respectivamente. O percentual de celulose na biomassa vai determinar a quantidade de enzima necessária nos ensaios de hidrólise enzimática.

5.8.2 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

A quantidade de derivado utilizada nos ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foi calculada a partir da concentração de proteínas aderidas ao suporte. A medida de concentração de proteínas para derivados que foram imobilizados na carga máxima de 300 U/g corresponde a 0,0033 mg de celulase por g de NPM.

A concentração de açúcares redutores encontrados nas amostras de hidrolisado foi utilizada para calcular o percentual de degradação de celulose e hemicelulose nos ensaios de hidrólise utilizando a enzima imobilizada com biocatalisador. A concentração de açúcares redutores também foi determinada para o branco de hidrólise, com o intuito de verificar a presença de açúcares no substrato antes da hidrólise. Assim, descontando o valor da concentração de açúcar do substrato, foi encontrada uma concentração 1,75 mg/mL de açúcares redutores. Os cálculos de conversão demonstraram que, em média, 15,6 % das massas de celulose e hemicelulose foram convertidas a açúcares redutores devido a ação da enzima imobilizada.

O uso de celulase imobilizada de *T. reesei* na hidrólise de materiais lignocelulósicos é bastante reportado na literatura. Resultados de hidrólise de bambu reportados por ABRAHAM *et al.*, (2014) indicaram que conversão completa de celulose a glicose foi igual a 89% para enzima livre, e de cerca de 93% para celulase imobilizada em Zn nanoferritas. IKEDA *et al.*, (2015) estudaram a imobilização de celulase em sílica não porosa para hidrólise de biomassa de álamo pré-tratado por explosão a vapor. Os resultados indicaram que, nos ensaios de hidrólise da biomassa, a enzima imobilizada reteve 41% da atividade da enzima livre. Estudos realizados por JIA *et al.*, (2017), investigaram o uso de magnetitas em escala nano (Fe_3O_4) como núcleo para a precipitação de celulases com o intuito de formar agregados enzimáticos reticulados. Os pesquisadores utilizaram APTES para funcionalização das nanoferritas, e a reticulação ocorreu na presença de glutaraldeído. Os resultados de hidrólise biomassa de bambu pré-tratado mostraram conversão de 44 e 21% de celulose a glicose para enzima livre e imobilizada, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, é possível constatar que nanopartículas magnéticas mistas Ni-Zn são carreadores aptos para imobilização de celulase de *Trichoderma reesei* usando ligação covalente como método de imobilização. Foi determinado que as melhores condições de imobilização por ligação covalente ocorrem em tampão fosfato 5mM pH 7, com NPMs ativadas com 25% de GA, resultando em 85% de rendimento de imobilização. Os ensaios de magnetização mostraram que nenhuma das modificações do suporte (funcionalização com APTES e ativação com GA) foram capazes de lesar o fenômeno de superparamagnetismo apresentado pelas NPMs. Contudo, houve diminuição da magnetização de saturação do derivado em comparação às NPMs não modificadas.

A eficiência catalítica do biocatalisador foi testada em diferentes pHs e temperaturas, e os resultados mostraram que a imobilização da enzima não alterou as melhores condições para atividade enzimática. Este estudo mostrou que a celulase imobilizada nas nanopartículas mistas corresponde a uma endoglucanase de tamanho aproximado de 41KDa. Foi demonstrado que o biocatalisador proposto foi capaz de converter 15,6% das massas de celulose e hemicelulose do bagaço de cana de açúcar em açúcares redutores fermentescíveis. Portanto, os resultados dos ensaios de imobilização e hidrólise enzimática mostraram que o biocatalisador proposto tem potencial promissor na hidrólise de materiais lignocelulósicos, podendo assim ser aplicada na produção de bioetanol de segunda geração

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABDULLAH DAR, M.; SHAH, J.; SIDDIQUI, W. A.; KOTNALA, R. K. Study of structure and magnetic properties of Ni–Zn ferrite nano-particles synthesized via co-precipitation and reverse micro-emulsion technique. **Applied Nanoscience**, v. 4, n. 6, p. 675–682, 2014.
- 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. 90, 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, n. 4, p. 529–538, 2005.
- AHMAD, R.; SARDAR, M. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 2, 2015.
- AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 1–13, 2012.
- ALFTRÉN, J. **Immobilization of cellulases on magnetic particles to enable enzyme recycling during hydrolysis of lignocellulose**. 2014. Tese de PhD - National Food Institute, Technical University of Denmark. 2014
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 512–523, 2012.
- BERNADES, dos santos Marco Aurélio. **Biofuel Production - Recent Developments and Prospects**. Rijeka: InTech, ISBN 978-953-307-478-8, 2011, 606 p.
- BETANCOR, L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, G. D. O. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 877–882, 2006.
- BEZERRA, C. S. et al. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 42125, p. n/a–n/a, 2015.
- BEZERRA, R. M. et al. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 125, p. 104–115, 2017.
- BINI, R. A.; MARQUES, R. F. C.; SANTOS, F. J.; CHAKER, J. A.; JAFELICCI JR, M. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy-silanes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 4, p. 534–539, 2012.
- BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 106, 2016

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A.D.T; FERREIRA, A.L.O.; PINTO, G.A.S.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 137-140, n. 1-12, p. 67–80, 2007.

CHANDEL, Anuj K.; DA SILVA, Silvio Silvério. **Sustainable Degradation Of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications And Commercialization**. Rijeka, Croatia: InTech, 2014. 284 p. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization>>. Acesso em Maio 2017.

CHEN, Hongzhang. **Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice**. Pequim: © Chemical Industry Press, Beijing and Springer Science + Business Media Dordrecht, 2014.

CLABORN, David. **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. InTech, ISBN 978-953-51-1232-7, 2014, 534 p.

COSTA, V. M.; DE SOUZA, M. C. M; FECHINE, P. B. A.; MACEDO, A. C.; GONÇALVES, L. R. B. Nanobiocatalytic systems based on lipase-Fe₃O₄ and conventional systems for isoniazid synthesis: A comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 661–673, 2016.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

DE SOUZA, M. C. M. **Imobilização de lipase de Candida Antarctica do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROCHA, G. J. M., PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C.E.V.; FILHO, R.M.; BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–8971, 2011.

EL-SAYED, A. M. Influence of zinc content on some properties of Ni – Zn ferrites. **Ceramics International**, v. 28, p. 363–367, 2002.

EYLEY, S.; THIELEMANS, W. Surface modification of cellulose nanocrystals. **Nanoscale**, v. 6, n. 14, p. 7764–7779, 2014.

FARZAD, Ebrahimi. **Nanocomposites - New Trends and Developments**,: InTech, ISBN 978-953-51-0762-0, 2012, 514 p.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 769–777, 2007.

GHASEMI, A.; MOUSAVINIA, M. Structural and magnetic evaluation of substituted NiZnFe₂O₄ particles synthesized by conventional sol-gel method. **Ceramics International**, v. 40, n. 2, p. 2825–2834, 2014.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. n. 59, p. 257-268, 1987.

GUPTA, Vijai. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Microbial Cellulase System Properties and Applications**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 2016. 302 p.

HASANY, S. F.; ABDURAHMAN, N.H.; SUNARTI, A.R.; JOSE, R. Iron oxide magnetic nanoparticles: A short review. **AIP Conference Proceedings**, v. 1502, n. 1, p. 298–321, 2012.

HWANG, E. T.; GU, M. B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 49–61, 2013.

IKEDA, Y.; PARASHAR, A.; CHAE, M.; BRESSLER, D.C. Reusability of Immobilized Cellulases with Highly Retained Enzyme Activity and their Application for the Hydrolysis of Model Substrates and Lignocellulosic Biomass. **Journal of Thermodynamics & Catalysis**, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2015.

INDIRA, T. Magnetic Nanoparticles: A Review. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 3, n. 3, p. 1035–1042, 2010.

JIA, J.; ZHANG, W.; YANG, Z.; YANG, X.; WANG, N.; YU, X. Novel magnetic cross-linked cellulase aggregates with a potential application in lignocellulosic biomass bioconversion. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

JIANG, C.; LIU, R.; SHEN, X.; ZHU, L.; SONG, F. Ni_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ nanoparticles and their magnetic properties and adsorption of bovine serum albumin. **Powder Technology**, v. 211, n. 1, p. 90–94, 2011.

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.

KARHUNEN, T.; MÄNTYLÄ, A.; NEVALAINEN, K.M.H.; SUOMINEN, P. L. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. **Molecular and General Genetics**, v. 241, n. 5–6, p. 515–522, 1993

KARTHICK, A. S. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Che Sci Rev Lett**, v. 1, n. 3, p. 148–155, 2012.

KHARISOV, B. I.; DIAS, H. V. R.; KHARISSOVA, O. V. Mini-review: Ferrite nanoparticles in the catalysis. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.

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. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 2, p. 669–673, 2011.

KRAMER, M.; CRUZ, J.C.; PFROMM, P.H.; REZAC, M.E.; CZERMAK, P. Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* Lipase B immobilized on fumed silica. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 80–86, 2010.

- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377–391, 2008.
- LAURENT, S.; HENOUMONT, C.; STANICKI, D.; BOUTRY, S.; LIPANI, E.; BELAIS, D.; MULLER, R.N.; ELST, L.V. **MRI Contrast Agents: From Molecules to Particles**. Springer Briefs in Applied Sciences and Technology. 2016.
- LIMA, J. S.; ARAÚJO, P.H.H.; SAYER, C.; SOUZA, A.A.U.; VIEGAS, A.C.; DE OLIVEIRA, D. Cellulase immobilization on magnetic nanoparticles encapsulated in polymer nanospheres. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 4, p. 511–518, 2017.
- LIU, Y. S.; BAKER, J.O.; ZENG, Y.; HIMMEL, M.E.; HAAS, T.; DING, S;Y. Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 11195–11201, 2011.
- LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70–75, 2005.
- MAAZ, K.; KARIMA, S.; MUMTAZB, A.; HASANAIN, S.K.; LIU, J.; DUANC, J.L. Synthesis and magnetic characterization of nickel ferrite nanoparticles prepared by co-precipitation route. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 12, p. 1838–1842, 2009.
- MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MATTINEM, M.L.; LINDER, M.; DRAKENBERG, T.; ANNILA, A. Solution Structure of the Cellulose-Binding Domain of Endoglucanase I from *Trichoderma Reesei* and its Interaction with Cello-Oligosaccharides **European Journal of Biochemistry**, p. 256-279,1998.
- MILLER, G. G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent Determination of Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p 426-428, 1959
- MISZCZYK, A.; DAROWICKI, K. Study of anticorrosion and microwave absorption properties of NiZn ferrite pigments, **Microwaves**, v 1, p. 13– 21, 2011.
- MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N.H.C.; BUANG, N.A.; HUYOP, F.; WAHAB, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.
- MOHAMMED, L.; GOMAA, H.G.; RAGAB, D.; ZHU, J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. **Particuology**, v. 30, p. 1–14, 2017.
- MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 3, n. 5, p. 371–384, 1978.

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

PARSONS, P.; DUNCAN, K.; GIRI, A. K.; XIAO, J. Q.; KARNA, S. P. Electromagnetic properties of NiZn ferrite nanoparticles and their polymer composites. **Journal of Applied Physics**, v. 115, n. 17, 2014.

R.M. Freire, T.S. Ribeiro, I.F. Vasconcelos, J.C. Denardin, E.B. Barros, G. Mele, L. Carbone, S.E. Mazzetto, P.B. a Fechine, MZnFe₂O₄ (M = Ni, Mn) cubic superparamagnetic nanoparticles obtained by hydrothermal synthesis, **Journal of Nanoparticle Research**. v.15, 2013.

RAGHAVENDER, A. T.; BILIŠKOV, N.; SKOKO, Ž. XRD and IR analysis of nanocrystalline Ni-Zn ferrite synthesized by the sol-gel method. **Materials Letters**, v. 65, n. 4, p. 677–680, 2011.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **World Fuel Ethanol Production**. Disponível em :<
<http://www.afdc.energy.gov/data/10331>>. Acesso em: 29 dezembro 2016

RESCH, M. G.; BAKER, J. O.; NREL, S. R. D. **Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: February 4, 2015. Technical Report NREL/TP-5100-63351.

RIOS, N. S. **Estudo de imobilização da lipase do tipo B de *Candida antarctica* em silicato mesoporoso nanoestruturado (SBA-15) visando a aplicação em reações de elevado interesse industrial**. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016

SEIBOTH, B.; IVANOVA, C.; SEIDL-SEIBOTH, V. Trichoderma reesei: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, 2011.

SHAHANE, G. S.; KUMAR, A.; ARORA, M.; PANT, R.P.; LAL, K. Synthesis and characterization of Ni-Zn ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 8, p. 1015–1019, 2010.

SLUITER, A.; HAMES, B. HYMAN, D. PAYNE, C. RUIZ, R; SCARLATA, C. SLUITER, J. TEMPLETON D. WOLFE, J. **Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process SAMPLES Laboratory Analytical Procedure (LAP)** Issue Date: 3/31/2008. Technical Report NREL/TP-510-42621 Revised March 2008b

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP)** Issue Date: 4/25/2008 Technical Report NREL/TP-510-42618 Revised April 2008c.

SLUITER, A.; RUIZ, R; SCARLATA, C.; SLUTER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Extractives in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP)** Issue Date : 7/17/2005, Technical Report NREL/TP-510-42619, January 2008a

SONG, Q.; MAO, Y.; WILKINS, M.; SEGATO, F.; PRADE, R. Cellulase immobilization on superparamagnetic nanoparticles for reuse in cellulosic biomass conversion. **AIMS Bioengineering**, v. 3, n. 3, p. 264–276, 2016.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A.H.; HAIK, Y.; FARID, M.M. A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1–25, 2011.

TANG, T.; FAN, H.; AI, S.; HAN, R.; QIU, Y. Hemoglobin (Hb) immobilized on amino-modified magnetic nanoparticles for the catalytic removal of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 83, n. 3, p. 255–264, 2011.

THAKUR, S.; KATYAL, S. C.; SINGH, M. Structural and magnetic properties of nano nickel-zinc ferrite synthesized by reverse micelle technique. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 1, p. 1–7, 2009.

TSAI, C. T.; MEYER, A. S. Enzymatic cellulose hydrolysis: Enzyme reusability and visualization of β -glucosidase immobilized in calcium alginate. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19390–19406, 2014.

VAGHARI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, M.; BERENJIAN, A.; ANARJAN, N.; JAFARI, N.; NASIRI, S. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 2, p. 223–233, 2016.

VELMURUGAN, K.; VENKATACHALAPATHY, V.S.K.; SENDHILNATHAN, S. Synthesis of Nickel Zinc Iron Nanoparticles by Coprecipitation Technique. **Materials Research**, v. 13, n. 3, p. 299–303, 2010.

VIRDEN, A.E.; O'GRADY, K. Structure and magnetic properties of NiZn ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290–291, p. 868–870, 2005.

YANG, Shang-Tian; EL-ENSHASY, Hesham A.; THONGCHUL, Nuttha. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. 1 ed. Publicado Online: 12 de Julho 2013 por © John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 9781118642047. Disponível em : < <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470541954,subjectCd-CHC0.html> >. Acesso em Agosto 2017.

YIU, H. H. P.; KEANE, M. A. Enzyme-magnetic nanoparticle hybrids: New effective catalysts for the production of high value chemicals. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 583–594, 2012.

