



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



IMOBILIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Mariana Bisinotto Pereira

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez

Coorientador: Dr^a. Dasciana de Sousa Rodrigues

Dissertação

Goiânia, fevereiro de 2019.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Mariana Bisinotto Pereira

Título do trabalho: Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

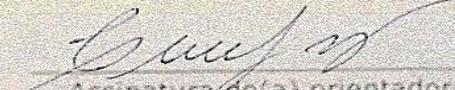
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Goiânia, 12 / 03 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



IMOBILIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Mariana Bisinotto Pereira
Engenheira Química, UFG

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Grande área: Engenharia de Processos.

Área de concentração: Processo Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez

Coorientador: Dr^a. Dasciana de Sousa Rodrigues

Goiânia, fevereiro de 2019.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pereira, Mariana Bisinotto

Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos [manuscrito] / Mariana Bisinotto Pereira. - 2019.

74 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez; co orientadora Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Goiânia, 2019.

1. Pré-tratamento organosolv. 2. Cellic Ctec 3. 3. Reuso de enzima. I. Suarez, Carlos Alberto Galeano, orient. II. Título.

CDU 66.011



Universidade Federal de Goiás

Instituto de Química

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

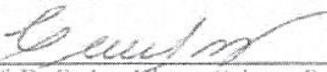
Aos dias 26 (vinte e seis) de fevereiro do ano de 2019 (dois mil e dezenove), com início às 08:30 hs (oito horas e trinta minutos) na Sala de Videoconferência do Centro de Eventos da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos seguintes doutores: Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez, Prof. Dr. Dasciana de Sousa Rodrigues, Prof. Dr. Araceli Aparecida Seolatto e Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, sob a presidência do primeiro, para julgar a dissertação de Mariana Bisinotto Pereira intitulada: "Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos" como requisito para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química. O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez: Aprovada
Prof. Dr. Dasciana de Sousa Rodrigues: Aprovada
Prof. Dr. Araceli Aparecida Seolatto: Aprovada
Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes: Aprovada

A seguir, na presença do público e da candidata, o presidente da Banca Examinadora declarou que Mariana Bisinotto Pereira, candidata ao título de mestre em Engenharia Química foi:

Aprovada (X); Reprovada ().

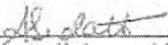
Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Caio Augusto Danião Franco, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 26 de fevereiro de 2019.



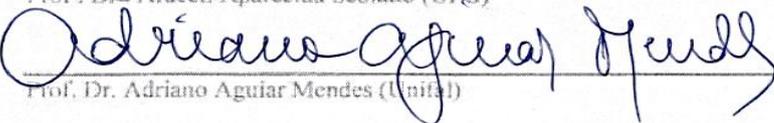
Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez (UFG)



Prof. Dr. Dasciana de Sousa Rodrigues (Embrapa)



Prof. Dr. Araceli Aparecida Seolatto (UFG)



Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes (Unifal)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e perseverança.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez por permitir-me a oportunidade de realizar este trabalho, além da orientação e confiança no meu trabalho.

A minha co-orientadora, Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues, que com sua paciência e sem medir esforços me ensinou desde os conceitos básicos até o final de todo este projeto.

Aos meus pais, Regina Tércia e Paulo Cezar, por todo o incentivo aos estudos, pelo apoio, carinho e amor. Obrigada por tudo que fizeram, pelas lutas diárias e pela criação que me deram, vocês são minhas inspirações de vida.

Ao meu irmão, Gabriel, pela a inspiração que é pra mim, por participar da minha vida acadêmica e mesmo reclamando de me esperar, obrigada pelas idas e vindas da faculdade juntos, filosofando sobre a vida e falando inglês do nosso jeito.

Ao meu amado, Guilherme, por toda paciência ao longo desse tempo, por me apoiar, incentivar e não deixar eu desistir. Obrigada por todo carinho e compreensão, pelas despedidas e reencontros na rodoviária e por sempre “me cuidar” e ajudar no que for preciso sem medir esforços.

Aos meus avôs, pelos conselhos e carinho.

A minha madrinha, Enia Valéria, pelo incentivo e carinho.

Aos meus amigos da Embrapa Agroenergia, Bruno, Nicole, Pedro, Dulce, Ruben, Samira, Helder, Hetiene, Débora, Elias, Vivianny, Júlia, Amanda, Gisele, Wilson, Daiana, Maria Luiza, Carolina, Tallyta e Jéssica, pela amizade e ensinamentos, pelas tortas de limão e risadas. Vocês fizeram meus dias em Brasília mais alegres. Quero agradecer em especial ao Bruno, pela grande ajuda durante o projeto, por mais que me deixou doida e irritada as vezes, me mostrou como fazer pesquisa e as perguntas que devem ser feitas.

Aos analistas do Laboratório de processos bioquímicos da Embrapa Agroenergia, Thaís, Thályta e Diogo, pela amizade, treinamentos e conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos de serviços gerais da Embrapa Agroenergia, pelas conversas de corredores, brincadeiras e ensinamentos.

A Prof. Dra. Fabrícia Paula de Faria, por abrir as portas do seu laboratório e pelas contribuições. Agradeço em especial à Izadora, por todo o apoio, paciência e ensinamento enquanto estive no laboratório de biotecnologia de fungos.

Aos meus amigos de pós-graduação e professores da UFG, que colaboraram para meu aprendizado e me escutaram nos momentos de desânimo.

As irmãs, da Congregação das irmãs franciscanas da Sagrada Família de Maria, que me acolheram com simpatia e amizade em Brasília, que com sua forma simples de vida me fizeram acreditar nos propósitos da vida.

No mais, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro para colaborar com o desenvolvimento deste projeto e a todos que de alguma forma colaboraram com meu crescimento acadêmico, pessoal e profissional.

Muito obrigada!

Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

- E isso importa?

- Mais do que a própria guerra.

(Ernest Hemingway)

Sumário

Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas	xiv
Resumo	xv
Abstract.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivo Específico.....	3
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Composição Química Dos Materiais Lignocelulósicos.....	4
2.1.1 Celulose.....	5
2.1.2 Hemicelulose.....	7
2.1.3 Lignina	8
2.1.4 Outras Substâncias.....	9
2.2 Hidrólise enzimática	10
2.3 Catalisadores Enzimáticos	12
2.3.1 Complexo Enzimático.....	13
2.4 Imobilização de Enzimas	15
2.4.1 Métodos de Imobilização de Enzimas	16
2.4.2 Parâmetros de Imobilização.....	19
2.4.3 Suportes para Imobilização de Enzimas	19
2.4.3.1 Quitosana	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Materiais	24
3.1.1 Enzimas.....	24
3.1.2 Suportes e ativadores	24

3.1.3 Substratos.....	24
3.2 Metodologia experimental	24
3.2.1 Determinação da atividade enzimática FPase.....	24
3.2.2 Determinação da atividade enzimática β -glicosidase	26
3.2.3 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina.....	28
3.2.4 Imobilização por entrecruzamento em Isopropanol e Glutaraldeído .	29
3.2.5 Imobilização por ligação covalente em Quitosana e Glutaraldeído ..	30
3.2.6 Imobilização sequencial de β -glicosidase e celulases.	31
3.2.7 Ajuste de parâmetros operacionais para imobilização.....	32
3.2.8 Rendimento de imobilização	33
3.2.9 Hidrólise Enzimática e Reuso.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1 Determinação da atividade celulolítica.....	35
4.1.1 Influência do pH na atividade enzimática e estabilidade	35
4.2 Análise dos teores de açúcares estruturais e lignina.....	37
4.3 Desempenho de Cellic CTec 3 imobilizada por entrecruzamento na hidrólise da biomassa.	37
4.4 Desempenho do imobilizado em quitosana ativada com glutaraldeído na sacarificação da biomassa.....	39
4.5 Estudo da imobilização sequencial de β -glicosidasas (núcleo) e celulases (periferia)	40
4.6 Seleção da melhor estratégia de imobilização	42
4.7 Ajuste de parâmetros operacionais para imobilização.....	43
4.7.1 Ajuste da concentração de quitosana	43
4.7.2 Avaliação do pH e tempo de imobilização	45
4.7.3 Estudo da carga enzimática.....	47
4.8 Reuso do biocatalisador	49
4.9 Novo estudo da imobilização sequencial de β -glicosidase e celulases.	52

5	CONCLUSÃO E SUGESTÃO	53
5.1	Conclusão	53
5.2	Sugestões	54
	REFERÊNCIAS	56

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.....	4
Figura 2. Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.....	6
Figura 3. Estrutura dos monossacarídeos que formam a hemicelulose.	7
Figura 4. Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides.....	9
Figura 5. Fluxograma de produção de etanol de segunda geração.	10
Figura 6. Esquema simplificado do complexo enzima-substrato.	13
Figura 7. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático.	14
Figura 8. Principais métodos de imobilização de enzimas.	16
Figura 9. Estrutura dos biopolímeros: quitosana (a), quitina (b) e celulose (c)..	21
Figura 10. Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído (a), genipina (b) e epiclorigrina (c).	22
Figura 11. Esquema da imobilização por entrecruzamento.....	30
Figura 12. Esquema de imobilização por ligação covalente em quitosana ativada com glutaraldeído.	31
Figura 13. Esquema da imobilização sequencial de β -glicosidase e celulases....	32
Figura 14. Esquema da unidade reacional utilizada na hidrólise enzimática.	34
Figura 15. Tubos de hidrólise utilizados na hidrólise da biomassa durante o ajuste dos parâmetros	34
Figura 16. Atividade em FPU do coquetel enzimático em diferentes pHs (3, 5, 7, 8 e 10 unidades) e tempos de incubação (5 minutos, 30 e 54 horas).....	36
Figura 17. Estabilidade enzimática a 28°C para diferentes pHs de incubação....	36
Figura 18. Imobilizado enzimático em suspensão.	38
Figura 19. Coquetel enzimático imobilizado em quitosana ativada com glutaraldeído.	40
Figura 20. Núcleos de β -glicosidase, cobertos com endo e exo-glicanases.	41
Figura 21. Rendimento de imobilização para diferentes concentrações de quitosana.	44
Figura 22. Relação entre glicose liberada por massa de catalisador usada na hidrólise.	44
Figura 23. Rendimento de imobilização para diferentes pHs e tempo de imobilização.....	45

Figura 24. Desempenho dos imobilizados na conversão da celulose presente na biomassa pré-tratada.	46
Figura 25. Rendimento de imobilização para diferentes cargas enzimáticas.	48
Figura 26. Desempenho dos imobilizados na conversão da celulose presente na biomassa pré-tratada.	48
Figura 27. Desempenho do biocatalisador em reciclos da hidrólise.....	50
Figura 28. Rendimento de imobilização ao decorrer do reuso do biocatalisador.	50

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	5
Tabela 2. Principais diferenças entre celulose e hemicelulose.	8
Tabela 3. Comparação entre os métodos de imobilização.....	18
Tabela 4. Diluições para a curva padrão de glicose.....	25
Tabela 5. Diluições para a curva padrão de glicose.....	27
Tabela 6. Valores das atividades enzimáticas FPase e β -glicosidase.	35
Tabela 7. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar em porcentagem de matéria seca.	37
Tabela 8. Caracterização do novo bagaço de cana-de-açúcar em porcentagem de matéria seca.	37
Tabela 9. Resumo dos resultados das hidrólises para cada biocatalisador.	42

Resumo

Neste trabalho, diferentes estratégias de imobilização de celulases foram estudadas, em consequência aquela que apresentou melhor custo-benefício foi escolhida para aprimoramento. O coquetel enzimático utilizado nesse estudo foi o Cellic Ctec 3 produzido pela Novozymes. Um dos principais desafios foi imobilizar, de forma não seletiva a maior diversidade possível das pelo menos 17 enzimas presentes no coquetel, visto que, elas apresentam diferentes massas moleculares, tipos e quantidade de grupos funcionais em sua superfície. A ausência de uma dessas enzimas pode impedir a conversão completa da celulose em glicose. Celulases imobilizadas por entrecruzamento, ligação covalente em gel de quitosana ativado com glutaraldeído e imobilização sequencial de β -glicosidase (núcleo) e celulases (periferia) tiveram seus desempenhos avaliados em hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por um processo organosolv. Imobilizados em gel de quitosana ativada com glutaraldeído apresentaram melhores resultados e seu estudo foi aprofundado, contudo um estudo preliminar que permitiu desenvolver uma metodologia para obtenção do imobilizado sequencial de β -glicosidase foi realizado, devido a inovação que representa o uso desta metodologia na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Parâmetros como a concentração de quitosana no preparo do gel (0,5% a 2%), o pH (7 a 10), tempo (10 a 120 minutos) de imobilização e a carga enzimática (40,2 a 1340 mg de proteína/g de suporte) foram avaliados. As celulases imobilizadas apresentaram melhor desempenho de hidrólise quando uma carga enzimática de 134 mg de proteína/g de suporte foi utilizada com pH 9,0 por 30 minutos de imobilização em suporte com 0,5% de quitosana. Hidrolisados com teor de glicose de 13,43 e 10,35 g/L, foram obtidos quando avicel microfibrilada e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram utilizados como substrato, respectivamente. A celulase imobilizada perdeu 60% de seu desempenho de hidrólise após 8 ciclos de aplicação em avicel microfibrilada. A perda foi de 75% após 6 ciclos de aplicação em bagaço de cana. O desempenho de hidrólise associado ao reuso das celulases imobilizadas indicam que o aprimoramento na imobilização de celulases acoplado ao aprimoramento de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, gerando celulose com elevado grau de pureza, permitirá o desenvolvimento de um sistema contínuo de hidrólise enzimática com enzima retida no reator.

Palavras-chaves. Pré-tratamento organosolv. Cellic Ctec 3. Reuso de enzima. Avicel.

Abstract

In the present work, different strategies of cellulases immobilization were studied. The strategy that showed better cost-benefit was chosen for further optimization. The enzymatic cocktail employed in this study was the Cellic Ctec 3 produced by Novozymes. One of the main challenges was to immobilize in a non-selective way, the greatest possible number of the (at least) 17 enzymes present in the cocktail, since they have different molecular masses, types and number of functional groups on their surface. It's worth mentioning that the absence of one of these enzymes may prevent the complete conversion of the cellulose into glucose. Cellulases immobilized by both cross-linking and covalent attachment on glutaraldehyde-activated chitosan gel as well as sequential immobilization of β -glycosidase (nucleus) and cellulases (periphery) had their performances evaluated in the hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by an Organosolv process. Cellulases immobilized by covalent attachment on glutaraldehyde activated chitosan gel presented the best results. A preliminary study was necessary to develop a methodology to obtain the sequential immobilized β -glycosidase, since the use of this methodology for hydrolysis of lignocellulosic materials represents a great scientific innovation. Reaction parameters such as chitosan concentration in gel preparation (0.5% to 2%), pH (7 to 10), immobilization time (10 to 120 minutes) and enzyme loading (40.2 to 1340 mg protein / g support) were evaluated. Cellulases immobilized at pH 9.0 for 30 minutes exhibited better hydrolysis performance when an enzyme loading of 134 milligrams per gram of support was used. Hydrolysates with a glucose content of 13.43 and 10.35 g / L were obtained when micro fibrillated avicel and pre-treated sugarcane bagasse were used as substrate, respectively. The immobilized cellulase lost 60% of its hydrolysis performance after 8 cycles of application using microfiber avicel as substrate. The loss was 75% after 6 cycles of application when sugarcane bagasse was used. The great hydrolysis performance associated with the successful reuse of the immobilized cellulases indicates that the improvement of both immobilization methodology and pretreatment of lignocellulosic biomass is able to generate cellulose with a high degree of purity, which will allow the development of a continuous system of enzymatic hydrolysis with retained enzyme in the reactor.

Keywords. Pre-treatment organosolv. Cellic Ctec 3. Enzyme reuse. Avicel.

1. INTRODUÇÃO

Os diferentes aspectos da sociedade humana, desde o bem-estar individual até o desempenho industrial, estão estruturados no suprimento de energia. Neste contexto, o petróleo apresenta uma importância notável, sendo responsável pelo fornecimento de um terço da energia primária consumida no planeta. Assim, alterações no suprimento ou no uso do petróleo teriam desdobramentos econômicos, políticos e sociais importantes para a maior parte das nações do mundo, tendo como exemplo claro a Crise do Petróleo em 1973 que acabou sendo uma das principais razões para a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975 (IPEA, 2010).

Outro aspecto importante a ser considerado é na área ambiental, o desmatamento, seja para a obtenção de madeira ou para liberação de área para o plantio, juntamente com a combustão crescente de combustíveis fósseis, o acúmulo na atmosfera de gases poluentes, particularmente de CO₂, responsáveis pelo efeito estufa e consequentes alterações climáticas, tem levado a sociedade moderna a pensar sobre a proteção ambiental. Esse atual quadro exige mudanças nos padrões de industrialização e de consumo da sociedade humana, de forma a reduzir a emissão de gases de efeito estufa (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

Diante de tal cenário, surgem os biocombustíveis, que são combustíveis produzidos a partir de biomassa, sejam eles líquidos ou gasosos (FAO, 2008). No entanto, aqueles que provêm de resíduos de culturas agrícolas são conhecidos como combustíveis de segunda geração. Dessa forma, a busca por novas fontes renováveis de energia está mobilizando de forma única setores acadêmicos, industriais e sociais, com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

Para incentivar a produção de biocombustíveis, o governo brasileiro sancionou em 2017 a lei que cria o Renovabio, sigla para Política Nacional de Biocombustíveis, política do Estado que objetiva reconhecer o papel estratégico de todos os tipos de biocombustíveis na matriz energética brasileira, além de cumprir os compromissos do Acordo de Paris e dar mais previsibilidade ao mercado. Garantindo assim uma maior segurança energética e redução da emissão de gases causadores do efeito estufa (MME, 2017).

Os combustíveis de segunda geração apresentam grande potencial de crescimento, visto que sua produção não depende do processamento de alimentos nem da expansão da área plantada, mas sim do reaproveitamento dos resíduos gerados na agroindústria. Logo, a principal vantagem do material lignocelulósico como matéria prima para produção de biocombustíveis de segunda geração, está na logística, pois como se trata de um coproduto, já se encontra disponível (ARAÚJO *et al.*, 2013).

Apesar dos resíduos de colheita serem os materiais que possuem maiores possibilidades de uso por estar mais disponíveis devido à atividade de agricultura, os demais materiais lignocelulósicos como resíduos celulósicos, biomassa herbáceos, madeira de lei, madeira conífera e resíduos sólidos municipais ainda podem ser utilizados em aproximadamente quarenta tipos de aplicações diferentes, dentre elas pode-se citar: produção de papel e celulose, de blendas e compósitos, de madeira prensada, de cosméticos, de hidrogéis, na indústria têxtil, no tratamento de resíduos industriais, entre outros (MOREIRA, 2016; ROCHA, 2012).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol, com 28% do total mundial, enquanto o Estados Unidos, que é o maior produtor, é responsável pela 57,5% do total (RFA,2015). Na última safra 2017/2018, mais de 630 milhões de toneladas de cana de açúcar foram produzidos no Brasil, resultando em 27,8 bilhões de litros de etanol, dos quais a região Centro-Sul foi responsável por 94% (26 bilhões de litros) (CONAB, 2018).

Embora as usinas de etanol celulósico sejam de tecnologia mais sofisticada e de investimentos mais elevados, com um custo de capital estimado em 30% superior ao de uma usina convencional, a integração entre os processos de primeira e segunda geração permitem uma sinergia que pode elevar de 30 a 40% a produtividade total em termos de etanol, sem a necessidade de ampliação da área agrícola. A larga experiência brasileira com a primeira geração é mais uma vantagem para a produção de etanol de segunda geração e que, se bem aproveitada, pode tornar o Brasil um líder no segmento de biocombustíveis de segunda geração (UNICA, 2017).

Além disso, as empresas brasileiras possuem grande vantagem em termos de custos, já que utilizam os insumos mais baratos para a produção de etanol celulósico, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar. Segundo a consultoria Lux Research (2016), essas

biomassas podem custar menos da metade da palha de milho, matéria-prima usada nos Estados Unidos.

No entanto, estes materiais lignocelulósicos possuem uma estrutura complexa e compacta, necessitando de pré-tratamentos que possam auxiliar principalmente na remoção da lignina e hemicelulose, permitindo a redução da cristalinidade e aumento da porosidade do material, possibilitando que a celulose se torne suscetível à hidrólise enzimática (UNICA, 2017).

Em relação à hidrólise, existem duas principais rotas pelas quais é possível quebrar as ligações da celulose, estas são a rota ácida e a enzimática. Embora os processos ácidos sejam eficientes e mais baratos, geram vários subprodutos inibidores da fermentação, devido à degradação parcial da glicose, da fração hemicelulósica e da lignina, além disso, em alguns casos, é necessário o uso de altas temperaturas e/ou pressões. Dessa forma, a hidrólise enzimática tem sido objeto de maior parte dos estudos, uma vez que proporciona maiores rendimentos e é realizada a pressão ambiente, sem formação de subprodutos indesejáveis e podendo ainda ser otimizada a partir de estudos biotecnológicos. Entretanto existem dificuldades, como o alto custo das enzimas, o qual pode ser contornado com o uso da imobilização das enzimas, o que pode viabilizar economicamente o processo. (RABELO, 2007).

A aplicação de celulases imobilizadas na degradação de biomassas traz vantagens para o processo, sendo uma das principais, o reuso de enzimas, o que permite uma maior produção de açúcar por massa de biocatalisador, mas também, as dificuldades relacionadas ao custo, estabilidade e recuperação das enzimas são grandes desafios para viabilizar técnica e economicamente o processo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar o efeito de diferentes tipos de imobilização de celulases, na produção de açúcares fermentescíveis utilizando substratos sólidos, com intuito de tornar o processo enzimático economicamente atrativo, para a produção de etanol de segunda geração.

1.1.2 Objetivo Específico

O objetivo deste trabalho é estudar diferentes estratégias de imobilização (entrecruzamento, ligação covalente e imobilização sequencial) e testar seu desempenho

em substratos sólidos, escolhendo o mais promissor, para aprimoração dos parâmetros de imobilização, como:

- Concentração de pó de quitosana no preparo do suporte;
- pH e tempo de imobilização;
- Carga enzimática.

De forma a se ter melhor carga ativa de enzima e máxima produção de açúcares fermentescíveis por grama de catalisador, ao final dos ajustes será estudado o potencial de reuso do biocatalisador.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição Química Dos Materiais Lignocelulósicos

Biomassas lignocelulósicas apresentam uma elevada recalcitrância devido a sua composição, que é essencialmente de natureza polimérica, apresentando em torno de 35 - 40% de celulose, 20 - 35% de hemicelulose e entre 10 - 25% de lignina, além de outros componentes como os extrativos (RABELO, 2007; AGUIAR, 2010). A estrutura recalcitrante pode ser observada na Figura 1.

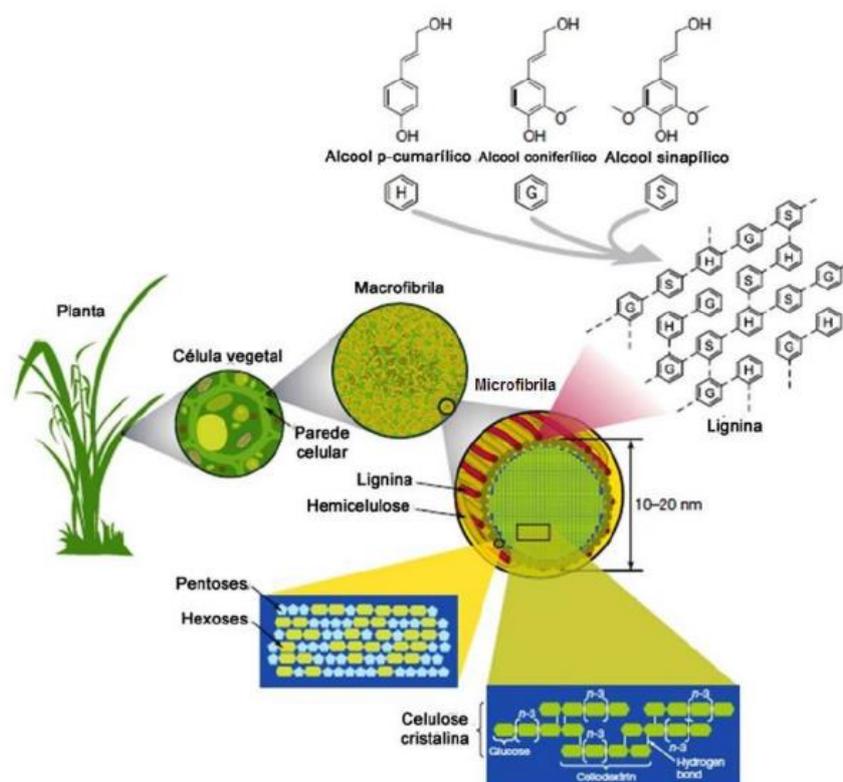


Figura 1. Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.

Fonte: RUBIN, (2008). Adaptado.

A Tabela 1 apresenta a composição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Essa composição depende não apenas do tipo de vegetal, mas também de condições de crescimento, da parte da planta escolhida, da idade de colheita, entre outras condições. (OGEDA e PETRI, 2010)

Tabela 1. Composição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Componentes	Fração (% m/m)
Celulose	34,1 ± 1,2
Hemicelulose	29,6 ± 1,4
Lignina	19,4 ± 0,4
Cinzas	7,9 ± 1,1
Umidade	4,4 ± 0,1
Total	95,5 ± 4,3

Fonte: MAEDA *et al.*, 2011.

Os materiais lignocelulósicos possuem considerável complexidade estrutural, quando comparados a outros substratos, como exemplo, o amido. São compostos majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, que estão entremeados por uma macromolécula de lignina através de ligações de hidrogênio, além de ligações covalentes. Portanto, o processo de conversão desses materiais em etanol requer: [1] deslignificação, no sentido de permitir que a celulose e hemicelulose fiquem expostas, [2] despolimerização, a fim de obter açúcares livres, [3] fermentação de pentoses e hexoses.

2.1.1 Celulose

É o principal polissacarídeo estrutural das plantas, pode ser encontrada tanto em vegetais primitivos quanto em plantas evoluídas, é um homopolissacarídeo de ocorrência natural, que contém unidades D-glicose (D-glicopiranoose) que são unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -(1→4) (β -D- glucana) (MARTINS, 2005).

Na Figura 2 é possível observar, a conformação da estrutura da celulose, a qual se apresenta como um polímero de cadeia linear, sendo a celobiose, um dissacarídeo, composto por duas moléculas de glicose, a unidade básica de repetição. As cadeias de celobiose são unidas através de ligações de hidrogênio e tem a função de dar suporte e proteção a célula vegetal, assim, sob condições normais, a celulose é extremamente insolúvel em água. (OGEDA e PETRI, 2010).

Devido a tal fato, quando colocada em contato com água ou solventes orgânicos, sofre intumescimento, podendo ser este intercrystalino ou intracrystalino. O primeiro caso se dá quando o agente intumescedor penetra na região amorfa da celulose, o caso mais comum é o inchamento da celulose em água. Já o segundo caso se dá quando o agente intumescedor penetra na região cristalina das microfibrilas, por isso é causado mais por soluções de ácidos ou bases fortes. (RABELO, 2007)

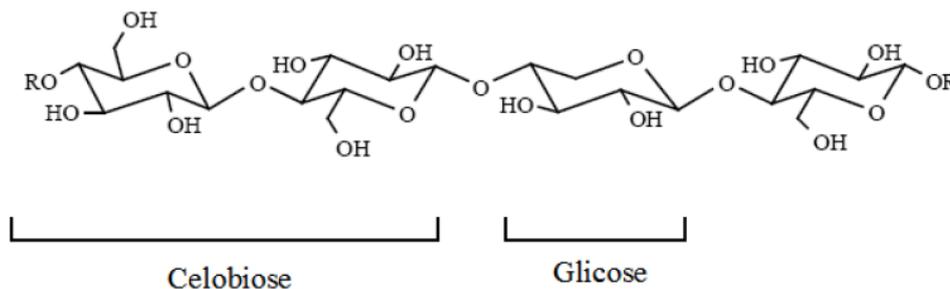


Figura 2. Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.
 Fonte: (FENGEL e WEGENER, 1989)

A estrutura celulósica apresenta regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas. Sendo a região cristalina caracterizada por uma alta organização das cadeias, esta apresenta resistência a degradação externa, ocorrendo então de forma lenta. Contrariamente, a região amorfa, apresenta um menor grau de organização, ocasionando assim disponibilidade nos grupos hidroxilas para reagir, dessa forma a degradação inicia-se nessa região (BOWES e MAUSETH, 2008; GARCIA, 2009).

Quanto a região cristalina, são conhecidas sete estruturas de cristal (estruturas polimorfas) designadas como celulose I α , I β , II, IIII, IIII, IV $_I$ e IV $_{II}$. A celulose I α , I β são as formas mais abundantes na natureza, sendo que a I α é metaestável, e assim, mais reativa que a I β (OGEDA e PETRI, 2010).

Finalmente, a celulose pode ser classificada de acordo com duas importantes propriedades: o índice de cristalinidade e o grau de polimerização. O primeiro diz respeito à reatividade do substrato, enquanto o segundo relaciona-se a frequência de ligações glicosídicas disponíveis para a ação das celulasas, baseando-se no número médio de monômeros e na massa molecular do polímero. Especificamente, cadeias de celulose em parede celular primária de plantas têm graus de polimerização (DP) na faixa de 5.000 a 7.500; o grau de polimerização de celulose de madeira é em torno 10.000, e a de celulose de algodão 15.000 (OGEDA e PETRI, 2010).

2.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses, também conhecidas como polioses, são definidas como heteropolissacarídeos, ou seja, não constituem uma única substância, sendo então uma mistura de polissacarídeo de baixa massa molecular, cuja propriedade química varia nas plantas de espécie para espécie e de tecido para tecido (LEE, 2005; RAMOS, 2003).

As unidades de açúcares que formam a hemicelulose podem ser subdivididas em grupos como: pentoses (arabinose, xilose e ramnose), hexoses (galactose, glicose e manose), e ainda quantidades variáveis em alguns tipos de vegetais de deoxihexoses e ácidos hexurônicos (ácidos urônicos), como pode ser visto na figura 3. As hemiceluloses são geralmente classificadas em três classes: de cadeias ramificadas, cadeias não ramificadas, cadeias helicoidais (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008; RAMOS, 2003; RABELO, 2007).

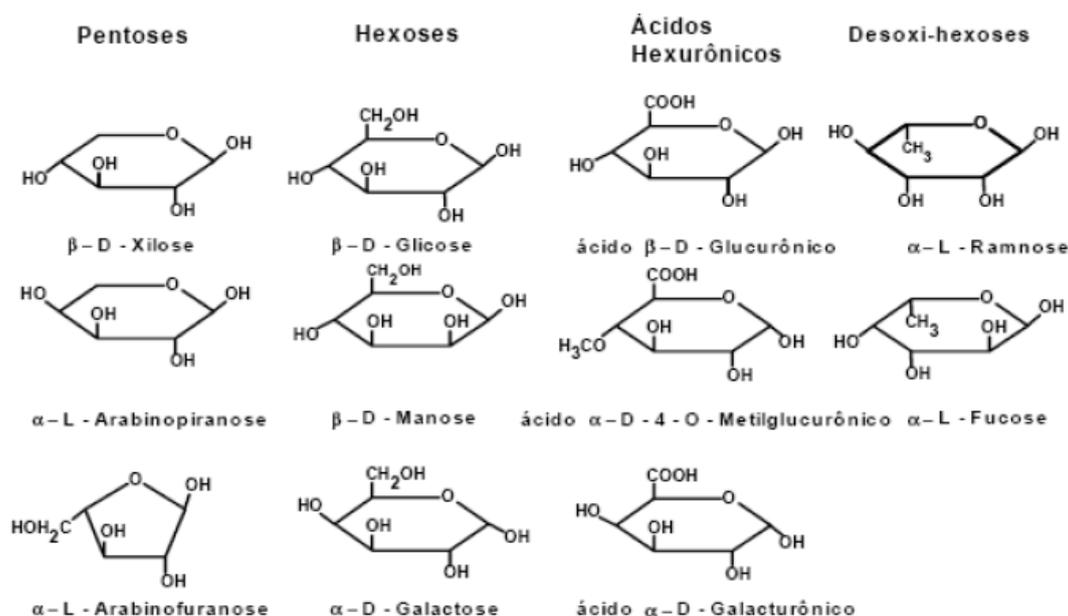


Figura 3. Estrutura dos monossacarídeos que formam a hemicelulose.

Fonte: (FENGEL e WEGENER, 1989)

Conseqüentemente, as estruturas de hemicelulose resultam ser mais semelhantes com a celulose, se comparado com a lignina. Possui funções variadas, sendo a principal função estabilizar a parede celular, por meio de ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina, mas atuam ainda como reserva de carbono, mecanismo de defesa (WYMAN *et al.*, 2005).

Assim, as hemiceluloses diferem da celulose principalmente por sua constituição, a qual acontece por diferentes unidades de açúcares, formando cadeias moleculares curtas e ramificadas. A Tabela 2 apresenta algumas diferenças entre a celulose e hemicelulose.

Tabela 2. Principais diferenças entre celulose e hemicelulose.

Celulose	Hemicelulose
Unidades de glicose unidas entre si	Unidades de diferentes pentoses e hexoses ligadas entre si
Alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidades de glicose)	Baixo grau de polimerização (60 a 300 unidades de açúcares)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões amorfas e cristalinas	Apresenta somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
É insolúvel em álcalis	É solúvel em álcalis

Fonte: (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008)

2.1.3 Lignina

A lignina é o terceiro componente principal da parede celular vegetal, sendo o último componente a ser incorporado, interpenetrando as fibrilas, fornecendo dessa forma o fortalecimento da parede. Entre suas principais funções estão, o transporte de água, nutrientes e metabólitos e conceder resistência mecânica e proteção dos tecidos contra os ataques de patógenos ou pragas (MARABEZI, 2009; TAIZ e ZEIGER, 2010).

A lignina pode ser definida como uma substância hidrofóbica, com estrutura tridimensional, amorfa e altamente ramificada. O mecanismo da sua síntese se dá a partir de três precursores monoméricos que são denominados álcoois cumarílicos, os quais se diferenciam pelas substituições que apresentam no anel aromático, como visto na Figura 4.

- Álcool coniferílico – apresenta grupo metoxílico na posição 3 do anel aromático. É precursor das unidades de guaiacil.
- Álcool sinapílico – apresenta grupo metoxílico nas posições 3 e 5 do anel aromático. É precursor das unidades de siringilo.
- Álcool p-cumarílico – não apresenta substituição. É precursor das unidades p-hidroxifenílicas (NASCIMENTO, 2007).

Devido a essas diferentes unidades precursoras e ao grande número de combinações entre elas, a composição encontrada em diferentes espécies de lignina não é sempre a mesma, portanto, a lignina não é uma substância química, mas sim uma classe de polímeros encontrada em boa parte dos vegetais, o que torna sua estrutura bem mais complexa que da celulose e hemicelulose (GONÇALVES, 2009).

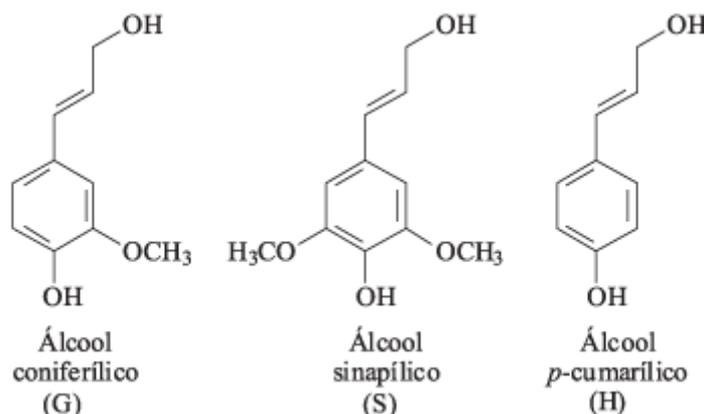


Figura 4. Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides.

Fonte: (BARBOSA *et al.*, 2008)

A lignina embora indesejada nos pré-tratamentos da biomassa, tem sido aplicada em vários processos industriais, como por exemplo, na indústria de fertilizantes, que devido sua constituição orgânica permite obter material húmico. A lignina por apresentar capacidade de retardar o crescimento bacteriano também tem sido utilizada em embalagens de alimento de contato e nos tratamentos de couro. Uma das mais conhecidas utilidades da lignina é na indústria de polímeros, pois pequenas incorporações melhoram as características e desempenho do material (SANTOS, 2011).

2.1.4 Outras Substâncias

As pectinas constituem o principal componente da lamela média da parede vegetal e são uma complexa família de polissacarídeos. É formada por um esqueleto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações $\alpha(1,4)$. Em sua constituição existe ainda em menor quantidade, ramnose, arabinose e galactose. Apresenta propriedades de gel e é carregada negativamente, o que confere a parede celular a propriedade de trocadora de íons (ANDERSEN, 2007).

Os extrativos referem-se a todos os componentes que não estão presentes na parede celular e em sua maioria são solúveis a solventes neutros, correspondem de 4-10% do peso seco da madeira. São componentes intermediários do metabolismo vegetal e que,

no entanto, são responsáveis por características da planta, como sabor, cor, cheiro (OLIVEIRA, 2012).

Os principais compostos químicos que abrangem as substâncias orgânicas de baixo peso molecular são: compostos aromáticos (fenólicos), resinas, terpenos, proteínas, flavonoides, ácidos graxos insaturados e saturados. Os constituintes inorgânicos em maior quantidade são: óxidos de cálcio, potássio, magnésio, seguidos dos óxidos de manganês e sódio, além de sais (MARABEZI, 2009).

Há ainda uma fração não extraível, que corresponde cerca de 2% do peso seco da madeira. Essa fração é formada por resíduos inorgânicos como carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos, que permanecem mesmo depois do substrato ser levado a elevadas temperaturas, e constituído também por partes de cinzas (RABELO, 2007).

2.2 Hidrólise enzimática

Devido à constituição física dos materiais lignocelulósicos e ao fato de que na natureza a celulose ocorre sempre associada à lignina e a hemicelulose, a estratégia de liberação dos açúcares fermentescíveis da celulose requer ações coordenadas de várias enzimas, após a etapa de pré-tratamento, como pode ser visto no fluxograma de produção, na figura 5 (ALVIRA, et al., 2010). A hidrólise enzimática da celulose representa uma alternativa importante para a produção de etanol usando resíduos agroindustriais, por se tratar de um processo específico e limpo.



Figura 5. Fluxograma de produção de etanol de segunda geração.

A biomassa pode ser hidrolisada por rotas biológicas com o uso de enzimas secretadas por microrganismos. O uso destes biocatalisadores, altamente específicos, reduz a geração de subprodutos indesejáveis e dispensa a utilização de equipamentos resistentes à corrosão, trazendo benefícios econômicos, tanto do ponto de vista energético quanto do ponto de vista metalúrgico, quando comparado à hidrólise ácida (CARVALHO, 2011).

Contudo, as condições e parâmetros do processo como: temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração enzimática e relação sólido-líquido, dependem do substrato escolhido e das características do complexo enzimático usado. Deve se ter um controle rigoroso, visto que as enzimas possuem alto custo e são extremamente sensíveis (RABELO, 2007).

Entretanto, quando comparada com os processos químicos, esta apresenta condições mais brandas e vantagens associadas à obtenção de rendimentos superiores a 0,85 g glicose/g celulose, sob temperaturas moderadas (40-50 °C) e pressão atmosférica. Porém, aspectos operacionais relacionados à elevada duração do processo (48-72 h), desativação catalítica por inibição da atividade enzimática, são motivos de incertezas quanto à viabilidade econômica do processo (GRASEL et al, 2016).

Por fim, outro aspecto importante que deve ser analisado, são os fatores que influenciam no rendimento do complexo enzimático, como as características da biomassa, dentre eles: porosidade (área superficial acessível), cristalinidade das fibras de celulose, conteúdo de lignina e hemicelulose do material, que são fatores importantes na realização da hidrólise enzimática (GARZON FUENTES, 2009).

Com relação ao complexo enzimático, uma forma de obter os diferentes tipos de enzimas, é por intermédio de alguns micro-organismos capazes de degradar e utilizar a celulose e a hemicelulose como fonte de carbono e de energia. Entre os fungos que secretam celulasas de alta atividade se tem: *Trichoderma reesei* ou *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Humicola insolens*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum* ou *Chrysosporum lignorum*, *Aspergillus niger* e *Schizophyllum sp.*, *Chaetomium sp.* e *Humicola sp.* Já no caso de bactérias produtoras de celulasas estão: *Cellulomonas fimi*, *Clostridium thermocellum* e *Bacillus subtilis*. E

também algumas leveduras como: *Trichosporium sp.* (RABELO, 2007; SCHEUFELE, 2012).

Estudos têm sido realizados na tentativa de detectar enzimas que sejam capazes de hidrolisar a celulose de uma forma mais efetiva, seja, pela combinação de enzimas para obtenção de complexos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies (engenharia genética), como também, pela otimização dos processos fermentativos permitindo um melhor rendimento do processo (MARTINS, 2005). No entanto, o desenvolvimento do processo enzimático de hidrólise tem sido delimitado pelo custo monetário, isto porque, para a produção das enzimas celulolíticas há um aumento significativo nos custos desse processo. Sendo assim, tornam-se necessárias algumas exigências para reduzir custos desta operação como, por exemplo, desenvolver cepas microbianas com maior produtividade, inclusive técnicas de melhoramento no decorrer da hidrólise, como reciclagem das enzimas (AGUIAR FILHO, 2008).

2.3 Catalisadores Enzimáticos

Enzimas são biomoléculas que atuam como catalisadores, aumentando a velocidade de reações químicas sem alterar o equilíbrio e sem serem consumidas. Com exceção de um pequeno grupo de RNA catalítico, todas as enzimas são de natureza proteica, sendo constituídas por longas cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Essas ligações são resultantes da reação de condensação entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro, com a eliminação de uma molécula de água (MARTINS, 2007).

Estes biocatalisadores, em processos industriais, possuem uma série de características que as tornam mais vantajosas quando comparadas a catálise química convencional. Dessa forma, cabe salientar o alto grau de eficiência catalítica de uma enzima, a alta especificidade e seletividade, o que significa que cada enzima catalisa um tipo de reação para um dado substrato. Essas características evitam formação de subprodutos indesejados gerando um aumento no grau de pureza do produto final. Ressalta-se ainda que as enzimas atuam em condições brandas de temperatura e pressão, e sua atividade pode ser regulada de acordo com as condições operacionais, enquanto os catalisadores químicos requerem condições críticas (RODRIGUES, 2009).

A reação catalisada por enzima ocorre no sítio ativo, o qual se liga ao substrato para formar o complexo enzima-substrato, como pode ser visto na figura 6. A estrutura

molecular alterada muda a conformação do sítio ativo e conseqüentemente inibe a atividade catalítica da enzima. Cada enzima tem uma estrutura tridimensional específica que lhe permite exercer sua função, denominada de conformação nativa, o que nada mais é que a conformação mais estável que uma proteína pode assumir. Essa estabilidade é reflexo de um delicado equilíbrio entre as interações ocorridas entre a molécula e o seu meio ambiente. O que torna então esse biocatalisadores suscetíveis a desnaturação com perda de atividade, quando agentes como pH, temperatura e pressão não se encontram na faixa ótima de operação (LIMA, 2016).

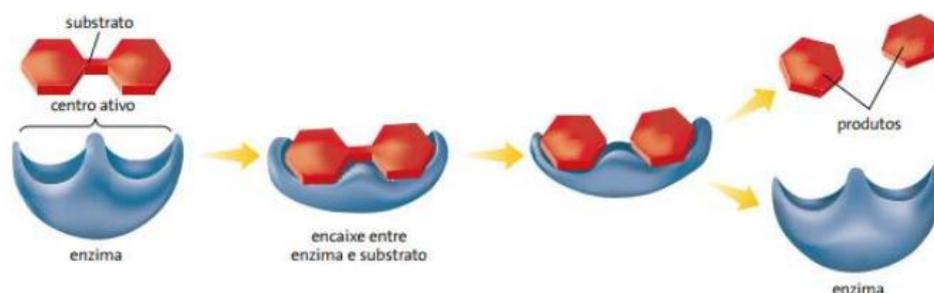


Figura 6. Esquema simplificado do complexo enzima-substrato.
Fonte: (LINHARES E GEWANDSZNAJDER, 2013)

A introdução de novas técnicas de engenharia de proteínas e pela tecnologia do DNA recombinante através da grande área da biotecnologia tem revolucionado o desenvolvimento de novas enzimas industriais, permitindo assim a modificação de propriedades cinéticas e da estabilidade, o desenvolvimento de novas soluções ao nível de tecnologia de reatores enzimáticos e das técnicas de imobilização. O crescimento no mercado de enzimas é de aproximadamente 4 a 5% ao ano, acompanhada pela redução de preço devido ao grande número de empresas que vem comercializando. A utilização de enzimas vem de encontro aos pressupostos da chamada Química Verde (RAJAN, 2004).

2.3.1 Complexo Enzimático

As celulasas são enzimas com capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas β 1,4 da celulose, estando presentes em 13 das 82 famílias das hidrolases glicosídicas identificadas através de análise sequencial molecular secundária. É um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente, ou seja, a atividade exibida por mistura de componente é maior que a soma das atividades desses componentes avaliadas separadamente. (SANTOS, 2014)

A celulases são classificadas como sendo hidrolases e segundo a nomenclatura enzimática (E.C. 3.2.1), em que 3 refere-se à hidrolases, 3.2 glicosilases e 3.2.1 glicosidases. Essas enzimas são divididas em três tipos, sendo elas: endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidases. (IUBMB, 2017).

As endoglicanases ou endo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam as cadeias de celulose internamente de modo aleatório. Essas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis). As exoglicanases ou exo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.91) agem nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose, produzindo em maiores quantidades a celobiose. As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) rompem a celobiose, liberando glicose, minimizando a ação inibitória que a presença da celobiose exerce sobre as atividades endo e exo. A figura 7 representa a ação sinérgica explicada acima.

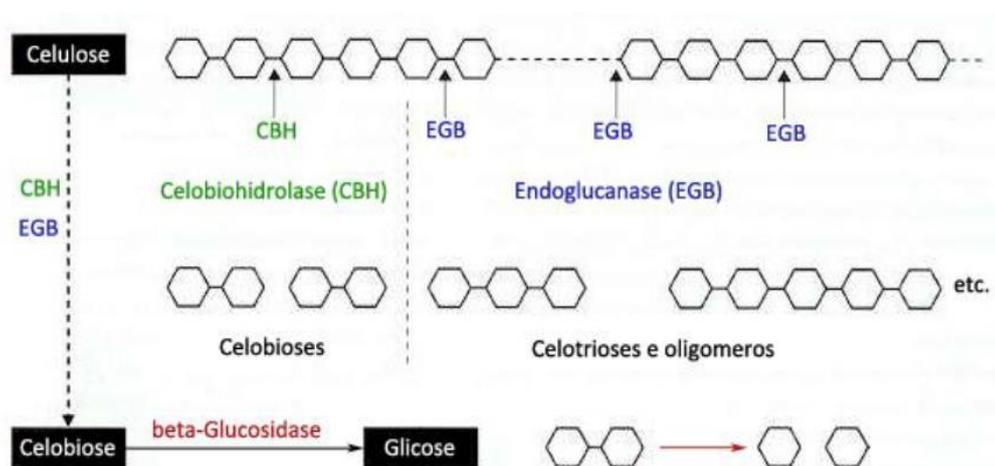


Figura 7. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático.

Fonte: (OGEDA., 2011)

A utilização de celulases é relatada desde 1959 para a modificação de polpas celulósicas. Mas a produção dessas enzimas em escala industrial começou em meados da década de 80, como um aditivo para ração animal (CASTRO, 2006).

O fungo mais estudado, que explica o mecanismo de ação das celulases, é o *Trichoderma reesei* – o primeiro fungo a ser utilizado na produção industrial da celulase, permanecendo ainda como a fonte mais utilizada (SANTOS, 2014). O *T. reesei* produz duas celobiohidrolases, ao menos cinco endoglucanases e duas β -glicosidases. Muito da pesquisa subsequente neste campo focou em mutação/seleção de melhores mutantes para comercialização da enzima. Além das celulases produzidas por fungos, há celulases produzidas por bactérias aeróbicas e anaeróbicas, como pode ser visto em LINDER, 1995 e WYMAN, 1999.

2.4 Imobilização de Enzimas

Comparado aos catalisadores químicos convencionais, as enzimas possuem muitas vantagens que tornam seu uso em aplicações industriais uma alternativa viável, mas apesar do elevado potencial de aplicações, as enzimas não são plenamente utilizadas na escala industrial devido ao seu alto custo, dificuldade de separação de meio reacional e instabilidade de suas estruturas quando em condições desnaturantes (pH e temperaturas altas, forte agitação e presença de solventes orgânicos). Para contornar esses problemas a imobilização de enzimas tem sido a alternativa mais estudada. (RODRIGUES, 2009)

A imobilização de enzima consiste na transformação de um biocatalisador homogêneo em um biocatalisador heterogêneo através da ligação da enzima em um suporte sólido.

As enzimas imobilizadas possuem várias vantagens em relação às suas formas livres, tais como: possibilidade de reutilização da preparação enzimática, proporcionando maior produtividade e redução no custo de aplicação, possibilidade de utilização em processos contínuos e a fácil separação da enzima dos produtos, o que simplifica a etapa de purificação e minimiza os problemas com o manejo do efluente, além de facilitar a interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão. Além disso, o desempenho da enzima, como atividade, seletividade, estabilidade operacional e ao armazenamento, também podem ser melhorados. (DUARTE, 2016)

A imobilização de enzimas deve considerar diversos aspectos e integrar o conhecimento em diversas áreas, incluindo enzimologia, reações químicas, ciência dos materiais e superfícies. A prática de imobilizar enzimas vem se expandindo extensivamente ao longo dos anos a medida que seus benefícios vêm sendo reconhecidos. Sheng (1998) imobilizou celulase em membrana polimérica com o objetivo de diminuir os custos operacionais modificando a celulase com PAN (Poli-N-hidroxialquilacrilamida) observando ganhos na estabilidade quanto ao pH e a temperatura. Em outro estudo, Xia (2003) imobilizou celulase em géis de alginato de sódio para conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares solúveis. Gu *et al.*, (2005), realizou um estudo no qual imobilizou celulase em géis de quitosana obtendo valores significativos de estabilidade térmica. Han *et al.*, (2018) imobilizou celulases em nanopartículas magnéticas, que apresentaram termoestabilidade, capacidade de armazenamento e reutilização melhores do que a enzima livre. Pesquisas mais recentes

vêm empregando, em suas metodologias de imobilização, líquidos iônicos, como Xiang *et al.* (2018) que imobilizou lipases sobre nanomateriais híbridos de sílica quitosana-mesoporosa por líquidos iônicos funcionalizados com carboxila como agente de acoplamento e os resultados indicaram que os nanomateriais híbridos podem formar estruturas tridimensionais com estruturas mesoporosa homogêneas e lipase imobilizada, revelando excelente desempenho enzimático. Apesar dessa metodologia estar apresentado bons resultados, essa ainda é mais dispendiosa quando comparada com outras metodologias.

Em consequência do reconhecimento dos benefícios da imobilização, houve uma expansão nas técnicas de imobilização visando se adequar as variabilidades de cada enzima, e embora exista uma grande diversidade de métodos, não há um aplicável para todas as enzimas. Assim, ao desenvolver um processo de imobilização é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e elevada estabilidade operacional (MENDES *et al.*, 2011).

2.4.1 Métodos de Imobilização de Enzimas

Para determinar o sucesso de imobilização de enzimas, devem-se considerar as características físico-cinéticas, como também, as características físico-químicas dos diferentes suportes (matriz), e as diferentes possibilidades de ativação química destes suportes. Os principais métodos de imobilização podem ser classificados em dois grupos: ligação em suportes sólidos (adsorção e ligação covalente) e confinamento (em matriz polimérica, cápsulas ou membranas), como pode ser visto na figura 8.

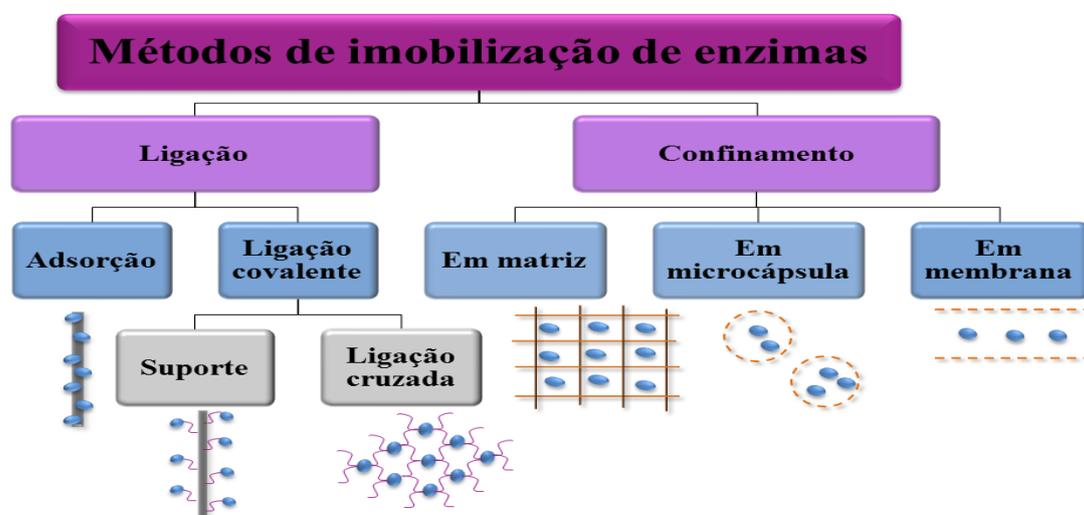


Figura 8. Principais métodos de imobilização de enzimas.

Fonte: (LIMA, 2016)

Os métodos de confinamento consistem no aprisionamento da enzima dentro de um pequeno espaço, que pode ser nos poros de uma matriz polimérica, no interior de cápsulas ou entre membranas. Neste método, a enzima não está ligada à matriz de suporte ao contrário de outros métodos, fazendo com que a estrutura da mesma seja mantida (DUTTA, 2008). Além do mais, as enzimas são protegidas de condições inadequadas de pH, temperatura e presença de solventes orgânicos no meio reacional. Contudo, a imobilização por confinamento apresenta problemas intrínsecos, tais como o escape da enzima do suporte e significativas limitações difusionais (DUARTE, 2016).

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

A ligação por meio de adsorção e/ou interações iônicas consiste na adesão da enzima no suporte por meio de ligações fracas, como interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e/ou interações iônicas. Trata-se de uma técnica simples, rápida, de baixo custo e, geralmente, causa pouca ou nenhuma mudança conformacional na enzima, preservando sua atividade catalítica. Contudo, devido à natureza fraca das ligações, este método é limitado pela tendência de dessorção da enzima do suporte e por ser sensível às condições do ambiente, como a temperatura e a concentração de íons no meio, além disso as enzimas podem ser lixiviadas durante a aplicação. (SHELDON; VAN PELT, 2013;).

Os métodos de ligação covalente se baseiam na formação de ligações fortes entre grupos funcionais presentes na superfície da enzima e do suporte (DE CASTRO *et al.*, 2008). Os grupos funcionais da enzima que participam dessa ligação, grupamento amino, carboxila, hidroxila e/ou sulfidril, não devem fazer parte do sítio ativo para que a atividade seja mantida. A imobilização covalente é frequentemente realizada na presença de um agente ativador, como o glutaraldeído, em suportes contendo grupamentos amino primários. O glutaraldeído reage covalentemente com os grupos amino primários presentes também na enzima ligando-a irreversivelmente ao suporte (GUISÁN, 2006). Na literatura foram descritos outros agentes de ativação. Um exemplo é a genipina e a epícloridrina (MENDES *et al.*, 2011).

A ligação covalente tem a vantagem de fixar a enzima firmemente ao suporte, evitando sua lixiviação. Essa técnica reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações

térmicas, evitando o desdobramento e desnaturação da proteína. Como efeito negativo, ocorre diminuição da liberdade de movimento, o que pode resultar em diminuição da atividade enzimática (AEHLE, 2007).

Outro método de imobilização de enzimas é a ligação cruzada (entrecruzamento) ou cross-linking entre enzimas por meio de agentes reticulantes, formando agregados insolúveis sem a presença de um suporte sólido. Essa técnica pode causar mudanças significativas no sítio ativo de enzima e ainda há o fato de que as enzimas se ligam de uma forma aleatória entre si, podendo endo e exoglicanases ficarem no interior dos agregados formados e sofrerem impedimento estérico, não tendo assim acesso ao seus substratos (DE CASTRO *et al.*, 2008)

As duas estratégias de ligações cruzadas mais utilizadas são os CLECs - *crosslinking enzyme crystals*, cristalização de enzimas puras, seguida pela reticulação ou os CLEAs - *crosslinking enzyme aggregates*, com agregação das enzimas antes da reticulação (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

A Tabela 3 apresenta de forma resumida a comparação entre os métodos de imobilização.

Tabela 3. Comparação entre os métodos de imobilização

Características	Ligações cruzadas	Adsorção física	Ligação iônica	Ligação metálica	Ligação covalente	Confinamento
Preparação	Intermediária	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força da ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Intermediária	Forte	Intermediária
Atividade	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação do suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediária	Intermediária	Alta	Baixa
Aplicabilidade geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção microbiana	Intermediária	Não	Não	Não	Não	Sim

Fonte: (Adaptada SANTOS, 2014)

2.4.2 Parâmetros de Imobilização

Algumas propriedades da enzima e seu comportamento podem mudar com a imobilização. Muitos fatores levam a alteração dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação à livre, diminuindo o rendimento do processo de imobilização. Alguns desses fatores são (BICKERSTAFF, 1995):

- Efeito conformacional: a conformação tridimensional da molécula de enzima pode ser modificada durante o processo de imobilização, ocasionando a alteração no sítio ativo, reduzindo a atividade enzimática. Os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada descontados de seus efeitos eletrostáticos e difusionais são denominados parâmetros inerentes.

- Efeitos eletrostáticos: a concentração de espécies químicas importantes (íons H^+ , moléculas de substrato) no micro-ambiente da enzima imobilizada pode ser diferente das concentrações no *bulk* devido a propriedades físico-químicas do suporte e de efeitos difusionais.

- Efeitos difusionais: a cinética observada da enzima imobilizada pode não estar sendo governada apenas por interações entre enzima e substrato, mas pode também estar sendo limitada pela taxa de difusão do substrato à superfície do suporte, ou internamente, por entre os poros do suporte. Nesse caso a concentração real de substrato que está em equilíbrio com a enzima imobilizada (sistema heterogêneo) é menor que a que haveria caso reagente e catalisador fossem solúveis (sistema homogêneo). Em consequência, a velocidade de reação com enzima imobilizada (velocidade real, aparente ou observada) é menor que a que se obteria para a mesma concentração de reagente no *bulk*.

2.4.3 Suportes para Imobilização de Enzimas

A escolha do tipo do suporte assim como acontece na escolha do método de imobilização deve ser feita caso a caso, não existindo um suporte universal. As propriedades das enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades da enzima e do suporte. A interação entre os dois fornece uma enzima imobilizada com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. As características do suporte são de importância primordial no desempenho do sistema de enzima imobilizada. (PEREIRA, 2015)

Os materiais utilizados na confecção de suportes deveriam, idealmente, ter as seguintes propriedades: (i) ser econômico, (ii) inerte, (iii) estável, (iv) capacidade de melhorar a especificidade / atividade, (v) regenerabilidade, (vi) capacidade de reduzir a

inibição do produto, e (vii) capacidade de prevenir a adsorção não específica e a contaminação bacteriana. A maioria das matrizes tem apenas algumas das propriedades, portanto, a seleção da matriz de suporte para imobilização enzimática deve ser escolhida com base nas propriedades e limitações das matrizes (SIRISHA *et al.*, 2016).

De modo geral, o suporte deve ter alta densidade de grupos ativos presentes na superfície, sendo que esses grupos devem ser capazes de interagir com os grupos frequentemente encontrados em proteínas. Os grupos químicos envolvidos na imobilização devem ser estáveis o suficiente para permitir que a enzima permaneça imobilizada no suporte por longos períodos de reação (MATEO *et al.*, 2007).

Com base na sua composição química, as matrizes de suporte são classificadas em duas categorias principais: (a) material de suporte inorgânico e (b) material de suporte orgânico (os suportes orgânicos são subdivididos em suportes naturais e sintéticos).

Suportes inorgânicos são mais adequados para o uso industrial devido às suas propriedades físicas, apresentando como vantagens elevada resistência mecânica e estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de microrganismos e fácil regeneração. Além de não apresentarem modificação na estrutura em uma larga faixa de pH, temperatura e pressão. Incluem vidro, gel de sílica, alumina, óxidos metálicos, zircônia e muitos outros materiais (SIRISHA, *et al.* 2016).

No caso de suportes orgânicos, estes podem ser de origem natural ou sintéticos. Uma grande variedade de polímeros naturais, principalmente polissacarídeos insolúveis em água como colágeno, quitosana, alginato, amido, agarose, etc., foram utilizados como matriz de suporte para imobilização enzimática. Apresentando algumas vantagens como fácil degradação, não causando danos ao meio ambiente, baixo custo e disponibilidade em grandes quantidades, capacidade de formar géis inertes, apresentam estruturas químicas que podem ser facilmente ativadas. Ademais apresentam alta resistência térmica e mecânica através de reticulação com agentes bifuncionais. Enquanto os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal (SIRISHA *et al.* 2016).

2.4.3.1 Quitosana

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua

utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (MARTINS, 2007).

A quitosana é produzida a partir da quitina por hidrólise alcalina via processo termoquímico, que promove a desacetilação da quitina, normalmente com NaOH (40-50% m/m) a 110-115 °C. Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e, conseqüentemente, as características da quitosana obtida são temperatura e tempo de reação, concentração da solução do álcali, razão quitina/álcali, tamanho das partículas da quitina e presença de agentes que evitam a despolimerização (MENDES *et al.*, 2011).

Como é apresentado na Figura 9, este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH₂) na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon NH₃⁺, que confere propriedades especiais (MARTINS, 2007).

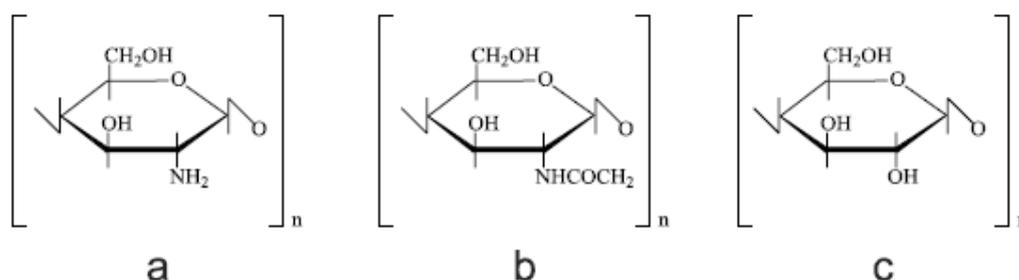


Figura 9. Estrutura dos biopolímeros: quitosana (a), quitina (b) e celulose (c).

Fonte: (MENDES *et al.*, 2011)

Entre as características desejáveis da quitosana pode-se destacar: produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental, alta afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos funcionais para reação direta com enzimas ou para modificação química, hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, resistência à degradação química, propriedades antimicrobianas e facilidade de preparação em uma variedade de formas físicas (DUARTE, 2016).

No intuito de aumentar a estabilidade química e física da quitosana e seus derivados (complexos polieletrólitos e matrizes híbridas), têm sido empregadas alternativas como a modificação química, também denominada de reticulação,

empregando diferentes agentes de ativação. As reações envolvidas na reticulação por agentes bifuncionais ocorrem entre os grupos amino e hidroxilas da quitosana. Estas reações podem ser realizadas de maneira homogênea pela adição do agente bifuncional à solução de quitosana, ou de maneira heterogênea com a adição do agente à quitosana nas formas de membranas e esferas (MENDES *et al.*, 2011).

A Figura 10 mostra uma representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído (a), genipina (b) e epícloridrina (c). No caso específico da quitosana, a modificação de sua estrutura química é necessária para a obtenção de um suporte quimicamente mais resistente ao meio ácido e redução da sua capacidade de retenção de água.

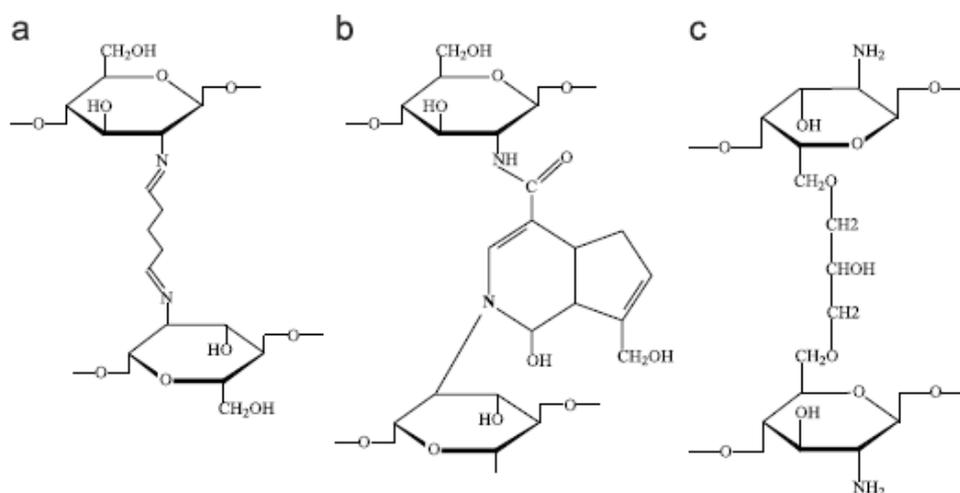


Figura 10. Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído (a), genipina (b) e epícloridrina (c).

Fonte: (MENDES *et al.*, 2011)

A utilização de quitosana em suas diferentes formas para imobilização de enzimas vem sendo muito estudada, sendo possível encontrar na literatura diversos trabalhos como:

Martino *et al.*, (1995), obtiveram êxito em imobilizar B-glicosidase em quitosana por adsorção com posterior formação de ligações cruzadas com glutaraldeído e por ligação covalente alcançando atividades recuperadas de 55 a 85% e derivados com estabilidade operacional.

Cetinus *et al.*, (2000), imobilizou a enzima Catalase® em filme de quitosana ativado com glutaraldeído e obteve a 5°C um aumento de estabilidade térmica de apenas 1,4 vezes em relação a enzima em sua forma solúvel.

Adriano *et al.*, (2003), obtiveram ganhos de estabilidade da Penicilina G Acilase imobilizada em pellets de quitosana ativados com glutaraldeído de cerca de 5 vezes em relação a enzima livre em ensaios realizados a uma temperatura de 50°C. Os rendimentos de imobilização chegaram a 82%.

Gu *et al.*, (2005) imobilizaram celulase em géis de quitosana obtendo um ganho na estabilidade térmica de 1,7 vezes em relação à enzima livre em ensaios realizados a 65 °C. Para a mesma enzima e condições de ensaio, Martins *et al.*, (2006), obtiveram valor para o fator de estabilidade térmica de 1,9 vezes. Portanto, quando utilizaram híbridos de quitosana com copolímeros (quitosana – alginato), o valor obtido para o fator de estabilidade térmica foi de 2,9 com rendimento de imobilização de 55,8%.

Aise Dinçer *et al.*, (2007), estudaram a imobilização por adsorção de celulase em quitosana modificada com álcool polivinílico obtendo um rendimento de imobilização de 87% apresentando uma boa estabilidade operacional.

El-Ghaffar (2010), imobilizou celulase diretamente em quitosana, ácido quitosana-l-glutâmico e ácido quitosana-4-amino butírico por ligação covalente e cross-linking. O imobilizado celulolítico apresentou melhor estabilidade e maior retenção de atividade em relação ao pH, temperatura e armazenamento do que a enzima livre.

Zang *et al.* (2014), desenvolveram suportes magnéticos de quitosana revestindo quitosana na superfície de nanopartículas de Fe₃O₄, a celulase imobilizada com a alta sensibilidade magnética tornou-se de fácil separação da mistura reacional. Em uma outra tentativa conduzida por Sánchez-Ramírez *et al.* (2017), a enzima celulase foi covalentemente estabilizada em nanopartículas magnéticas revestidas de quitosana. Este método melhorado foi mais simples do que os anteriormente estudados, resultando em imobilização e atividade superior.

Os exemplos citados sugerem que, apesar de estar sendo bastante explorada como suportes para imobilizar enzimas, ainda não foram alcançados 100% de rendimento e não foram atingidos altos valores de estabilização térmica. Apesar disso, é fundamental que

se continue com a exploração deste material e o aperfeiçoamento dos métodos de imobilização de enzimas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Enzimas

Foram utilizadas preparações de Celobiase de *aspergillus niger* adquiridas da Sigma-Aldrich, coquetel enzimático Cellic CTec 3 e Celluclast fornecidas pela empresa Novozymes A/S.

3.1.2 Suportes e ativadores

Foram utilizados como suporte para a imobilização: quitosana com peso molecular médio da Sigma Aldrich. O agente de ativação empregado foi glutaraldeído 25% (v/v) da Vetec.

3.1.3 Substratos

Foram utilizados como substratos para a dosagem da atividade hidrolítica do coquetel enzimático, Papel de filtro Whatman n°1, celobiose, avicel e carboximetilcelulose (CMC). Para avaliar o desempenho de celulasas imobilizadas foram utilizados como substratos o bagaço de cana-de-açúcar previamente tratado por organosolv, fornecido pela Embrapa Agroenergia e avicel microfibrilada, obtida processando uma solução de 10% (m/v) de avicel em turrax, por 30 minutos a 15000 rpm.

3.2 Metodologia experimental

3.2.1 Determinação da atividade enzimática FPase

Para a determinação da atividade celulolítica total das enzimas, utilizou-se a metodologia de determinação de açúcares totais, por ácido dinitrosalicílico (DNS), em papel de filtro de acordo com o protocolo de GHOSE, 1987 e Xiao *et al.* 2004.

Em placa de PCR (96 poços) foi adicionado 40 µl de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5 e 20 µl do coquetel enzimático previamente diluído. Como substrato, utilizou-se discos de papel de filtro Whatman n°1 de 7 mm de diâmetro (aproximadamente 3,4 mg), feitos utilizando furador de papel (tipo material de escritório), tomando cuidado para que o papel fique totalmente submerso na solução. A placa foi colocada em termociclador a 50°C por 60 minutos e depois a 4°C por 5 minutos, para parada de reação. Após o período de incubação, adicionou-se 120 µl de reagente DNS em

cada poço e a placa foi levada, novamente, ao termociclador a 95°C por 10 minutos e depois a 4°C por 5 minutos. Ao final do tempo, retirou-se uma alíquota de 36 µl de cada um dos poços e transferiu para placa de Elisa contendo 160 µl de água deionizada. A absorbância foi determinada a 540 nm em um espectrofotômetro;

Os ensaios podem, em alguns casos, conter açúcares redutores intrínsecos ao substrato ou à solução de enzima. Por esta razão, necessariamente, foram incluídos os controles:

- (i) branco da enzima: ensaio contendo a enzima, sem a adição de substrato ao poço. Adicionou-se 40 µl de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5 e 20 µl de enzima diluída;
- (ii) branco do substrato: ensaio contendo substrato, sem adição de enzima ao poço. Adicionou-se 60 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5 e um disco de 7 mm de papel de filtro.

Os valores de açúcares redutores obtidos nos ensaios enzimáticos foram corrigidos, subtraindo os valores apresentados pelos controles.

Preparo da curva padrão: ao poço correspondente, adicionou 40 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5 e 20 µL de cada uma das diluições da curva padrão, presentes na Tabela 4. O mesmo procedimento citado acima foi adotado para determinar as leituras das soluções padrões de glicose.

Tabela 4. Diluições para a curva padrão de glicose.

Ponto	Padrão Glicose 10 mg/ml (µL)	Solução Tampão (µL)	Concentração (mg/ml)	Quantidade glicose no ensaio (mg)
1	100	400	2,0	0,040
2	100	200	3,3	0,066
3	100	100	5,0	0,100
4	100	50	6,7	0,134

Para a determinação da atividade enzimática FPase, os resultados são expressos utilizando a concentração final de glicose. A solução de enzima é diluída em tampão até atingir 0,128 mg de glicose final, 4% de conversão do substrato (o coquetel enzimático Cellic Ctec 3 foi diluído 350 vezes, enquanto a Celluclast foi diluída 150 vezes). Para então ser realizados cálculos de determinação de atividade de acordo com as equações (1) e (2).

$$\frac{0,128(mg)/0,18016\left(\frac{mg}{\mu\text{mol}}\right)}{0,02\text{ ml de enzima} * 60\text{ minutos}} = 0,5926 \mu\text{mol/ml min} \quad (1)$$

$$FPU = \frac{0,5926}{\text{Concentração da enzima que libera } 0,128\text{ mg de açúcar}} U/ml \quad (2)$$

As soluções usadas no experimento descrito foram feitas da seguinte forma:

Reagente DNS: Dissolveu-se 10,6 g de ácido dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 ml de água deionizada. Após completa solubilização, adicionou-se 306 g de tartarato de sódio e potássio, 8,3 g de metabissulfito de sódio e 423,6 ml de água deionizada. A solução foi mantida sob agitação até completa solubilização e armazenada em frasco âmbar ou vidro envolvido em papel alumínio.

Tampão Citrato de sódio/Ácido Cítrico: preparou-se soluções 0,1M de citrato de sódio e 0,1M de ácido cítrico e ajustou o pH da solução de citrato de sódio com a solução de ácido cítrico até pH 5. A solução foi armazenada em geladeira.

- Influência do pH

A atividade da celulase livre foi estudada utilizando-se a reação de hidrólise do papel de filtro Whatman n° 1 na faixa de pH entre 3,0 a 10,0. Foi empregada a metodologia descrita anteriormente variando o pH (3, 5, 7, 8, 10) do tampão citrato de sódio/ácido cítrico na temperatura de 28°C.

3.2.2 Determinação da atividade enzimática β -glicosidase

Para a determinação da atividade de β -glicosidase das enzimas, utilizou-se o protocolo miniaturizado reduzindo em dez vezes os volumes empregados no método clássico proposto pela International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC (GHOSE, 1987).

Em placa de PCR (96 poços) foi adicionado 100 μ l de solução de celobiose 15 mM e 100 μ l do coquetel enzimático previamente diluído. A placa foi vedada e levada ao termociclador a 50°C por 30 minutos e depois a 95°C por 10 minutos. Após o período de incubação, retirou-se uma alíquota de 2,5 μ l de cada um dos poços e transferiu para placa de Elisa contendo 250 μ l do reagente enzimático do kit GOD-POD (Glicose oxidase – Bioclin). A placa foi incubada a 37°C por 10 minutos. A absorbância foi determinada a 505 nm em um espectrofotômetro;

Os ensaios podem, em alguns casos, conter açúcares redutores intrínsecos ao substrato ou à solução de enzima. Por esta razão, necessariamente, foram incluídos os controles:

- (i) branco da enzima: ensaio contendo a enzima, sem a adição de substrato ao poço. Adicionou-se 100 μL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5 e 100 μL de enzima diluída;
- (ii) branco do substrato: ensaio contendo substrato, sem adição de enzima ao poço. Adicionou-se 100 μL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5 e 100 μL de solução de celobiose 15 mM.

Os valores de açúcar redutor obtidos nos ensaios enzimáticos foram corrigidos, subtraindo os valores apresentados pelos controles.

Preparo da curva padrão: ao poço correspondente, adicionou 100 μL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5 e 100 μL de cada uma das diluições da curva padrão, presentes na Tabela 5. O mesmo procedimento citado acima foi adotado para determinar as leituras das soluções padrões de glicose.

Tabela 5. Diluições para a curva padrão de glicose.

Ponto	Padrão Glicose 5 mg/ml (μL)	Solução Tampão (μL)	Concentração (mg/ml)	Quantidade glicose no ensaio (mg)
1	100	900	0,5	0,050
2	100	400	1,0	0,100
3	100	200	1,65	0,165
4	100	150	2,5	0,250

Para a determinação da atividade enzimática de β -glicosidase, os resultados são expressos utilizando a concentração final de glicose. A solução de enzima é diluída em tampão até atingir 0,100 mg de glicose final (o coquetel enzimático Cellic Ctec 3 foi diluído 70000 vezes, enquanto a Cellobiase de *aspergillus niger*, foi diluída 7000 vezes). Para então ser realizados cálculos de determinação de atividade de acordo com as equações (3) e (4).

$$CB = \frac{0,0926}{\text{Concentração da enzima que libera 0,1 mg de glicose}} U/ml \quad (3)$$

Em que,

$$0,0926 \mu\text{mol/ml min} = \frac{(0,05/0,18016) (\mu\text{mol de celobiose convertida})}{0,1 \text{ ml de enzima} * 30 \text{ minutos}} \quad (4)$$

As soluções usadas no experimento descrito foram feitas da seguinte forma:

Padrão de celobiose 15 mM: Em um béquer, pesou-se 0,2566 g de celobiose (padrão) e avolumou para 50 mL, com tampão citrato de sódio/ ácido cítrico 0,1 M pH 5, em balão volumétrico. Esta solução não deve ser armazenada para uso posterior.

Tampão Citrato de sódio/Ácido Cítrico: preparou-se soluções 0,1M de citrato de sódio e 0,1M de ácido cítrico e ajustou o pH da solução de citrato de sódio com a solução de ácido cítrico até pH 5. A solução foi armazenada em geladeira.

3.2.3 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina

Para verificar a eficiência da hidrólise do material, foram determinados os teores de celulose, hemicelulose e lignina, presente no bagaço de cana-de-açúcar previamente tratado por organosolv, fornecido pela Embrapa Agroenergia. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por NREL, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, 2012.

A metodologia consiste em fazer hidrólise ácida do bagaço pré-tratado, dessa forma, em tubos para autoclavagem foi adicionado 0,3 g da biomassa e 3 ml de ácido sulfúrico 72% e incubado a 30°C por 60 minutos. Com o auxílio de um bastão de vidro, homogeneizou-se as amostras a cada 10 minutos sem retirar do banho. Ao final do período, foi adicionado 84 ml de água Milli-Q, agitando para completa homogeneização, levando os tubos para autoclave por 60 minutos a 121°C.

Após autoclavagem, filtrou-se com auxílio de bomba a vácuo e foi armazenado amostra do licor para análise em espectrofotômetro, no comprimento de onda 240 nm, e HPLC. Os sólidos presentes foram transferidos quantitativamente para cadinhos e foram levados a estufa em 105°C por 16 horas e posteriormente a mufla para análise de lignina insolúvel e cinzas.

- Determinação de Lignina.

Para o cálculo de lignina solúvel utilizou-se a equação (5)

$$\%Li_{\text{solúvel}} = \frac{Abs_{\text{amostra}} * Volume_{\text{total}} * Diluição}{\epsilon * Massa_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (5)$$

Em que:

$$Diluição = \frac{Volume_{amostra} + Volume_{total}}{Volume_{amostra}} \quad (6)$$

Volume total = 0,087 L

$\varepsilon = 25 \text{ L/g.cm}$

O teor de lignina insolúvel com base no material livre de extrativos foi determinado segundo a fórmula abaixo (7):

$$\%Lig_{insolúvel} = \frac{(Massa_{cadinho\ estufa} - Massa_{cadinho\ mufla})}{Massa_{amostra}} \times 100 \quad (7)$$

- Determinação de Carboidratos estruturais

A quantificação dos carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e Hidroximetilfurfural (HMF) na fração líquida foi realizada empregando HPLC nas seguintes condições:

Coluna: Aminex HPX-87H com pré-coluna.

Detector: RID

Volume de injeção: 10 μL

Fase móvel: 5 mM de ácido sulfúrico

Fluxo: 0.6 mL/minuto

Temperatura da coluna: 45°C

Temperatura do detector: 45°C

Tempo de corrida: 60 minutos

Ao determinar os carboidratos, também é possível calcular os teores de celulose (equação 8), hemicelulose (equação 9) utilizando os seguintes fatores de conversão (GOUVEIA, 2009):

$$\%Celulose = (0,9 * \%glicose + 0,95 * \%celobiose + 1,2 * \%HMF + 3,09 * \%ácido\ f\acute{o}\text{r}\text{m}\text{i}\text{c}\text{o}) \quad (8)$$

$$\%Hemicel = (0,88 * \%xilose + 0,88 * \%arabinose + 0,72 * \%ácido\ a\acute{c}\text{e}\text{t}\text{i}\text{c}\text{o} + 1,37 * \%furfural) \quad (9)$$

3.2.4 Imobilização por entrecruzamento em Isopropanol e Glutaraldeído

Para a imobilização do coquetel enzimático, utilizou Cellic Ctec 3 concentrada. Para o preparo dos derivados imobilizados, em banho de gelo e sob agitação magnética, 20 ml da enzima foram adicionadas em 30 ml de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M em pH 5. Após homogeneização, foram adicionados, lentamente, 40 ml de isopropanol, assim que a solução se tornou turva, adicionou-se 3,0 ml de glutaraldeído e a suspensão

foi mantida sob agitação por 10 minutos. A figura 11 exemplifica o esquema da imobilização.

Após a reação, a enzima imobilizada foi centrifugada a 10000 rpm durante 5 minutos, retirou-se o sobrenadante para posterior análise. Depois da retirada do sobrenadante, adicionou-se água, homogeneizou a solução e repetiu a centrifugação. O processo de lavagem do imobilizado foi repetido mais uma vez, com solução de aminoácidos em pH 8, e finalmente uma lavagem com tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. De modo a lavar glutaraldeído que não reagiu.

As soluções usadas no experimento descrito foram feitas da seguinte forma:

Solução de aminoácidos: pesou-se em um béquer 1,0 g de cisteína e 1,0 g de glicina, avolumou para 100 ml como água deionizada e ajustou pH para 8,0 com trisbase.



Figura 11. Esquema da imobilização por entrecruzamento.

3.2.5 Imobilização por ligação covalente em Quitosana e Glutaraldeído

O suporte foi preparado a partir de 1% (m/v) de quitosana em pó solubilizada em ácido acético 2% (v/v) e homogeneizada por 40 minutos em agitador magnético sob temperatura de 50°C. Ao final da dissolução, adicionou-se 20 mL de solução de KOH 10 mM, como agente coagulante para a formação do gel de quitosana, mantendo a agitação por mais 20 minutos.

A ativação deste suporte foi realizada adicionando glutaraldeído 1% (v/v) sob a solução de quitosana coagulada com KOH. Decorrido o tempo de 20 minutos, o suporte foi filtrado a vácuo e lavado exaustivamente com água deionizada. (BUDRIENE *et al.*, 2005).

Ao suporte ativado, foi adicionada, na proporção de 1:10, uma solução de Cellic Ctec 3, preparada em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M, pH 7. A mistura foi mantida sob agitação durante 2 horas.

Ao final da reação, o derivado imobilizado foi lavado com solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M e pH 5. A figura 12 apresenta o esquema de imobilização em quitosana ativada com glutaraldeído.

As soluções usadas no experimento descrito foram feitas da seguinte forma:

Solução de KOH: pesou-se 0,66 g de KOH com 85% de pureza e avolumou-se para 20 ml de água deionizada.

Tampão Citrato de sódio/Ácido Cítrico: preparou-se soluções 0,1M de citrato de sódio e 0,1M de ácido cítrico e ajustou o pH da solução de citrato de sódio com a solução de ácido cítrico até pH 7. A solução foi armazenada em geladeira.

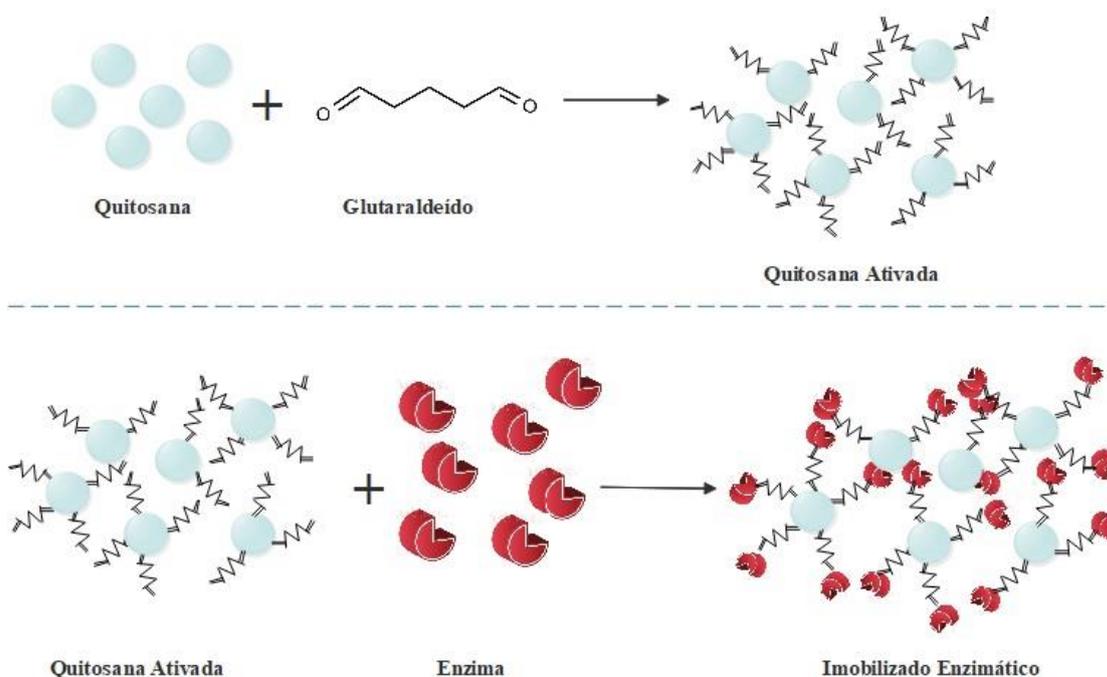


Figura 12. Esquema de imobilização por ligação covalente em quitosana ativada com glutaraldeído.

3.2.6 Imobilização sequencial de β -glicosidase e celulasas.

Para a formação de núcleos de β -glicosidase foi utilizada Celobiase de *aspergillus niger*, que ao decorrer do experimento se mostrou resistente a precipitação, dessa forma, para a formação dos agregados foi adicionada uma pequena quantidade de Cellic Ctec 3. Assim, 0,5 ml de β -glicosidase e 0,1 ml de Cellic Ctec 3 foram mantidas sob agitação em 0,9 ml de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5, adicionou-se aos poucos 1,2 ml de isopropanol, assim que a solução se tornou turva, adicionou 0,09 ml de glutaraldeído.

Posteriormente, a solução foi centrifugada, para separar os agregados formados, em seguida foram adicionados 5 ml de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 8 e 2,5 ml de Celluclast, deixando sob agitação por 2 horas. Ao final da reação, o derivado imobilizado foi lavado com uma solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M e pH 5. O esquema da formação dos agregados de β -glicosidase é representado na figura 13.

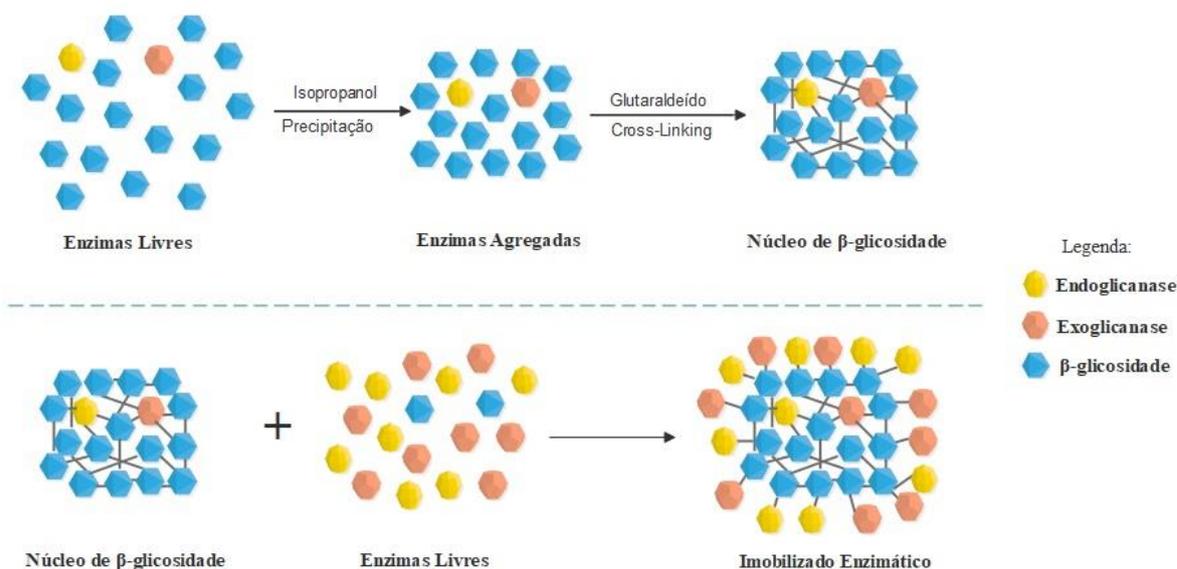


Figura 13. Esquema da imobilização sequencial de β -glicosidase e celulases.

3.2.7 Ajuste de parâmetros operacionais para imobilização

A massa de quitosana utilizada para o preparo do suporte, a carga enzimática, o tempo e pH de imobilização são parâmetros importantes na otimização da metodologia de imobilização para um melhor custo benefício e possível aplicação industrial. Dessa forma, a imobilização de celulase foi realizada seguindo a metodologia descrita na secção 3.2.5, variando a quantidade de quitosana utilizada para o preparo do suporte (0,5% a 2%), o pH (7 a 10), tempo de imobilização (10 minutos a 120 minutos) e carga enzimática (40,2 a 1340 mg de proteína/g de suporte).

Para avaliar o efeito da concentração de quitosana no suporte (gel) sobre a eficácia de imobilização de celulases, foram preparados géis com diferentes concentrações de quitosana e os mesmos foram aplicados para a imobilização de celulases fixando-se as demais condições de imobilização, por exemplo, pH 9,0 e o tempo de reação de 60 minutos.

Para avaliar o efeito do pH sobre a eficácia de imobilização, foi utilizado gel de quitosana (0,5% de quitosana em pó), tempo de reação variando de 10 a 120 minutos e

pH do meio reacional variando de 7 a 10. A solução tampão usada no experimento para os diferentes pHs, foi tampão tetraborato de sódio/ácido bórico 0,1 M.

O estudo da carga enzimática foi realizado, variando-se a carga enzimática de 40,2 a 1340 mg de proteína/g de suporte, a pH 9, tempo de reação 30 minutos em suporte com 0,5% de quitosana.

3.2.8 Rendimento de imobilização

Para determinar o rendimento de imobilização da enzima, durante os ajustes dos parâmetros da melhor estratégia de imobilização escolhida, analisou-se o teor de proteína no sobrenadante da solução de imobilização antes e após o contato com o suporte ativado.

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando ácido bicinconínico – BCA, de acordo com o manual do kit da Thermo Scientific - Pierce® BCA Protein Assay Kit, utilizando albumina de soro bovino como padrão.

O rendimento de imobilização é dado pela equação (10).

$$\text{Rendimento de imobilização} = \frac{\text{Proteína}_{\text{inicial}} - \text{Proteína}_{\text{final}}}{\text{Proteína}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (10)$$

3.2.9 Hidrólise Enzimática e Reuso

Para o estudo das diferentes estratégias de imobilização, a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foi realizada em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M, pH 5,0, com concentração de sólidos de 2,5% (m/v), em um volume final de reação de 50 ml. Os ensaios foram conduzidos, em triplicata, em reator encamisado e com agitação magnética a 50°C por 48 horas, como representado na figura 14. Ao final das 48 horas, as amostras foram centrifugadas e alíquotas do sobrenadante foram retiradas, para a quantificação da concentração de açúcares redutores totais, usando o método colorimétrico DNS, descrito por MILLER (1959).

Para o estudo do desempenho da celulase imobilizada em diferentes condições operacionais, a hidrólise enzimática foi realizada em eppendorfs de 5 ml, em meio contendo tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M, pH 5,0, com concentração de 2,5% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como visto na figura 15. Os ensaios foram conduzidos em triplicata utilizando uma incubadora rotativa com agitação de 200 rpm, a 50°C por 48 horas. A concentração de catalisador no meio reacional era de 1 % m/v. Para verificar a possibilidade de reuso da celulase imobilizada, ao final de cada ensaio de hidrólise, o meio reacional foi centrifugado, a 10000 rpm por 5 minutos, para a recuperação do sólido

(biomassa não hidrolisada + celulase imobilizada) e este foi aplicado como catalisador em novo processo de hidrólise, nas mesmas condições do primeiro ciclo de hidrólise.



Figura 14. Esquema da unidade reacional utilizada na hidrólise enzimática.



Figura 15. Tubos de hidrólise utilizados na hidrólise da biomassa durante o ajuste dos parâmetros

Para o estudo do reuso do imobilizado em suas condições otimizadas, a hidrólise enzimática seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente, com o diferencial de ser realizada em reatores encamisados com um volume final de 50 ml (os mesmos da figura 14) e uma massa de catalisador utilizada de era de 0,75 % m/v. A hidrólise foi realizada tanto em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada quanto em Avicel microfibrilada.

A glicose liberada nos ensaios de hidrólise foi determinada usando cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), equipada com coluna Aminex HPX-87H, um detector de índice de refração (RID). A fase móvel foi H_2SO_4 5 mM a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. O forno da coluna foi mantido a 45°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação da atividade celulolítica

Para a caracterização das enzimas livres foram determinadas a atividade enzimática Fpase (FPU/mL) e atividade de β -glicosidase (CBU/mL), com a finalidade de saber o quanto de atividade foi oferecido no preparo dos biocatalisadores. Com o auxílio das equações (1), (2) e (3), citadas no item 3.2, obteve-se os valores de atividades que estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6. Valores das atividades enzimáticas FPase e β -glicosidase.

Enzima	FPase (FPU/mL)	β -glicosidase (CBU/mL)
Cellic Ctec 3	220 \pm 3,4	6482 \pm 125,7
Celluclast	60 \pm 2,2	15 \pm 1,3
Celobiase de <i>aspergillus niger</i>.	-	581 \pm 3,8

Observa-se que o valor da atividade de Fpase foi maior para Cellic Ctec 3, sendo 3,6 vezes maior que a Celluclast, de igual forma, para o caso da atividade de β -glicosidase, a contida no complexo Cellic Ctec 3 apresenta um valor aproximadamente 11 vezes maior que aquela obtida da Celobiase de *aspergillus niger*.

4.1.1 Influência do pH na atividade enzimática e estabilidade

A maioria das enzimas apresentam um valor de pH ótimo, no qual sua atividade é máxima. Valores acima ou abaixo do ótimo fazem com que a atividade seja reduzida. O pH do meio determina as cargas de resíduos de aminoácidos que constituem enzimas e a alteração dessas cargas pode induzir alterações conformacionais nas moléculas do biocatalisador. A estabilidade da atividade enzimática com o pH, para qualquer enzima, depende do comportamento ácido-básico do meio, natureza do substrato, ponto isoelétrico, estado de pureza da enzima e força iônica (Gama, 2003).

Segundo informações do fabricante o pH ótimo para Cellic Ctec 3 é pH 5, como pode ser visto na figura 16. Contudo, algumas imobilizações se dão de forma melhorada em pHs básicos. Dessa forma, estudos da estabilidade da Cellic Ctec 3 em diferentes pHs foram realizados sendo pH 3, pH 5, pH 7, pH 8 e pH 10 a temperatura de 28°C, para análise de perda de atividade com o decorrer do tempo.

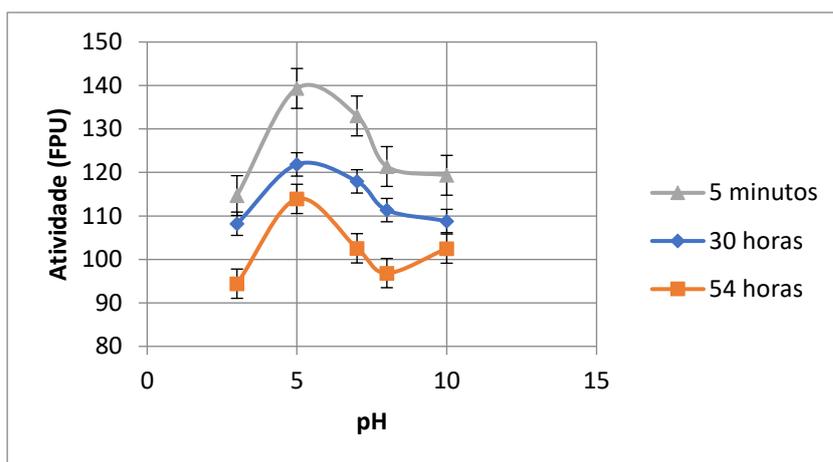


Figura 16. Atividade em FPU do coquetel enzimático em diferentes pHs (3, 5, 7, 8 e 10 unidades) e tempos de incubação (5 minutos, 30 e 54 horas).

A figura 17 mostra a estabilidade do coquetel enzimático frente ao pH, e representa a atividade relativa de FPase em função do tempo de incubação.

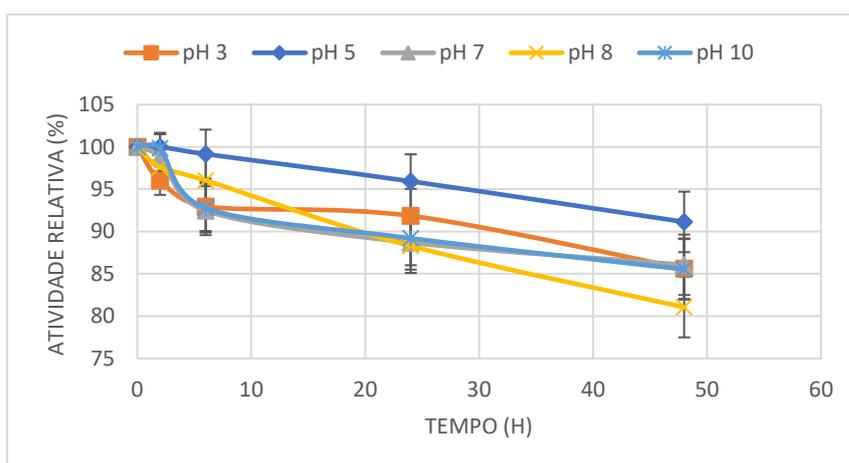


Figura 17. Estabilidade enzimática a 28°C para diferentes pHs de incubação.

Apesar de algumas celulases presentes nos complexos enzimáticos comerciais apresentarem baixa estabilidade abaixo de pH 4,0 e acima de pH 7,0 a presença de vários tipos de aditivos em elevadas concentrações na formulação deste coquetel faz com que estas enzimas suportem melhor condições extremas de pH, por exemplo valores de pH acima de 9. Nas condições avaliadas nesse estudo (28 °C e pH de 3 a 10), a perda de atividade FPase foi inferior a 20% após um período de incubação de 48 horas, tempo muito superior ao necessário para imobilização.

Com estes resultados, estudos de imobilização em pHs alcalinos podem ser realizados, visto que a perda de atividade se apresenta baixa frente a melhor eficiência de imobilização, que pode ser obtida nessa condição de pH.

4.2 Análise dos teores de açúcares estruturais e lignina.

Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo organosolv (BCO) foi utilizado como biomassa modelo neste estudo para avaliar o desempenho de celulases imobilizadas na hidrólise de celulose.

O bagaço utilizado apresentou uma umidade de aproximadamente 4,6% e os resultados obtidos da caracterização encontram-se na tabela 7, para resultados com base de cálculo em massa seca.

Tabela 7. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar em porcentagem de matéria seca.

Componentes	Fração (% m/m)
Celulose	70,3 ± 0,9
Hemicelulose	12,3 ± 0,1
Lignina Total	7,1 ± 0,1
Cinzas	2,7 ± 0,1

Para o estudo do desempenho da celulase imobilizada em diferentes condições operacionais, um novo lote de bagaço pré-tratado precisou ser feito e por mais que foi utilizado o mesmo pré-tratamento este apresentou uma variação em sua composição, como pode ser visto na tabela 8. A nova biomassa apresentou uma umidade de 3,2% e os resultados apresentado na tabela encontram-se em base de cálculo em massa seca. Para diferenciar os materiais ao longo da discussão dos resultados, o material descrito na Tabela 7 foi denominado (BCO1) e o descrito na Tabela 8 (BCO2).

Tabela 8. Caracterização do novo bagaço de cana-de-açúcar em porcentagem de matéria seca.

Componentes	Fração (% m/m)
Celulose	59,6 ± 1,6
Hemicelulose	16,3 ± 0,5
Lignina Total	18,6 ± 0,2
Cinzas	2,2 ± 0,5

4.3 Desempenho de Cellic CTec 3 imobilizada por entrecruzamento na hidrólise da biomassa.

Com o processo de imobilização por entrecruzamento foi possível obter um derivado imobilizado do complexo celulolítico Cellic CTec 3, como pode ser visto na figura 18.

O derivado imobilizado de Cellic CTec 3 teve seu desempenho como biocatalisador avaliado na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo organosolv. Para fins comparativos, a biomassa também foi hidrolisada empregando a enzima em sua forma solúvel, empregada na quantidade de atividade total de 15 FPU/g de biomassa.



Figura 18. Imobilizado enzimático em suspensão.

De acordo com a metodologia da hidrólise, a massa úmida de biomassa utilizada em cada ensaio é de 1,25 g em 50 mL de líquido, o que segundo a Tabela 7, caso toda a celulose disponível seja consumida, fornecerá 18,6 g/L de glicose. Quando a celulose é hidrolisada à glicose, ocorre a incorporação de uma molécula de água em cada uma das ligações glicosídicas presentes no polissacarídeo. A incorporação da molécula de água representa o aumento de 18 g/mol em cada molécula de anidroglicose presente no polissacarídeo. Assim, quando a celulose é hidrolisada à glicose, a massa glicose obtida é 10% maior do que a de celulose originalmente presente na biomassa. Sendo importante levar em consideração esse fato durante o cálculo de conversão.

Dessa forma, observa-se que a enzima em sua forma livre, em 24 horas, consegue consumir quase a totalidade da celulose presente na biomassa (BCO1), gerando em média 18 g/L de glicose.

Quando se trata da forma imobilizada do extrato enzimático, após 48 horas apresenta hidrolisados com concentração de cerca de 11,80 g/L de açúcares redutores, o que corresponde a uma conversão de 63,40 % da celulose disponível no meio reacional.

Para verificar a possibilidade de reuso do derivado imobilizado, ao final da primeira hidrólise, o meio reacional foi centrifugado para a recuperação do sólido e este aplicado como biocatalisador em novo processo de hidrólise, nas mesmas condições do primeiro uso. Considerando esse um novo ciclo de hidrólise, para efeitos de cálculo considerou-se apenas a massa de substrato adicionada novamente ao reator. Dessa forma, após 48 horas de reação,

foi possível obter um hidrolisado com 9,82 g/L de açúcares redutores, rendimento cerca de 17% menor que o resultante do primeiro uso do derivado imobilizado, mas que mesmo com essa queda de rendimento, houve a conversão de 52,76 % da biomassa presente no reator.

A diminuição do rendimento de hidrólise pode ter sido resultante de vários fatores, como por exemplo: (i) cisalhamento das partículas do biocatalisador pelo atrito com as fibras de celulose; (ii) inativação da enzima após maior tempo de aplicação; (iii) dificuldade de acesso do sítio catalítico ao substrato, devido ao carregamento de teor de sólido não hidrolisado da reação anterior; ou uma combinação destes efeitos.

Na literatura encontra-se trabalhos que utilizaram imobilização por *cross-linking* e obtiveram bons resultados, como Periyasamy *et al.*, 2016 que realizou uma co-imobilização por *cross-linking* de xilanase, celulasas e β -1,3-glicanases para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por cozimento em amônia, com carga de 3% de sólidos que resultou em hidrólise máxima de cerca de 83,5% do bagaço em 48 h e foi reutilizado 9 vezes mantendo 50% da atividade inicial.

4.4 Desempenho do imobilizado em quitosana ativada com glutaraldeído na sacarificação da biomassa.

A estratégia de imobilização adotada aqui consiste na reação de grupos aminos presentes na superfície da quitosana e na superfície da enzima com grupos carbonilas do glutaraldeído, como representado na figura 12.

O glutaraldeído reage reversivelmente com grupos amino em uma ampla faixa de pH (\geq pH 3,0), exceto entre pH 7,0 e 9,0, onde apenas uma pequena reversibilidade é observada (MIGNEAULT, 2004). Por esse motivo a imobilização se deu em pH 7,0, entretanto, as celulasas de muitos complexos enzimáticos comerciais sofrem rápida inativação em valores de pH acima de 7,0. Para analisar a inativação do coquetel enzimático o estudo do tópico 4.1.1 foi realizado.

O processo de imobilização empregado foi eficaz, sendo possível obter um derivado imobilizado do complexo celulolítico Cellic CTec3, como pode ser visto na figura 19.



Figura 19. Coquetel enzimático imobilizado em quitosana ativada com glutaraldeído.

O derivado imobilizado de Cellic CTec 3 teve seu desempenho como biocatalisador avaliado na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo organosol (BCO1). Foram obtidos hidrolisados com concentração média de 9,78 g/L de glicose, o que corresponde a uma conversão de 52,55 % da celulose disponível no meio reacional.

Assim como para o biocatalisador obtido por entrecruzamento, para verificar a possibilidade de reuso do derivado imobilizado em quitosana, ao final da primeira hidrólise, o meio reacional foi centrifugado para a recuperação do sólido e este aplicado como biocatalisador em novo processo de hidrólise, nas mesmas condições do primeiro uso. Considerando esse um novo ciclo de hidrólise, para efeitos de cálculo considerou-se apenas a massa de substrato adicionada novamente ao reator. Dessa forma, após 48 horas de reação, foi possível obter um hidrolisado com 5,45 g/L de glicose, rendimento cerca de 44% menor que o resultante do primeiro uso do derivado imobilizado, com essa queda de rendimento houve a conversão de apenas 29,28 % da biomassa presente no reator.

A diminuição do rendimento de hidrólise pode ter sido resultante de vários fatores, como por exemplo: (i) cisalhamento das partículas do biocatalisador pelo atrito com as fibras de celulose; (ii) inativação da enzima após maior tempo de aplicação; (iii) dificuldade de acesso do sítio catalítico ao substrato, devido ao carregamento de teor de sólido não hidrolisado da reação anterior; ou uma combinação destes efeitos.

4.5 Estudo da imobilização sequencial de β -glicosidases (núcleo) e celulasas (periferia)

Esta metodologia de imobilização foi estudada com o intuito de reduzir as desvantagens apresentada por imobilização por entrecruzamento, como descrito na seção 2.4.1, dessa forma se controla a ordem de ligação das enzimas, fazendo com que as β -glicosidases fiquem no núcleo, enquanto as demais em torno do agregado.

Para isso, as enzimas presentes em uma mistura dos extratos enzimáticos Celobiase de *aspergillus niger* adquiridas da Sigma-Aldrich e coquetel enzimático Cellic CTec 3 da Novozymes foram precipitadas pela adição de isopropanol e interligadas (*cross-linking*) com a adição de glutaraldeído como agente de entrecruzamento, e então as enzimas presentes em Celluclast foram ligadas aos núcleos formados, de acordo com o esquema da figura 13.

Na figura 20 é possível notar que o processo de imobilização empregado gerou um derivado imobilizado. Contudo no decorrer do preparo, notou-se que os núcleos formados apenas pela celobiase de *aspergillus niger* eram pouco resistentes e se desmanchavam na etapa de lavagem. Para aumentar a estabilidade dos núcleos, adicionou-se então uma pequena quantidade do coquetel enzimático Cellic Ctec 3.

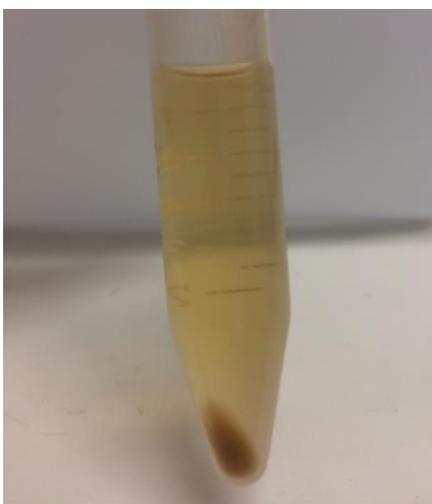


Figura 20. Núcleos de β -glicosidase, cobertos com endo e exo-glicanases.

Assim como os demais derivados imobilizados, este teve seu desempenho como biocatalisador avaliado na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo organosolv (BCO1). Foram obtidos hidrolisados com concentração média de 1,25 g/L de glicose, o que corresponde a uma conversão de 6,71 % da celulose disponível no meio reacional. Devido a baixa conversão não foi estudado a possibilidade de reuso do imobilizado.

Ao final das 48 h de hidrólise, observou-se que parte da biomassa presente no reator havia sido liquefeita, assim como nos outros imobilizados, contudo esta não foi totalmente degradada. À vista disso, o baixo rendimento de hidrólise pode ter sido resultante de vários fatores, como por exemplo: (i) inativação da β -glicosidase durante a formação dos núcleos; (ii) inativação das endo e exoglicanases ao se ligarem aos núcleos; (iii) dificuldade de acesso do substrato (celobiose) ao sítio catalítico; ou uma combinação destes fatores.

4.6 Seleção da melhor estratégia de imobilização

Para atingir elevados rendimentos de hidrólise da celulose é necessário, tanto para enzimas solúveis quanto para enzimas imobilizadas, que todos os tipos de enzima (endoglicanases, betaglicosidases e exoglicanases, principalmente) estejam presentes durante a hidrólise, visto que a ausência de uma dessas enzimas impede a conversão completa de celulose à glicose (KOSTYLEV *et al.*, 2012). Desse modo, o método escolhido para a imobilização de celulasas não pode ser seletivo, deve permitir a imobilização de todos os tipos de enzimas presentes no coquetel.

Em geral, as celulasas imobilizadas por entrecruzamento, ou por ligação covalente em quitosana ativada com glutaraldeído mostram potencial na sacarificação da biomassa e para reuso, conferindo-lhes vantagem em relação à forma solúvel das enzimas. Considerando a quantidade de enzima usada na preparação dos imobilizados, conclui-se que o biocatalisador obtido pela imobilização de celulasas em quitosana é mais eficaz, ou seja, libera mais glicose para uma mesma massa de enzimas (sem considerar a massa do suporte).

A Tabela 9, apresenta a quantidade de enzima usada em cada metodologia e um resumo dos resultados obtidos nas hidrólises realizadas para cada biocatalisador produzido.

Tabela 9. Resumo dos resultados das hidrólises para cada biocatalisador.

Estratégia de imobilização	Quant. de enzima no preparo do imobilizado	Hidrólise		Reuso	
		Conversão (%)	Concentração de ART (g/L)	Conversão (%)	Concentração de ART (g/L)
Entrecruzamento	20 mL	63,4	11,8	52,8	9,8
Ligação covalente em quitosana	2,5 mL	52,6	9,8	29,3	5,5
Imobilização sequencial de β -glicosidase e celulase	0,6 mL + 2,5 mL	6,71	1,25	-	-

Assim sendo, pelos resultados apresentados, por se tratar de um suporte de fácil obtenção e o processo de imobilização ser simples, o derivado de imobilizado em quitosana ativada com glutaraldeído, foi escolhido para o estudo do aprimoramento dos parâmetros de imobilização.

4.7 Ajuste de parâmetros operacionais para imobilização

A quantidade de enzimas ativas ligadas à superfície do suporte após a imobilização depende das condições operacionais desse processo (POON *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2014). Condições como a massa de quitosana e a concentração de glutaraldeído utilizados para o preparo do suporte, a carga enzimática, o tempo e pH de imobilização são fatores importantes no desenvolvimento de metodologia para um imobilizado mais ativo e com melhor desempenho no processo de hidrólise.

A quantidade de glutaraldeído desempenha um papel importante na recuperação total da atividade. Esse agente de ativação pode reagir com diferentes grupos funcionais de proteínas e ligá-los covalentemente aos grupos amino na superfície do suporte de imobilização (MENDES *et al.*, 2011).

Segundo (QI *et al.*, 2018) melhores atividades dos imobilizados são obtidas quando se utiliza 1% (v/v) de glutaraldeído, enquanto valores menores causa uma menor disponibilidade de glutaraldeído para a ligação covalente e valores maiores que este diminui significativamente a atividade. O efeito negativo da sobredosagem do glutaraldeído pode ser atribuído ao fato de o glutaraldeído causar a desnaturação de proteínas devido a mudanças conformacionais. Além disso o excesso de ligações cruzadas entre as moléculas de enzima resulta no aumento da rigidez da enzima afetando negativamente a sua atividade catalítica. Devido a estes fatos, a concentração de glutaraldeído foi mantida em 1% (v/v) em todos os experimentos.

Condições brandas de temperatura e agitação também foram utilizadas neste estudo a fim de evitar perda de atividade enzimática, enquanto os demais parâmetros de imobilização foram avaliados visando aumentar o rendimento de imobilização e o desempenho das enzimas imobilizadas na hidrólise de biomassa pré-tratada.

4.7.1 Ajuste da concentração de quitosana

Uma variável significativa para a imobilização eficaz de celulasas é o tamanho da partícula do suporte. Para avaliar esse efeito, foi estudado a concentração de quitosana no suporte (gel) sobre a eficácia de imobilização de celulasas, foram preparados géis com diferentes concentrações de quitosana (0,5 % a 2% de pó de quitosana) e os mesmos foram aplicados para a imobilização de celulasas fixando-se as demais condições de imobilização, por exemplo, pH 9,0 e o tempo de reação de 60 minutos e carga de enzima de 134 mg de proteína/g de suporte.

As figuras 21 e 22 trazem os resultados de rendimento de imobilização e relação entre a quantidade de glicose liberada na hidrólise do bagaço (BCO2) pela massa de catalisador utilizada na hidrólise, respectivamente.

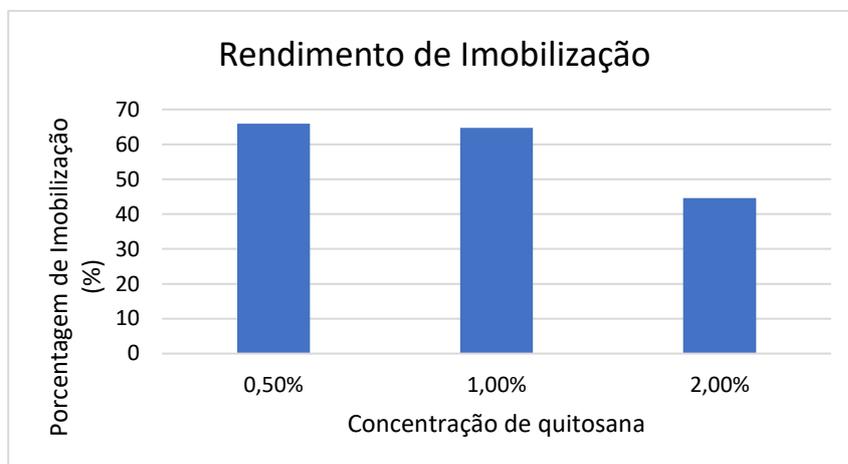


Figura 21. Rendimento de imobilização para diferentes concentrações de quitosana.

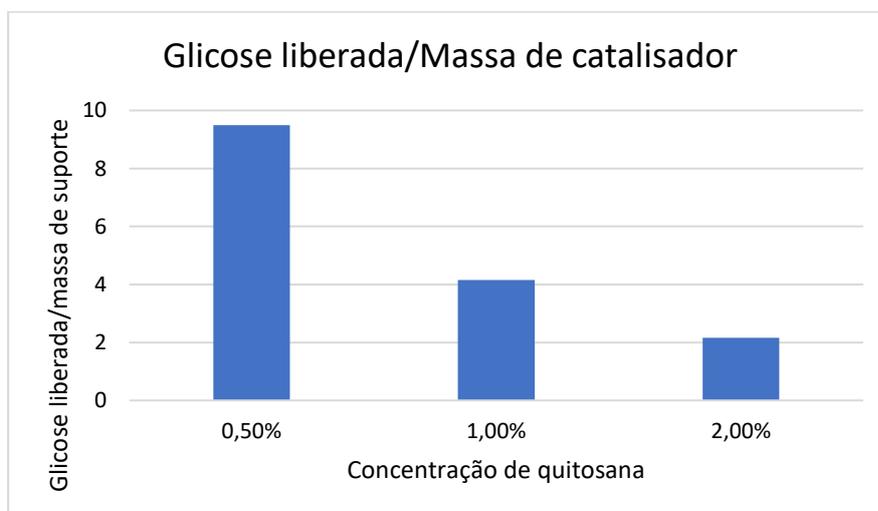


Figura 22. Relação entre glicose liberada por massa de catalisador usada na hidrólise.

A eficiência da hidrólise está ligada aos efeitos de transferência de massa, parece improvável que celulasas imobilizadas em partículas insolúveis sejam capazes de atuar sobre substratos insolúveis. Entretanto, sabe-se que grandes complexos celulolíticos (celulossomas) ligados à parede de células como as de *Clostridium thermocellum* são capazes de catalisar a hidrólise de celulose cristalina (XIMENES E FÉLIX, 2003). Sabendo que a célula de *C. thermocellum* tem aproximadamente 0,3-0,4 μm de largura

por 2-4 μm de comprimento (SATO *et al.*, 1993), é esperado que qualquer partícula com essas dimensões seja eficaz para a hidrólise de celulose também.

Isso pode ser observado nos resultados apresentados, em que o rendimento de imobilização e desempenho de hidrólise reduzem drasticamente quando a concentração de quitosana durante o preparo do gel é aumentada de 0,5 % m/v para 2,0 % m/v. O aumento no tamanho da partícula dificulta o acesso da enzima ao substrato além de dificultar sua ação durante a hidrólise de celulose.

4.7.2 Avaliação do pH e tempo de imobilização

Para avaliar o efeito do pH sobre a eficácia de imobilização, foi utilizado a concentração de quitosana otimizada nos testes anteriores (0,5% de quitosana em pó), tempo de reação variando de 10 a 120 minutos e pH do meio reacional variando de 7 a 10 e carga de enzima de 134 mg de proteína/g de suporte.

Nas figuras 23 e 24 são apresentados os resultados de desempenho dos biocatalisadores obtidos com base no rendimento de imobilização e os valores de conversão da biomassa (BCO₂) após hidrólise de 48 horas, respectivamente.

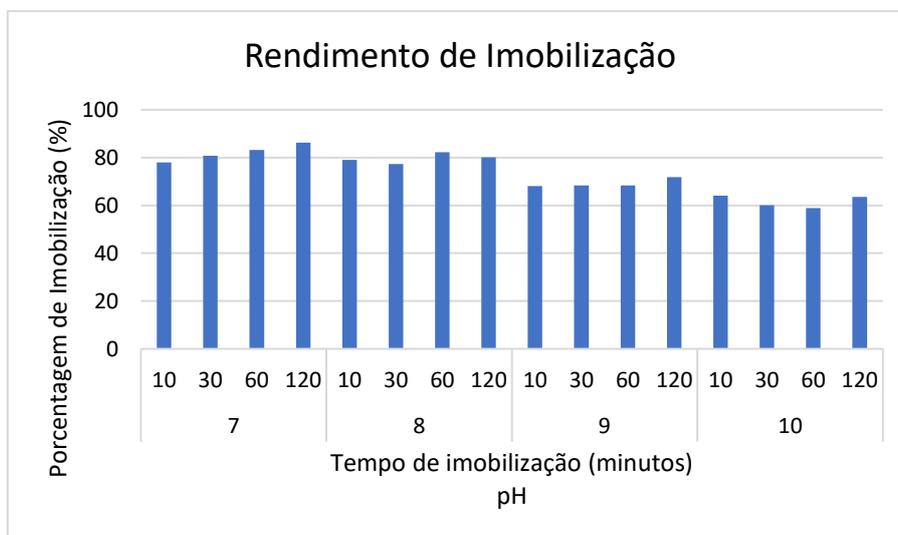


Figura 23. Rendimento de imobilização para diferentes pHs e tempo de imobilização.

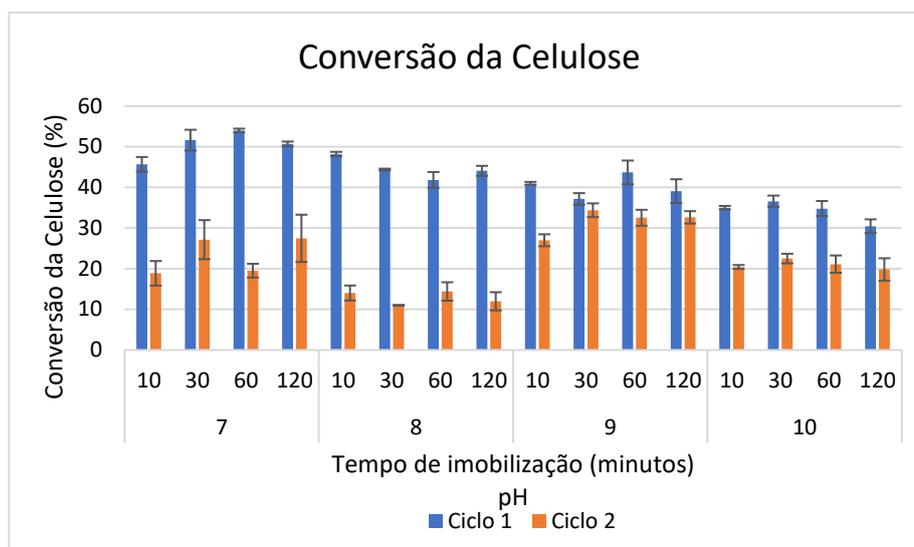


Figura 24. Desempenho dos imobilizados na conversão da celulose presente na biomassa pré-tratada.

Com esses dados, vemos que o rendimento de imobilização em valores de pH 7 e 8 foram ligeiramente maiores quando comparados à imobilização realizada em valores de pH 9 e 10. Por outro lado, enzimas imobilizadas a pH 9 apresentaram maior estabilidade operacional quando comparadas às enzimas imobilizadas em valores de pH 7, 8 e 10. Isso é evidenciado pela menor perda de desempenho de hidrólise apresentada pelas enzimas imobilizadas em pH 9 quando se compara o segundo e o primeiro ciclos de hidrólises (barra laranja, Figura 24). Provavelmente, durante a imobilização em valores de pH 7 e 8, a maior parte das enzimas foram apenas adsorvidas, ou ligadas reversivelmente ao suporte (MIGNEAULT *et al.*, 2004) e, devido a isso, essas enzimas foram removidas do meio reacional após o primeiro ciclo de hidrólise, enquanto em pH 9 a maioria das enzimas foram covalentemente ligadas ao suporte.

Era esperado que o procedimento de imobilização realizado a pH 10 resultasse em maior rendimento de imobilização e maior desempenho de hidrólise comparado aos demais valores de pH, visto que as celulases utilizadas são estáveis em pH 10, entretanto isto não foi observado. É possível, que a imobilização irreversível das enzimas em pH 10 tenha ocorrido de forma muito rápida na superfície e entrada dos poros do gel de quitosana, impedindo uma melhor distribuição das enzimas por toda a superfície do suporte. É desejado que o processo de imobilização seja lento o suficiente para que as enzimas sejam distribuídas e acomodadas sobre a superfície do suporte de forma a manter a atividade catalítica, evitando problemas de impedimentos estéricos (FANG *et al.*, 2011).

Em relação ao tempo de imobilização em pH 9, foi observado que 30 minutos é um tempo suficiente para atingir o máximo rendimento de ligação das enzimas e estabilização, visto que ganhos significativos não foram observados após esse intervalo. Apesar de haver um rendimento de imobilização ligeiramente maior em 10 minutos, é provável que parte destas enzimas estivesse apenas adsorvida ou ligada de forma unipontual (apenas uma ligação entre uma mesma enzima e o suporte), visto que houve uma forte redução no desempenho de hidrólise no segundo ciclo em que este catalisador foi utilizado. Aparentemente, após 30 minutos, as possíveis ligações multipontuais (duas ou mais ligações entre uma mesma enzima e o suporte) já haviam ocorrido, e o catalisador manteve praticamente o mesmo desempenho no segundo ciclo de hidrólise.

4.7.3 Estudo da carga enzimática

Após o ajuste das variáveis como concentração de quitosana, pH e tempo de imobilização, a carga enzimática foi ajustada para que o catalisador atingisse seu máximo desempenho de hidrólise. Em se tratando de imobilização de celulasas, uma mistura com pelo menos 17 enzimas diferentes, com massas moleculares variando de 10 a 800 kDa, e cada uma dessas enzimas com diferentes tipos e quantidade de grupos funcionais em sua superfície, é fundamental estabelecer a carga proteica máxima permitida para que a maior diversidade possível de enzimas seja imobilizada, uma vez que a ausência de um dos tipos de enzima pode inviabilizar a hidrólise de celulose.

Desta maneira, o excesso de proteína oferecida para a imobilização poderia induzir a uma imobilização seletiva, geralmente favorecendo a imobilização de proteínas com baixa massa molecular. Nesse estudo a carga de proteína oferecida para imobilização variou de 40,2 a 1340 mg de proteína/g de suporte, a pH 9, tempo de reação 30 minutos em suporte com 0,5% de quitosana.

As figuras 25 e 26 trazem os resultados de rendimento de imobilização e o desempenho de cada catalisador na hidrólise do bagaço pré-tratado (BCO₂), respectivamente.

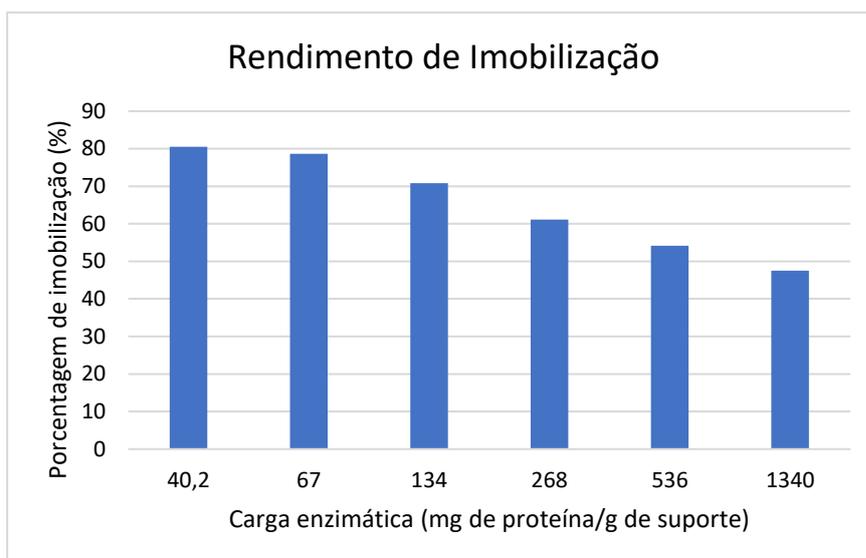


Figura 25. Rendimento de imobilização para diferentes cargas enzimáticas.

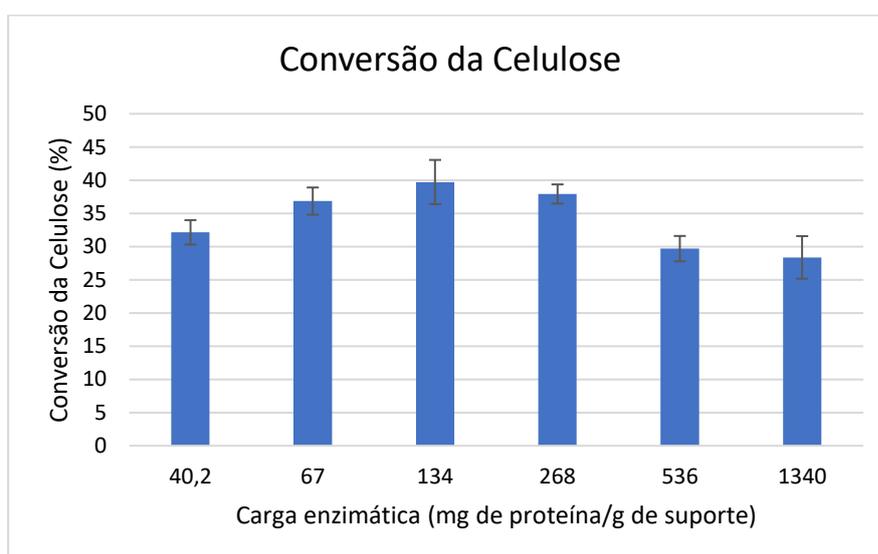


Figura 26. Desempenho dos imobilizados na conversão da celulose presente na biomassa pré-tratada.

Nota-se que apesar de atingir o máximo rendimento de imobilização quando 40,2 mg de proteína/g de suporte (80%) foi utilizado, o máximo desempenho de hidrólise só foi atingido quando a carga de proteína foi aumentada para 134 mg de proteína/g de suporte. Quando cargas de proteínas muito baixas são oferecidas (<40 mg de proteína/g de suporte) o desempenho de hidrólise é prejudicado, provavelmente porque algumas das enzimas sofrem inativação, tornando o coquetel celulolítico desbalanceado. Por outro lado, o excesso pode levar a imobilização preferencial, prejudicando também a hidrólise de celulose. Para as condições estabelecidas nesse estudo a carga ótima para a imobilização de celulasas é de 134 mg de proteína/g de suporte.

4.8 Reuso do biocatalisador

Após ajuste dos principais parâmetros de imobilização, sendo os melhores então, pH 9 com tempo de imobilização de 30 minutos, em suporte com 0,5% de quitosana, 1% de glutaraldeído e 134 mg de proteína/g de suporte, o catalisador obtido foi avaliado quanto ao seu potencial de reuso. Além do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BCO2), foi utilizado como substrato para testes de reuso a avicel microfibrilada. Este último foi utilizado por atingir hidrólise quase completa, evitando o acúmulo de sólido ao longo dos ciclos de hidrólise, fenômeno observado quando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado é utilizado, devido à presença de quase 20 % de lignina em sua composição, componente que não é hidrolisado e permanece insolúvel após a hidrólise de celulose e hemicelulose. O sólido remanescente da hidrólise não pode ser separado do catalisador (também sólido) por apresentarem características físicas similares, sendo difícil diferenciar as partículas. O acúmulo desse sólido ao longo dos ciclos de hidrólise dificulta a homogeneização do meio reacional e conseqüentemente interfere no desempenho do catalisador, mascarando sua estabilidade operacional e levando a baixas conversões de celulose.

Os resultados encontrados para a conversão da celulose ao longo dos ciclos de hidrólise estão representados na figura 27.

Nota-se que quando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foi utilizado somente 6 ciclos de hidrólise foram possíveis, sendo cada ciclo de 48 h de hidrólise totalizando 288 h de uso da enzima. Após esse intervalo de tempo, aproximadamente 75 % do desempenho inicial de hidrólise havia sido perdido (barras azuis). Quando avicel microfibrilada foi utilizada, 8 ciclos de hidrólise foram realizados, totalizando 384 h de uso da enzima. Nesse caso, houve uma perda de 60% do desempenho inicial de hidrólise até o sexto ciclo, e nos ciclos seguintes o desempenho de hidrólise se manteve (barras laranjas), indicando que há uma subpopulação de enzimas altamente estáveis que provavelmente permaneceriam estáveis por dezenas de ciclos.

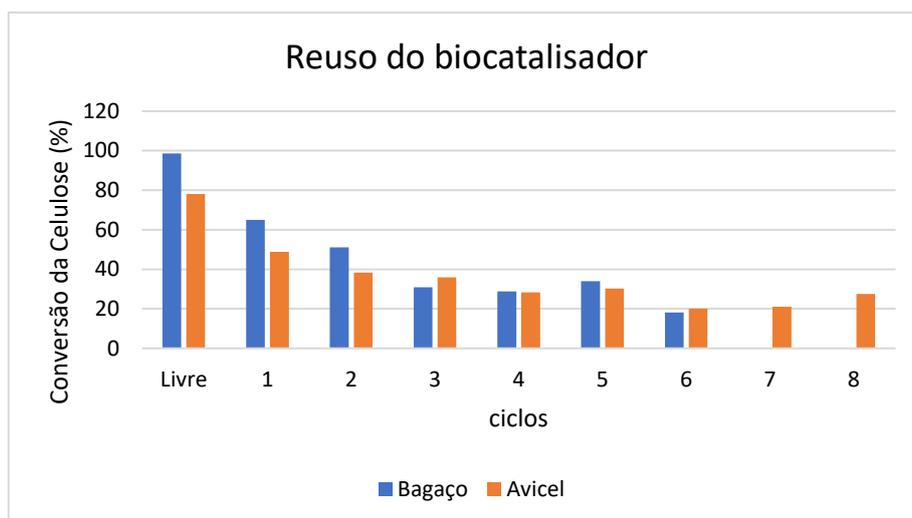


Figura 27. Desempenho do biocatalisador em reciclos da hidrólise.

Estudos da dessorção das enzimas do imobilizado foram realizados de um ciclo para o outro, de forma a observar a perda de enzima por dessorção/lixiviação do suporte. Como pode ser observado na figura 28, nos três primeiros ciclos de hidrólise, tanto para o bagaço pré-tratado quanto para a avicel microfibrilada, uma pequena quantidade de enzima foi encontrada no sobrenadante, fazendo com que o suporte que inicialmente (ciclo 0) estava com toda sua carga de enzima (100%), passasse a ter no terceiro ciclo 90% quando o substrato utilizado é o bagaço de cana pré-tratado e 83% quando se utiliza a avicel microfibrilada. Nos demais ciclos vemos que o rendimento de imobilização se manteve, indicando que a subpopulação de enzimas restantes é estável, como dito anteriormente.

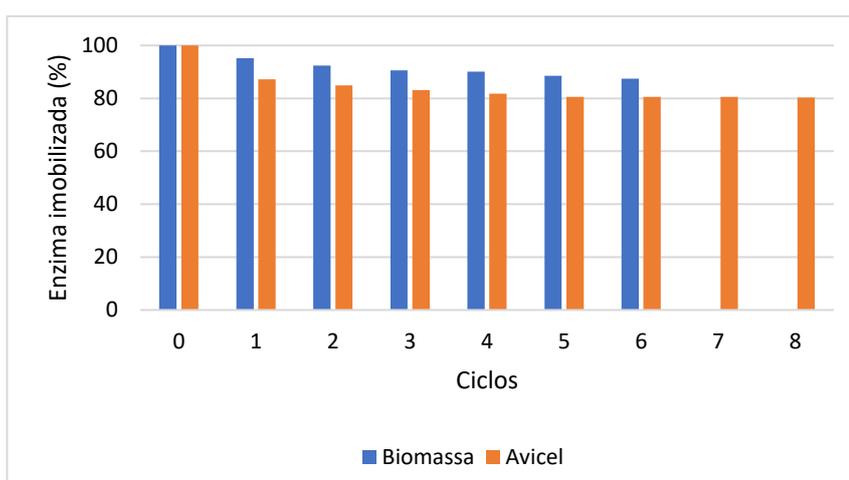


Figura 28. Rendimento de imobilização ao decorrer do reuso do biocatalisador.

Além do estudo da dessorção das enzimas, foi realizado ainda teste de hidrólise em avicel microfibrilada com o biocatalisador armazenado em tampão citrato de

sódio/ácido cítrico 0,1 M e pH 5, por 25 dias em geladeira. Notou-se que o armazenamento do imobilizado fez com que a pequena quantidade de enzimas que não estavam ligadas irreversivelmente ao suporte se desprendesse desse, mas quando estabelecemos uma relação entre a massa do catalisador e a conversão de celulose encontrada, vemos que as enzimas que se mantiveram ligadas covalentemente ao suporte não perderam a atividade, uma vez que na hidrólise com biocatalisador antes do armazenamento (figura 27) utilizou-se uma massa de imobilizado de 3,32 g e no primeiro ciclo de hidrólise encontrou-se aproximadamente 50% de conversão, se mantivermos a proporção usando 1 g de imobilizado o esperado seria de 15% e o valor encontrado quando utilizado o imobilizado armazenado foi bem próximo disso sendo 13,67%. No segundo ciclo de hidrólise, observou uma conversão de 11,56% o que é um valor bem próximo do primeiro, mostrando que realmente as enzimas se encontram estáveis e imobilizadas.

Foram incluídos ainda os controles com: branco do imobilizado e hidrólise com a enzima em sua forma livre, com a mesma carga presente nos imobilizados. Com o intuito de analisar se a quitosana poderia estar interferindo na leitura dos valores de glicose, realizou-se uma hidrólise contendo apenas tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5 e massa do imobilizado catalítico, sem a presença do substrato, que ao final de 48 horas apresentou 0,0 g/L de glicose, provando assim que a glicose encontrada ao final de cada ciclo é realmente proveniente da degradação da celulose presente no substrato.

Com a enzima em forma solúvel, vemos que o desempenho da hidrólise é muito melhor (coluna “livre” na figura 27), visto que nessa condição a transferência de massa e os efeitos difusionais já não são um problema, obtendo uma conversão praticamente total do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e 80% de conversão de avicel microfibrilada. Avicel por se tratar de uma celulose microcristalina apresenta maior resistência a degradação do que a celulose presente do bagaço, que já teve suas fibras abertas pelo pré-tratamento, por isso apresenta uma menor conversão mesmo estando microfibrilada.

Com a intenção de verificar se as enzimas livres adsorvem ao substrato e mascaram a atuação das enzimas imobilizadas, sendo essas então que degradam a celulose e não a imobilizada, o reuso da enzima em sua forma livre foi realizado. Ao final da hidrólise da avicel microfibrilada, o meio reacional foi centrifugado e retornou ao reator, como metodologia descrita em 3.2.9, a conversão teve uma queda drástica quando comparado como primeiro ciclo (80%) apresentando apenas 10% de conversão. O que

nos leva a entender que uma pequena quantidade de enzima não é totalmente retirada do meio reacional com a centrifugação se mantendo para a próxima hidrólise, mas que essas não estão adsorvidas visto a queda drástica na conversão, diferente do imobilizado catalítico que se mantém estável a partir de alguns ciclos de hidrólise.

Os resultados alcançados nesse estudo são relevantes, considerando o número de longos ciclos de hidrólise em que celulasas imobilizadas puderam ser reutilizadas quando um substrato sólido foi utilizado. Dados anteriormente descritos na literatura científica indicam que celulasas imobilizadas podem liberar até 38,8 g/L de açúcares redutores quando biomassa lignocelulósica pré-tratada é utilizada como substrato (Saha et al., 2018), e que estas podem ser reutilizadas em até 5 ciclos mantendo 50% do seu desempenho de hidrólise inicial de palha explodida a vapor (Zhang et al., 2010). Liang, et al., 2012 e Wang et al., 2013 também realizaram 5 ciclos mantendo o desempenho em 83,1% e 52% em relação a hidrólise inicial de palha de milho e fios de algodão banqueados, respectivamente, enquanto Jiang et al., 2017 imobilizou celulase em magnetita alginato de carboximetilquitosano / alginato de cálcio - bioconjugado de celulase (MCCCB) foi reutilizada 10 vezes em ciclos de 24 h, na hidrólise de caules de milho.

4.9 Novo estudo da imobilização sequencial de β -glicosidase e celulasas.

Por mais que o método de imobilização dos agregados de β -glicosidase foi o que apresentou o pior resultado quando comparado com os demais, observou-se um potencial nesse tipo de imobilizado, que consiste em imobilizar as β -glicosidase, as quais atuam sobre fragmentos solúveis da celulose, e, em seguida, imobilizar endo e exoglicanases, as quais atuam sobre a fibra de celulose ainda insolúvel. A imobilização dessas últimas é essencial para maior acessibilidade ao substrato insolúvel e conseqüentemente maior eficiência de hidrólise da celulose quando as enzimas estão imobilizadas.

Tendo isso em vista, estudou-se um novo método para a imobilização em agregados. Dessa forma, Cellic Ctec 3 foi posta em contato com avicel microfibrilada durante 1 hora a 35°C, para que as enzimas endo e exoglicosidases se “ligassem” ao substrato para começar a degradação deste. Como as β -glicosidase atuam sobre substrato líquido, proveniente da ação das endo e exo, estas estariam presente somente no sobrenadante da reação. Ao separar o sobrenadante dessa reação, as enzimas que não adsorvem na celulose (principalmente β -glicosidase) seriam separadas e poderiam ser usadas para formar um núcleo que serviria como suporte para as enzimas que ficam

adsorvidas na celulose. Para a formação dos núcleos de β -glicosidase, isopropanol foi adicionado ao sobrenadante, para precipitação e em seguida foram entrecruzados com glutaraldeído. Os núcleos formados foram então colocados em contato novamente com a avicel, a qual continha endo e exo adsorvidas, na presença de tampão borato 0,1M pH 9, para que assim as enzimas que estavam ligadas ao substrato se liguem aos núcleos.

Este imobilizado foi testado então na hidrólise de avicel microfibrilada, como descrito na seção 3.2.9 no estudo de estratégias de imobilização. Além disso estudos de rendimento de imobilização foram realizados.

Os estudos de quantificação de proteína mostram que apenas 28% das enzimas que estavam no sobrenadante precipitaram e entrecruzaram com a adição de isopropanol e glutaraldeído. O primeiro ciclo de hidrólise apresentou uma conversão de 43%, resultado próximo do que se encontrou para o imobilizado em quitosana (barras laranja, figura 26), entretanto, ao se analisar o teor de proteína no meio reacional, observou-se que 30% das enzimas estavam solúveis. Devido a tal fato, a conversão para o segundo ciclo foi menor, sendo apenas 20%, o qual é um valor próximo do encontrado nos ciclos finais do imobilizado em quitosana (barras laranja, figura 26), quando esse já se encontrava com uma subpopulação estável de enzimas, o que também ocorre aqui, visto que na análise de proteína do meio reacional não se encontrou nenhum teor, o que mostra que as enzimas que restaram realmente estão imobilizadas.

Com esses resultados, vemos que esta estratégia de imobilização realmente se mostra um potencial, porém estudos mais aprofundados dos seus parâmetros de imobilização devem ser realizados.

5 CONCLUSÃO E SUGESTÃO

5.1 Conclusão

Em geral, a celulase imobilizada por entrecruzamento e quitosana ativada com glutaraldeído mostram vantagens significantes quando comparadas à enzima em sua forma livre. Por mais que o método de imobilização por entrecruzamento apresente a vantagem de não ter uma massa de suporte adicional ao reator e ter apresentado uma maior conversão, o imobilizado em quitosana utilizou oito vezes menos enzima e apresentou uma conversão apenas 17% menor.

Deste modo, pelos resultados apresentados, por se tratar de um suporte de fácil obtenção e o processo de imobilização ser simples, o derivado de imobilizado em quitosana ativada com glutaraldeído, torna-se promissor na aplicação e desenvolvimento de processos industriais envolvendo hidrólise de materiais celulolíticos e por esse motivo teve a continuidade dos estudos visando os ajustes dos parâmetros, obtendo um biocatalisador imobilizado otimizado, com seu desempenho e reuso testado na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e em avicel microfibrilada.

Em suas melhores condições de imobilização, sendo pH 9 com tempo de imobilização de 30 minutos, em um suporte com 0,5% de quitosana e uma carga enzimática de 134 mg de proteína/g de suporte, o biocatalisador foi capaz de realizar seis ciclos de hidrólise de 48 horas em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e oito ciclos em avicel microfibrilada, mas com potencial estabilidade para dezenas de ciclos como pôde ser observado durante o estudo.

Apesar das dificuldades, inicialmente, encontradas na formação dos agregados de β -glicosidase e sua baixa conversão da biomassa empregada, o derivado imobilizado é uma inovação nessa área de estudos, devido a isso, mudanças em sua estratégia de imobilização foram propostas e resultados mais promissores foram encontrados, porém mais estudos devem ser realizados.

Portanto, além de se dar início ao estudo de uma nova estratégia de imobilização, ao longo do trabalho vemos melhoras nos parâmetros de imobilização para celulasas, mostrando uma evolução no estudo de imobilização utilizando suporte e ativação de baixo custo, obtendo resultados significantes quando comparados a outros métodos de imobilização e suportes mais dispendiosos.

5.2 Sugestões

Como continuidade deste trabalho, pode-se sugerir:

- Otimização do protocolo de imobilização dos agregados de β -glicosidase utilizado neste trabalho:
 - Realizar estudos com outras celulasas;
 - Estudar a adsorção das endo e exoglicanases no substrato sólido;
 - Estudo de novos substratos para formação dos agregados;
 - Avaliar quais as consequências do tempo de formação para o tamanho e atividade dos agregados;

- Aumento da carga/atividade enzimática imobilizada;
 - Avaliar o desempenho dos derivados imobilizados em reações de bateladas consecutivas (reuso).
- Desenvolver derivados de hemicelulases e ligninases e usá-los juntamente com os de celulasas, de modo a ter maior conversão (liquefação) da biomassa;
 - Otimização da reação de hidrólise, ajustando parâmetros como a porcentagem de sólidos, relação enzima-substrato, agitação e configuração do reator.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO, W.S.; FILHO, E.H.C.; SILVA, J.A.; GONÇALVES, L.R.B. **Stabilization of penicillin g acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan.** Brazilian Journal of Chemical Engineering v.22, p.529-538, 2005.
- AEHLE, W. **Enzymes in Industry: Production and Applications.** 3rd Edition. 2007.
- AGUIAR, C. M. D. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidos pelo fungo *Aspergillus niger*.** (Dissertação de Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** Bioresource Technology, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- ANDERSEN, N. **Enzymatic Hydrolysis of Cellulose – Experimental and Modeling Studies.** Tese de doutorado. Technical University of Denmark, 2007.
- ARAÚJO, G. J. F., NAVARRO, L. F. S., SANTOS, B. A. S., **O etanol de segunda geração e sua importância estratégica ante o cenário energético internacional contemporâneo.** IX Fórum Ambiental da Alta Paulista, v.9, n. 5, 2013.
- BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A.; SILVA, V.L.; COLODETTE, J.L. **Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI - CG/EM).** Quím. Nova vol.31 no.8 São Paulo, 2008.
- BARBOSA, O., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, Á., TORRES, R., RODRIGUES, R.C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization.** RSC Adv. 4, 1583–1600. 2014.
- BICKERSTAFF, G. **Immobilization of Enzymes and Cells – Some Practical Considerations, Methods in Biotechnology** 1995, pp.1-9
- BOWES, B.G., MAUSETH, J.D. **Plant Structure – a Color Guide.** Jones and Bartlett Publishers, 2ª edição, 2008.
- BUDRIENE, S., GOROCHOVCEVA, N., ROMASKEVIC, T., YUGOVA, VL., MIEZELIENE, DIENYS, G.; ZUBRIENE, A. **β -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization.** Central European Journal of Chemistry, v.3, n.1, p.95-105. 2005.
- CETINUS, S.A e ÖZTOP, H.N. **Immobilization of Catalase on Chitosan Film.** Enzyme and Microbial Technology, v.26, p.497-501, 2000.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>.
- DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; DE MOARES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. **Imobilização de enzimas e sua estabilização** In: (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6, p.123-150.

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

DUARTE, L.S., **Imobilização de β -galactosidase de *Bacillus circulans* em macroesferas de quitosana para a produção de lactosacarose.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2016.

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

EL-GHAFFAR.M.A.A., M.S. HASHEM. **Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization.** Carbohydrate Polymers 81 (2010) 507–516.

FANG, Y.F., HUANG, X.J., CHEN, P.C., XU, Z.K. **Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors.** BMB Rep. 44, 87–95. 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization., **Forests and Energy on Developing Countries.** Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/k1140e/k1140e00.pdf>.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, 610 f. 1989.

GAMA, F M. AIRES-BARROS, M.R. CABRAL, J.M.S. **ENGENHARIA ENZIMÁTICA.** Lisboa, Portugal, Lidel, 2003.

GARCIA, D. R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior.** 107f (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química SP. 2009.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, Nov 2011.

GARZÓN FUENTES, L. L. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio.** Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2009.

GHOSE, T.K. **Measurement of Cellulase Activities.** *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.

GONÇALVES FILHO, C. L. **Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: Avaliação de diferentes processos de despolimerização.** 96f. (Dissertação de Mestrado). Universidade da Região de Joinville, SC. 2011.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. **Validação de Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana-de-Açúcar.** *Química Nova*, v. 32(6). São Paulo, 2009.

GU, L.; MAO, X.; GUO, G.; HUANG, J.; DU, Z.; HUANG, Z.; MA, L.; LI, P. **A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization.** Journal Chem Technol Biotechnol (in press). 2005.

GUISÁN, J. M. **Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes.** Enzyme and Microbial Technology, v. 10, p. 375-382, 1988.

HAN, J., LUO, P., WANG, Y., WANG, L., LI, C., ZHANG, W., DONG, J., NI, L. **The development of nanobiocatalysis via the immobilization of cellulase on composite magnetic nanomaterial for enhanced loading capacity and catalytic activity.** Int. J. Biol. Macromol. 119, 692–700, 2018.

IPEA. **Petróleo: da crise aos carros flex.** 2010. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=2321:catid=28&Itemid=23>.

IPEA. **Petróleo: da crise aos carros flex.** 2010. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=2321:catid=28&Itemid=23>.

IUBMB- International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. 2017.

JIANG, J., ZHAO, J., HE, C., CUI, B., XIONG, J., JIANG, H., AO, J., XIANG, G. **Recyclable magnetic carboxymethyl chitosan/calcium alginate – cellulase bioconjugates for corn stalk hydrolysis.** Carbohydr. Polym. 166, 358–364. 2017.

KOSTYLEV, M., WILSON, D. **Synergistic interactions in cellulose hydrolysis.** Biofuels 3, 61–70. 2012.

LAUFENBERG, G., **Transformation of vegetable waste into added products: The upgrading concept practical implementations.** Bioresource Technology, v.87, p.167-198, 2003.

LEE, L.Y. **Oxidation of sugarcane bagasse using a combination of hypochlorite and peroxide.** 74f. (Master of Science). Louisiana State University, Agricultural and Mechanical College. Department of Food Science. B.Sc, 2005.

LIANG, W., CAO, X. **Preparation of a pH-sensitive polyacrylate amphiphilic copolymer and its application in cellulase immobilization.** Bioresour. Technol. 116, 140–146. 2012.

LIMA, J.S. **Imobilização de Celulase em Nanopartículas Magnéticas Encapsuladas em Poli (metacrilato de metila) –** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2016.

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

LINHARES e F. GEWANDSZNAJDER (2ª ed.), **Biologia hoje: Biologia - 1º ano do Ensino Médio.** São Paulo, Editora Ática, p.52-61, 2013.

LUX RESEARCH. Raizen Has Lowest Price as Cellulosic Ethanol Hinges on Feedstock Cost, 24 de fevereiro de 2016. Disponível em: [http:// www.luxresearchinc.com/news-and-events/press-releases/read/raizen-has-lowest-pricecellulosic-ethanol-hinges-feedstock-cost](http://www.luxresearchinc.com/news-and-events/press-releases/read/raizen-has-lowest-pricecellulosic-ethanol-hinges-feedstock-cost)

MAEDA, R.N., SERPA, V.I., ROCHA, V.A.L., MESQUITA, R.A.A., ANNA, L.M.M.S., DE CASTRO, A.M.H., DRIEMEIER, C.E., PEREIRA, N., POLIKARPOV, I. **Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases**. Process Biochem. 46, 1196–1201. 2011.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação de teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 95 p. Dissertação (mestrado em química) – universidade de são Paulo, são carlos, 2009.

MARTINO, A.; PIFFERI, P. G.; SPAGNA, G. **Immobilization of B-glucosidase from a comercial prepatation**. Part 2. Optimization of the immobilization process on chitosan. Process Biochemistry, v.31, n.3, p.287-293. 1995.

MARTINS, F. L. **Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum***. 139f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Instituto de Química, Curitiba. 2005.

MARTINS, R. E. **Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana**. São Carlos. UFSCar, 2007.

MATEO, C., PALOMO, J.M, FERNADEZ-LORENTE, G., GUISAN, J.M., FERNADEZ-LAFUENTE, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques**. Enzyme Microb. Technol. 40, 1451-1463, 2007.

MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. **Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest**. Quimica Nova, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDES, A.A., DE OLIVEIRA, P.C., DE CASTRO, H.F., GIORDANO, R.D.L.C. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial**. Quim. Nova 34, 831–840. 2011.

MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M. J., WALDRON, K. C. **Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking**. BioTechniques 37:790-802 (November 2004)

MME – Ministério de Minas e Energia. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-combustiveis-renovaveis/programas/renovabio/principal>. 2017.

MOREIRA, Tatiana Martinez; SEO, Emília Satoshi Miyamaru. **Obtenção e caracterização de polímero reforçado com fibras da folha de milho**. Revista Matéria, São Paulo, v. 21, n. 4, p.1054-1068, 2016.

NASCIMENTO, R.A.A. **Caracterização da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação dos compostos de degradação e reações**

envolvidas. 130 p. Tese (doutorado em conversão de biomassa). Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

OGEDA, T.L. **Hidrólise enzimática de celuloses pré-tratadas**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. **Hidrólise Enzimática De Biomassa** - *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010

OLIVEIRA, S. C. dos C. **Otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio a alta concentração de sólidos para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 81f. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, SP. 2012.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p. 2008.

PEREIRA, R. M. **Obtenção, caracterização e utilização de hidrogel de quitosana e glicerol fosfato para imobilização de lipase de *Rhizopus oryzae***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas, 2015.

PERIYASAMY, K., LAISHRAM, S., MORTHA, G., AUROUSSEAU, M., SUBRAMANIAN, S. **Carrier-free co-immobilization of xylanase, cellulase and β -1,3-glucanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs) for one-pot saccharification of sugarcane bagasse**. RSC Adv., 2016

POON, L., WILSON, L.D., HEADLEY, J. V. **Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties**. Carbohydr. Polym. 109, 92–101. 2014.

QI, B., LUO, J., WAN, Y. **Immobilization of cellulase on a core-shell structured metal-organic framework composites: Better inhibitors tolerance and easier recycling**. Bioresour. Technol. 268, 577–582. 2018.

RABELO, S. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 180f. (Dissertação de Mestrado) São Paulo: Escola Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP. 2007.

RAJAN, M. (2004). Global market for industrial enzymes to reach \$2.4 million by 2009 Business Communications Company, Inc. RC-147U Enzymes for Industrial Applications. <http://www.bccresearch.com/editors/RC-147U.html>.

RAMOS, L. P. **The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials**. Química Nova, v. 26, p. 863-871, 2003.

RFA. Renewable Fuel Association. **World fuel ethanol production – 2015** Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099788442-e48b2782-ea53>>

ROCHA, G.J.M., GONÇALVES, A.R., OLIVEIRA, B.R., OLIVARES, E.G., ROSSELL, C.E.V. **Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production**. Ind. Crops Prod. 35, 274–279. 2012.

RODRIGUES, R.S.B. **Produção e caracterização de um biocatalisador heterogêneo para ser utilizado em aplicações industriais.** Dissertação de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SAHA, K., VERMA, P., SIKDER, J., CHAKRABORTY, S., CURCIO, S. **Synthesis of chitosan-cellulase nanohybrid and immobilization on alginate beads for hydrolysis of ionic liquid pretreated sugarcane bagasse.** *Renew. Energy* 133, 66–76. 2019.

SÁNCHEZ-RAMÍREZ, J., J.L. MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, P. SEGURACENICEROS, G. LÓPEZ, H. SAADE, M.A. MEDINA-MORALES, R. RAMOS-GONZÁLEZ, C.N. AGUILAR, A. ILYINA. **Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for *Agave Atrovirens* lignocellulosic biomass hydrolysis.** *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40 (2017) 9–22.

SANTOS, A.F., **Produção e imobilização de celulasas em matriz de agarose com diferentes ativações químicas.** Dissertação de doutorado. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2014.

SANTOS, F. R. F. dos M. **Elaboração do technology roadmap para biorrefinaria de produtos da lignina no Brasil.** 309f. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.

SATO, K., TOMITA, M., YONEMURA, S., GOTO, S., SEKINE, K., OKUMA, E., TAKAGI, Y., HON-NAMI, K., SAIKIT, T. **Characterization of and ethanol hyperproduction by *Clostridium thermocellum* i-1-b.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 2116–2121. 1993.

SCHEUFELE, B. F. **Bioconversão de resíduos agroindustriais por microorganismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas.** 119f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo. PR, 2012.

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

SHENG JING *et al.* **Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes.** *Journal of membrane science.* v. 155. p. 101-106. 1998.

SIRISHA, V.L; ANKITA JAIN; AMITA JAIN. **Enzyme Immobilization: Na Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes.** *Advances in Food and Nutrition Research.* 2016.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** Editora Arned, 4ª edição, 2010.

União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA). Disponível em: <http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/etanol/>. 2017.

WANG, Q. **Immobilization of cellulases on the reversibly soluble polymer Eudragit S-100 for cotton treatment** 100, 194–200. 2013.

WYMAN, C.E. **Biomass ethanol: Technical progress, opportunities and comercial challenges.** *Annual Review of Energy and the Environment*, 24, 189, 1999.

WYMAN, C.E; DALE, B.E; ELANDER, R.T; HOLTZAPPLE, M; LADISCH, M.R; LEE, Y.Y. **Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies.** Bioresource Technology, Essex, v.96, p. 1959-1966, 2005.

XIA. L., SHEN. X. **Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07.** Process Biochemistry. V. 39.p. 1363-1367, (2004).

XIANG, X., SUO, H., XU, C., HU, Y. **Covalent immobilization of lipase onto chitosan-mesoporous silica hybrid nanomaterials by carboxyl functionalized ionic liquids as the coupling agent,** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, ADRIAN. **Microplate-Based Filter Paper Assay to Measure Total Cellulase Activity.** Biotechnology and Bioengineering, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.

XIMENES, E.A., FELIX, C.R. **O sistema celulolítico de microrganismos anaeróbios: uma mini-revisão sobre o celulossoma.** Univ. Ciências da Saúde 1, 335–341. 2003.

ZANG L., J. QIU, X. WU, W. ZHANG, E. SAKAI, Y. WEI. **Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles as Support for Cellulase Immobilization.** Ind. Eng. Chem. Res. 53(2014) 3448–3454. 2014.

ZHANG, Y.U., XU, J., LI, D., YUAN, Z. **Preparation and properties of an immobilized cellulase on the reversibly soluble matrix Eudragit L-100** 28, 313–319. 2010.