



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Estudo de celulases imobilizadas em suportes a base de quitosana/alginato
aplicadas na hidrólise de diferentes resíduos agroindustriais.**

Jorge Luis Santos Fileti

ALEGRE, ES

2023

Jorge Luis Santos Fileti

**Estudo de celulases imobilizadas em suportes a base de quitosana/alginato
aplicadas na hidrólise de diferentes resíduos agroindustriais**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química

Linha de Pesquisa: Materiais, Bioprocessos e Meio Ambiente

Orientador: Profº. Drª Iara Rebouças Pinheiro

ALEGRE, ES

Junho de 2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

F481e Fileti, Jorge Luis Santos, 1988-
Estudo de celulasas imobilizadas em suportes a base de
quitosana/alginato aplicadas na hidrólise de diferentes resíduos
agroindustriais. / Jorge Luis Santos Fileti. - 2023.
98 f. : il.

Orientadora: Iara Rebouças Pinheiro.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias.

1. Engenharia Química. 2. Enzimas. 3. Resíduos
Lignocelulósicos. 4. Imobilização. 5. Quitosana. 6. Alginato. I.
Pinheiro, Iara Rebouças. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 66.0

Jorge Luis Santos Fileti

**Estudo de celulasas imobilizadas em suportes a base de quitosana/alginato
aplicadas na hidrólise de diferentes resíduos agroindustriais**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Examinado em 21 de junho de 2023.

Prof. Dr: Wellington Betencurte da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.^a Dr^a: Lilian Gasparelli Carreira
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.^a Dr^a: Laura Marina Pinotti
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Diego Cardoso Estumano
Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, por sempre me orientar com sabedoria, discernimento e força para poder superar os desafios diariamente. A minha esposa Daiana que tem sido o meu pilar nas orientações afim de cumprir os objetivos traçados no dia-a-dia e a meus filhos, é por eles que procuro ser melhor a cada dia e me superar frente aos desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof. Dr. Iara Rebouças Pinheiro por me proporcionar realizar esse projeto em conjunto, incentivo e confiança depositada.

À Faculdade de Venda Nova do Imigrante por fazer parte e me apoiar nesse projeto, com redução da carga horária de trabalho e ceder toda área física para o desenvolvimento da pesquisa.

À meus pais por me dar suporte nos afazeres do dia-a-dia para que eu conseguisse ter uma dedicação maior no projeto.

À todos os amigos que de uma forma ou outra que me ajudaram no andamento do mestrado seja com acomodações em sua residência, seja transportando materiais de Alegre - ES para Venda Nova do Imigrante – ES.

RESUMO

FILETI, Jorge. **Estudo de celulasas imobilizadas em suportes a base de quitosana/alginato aplicadas na hidrólise de diferentes resíduos agroindustriais**. 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientador: Iara Rebouças Pinheiro.

A procura por tecnologias que sejam viáveis para produção de energia de maior valor agregado tem movimentado o cenário mundial de inovação e tecnologia. Uma via é a produção de etanol através da hidrólise e posteriormente a fermentação alcoólica de materiais lignocelulósicos, o chamado etanol de segunda geração. A imobilização da celulase em suportes insolúveis na solução pode viabilizar essa rota de síntese de etanol, permitindo a reutilização da enzima, ponto chave no processo. Neste trabalho Celluclast 1.5L (Novozymes A/S) foram imobilizadas em géis de quitosana e quitosana-alginato ativados com glutaraldeído, sendo o método mais empregado. Foi avaliado rendimento de imobilização, atividade recuperada, estabilidade térmica, temperatura e pH ótimo de atividade enzimática. O biocatalisador que obteve o melhor desempenho foi a base de quitosana/alginato – 3,5% ativados com glutaraldeído. O suporte não sofreu nenhuma fragmentação ou ruptura em sua estrutura durante a hidrólise do papel de filtro. O biocatalisador teve sua atividade de 1,83 FPU/g de suporte, atividade recuperada de 8,26% e rendimento de imobilização de 87,72%. A temperatura ótima para os derivados foi cerca de 50°C, enquanto para enzima livre foi de 60°C. O pH deslocou-se de 4,0 (enzima livre) para 5 dos derivados. Os pontos ótimos de trabalho se mostram satisfatórios, são regiões brandas de trabalho. Para suportes de quitosana/alginato, a maior carga enzimática representou maior atividade retida no suporte, 68% superior à atividade retida em suportes de quitosana sob uma carga enzimática de 1280mg de proteína/g de suporte, com probabilidade de maior atividade com um fornecimento maior de enzimas. A hidrólise dos resíduos lignocelulósicos se mostrou mais eficiente nas enzimas imobilizadas em quitosana/alginato com carga de 1280mg de proteína/g de suporte, com desempenho de 2,1 vezes superior ao biocatalisador em quitosana.

Palavras-chave: celulasas; imobilização; quitosana; alginato.

ABSTRACT

FILETI, Jorge. **Study of cellulases immobilized on supports based on chitosan/alginate applied in the hydrolysis of different agro-industrial residues.** 2022. Qualification Exam. (Master degree in Chemical Engineering) – Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Adviser: Dr.(a) Iara Rebouças Pinheiro.

The pursuit of high-value energy production technologies has driven innovation and technology worldwide. One promising avenue is the production of ethanol from lignocellulosic materials, known as second-generation ethanol, through hydrolysis and subsequent alcoholic fermentation. Immobilizing cellulase on insoluble supports in the solution offers a viable approach, enabling enzyme reuse, a critical aspect of the process. In this study, CelluClast 1.5L (Novozymes A/S) was immobilized using chitosan and chitosan-alginate gels activated with glutaraldehyde, which proved to be the most widely adopted method. The research evaluated the immobilization yield, recovered activity, thermal stability, temperature, and optimal pH for enzymatic activity. Among the tested biocatalysts, the chitosan/alginate gel activated with glutaraldehyde demonstrated the best performance. The support material remained intact without fragmentation or structural damage during the hydrolysis of the filter paper. The biocatalyst exhibited an activity of 1.83 FPU/g of support, with a recovered activity of 8.26% and an immobilization yield of 87.72%. The optimal temperature for the derivatives was approximately 50°C, compared to 60°C for the free enzyme. The pH shifted from 4.0 (free enzyme) to 5.0 for the derivatives. For chitosan/alginate supports, a higher enzymatic load resulted in greater activity retained on the support, showing a 68% increase compared to chitosan supports. Specifically, under an enzymatic load of 1280mg of protein/g of support, the chitosan/alginate biocatalyst exhibited significantly enhanced performance. Notably, the hydrolysis of lignocellulosic residues proved to be 2.1 times more efficient using enzymes immobilized in chitosan/alginate with this higher protein load compared to the chitosan biocatalyst. In summary, this study provides a technical assessment of the immobilization process and its impact on enzymatic activity and the efficiency of ethanol production from lignocellulosic materials.

Keywords: cellulases; immobilization; 2G ethanol, waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção brasileira de etanol.

Figura 2: Exportações e importações brasileiras de etanol

Figura 3: Esquema de uma biorrefinaria utilizando materiais lignocelulósicos

Figura 4: Arquitetura da parede celular vegetal

Figura 5: Fórmula estrutural da celulose mostrando as ligações glicosídicas β (1-4)

Figura 6: Representação das ligações de hidrogênio, intercadeias e intracadeias

Figura 7: Monômeros de hemicelulose

Figura 8: Unidades de fenilpropano precursoras da lignina

Figura 9: Outros fenilpropanóides precursores da lignina

Figura 10: Principais vantagens dos biocatalisadores na química verde

Figura 11: Influência da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzimas

Figura 12: Influência do pH na atividade enzimática

Figura 13: Influência da temperatura na atividade enzimática

Figura 14: Ação sinérgica do complexo enzimático celulolítico

Figura 15: Métodos de imobilização enzimática

Figura 16: Métodos físicos de imobilização enzimática

Figura 17: Métodos químicos de imobilização enzimática

Figura 18: Desacetilação alcalina da quitina

Figura 19: Estruturas químicas das unidades méricas do alginato distribuídas em diferentes sequências de monômeros

Figura 20: Estrutura dos hidrogéis de quitosana

Figura 21: Aparato utilizado para preparação das partículas

Figura 22: Partículas de quitosana e quitosana/alginato em diferentes concentrações

Figura 23: Aparato utilizado para ativação das partículas com glutaraldeído

Figura 24: Partículas de quitosana e quitosana/alginato ativadas com glutaraldeído

Figura 25: Suportes de quitosana em diferentes concentrações com enzimas imobilizadas

Figura 26: Suportes de quitosana/alginato em diferentes concentrações com enzimas imobilizadas

Figura 27: Influência do pH na atividade enzimática da: solução enzimática, enzimas imobilizadas em quitosana - 3,5%, enzimas imobilizadas em quitosana/alginato - 3,5%

Figura 28: Influência da temperatura na atividade enzimática da solução enzimática, enzimas imobilizadas em quitosana - 3,5%, enzimas imobilizadas em quitosana/alginato - 3,5%

Figura 29: Influência da temperatura na estabilidade térmica da solução enzimática, enzimas imobilizadas em quitosana - 3,5%, enzimas imobilizadas em quitosana/alginato - 3,5%

Figura 30: Rendimento de imobilização com variação da carga enzimática oferecida a diferentes composições do suporte

Figura 31: Atividade enzimática dos biocatalisadores quitosana e quitosana/alginato após o fornecimento de diferentes cargas enzimáticas na imobilização

Figura 32: Concentração de açúcares liberados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por enzimas solúveis e imobilizadas

Figura 33: Concentração de açúcares liberados na hidrólise da casca de café por enzimas solúveis e imobilizadas

Figura 34: Desempenho do biocatalisador em reciclo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição mássica de alguns materiais lignocelulósicos

Tabela 2: Vantagens e desvantagens da imobilização enzimática

Tabela 3: Teor de componentes do bagaço da cana-de-açúcar e casca de café

Tabela 4: Características do complexo enzimático Celluclast 1.5 L

Tabela 5: Parâmetros de imobilização dos diferentes suportes de quitosana sob as mesmas condições de imobilização.

Tabela 6: Parâmetros de imobilização dos diferentes suportes de quitosana/alginato sob as mesmas condições de imobilização.

Tabela 7: Estabilidade térmica a 65°C para as celulasas livres e imobilizadas ativados com glutaraldeído.

Tabela 8: Atividade enzimática dos biocatalisadores, frente as diferentes cargas enzimáticas na imobilização.

Tabela 9: Rendimento mássico de solubilização após as etapas de pré-tratamento dos resíduos.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	3
2.1. Objetivos específicos	3
3. Revisão de Literatura.....	3
3.1 Biocombustíveis	3
3.2 Bioprocessos: uso da biomassa para produção energética	5
3.3.1 Celulose	9
3.3.2 Hemicelulose	11
3.3.3 Lignina	12
3.4 Catalisadores Biológicos: Enzimas	13
3.4.1 pH	16
3.4.2 Temperatura	17
3.5 Enzimas Celulolíticas	17
3.6 Aplicações Biotecnológicas da Enzima Celulase	20
3.7 Imobilização de Enzimas.....	22
3.7.1 Métodos de imobilização enzimática	23
3.8 Parâmetros de imobilização	27
3.9 Suportes para imobilização de enzimas	27
3.10 Quitosana.....	29
3.11 Alginato de sódio.....	32
3.12 Princípios da formação de hidrogéis	34
3.13 Modificação química do suporte.....	36
4. Material e Métodos.....	39
4.1 Materiais.....	39
4.1.1 Enzimas	39
4.1.2 Suportes utilizados na imobilização enzimática	39
4.1.3 Reagentes e substratos	39
4.1.4 Equipamentos	40
4.2 Metodologia experimental	40
4.2.1 Preparo das partículas de quitosana e quitosana/alginato	40
4.2.2. Ativação dos suportes.....	41
4.2.3 Imobilização covalente das celulasas em matrizes de quitosana e quitosana/alginato.....	42

4.2.4 Atividade celulolítica	43
4.2.5 Determinação das propriedades cinéticas da celulase livre e imobilizada	44
4.2.6 Influência do pH	44
4.2.7 Influência da temperatura.....	44
4.2.8 Estabilidade térmica	45
4.3 Cálculo dos parâmetros de imobilização	46
4.3.1 Rendimento de imobilização	46
4.3.2 Atividade recuperada	46
4.3.3 Fator de estabilidade	47
4.4 Avaliação da interação enzima – suporte	47
4.5 Ajuste da carga enzimática.....	48
4.6 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando celulase livre e imobilizada.....	48
4.6.1 Preparo do material.....	48
4.6.2 Pré-tratamento do material.....	49
4.6.3 Ensaios de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos utilizando celulase livre e imobilizada	50
5. Resultados e Discussão	51
5.1 Caracterização do extrato enzimático (Celluclast)	51
5.2 Parâmetros de imobilização dos diferentes suportes de quitosana.	51
5.3 Parâmetros de imobilização dos diferentes suportes de quitosana/alginato.....	54
5.4 Influência do pH.....	55
5.5 Influência da temperatura	57
5.6 Estabilidade térmica.....	59
5.7 Testes de Dessorção Enzimática	60
5.8 Ajuste da carga enzimática.....	61
5.8 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos e reuso do biocatalisador	64
5.8.1 Tratamento ácido e alcalino dos resíduos lignocelulósicos.....	64
5.8.2 Hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos utilizando enzima livre e imobilizada	67
5.8.3 Reuso do biocatalisador em bateladas sequenciais.....	71
6. Conclusões e sugestões.....	73
6.1 Conclusões	73
6.2 Sugestões.....	74
7. Referências bibliográficas.....	75

1. Introdução

O desenvolvimento de processos que tragam ao mercado fontes alternativas de energia como bioetanol, biodiesel, entre outras, ganharam destaque e tornaram-se objeto de pesquisa no ramo da biotecnologia. Uma pesquisa que merece destaque é à aplicação de enzimas imobilizadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol de segunda geração, uma fonte alternativa, renovável ecologicamente sustentável e que pode reduzir os custos do processo.

Processos que visam a valorização de resíduos da agroindústria através da biotransformação em produtos de alto valor agregado como enzimas e bioetanol já vem sendo empregados e movimentando o mercado. A Raízen uma empresa de bioenergia selou um contrato de 10 anos com a petrolífera Shell para a produção de 3,3 bilhões de litros de etanol de segunda geração com início de produção entre 2025 e 2027 o contrato tem por finalidade o uso do etanol no mercado europeu, onde é mais valorizado (RIBAS, 2022). O alto custo do processo de hidrólise de resíduos lignocelulósicos inviabiliza a expansão do uso de enzimas para o mercado interno, assim como ainda existe demanda para estudos de reutilização das celulasas por processos em bateladas repetidas para baratear o processo.

Os materiais lignocelulósicos podem ser hidrolisados por enzimas, com melhor rendimento na produção e menor degradação de açúcares em comparação com processos químicos. Celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise (quebra na presença de água). Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a quebra da celulose (polímero) em unidades de glicose (monômero), sendo esta a que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO e JUNIOR, 2009). Aplicando celulasas em resíduos lignocelulósicos pré-tratados é possível converter a celulose em glicose para posterior processo fermentativo, no entanto a um custo de reposição enzimática que pode inviabilizar o processo. Frente a esse problema pesquisas vem sendo desenvolvidas na área da imobilização enzimática para aplicação em tais processos.

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso. Existem vários métodos de imobilização enzimática, no entanto não existe um método comum

a todas as enzimas, o ideal é escolher um que resulte em menos custo de operação e uma boa retenção de atividade. (MENDES *et al.*, 2011).

Alguns inúmeros trabalhos são encontrados na literatura que abordam a imobilização enzimática como rota alternativa e promissora frente as rotas tradicionais já existentes na indústria, como por exemplo a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos como bagaço da cana-de-açúcar e casca de café como será visto neste trabalho, mostrando que a imobilização contribui muito para novos estudos.

O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 11, 47 bilhões em 2021 e está projetado para expandir a uma taxa de crescimento anual composta de 6,5% de 2022 a 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Segundo a Mordor Intelligence (2021) os fatores que impulsionam o crescimento do mercado de enzimas industriais são as mais variadas possíveis como alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, detergentes, cosméticos e inovações de produtos e expansões como produção de biocombustíveis são esperadas para fornecer inúmeras oportunidades.

Diante do exposto, a busca por fontes alternativas de energia como os biocombustíveis obtidos pela hidrólise da biomassa, com adventos tecnológicos que barateiam a produção, o presente trabalho teve como objetivo confeccionar partículas utilizando quitosana e alginato em diferentes concentrações que serviram de meio suporte para enzimas celulasas. Os suportes foram ativados com glutaraldeído e posteriormente realizado a imobilização, em seguida foi realizada a hidrólise de papel de filtro para avaliar a atividade enzimática de enzimas celulasas livres e imobilizadas. Avaliado os parâmetros físico-químicos e os parâmetros de imobilização e posteriormente hidrólise de resíduos lignocelulósicos para testar o desempenho e reutilização em bateladas sequenciais, obtendo resultados que contribuem para desenvolvimento de rotas economicamente viáveis e tecnologicamente possíveis.

2. Objetivo

Estudar o processo de imobilização de celulasas em suportes a base de quitosana e quitosana-alginato, ativados com glutaraldeído, determinar as propriedades bioquímicas do biocatalisador para uma posterior aplicação na hidrólise de resíduos lignocelulósicos.

2.1. Objetivos específicos

- Produzir partículas de quitosana e quitosana-alginato ativados com glutaraldeído;
- Imobilizar celulasas nos suportes de quitosana e quitosana/alginato por meio de ligações covalente;
- Determinar a estabilidade térmica e propriedades cinéticas das enzimas livres e imobilizadas;
- Estudar a influência da carga enzimática na imobilização;
- Estudar a hidrólise de resíduos lignocelulósicos com celulasas imobilizadas;
- Realizar bateladas sequenciais para analisar o desempenho do biocatalisador.

3. Revisão de Literatura

3.1 Biocombustíveis

Os biocombustíveis são derivados da biomassa e podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia e são consideradas fontes de energia alternativa que apresentam baixo índice de emissão de poluentes (COELHO, 2021).

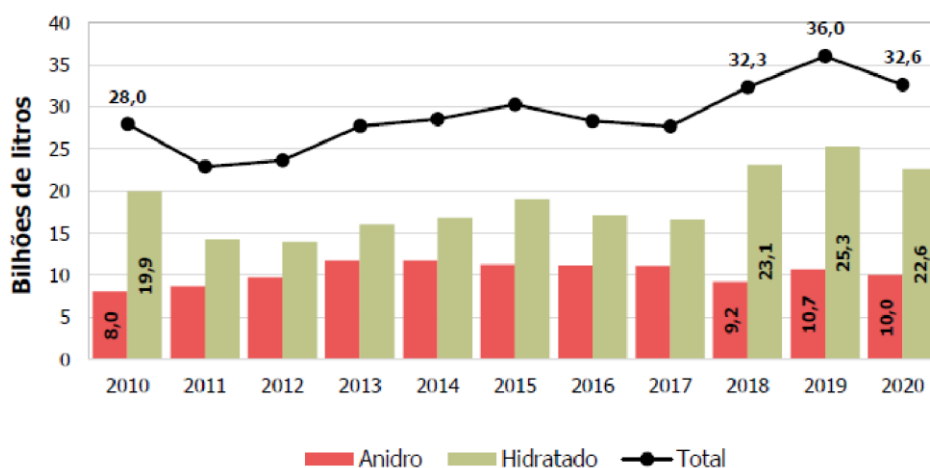
Os dois principais biocombustíveis produzidos no Brasil são o etanol obtido através da fermentação do caldo extraído da cana-de-açúcar e o biodiesel obtido através de

óleos vegetais e gorduras de origem animal, ambos biodegradáveis, provocando um menor impacto ambiental.

Os biocombustíveis acabam não colaborando com os gases do efeito estufa na atmosfera em especial o dióxido de carbono (CO_2), quando emitido na atmosfera devido à combustão, acabam sendo reabsorvidos na safra seguinte pelo processo de fotossíntese das plantas (safra responsável por gerar a biomassa que dará origem aos biocombustíveis) mantendo assim um equilíbrio entre geração e absorção de gases. Um outro ponto positivo é que biocombustíveis que contêm oxigênio em sua composição quando queimados ou adicionados aos combustíveis de origem fóssil ajudam a reduzir a emissão de monóxido de carbono (CO), representando uma menor poluição atmosférica (PETROBRAS, 2007).

O reflexo da pandemia de Covid 19 afetou o mercado de energia mundial, inclusive na produção e consumo global de biocombustíveis. Houve uma redução na produção mundial de etanol combustível de 8% entre 2019 a 2020, no entanto Brasil e Estados Unidos continuaram com alta participação, com 84% da produção e comercialização. Em 2020 no Brasil, devido a Covid 19 foram produzidos 32,6 bilhões de litros de etanol 9,4% a menos que o ano anterior, divididos em 22,6 bilhões de hidratado e 10,0 bilhões de anidro como mostrado na FIGURA 1 (EPE, 2021).

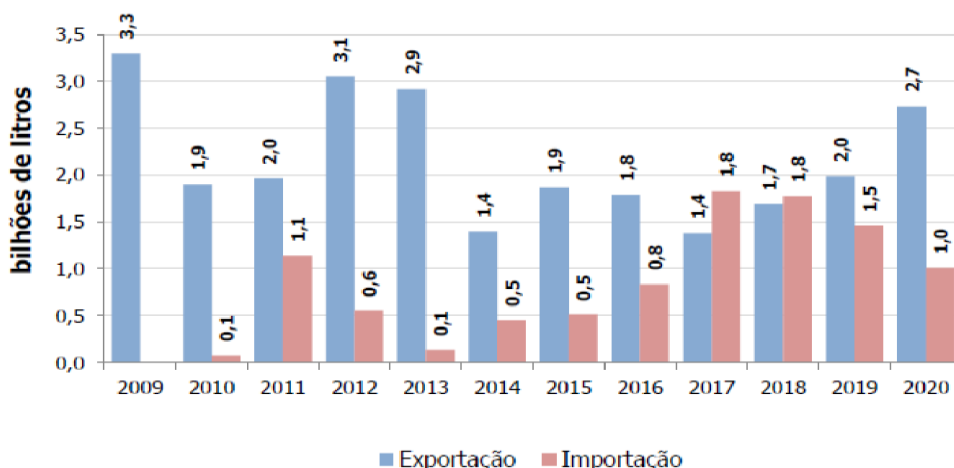
Figura 1: Produção brasileira de etanol. (Fonte: EPE, 2021)



Em 2020, como apresentado na FIGURA 2, o Brasil apresentou uma alta nos volumes exportados, atingindo 2,7 bilhões de litros, 0,7 bilhão superior a 2019, mesmo em

tempos de pandemia, o que mostra a capacidade de produção e de mercado do Brasil mesmo em situações adversas (EPE, 2021).

Figura 2: Exportações e importações brasileiras de etanol. (Fonte: EPE, 2021)



O etanol de primeira geração é o biocombustível mais utilizado no Brasil, contudo outros biocombustíveis vêm ganhando espaço como o etanol de segunda geração e o biometano. O etanol de segunda geração, também chamado de etanol celulósico ou de lignocelulose, é obtido a partir da quebra de cadeias de celulose presentes nas fibras dos vegetais e posterior fermentação (WWF, 2021). Uma grande vantagem quando comparado com o etanol de primeira é que o etanol de segunda geração pode utilizar uma gama muito maior de matéria prima, que muitas vezes é considerada material de descarte por não ter valor agregado ao meio ao qual foi produzida.

O Brasil apresenta vantagens competitivas em relação aos outros países também na produção de etanol de segunda geração, como o menor custo e a fácil disponibilidade de grandes quantidades de matéria-prima, como é o caso da do bagaço e a palha da cana-de-açúcar, resíduos do beneficiamento da laranja, café, soja, capim forrageiro utilizado como pastagem, árvores de crescimento rápido como o eucalipto e várias outras culturas disponíveis no território brasileiro, sendo todas passíveis de utilização como matéria prima na fermentação alcoólica (PACHECO, 2011).

3.2 Bioprocessos: uso da biomassa para produção energética

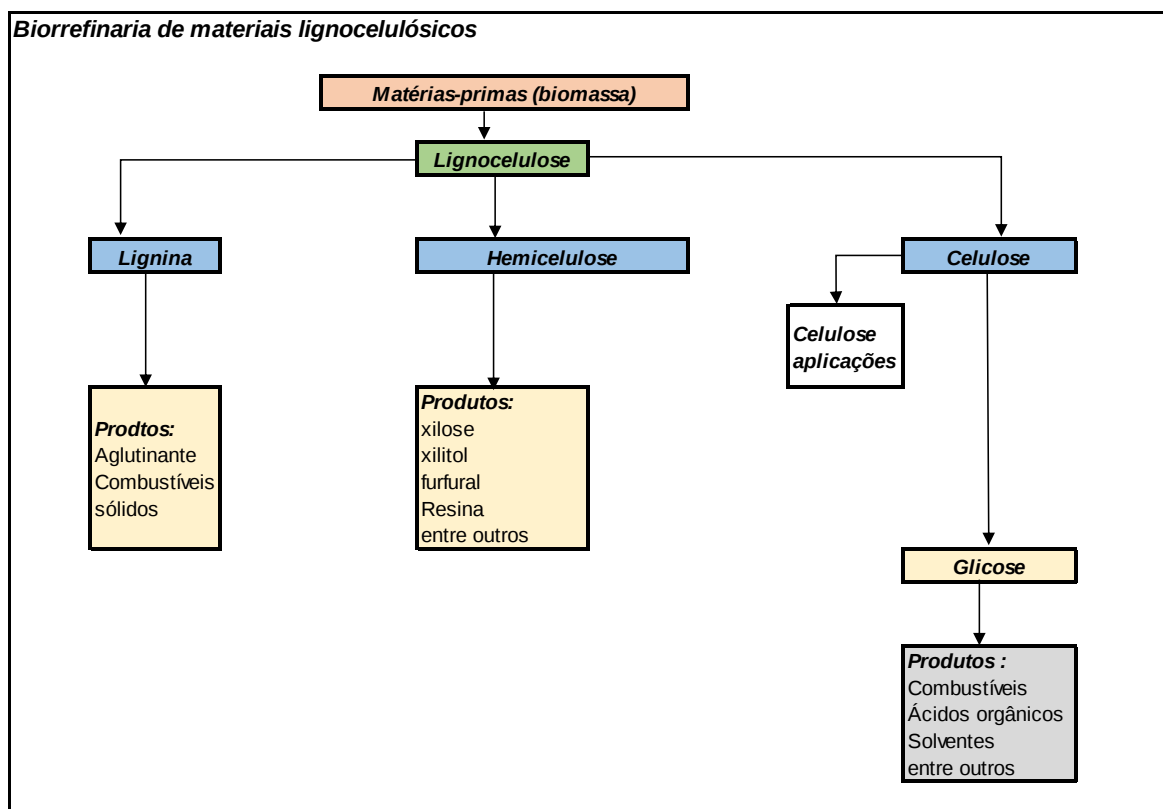
Bioprocessos compreendem um conjunto de operações que tratam a matéria-prima, com o preparo dos meios de propagação e produção, a esterilização caso necessário,

e a transformação do substrato em produto(s) por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação de produto(s) (COELHO *et al.*, 2018).

Ocorre muitas vezes uma confusão entre processos químicos e bioprocessos, quando conduzidos mediante ação de micro-organismos, células animais ou vegetais, ou ainda de substâncias produzidas por estes agentes são bioprocessos, como é o caso dos catalisadores enzimáticos, atuando em matérias-primas renováveis com rejeitos gerados de baixa toxicidade sendo facilmente tratados. Processos químicos por outro lado envolvem catalisadores químicos, do quais não são muito específicos e necessitam de condições operacionais mais severas de temperatura, pressão ou pH, utilizando as mais variadas matérias primas possíveis (COELHO *et al.*, 2018).

Nesse contexto, processos de conversão de biomassa em biocombustíveis ou até mesmo em insumos químicos para obtenção de materiais, alimentos, rações e energia, ocorrem nas chamadas biorrefinarias, sendo conceituada pela *American National Renewable Energy Laboratory* como indústrias que convertem a biomassa, e que a utilizam para produzir: combustíveis, energia ou produtos químicos como mostrado na Figura 3 (NREL, 2008 *apud* ALVIM *et al.*, 2015).

Figura 3: Esquema de uma biorrefinaria utilizando materiais lignocelulósicos (Fonte: Adaptado de ALVIM *et al.*, 2015)



Os materiais lignocelulósicos são os materiais orgânicos mais abundantes da biosfera, representando aproximadamente 60% da biomassa vegetal. A biomassa lignocelulósica é constituída por três frações fundamentais, celulose, hemicelulose e lignina. Celulose é a fração em massa mais abundante, em torno de 30 a 50%, rica em açúcares fermentescíveis, sendo um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas. A segunda fração mais abundante é a hemicelulose, em torno de 15 a 35%, apresenta composição heteropolissacarídica (xilose e arabinose), cujas proporções dependem da origem do material. Em menor quantidade encontra-se a lignina, em torno de 10 a 30% em massa, álcoois aromáticos polimerizados que unida à hemicelulose envolve a matriz celulósica (ALVIM *et al.*, 2015; MARTINS, 2007).

As fontes lignocelulósicas representam uma importante fonte de produtos químicos, combustíveis e energia de caráter renovável. A composição dos resíduos depende do tipo de matéria-prima, idade e estágio vegetativo conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Composição mássica de alguns materiais lignocelulósicos (Fonte: produção do próprio autor).

Biomassa Lignocelósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina	Referência
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32	Santos et al., 2012
Madeira dura	43-47	25-35	16-24	
Casca do café	24	19	13,68	Freitas, 2016
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10	Santos et al., 2012
Bagaço de laranja	31	21	17	Benevides, 2015

3.3 Biomassa: Resíduos lignocelulósicos

Denomina-se biomassa qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. As principais fontes de biomassa provêm dos resíduos agrícolas, como restos de madeira, resíduos de serralherias, plantas como a cana-de-

açúcar, palha de cereais, plantas forrageiras, resíduos sólidos oriundos do beneficiamento de frutas, entre outros. (SILVA, 2012).

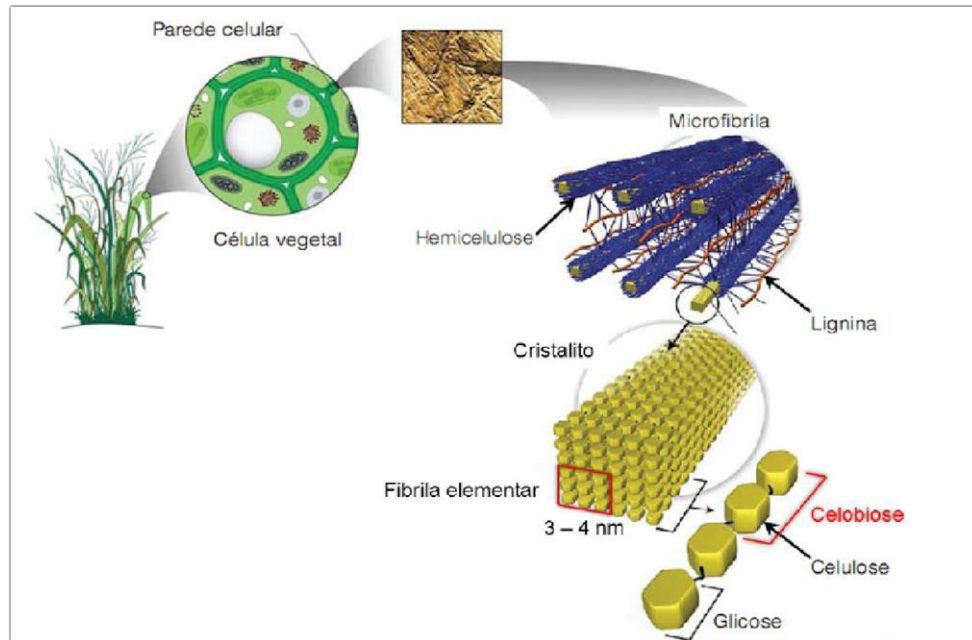
A cada ano se intensifica os problemas causados pelo aquecimento global no planeta, resultado do aumento de emissão de gases do que intensificam o efeito estufa proveniente da queima de combustíveis fósseis, e sem contar a dependência mundial pelos mesmos combustíveis fósseis em que, qualquer redução na disponibilidade atual de petróleo e seus derivados podem levar a uma crise mundial de combustíveis. Frente a isso a necessidade de se utilizar novas fontes de obtenção de combustíveis que não agridam ao meio ambiente e que não cause toda essa dependência (ALVIM et al., 2015).

A biomassa já é utilizada como fonte alternativa na matriz energética em substituição e até como complemento ao petróleo. Na matriz energética brasileira e mundial é praticamente toda utilizada na queima em caldeiras ou em processos químicos que utiliza a energia térmica.

A Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) uma entidade sindical patronal relata que o Brasil está entre os maiores países produtores e exportadores de alimentos e que no futuro será o maior fornecedor de alimento do mundo. O Brasil é hoje o maior exportador de açúcar, café, suco de laranja, soja em grãos, carnes bovina e de frango; o terceiro maior de milho. É também o maior produtor mundial de soja em grãos, café, suco de laranja e açúcar; e o terceiro na produção mundial de milho, uma verdadeira potência no agronegócio e uma imensa fonte de biomassa (CNA, 2021).

A biomassa lignocelulósica possui uma estrutura complexa bem considerável Figura 4, quando comparado a outros materiais, possuindo uma composição majoritária de celulose e hemicelulose, polissacarídeos que estão entrelaçados por uma macromolécula de lignina majoritariamente por meio de ligações de hidrogênio, formando uma estrutura cristalina resistente ao ataque de microorganismos ou enzimas (PEREIRA, 2019).

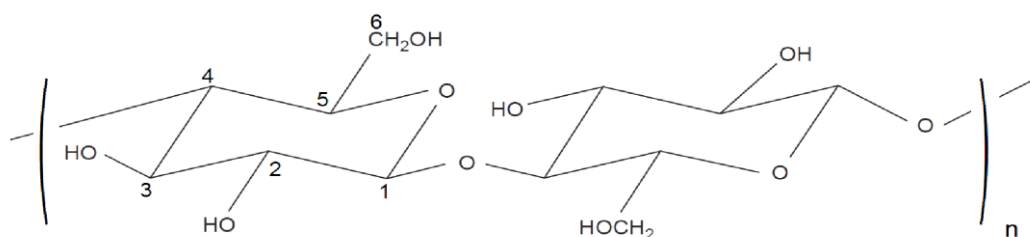
Figura 4: Arquitetura da parede celular vegetal (Câmara, 2012).



3.3.1 Celulose

A celulose é um polímero linear de alta massa molar com estrutura de cadeia uniforme. A unidade repetitiva deste polímero é denominada celobiose (β -D-glucopirranose), que consiste em duas moléculas adjacentes de glicose ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$ (SOUZA, 2015). Na Figura 5, é possível visualizar a fórmula estrutural de uma ligação glicosídica entre duas glicoses formando a celobiose.

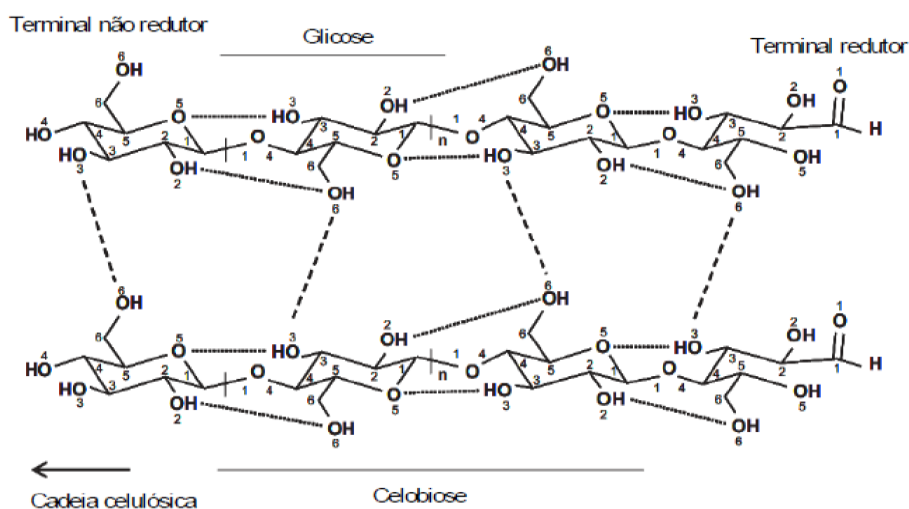
Figura 5: Fórmula estrutural da celulose, mostrando a ligação glicosídica $\beta(1 \rightarrow 4)$ (FONTE: SOUZA 2015).



As cadeias de celobiose são unidas por meio de ligações de hidrogênio como mostrado na Figura 6, que tem a função de dar suporte e proteção a célula vegetal, o que a torna, sob condições normais, extremamente insolúvel em água (PETRI e

OGEDA, 2010). As ligações de hidrogênio inter e intracadeias resultam na formação de um conjunto de agregados, denominados fibrilas elementares, que são estruturas altamente ordenadas, retas e compactas, com grande resistência à tensão, de forma que a resistência à degradação deriva em maior parte por sua estrutura cristalina e agregação da estrutura do que pela ligação $\beta(1-4)$ glicosídica propriamente dita. (CÂMARA, 2012).

Figura 6: Representação das ligações de hidrogênio inter e intracadeias. Fonte (CÂMARA, 2012).



A estrutura celulósica apresenta regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas. Sete formas cristalinas foram identificadas para celulose, e são designadas como $I\alpha$, $I\beta$, II, III, IIII, IV_I e IV_{II} . Cada uma destas formas cristalinas apresenta características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, ponto de fusão, forma do cristal, além de propriedades ópticas e elétricas. Na natureza, celulose $I\alpha$ e $I\beta$ são as mais abundantes e, logo, são chamadas de celulose nativa. Celulose $I\alpha$ é o alomorfo majoritário produzido por fontes de bactérias e fungos, Celulose $I\beta$ é a forma cristalina majoritária em plantas superiores (PETRI E OGEDA, 2010).

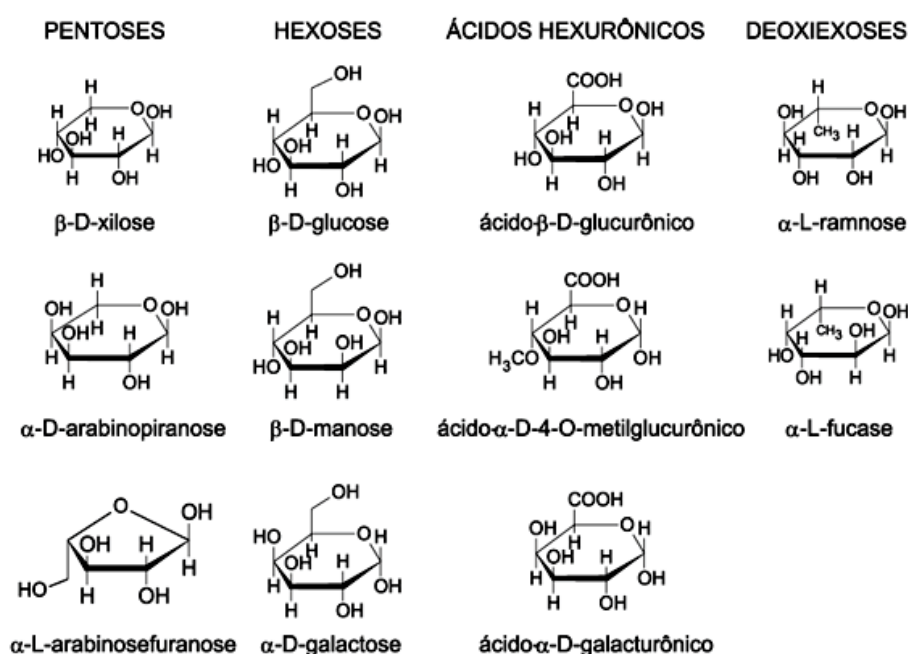
A celulose pode ter diferentes graus de polimerização, cadeias de celulose em parede celular primária de plantas graus de polimerização na faixa de 5.000 a 7.500, para a celulose de madeira é em torno 10.000, e a de celulose de algodão 15.000 logo a eficiência e a viabilidade da conversão da celulose oriunda da biomassa em um produto final pode estar condicionada ao tipo de resíduo (PETRI E OGEDA, 2010).

3.3.2 Hemicelulose

Hemiceluloses são polissacarídeos flexíveis que se ligam à superfície da celulose podendo atuar como amarras que unem as microfibrilas de celulose ou como um revestimento que previne o contato direto entre as microfibrilas. (CÂMARA, 2012).

As hemiceluloses são materiais amorfos heterogêneos com grau de polimerização que varia de 80 a 200 unidades com uma combinação aleatória de monossacarídeos dos quais são apresentados na Figura 7 os principais monômeros que originam as hemiceluloses (GAMBARATO, 2014).

Figura 7: Monômeros que compõem a hemicelulose (Fonte: Morais et al., 2005).



Estruturalmente, a hemicelulose é similar à celulose, pois seus esqueletos são formados por ligações β -glicosídicas e geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto. De acordo com a espécie de planta, estágio de desenvolvimento e tipo de tecidos, várias classes de hemiceluloses podem ser encontradas. Acredita-se que as hemiceluloses estejam envolvidas na regulação do alongamento e modificação da parede, e que as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose sejam mais fortes do que as interações entre as hemiceluloses e ligninas sendo sua principal função estabilizar a parede celular por

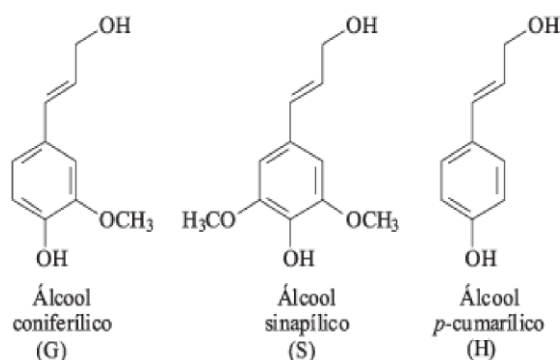
meio de ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina (PETRI E OGEDA, 2010 PEREIRA, 2019).

3.3.3 Lignina

A lignina é o material aromático de estrutura amorfa tridimensional, altamente irregular em comparação com a celulose (LOURENÇON et al., 2020). É o terceiro componente principal da parede celular vegetal, está interpenetrada entre as fibrilas, proporcionando resistência mecânica e proteção dos tecidos, além de atuar no transporte de água, nutrientes e metabólitos (PEREIRA, 2019).

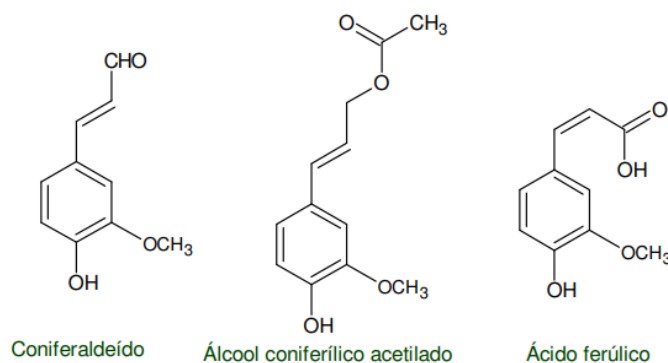
A estrutura da lignina é bem diversificada entre os vegetais e até mesmo em partes distintas do mesmo vegetal. A lignina é um polímero de constituição difícil de ser estabelecida, possui unidades fenilpropanóides como mostrado na Figura 8, interligadas por ligações éter e carbono. A diversidade da estrutura se dá principalmente pela natureza aleatória do acoplamento das unidades de fenilpropanóides (GAMBARATO, 2014).

Figura 8: Unidades de fenilpropano precursoras da lignina (PEREIRA, 2019).



Existem outros fenilpropanóides que também podem atuar como monômeros de formação da lignina, como mostrado na Figura 9. A proporção entre os precursores varia entre as diferentes espécies.

Figura 9: outros fenilpropanóides precursores da lignina. (GAMBARATO, 2014)



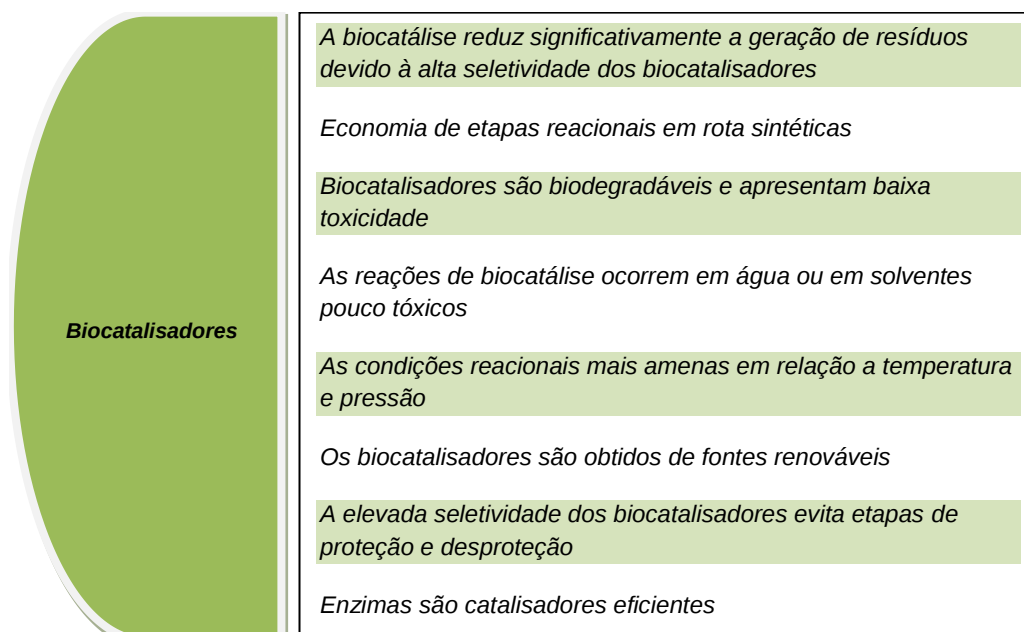
A lignina possui uma natureza recalcitrante, que de alguma maneira inibe o aproveitamento dos carboidratos estruturais de forma direta como, por exemplo, por animais (SALIBA et al., 2001).

Durante o processo de polpação para fabricação de polpa de celulose a lignina é obtida em grande escala, e não possui um fim muito nobre. A aplicação mais comum é a queima em caldeiras para a cogeração de energia. No entanto com o desenvolvimento químico do aproveitamento, a lignina pode ser utilizada como matéria-prima e insumos no desenvolvimento de novos produtos (SOUZA, 2015)

3.4 Catalisadores Biológicos: Enzimas

Na síntese de compostos os químicos dispõem de uma gama de catalisadores para utilizar, como por exemplo os catalisadores metálicos, organometálicos, organocatalisadores, catalisadores de transferência de fase e biocatalisadores, com cada um deles oferecendo vantagens e desvantagens (TEIXEIRA E MILAGRE, 2020). Muito se fala na sustentabilidade ambiental nos dias atuais e o uso de biocatalisadores traz diversas vantagens como demonstrado na Figura 10.

Figura 10: Principais vantagens dos biocatalisadores na química verde. (FONTE: adaptado de TEIXEIRA E MILAGRE, 2020).

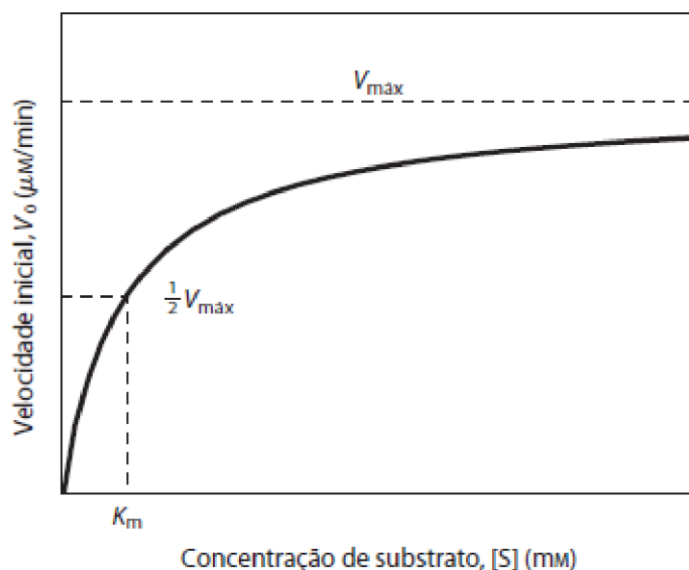


Segundo Osbon e Kumar (2019) as enzimas são catalisadores biológicos ou biocatalisadores tidos como os pilares da vida que asseguram as necessidades metabólicas das células e uma grande variedade de atividades essenciais para a vida, sendo altamente eficientes e pode aumentar a taxa de biotransformação em até 10^{17} vezes.

Grande parte das enzimas são de natureza protéica, formadas por longas cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e que atuam somente na diminuição da energia de ativação das reações tornando às mais rápidas. As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam e muitas recebem seus nomes de acordo com substrato que atuam (NELSON E COX, 2014).

A concentração tanto de enzimas como substrato são fatores chave que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Entretanto, o estudo dos efeitos da concentração do substrato (S) é complicado, pelo fato de modificar-se durante o curso de uma reação *in vitro* à medida que o substrato é convertido em produto. Uma medida para simplificar as abordagens cinéticas é medir a velocidade inicial (V_0). A Figura 11 mostra o efeito da variação de S sobre V_0 quando a concentração da enzima é mantida constante.

Figura 11: influência da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzimas. (NELSON e COX, 2014).



O complexo enzima-substrato (ES) é chave para entender o comportamento catalítico das reações. O movimento natural em uma reação catalisada por enzimas é primeiramente a enzima se combinar com o substrato de modo reversível formando o complexo ES de forma muito rápida mostrado na Equação 1 (NELSON E COX, 2014).



Posteriormente o complexo ES é rompido em uma segunda etapa mais lenta apresentada na Equação 2, fornecendo o produto (P) e a enzima livre (E).



A segunda reação por ser mais lenta que a primeira acaba limitando a velocidade da reação total, que deve ser proporcional à concentração de ES. A velocidade inicial máxima de uma reação catalisada ($V_{\max}$) ocorre quando quase toda a enzima estiver presente como complexo ES e E é desprezível, logo qualquer incremento de S não surte efeito para o aumento da velocidade reacional (NELSON E COX, 2014).

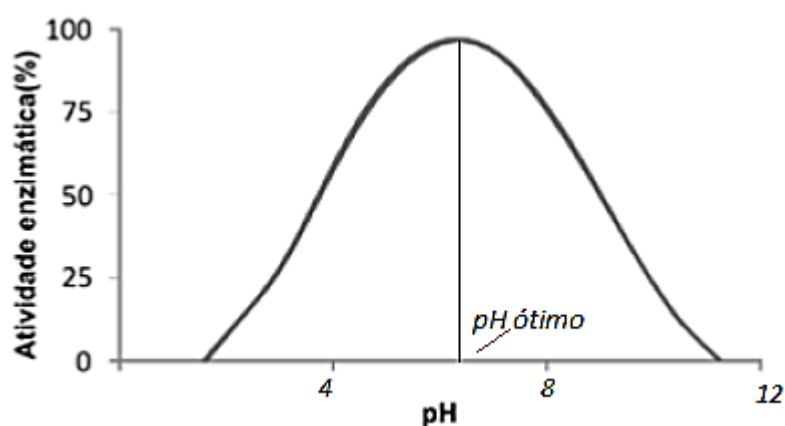
Cada enzima possui uma estrutura tridimensional, e um sítio ativo que podem ser afetados por agentes capazes de alterar o equilíbrio que a enzima possui no seu

interior com o meio ao entorno. Logo atividade enzimática depende das características do meio, como pH e temperatura (LIMA, 2016).

3.4.1 pH

As enzimas têm uma faixa de pH ótimo no qual a atividade catalítica é máxima, com isso a atividade decresce em pH inferior ou superior em relação ao pH ótimo, como pode ser visto na Figura 12. As cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo podem funcionar como ácidos ou bases fracas em funções críticas e em outras partes da enzima as cadeias laterais ionizáveis podem ter uma participação essencial nas interações que mantêm a estrutura proteica. Quando a enzima desenvolve seu papel catalítico de forma ótima é porque há uma concentração hidrogeniônica ideal de grupos protonados e desprotonados. O substrato também pode ter grupos ionizáveis em que a variação de pH também pode afetar a sua carga. Com isso a eficiência da catálise dependerá da enzima e substrato estarem com cargas adequadas para permitir a interação (NELSON e COX, 2014; MARZZOCO e TORRES, 1999).

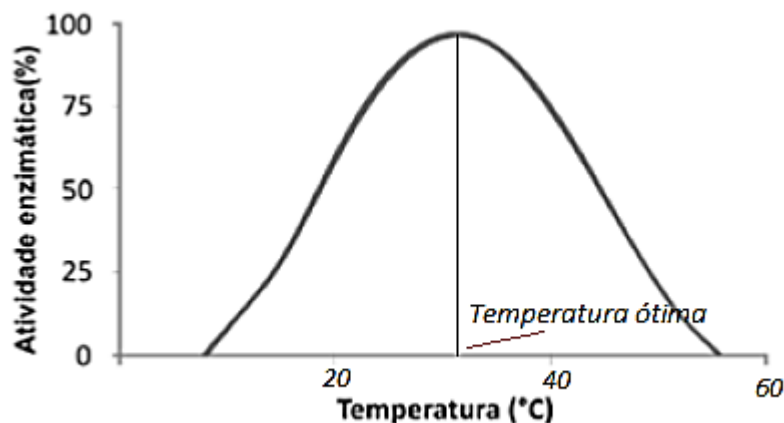
Figura 12: influência do pH na atividade enzimática. Adaptado de SILVA e MONTEIRO, 2009;



3.4.2 Temperatura

Como ocorre na maioria das reações químicas a velocidade da reação é aumentada com o aumento da temperatura. Em reações catalisadas por enzimas a elevação da temperatura só se verifica enquanto a enzima conservar a sua estrutura nativa. O aumento da temperatura também aumenta a energia vibracional das moléculas causando o rompimento de ligações ou interações fracas, especialmente as pontes de hidrogênio. A quebra dessas ligações provoca alterações conformacionais que levam à desnaturação da enzima, causando queda brusca da atividade. Assim como o pH a temperatura também possui um ponto ótimo de trabalho em que a catálise enzimática atua, como mostrado na Figura 13 (LIMA, 2016; MARZZOCO e TORRES, 1999)

Figura 13: influência da temperatura na atividade enzimática. Adaptado de SILVA e MONTEIRO, 2009.



3.5 Enzimas Celulolíticas

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO e JUNIOR, 2009).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. As celulasas podem ser produzidas por uma grande gama de microrganismos, que inclui bactérias anaeróbicas e aeróbicas, fungos filamentosos, plantas e animais. Dentre todos microrganismos, fungos filamentosos são os mais utilizados no processo industrial para produção de celulasas (FLORENCIO, 2011).

As enzimas celulolíticas possuem grande importância biotecnológica, contribuindo com aproximadamente 20% do mercado global de enzimas, correspondem a terceira classe de enzimas industriais mais vendidas em todo o mundo e estima-se que se torne a enzima industrial de maior volume de produção. Apresentam uma ampla gama de aplicações nas indústrias de biocombustíveis, assim como no processamento de amido, produção de ração animal, fermentação alcoólica de grãos, malte e fabricação de cerveja, extração de sucos de frutas, vegetais, polpa e na indústria têxtil (OLIVEIRA *et al.*, 2021). As enzimas celulolíticas são agrupadas em pelo menos 15 das mais de 80 famílias estruturais conhecidas de glicosil hidrolases e classificando-as ainda em 4 dos 14 clãs, com base em semelhanças estruturais (GOYARI e SINGH, 2019).

O complexo enzimático celulolítico é classificado pelo Enzyme Commission (EC) com a codificação 3.2.1.x, sendo chamadas de hidrolases pois clivam as ligações O-glicosídicas. A classificação das celulasas também pode ser de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico da seguinte forma: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO e JUNIOR, 2009). De uma forma mais clara pode-se explicar essas três enzimas do complexo como:

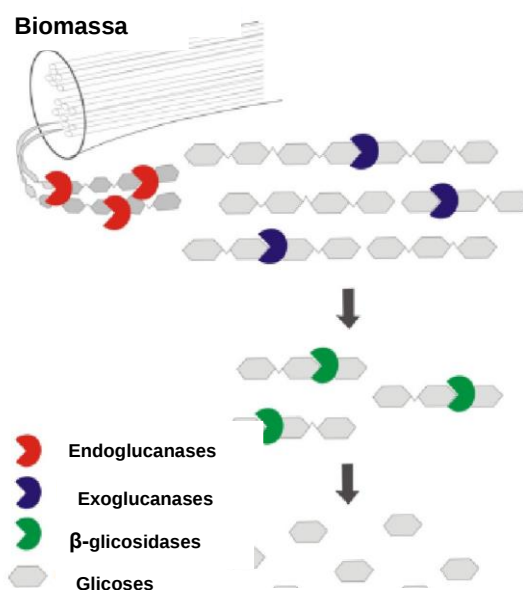
- Endoglucanases (EC 3.2.1.4), é a enzima do complexo celulolítico também conhecida como carboximetilcelulase ou endocelulase, responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. Essas enzimas catalisam preferencialmente a hidrólise das ligações $\beta(1-4)$ D-glicosídicas (CASTRO e JUNIOR, 2009).
- Exoglucanases, grupo de enzimas constituído por celobio-hidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). As exoglucanases são responsáveis pela hidrólise

primária de fibra. (BORTALOZZO, 2011). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase, é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. (CASTRO e JUNIOR, 2009). A CBH (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4-b-D-glucana-celobio-hidrolase. A CBH participa da hidrólise primária da fibra, podendo ainda ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose). (CASTRO e JUNIOR, 2009).

- β -glicosidases (EC 3.2.1.21), também chamadas de β -glicosídeo gluco-hidrolase ou simplesmente celobiase. Esse grupo de enzimas tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose de um modo mais específico a BG catalisa a hidrólise de resíduos β -D-glicose terminais não redutoras, liberando β -D-glicose. Apresentam ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilanosídeos. As BG também podem sofrer inibição pela formação de seus produtos de hidrólise (CASTRO e JUNIOR, 2009; MARTINS, 2007).

As enzimas do complexo celulolítico atuam em sinergia como mostra a Figura 14, apresentando um rendimento melhor atuado em conjunto (CASTRO e JUNIOR, 2009).

Figura 14: Ação sinérgica do complexo enzimático celulolítico (GOYARI e SINGH, 2019).



A utilização de celulasas na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de temperatura, pH e pressão do que os processos químicos, e exibe elevada especificidade, eliminando a chance de formação de substâncias tóxicas que pode influenciar negativamente na fermentação do hidrolisado por microrganismos fermentativos (BORTALAZZO, 2011).

O custo e a eficiência dos coquetéis enzimáticos empregados nos processos que envolvem biocombustíveis são os verdadeiros gargalos. Os custos iniciais de enzimas no processamento de etanol são de US\$ 1,0 -- 1,3 por litro de etanol produzido, o que inviabiliza o processo quando comparado com o processo tradicional que gira em torno de US\$ 0,18 por litro de etanol produzido Dahiya (2015). Logo há necessidade de se criar meios para baratear o processo, uma alternativa é reutilizando essas enzimas no processo em bateladas sequentes.

Devido as condições operacionais serem brandas a celulase vem sendo estudada para aplicações em diferentes ramos industriais, como na produção de etanol, indústria têxtil, indústria alimentícia, alimentação animal, entre outros.

3.6 Aplicações Biotecnológicas da Enzima Celulase

O complexo enzimático celulolítico apresenta importância tanto na pesquisa a nível acadêmico, quanto industrial devido às suas aplicações (SILVA et al., 2021). As indústrias vêm aplicando a tecnologia enzimática para redução de custos operacionais, aumento da qualidade e buscando processos mais limpos diminuindo assim os impactos ambientais (MARTINS, 2007).

As enzimas celulolíticas apresentam aplicação no setor de alimentação animal com melhora na digestão alimentar direcionado a aves, porcos, ruminantes, animais de estimação e piscicultura. Há um grande interesse na utilização de compostos enzimáticos com altos níveis de celulasas e hemicelulasas com o intuito de melhorar a produção de leite e o ganho de pesos de ruminantes (OLIVEIRA et al., 2021).

Na indústria de alimentos o complexo celulolítico desempenha um importante papel em combinação com a pectinase e a xilanase, conhecidos como coquetéis enzimáticos, atuando na redução do tempo de processamento, extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, diminuindo a viscosidade de sucos de frutas, aumenta

às características voláteis, melhorando a propriedade do produto e desempenho do processo (WU, JUTURU, 2014; TOUSHIK *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Na indústria têxtil, estão implementados processos que utilizam enzimas no biopolimento (desfibrilação de tecidos de algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim). As enzimas são utilizadas nessa área como uma alternativa ambientalmente correta para melhorar a qualidade dos produtos, criando uma aparência desbotada no jeans (processo conhecido como bioestonagem) e remover microfibrilas salientes na superfície de tecidos de celulose para reduzir a tendência de formação do *pilling* (processo conhecido como biopolimento) (CASTRO e JUNIOR, 2009; LIMA, 2016).

Na indústria de papel e celulose, celulasas são amplamente empregadas para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas (CASTRO e JUNIOR, 2009). Estudos vêm sendo realizados nesse ramo industrial com o objetivo de modificar o processo tradicional de fábrica, muito poluente que recorre a tratamentos químicos e/ou mecânicos, por soluções ambientalmente mais favoráveis com aplicação de enzimas (SOUSA, 2002).

Um outro ramo que vem empregando celulasas é nas lavanderias e desenvolvimento de produtos de limpeza de roupas. O uso de enzimas em produtos de limpeza, os detergentes têxteis vem crescendo devido à eficácia e especificidade na remoção da matéria orgânica, diminuindo o custo das lavanderias, pois necessitam de menor energia na lavagem, além de serem biodegradáveis, ecologicamente corretas, e os detergentes não são agressivos ou tóxicos aos consumidores (POLYORGANIC, 2022).

Dentre os vários estudos e inovações no campo de aplicação de enzimas celulasas, uma das mais estudadas é a aplicação de enzimas do complexo celulolítico na hidrólise de biomassas para posterior processo fermentativo na obtenção de etanol de segunda geração. No entanto, a competitividade pelo uso da enzima é grande, e isso acaba aumentando os custos, em especial para reposição enzimática no processo. Diante do exposto se faz necessário a aplicação de tecnologias para minimizar os custos com a reposição, e uma boa alternativa é a imobilização enzimática em suportes de diferentes características.

3.7 Imobilização de Enzimas

A tecnologia enzimática despontou como área de investigação no início da década de 1960, com a imobilização de enzimas para uso em diversos processos industriais já descritos (MENDES, 2019).

Frente aos altos custos dos catalisadores enzimáticos, a recuperação e a reutilização destas se faz necessário para tornar o processo economicamente viável. Isso é alcançado com a aplicação de enzimas na forma imobilizada, que consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador (MENDES *et al.*, 2011).

Em geral, a imobilização enzimática oferece uma série de vantagens e desvantagens quando comparada com as enzimas solúveis como pode ser observado na Tabela 2. A possibilidade de reutilização, uso em operações de modo contínuo, insolubilidade e estabilidade são características desejadas comercialmente na imobilização enzimática (MENDES *et al.*, 2011; PEREIRA, 2019; MARTINS, 2007; ADRIANO, 2008).

Tabela 2: Vantagens e desvantagens da imobilização enzimática.

<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo	Alteração da conformação nativa da enzima
Possibilidade de operação contínua do processo	Custo do suporte
Maior facilidade de controle	
Facilidade de separação do produto final	Perda da atividade devido a interação enzima-suporte
Maior estabilidade ao pH	Redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais de microambiente e estéricos conformacionais
Maior estabilidade a temperatura	
Facilidade na interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão	
Uso de grandes concentrações de enzimas	Perda de atividade durante o processo de imobilização

O termo enzimas imobilizadas refere-se a “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região definida no espaço com retenção de suas

atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente". A imobilização de enzima consiste na transformação de um biocatalisador homogêneo (enzima) em um biocatalisador heterogêneo (enzima-suporte) através da ligação da enzima em um suporte sólido (BRENA *et al.*, 2013; PEREIRA, 2019).

A imobilização enzimática não é trivial, deve-se considerar diversos aspectos e integrar o conhecimento em diversas áreas, incluindo enzimologia, reações químicas, ciência dos materiais e superfícies e a hidrodinâmica de reatores (PEREIRA, 2019).

Não há um método de imobilização que se aplique a todas as enzimas conhecidas e todos os suportes possíveis, por isso a necessidade de um conhecimento prévio em diversas áreas que norteiam a aplicação para selecionar a técnica de imobilização a ser utilizada para uma determinada finalidade. Para uma dada aplicação o ideal é selecionar o método de imobilização que gere o melhor custo benefício (MENDES *et al.*, 2016).

Uma das propriedades mais esperadas após a imobilização é a estabilidade enzimática, no entanto, isso pode não ser totalmente alcançado se a imobilização não for devidamente projetada (SHELDON e VAN PELT, 2013).

3.7.1 Métodos de imobilização enzimática

Diversas formas são utilizadas para classificar os biocatalisadores imobilizados. A classificação dos métodos de imobilização de enzimas mais aceita na literatura é a que considera a combinação da natureza da interação responsável pela imobilização e o tipo de suporte utilizado, feita da seguinte forma (MORAES *et al.*, 2008):

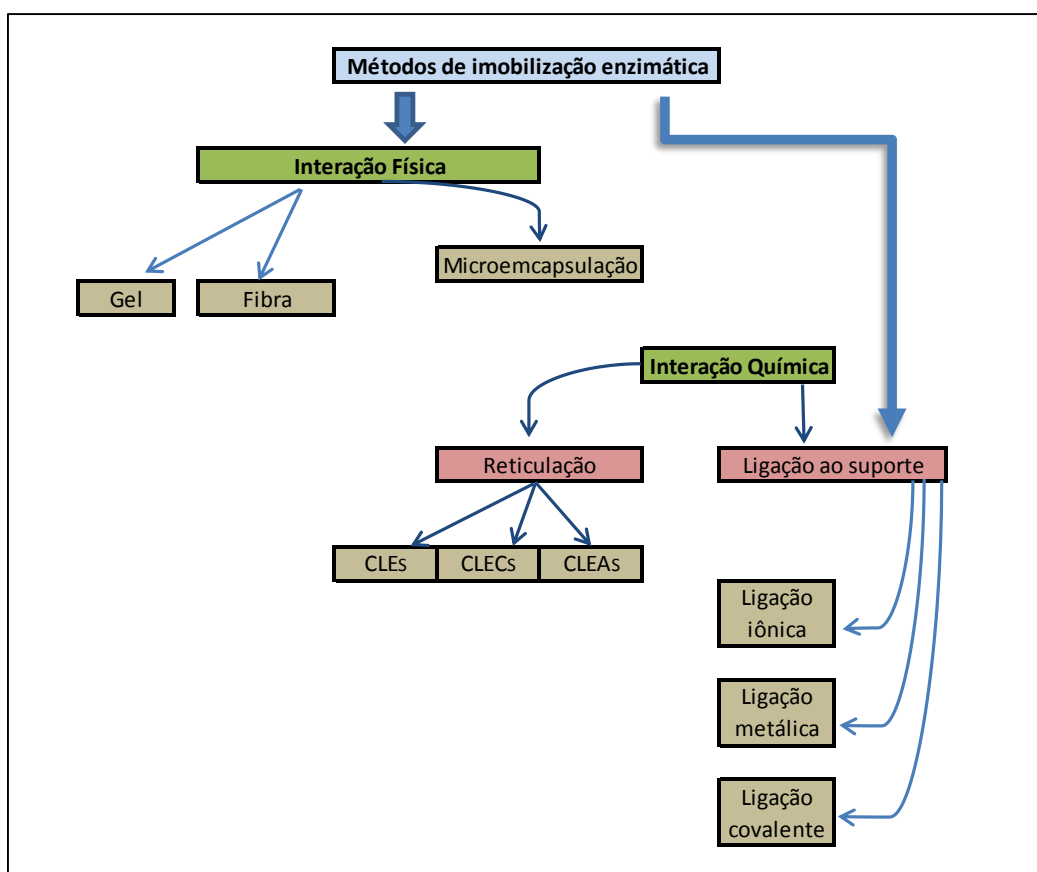
- 1- Ligação em suportes - modificação da enzima, por meio de técnicas apropriadas, para torná-las imóveis no meio de reação e ligação cruzada intermolecular ou reticulação;
- 2- Enzimas solúveis sem derivatização - enzimas solúveis em que são retidas no interior do reator por meio de uma barreira física;
- 3- Enzimas solúveis com derivatização - enzimas ligadas a um suporte solúvel no meio reacional, no entanto com mobilidade restringida.

A imobilização é geralmente um requisito ao uso de uma enzima como biocatalisador industrial, sendo a solução mais simples para o problema de solubilidade desses

biocatalisadores e é o que mais desperta interesse dos pesquisadores (MATEO *et al.*, 2007). Os métodos de imobilização enzimática do tipo ligação em suportes podem ser divididos em três categorias: I- ligação a um suporte, seja uma interação física ou química, II- aprisionamento, retenção da enzima no interior de uma matriz suporte e III- reticulação, que consiste em um agregado enzimático que não faz uso de um meio suporte (SHELDON e VAN PELT, 2013).

Os métodos de imobilização em que a enzima está ligada ao suporte representa apenas uma fração de todas as tecnologias disponíveis de reter uma enzima a um suporte como possível observar na Figura 15, em que os métodos de imobilização podem ser divididos de um modo mais completo em interações físicas e químicas. (CANTONE *et al.*, 2013).

Figura 15: Métodos de imobilização enzimática. Adaptado de (CANTONE *et al.*, 2013)



Não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas e suas várias aplicações, isso se deve às diferentes características físico-químicas

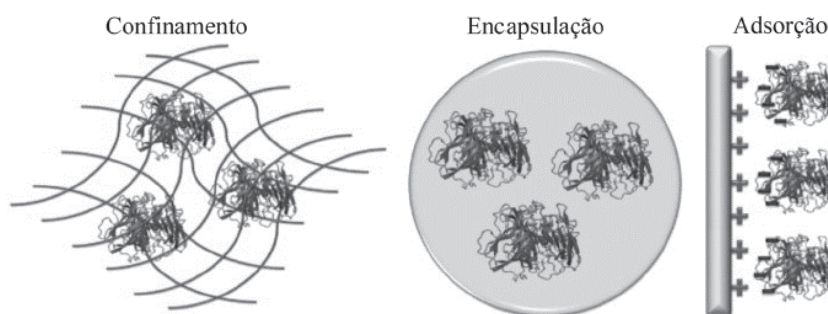
das enzimas, substratos e produtos obtidos no processo de interesse. Além disso, todos os métodos apresentam vantagens e limitações (MENDES *et al.*, 2016).

Nos métodos físicos, a imobilização é realizada por meio de forças físicas, como a eletrostática, iônica, interação proteína – proteína (MARTINS, 2007). São citados como métodos físicos:

- **Adsorção:** Forças de interação (van der Waals, iônica, pontes de hidrogênio) numerosas e fracas entre suporte e enzima. As principais vantagens deste processo de imobilização é a facilidade, simplicidade e com a estrutura conformacional da enzima pouco alterada. As desvantagens são a adsorção não-específica de outras proteínas e substâncias e a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH, força iônica e a presença de substrato (MARTINS 2007; ADRIANO, 2008).
- **Aprisionamento/Confinamento:** Moléculas de enzimas livres são presas a estrutura do gel como em uma caixa, com nenhuma interação química entre o suporte e os grupos constituintes da enzima, o que garante uma estrutura tridimensional e um sítio ativo sem alterações (QUEISSADA e SILVA, 2020)
- **Encapsulação:** Enzima contida em uma microcápsula de membrana porosa semipermeável, por onde permeiam substrato e produtos. A enzima permanece livre, mas com mobilidade restrita devido à microcápsula.

A Figura 16 apresenta, esquematicamente, os métodos de imobilização enzimática do tipo físico.

Figura 16: Métodos físicos de imobilização enzimática (MENDES *et al.*, 2016).



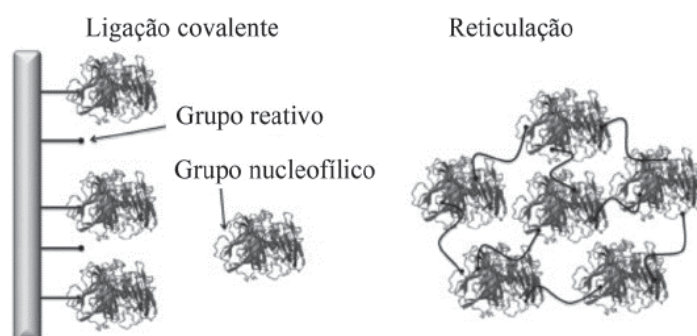
Nos métodos químicos de imobilização enzimática, a formação de pelo menos uma ligação covalente entre uma ou mais moléculas de enzima e um polímero insolúvel ou enzima-enzima. O processo é irreversível e a enzima geralmente não pode ser

recuperada posteriormente (MARTINS 2007). As ligação covalentes podem ser realizada das seguintes maneiras:

- **Ligação covalente:** Envolve normalmente grupos amino dos aminoácidos da enzima (NH_2), que cedem elétrons ao suporte fortemente eletrofílico (+). Vale ressaltar que a ligação deve ocorrer longe do sítio ativo da enzima. As vantagens da ligação covalente entre a enzima e o suporte é a grande força de ligação e estabilidade do complexo enzima-suporte.
- **Cross-linked ou enzimas reticuladas:** sistema em que se baseia na ligação cruzada entre as enzimas ou enzimas e algum cristal. Os chamados *Agregados Enzimáticos Reticulados* (CLEAs) são preparados primeiramente agregando enzimas por meio de diferentes técnicas de reticulação, produzindo ligações diaminas. A vantagem desse sistema é que não há necessidade de se usar qualquer tipo de suporte, mas, no entanto, a separação dos CLEAs é mais complexa. A reticulação pode ser CLEs – *Enzimas reticuladas*, CLECs – *Cristais de Enzimas Reticuladas* e *Agregados Enzimáticos Reticulados* (CLEAs) (CANTONE et al., 2012).

A Figura 17 apresenta, esquematicamente, os métodos de imobilização enzimática do tipo químico.

Figura 17: Métodos químicos de imobilização enzimática (MENDES et al, 2016).



A ligação covalente da enzima ao suporte é o método mais interessante de imobilização sob ponto de vista industrial (MARTINS, 2007). Vários estudos vêm sendo desenvolvidos com respeito a imobilização covalente. Adriano (2007) em sua tese, analisou várias estratégias com objetivo de melhorar e promover uma imobilização covalente multipontual de quimotripsina, carboxipeptidase A e celulase em quitosana. Martins (2007) em seu trabalho utilizou celulases comerciais

imobilizadas covalentemente em diferentes suportes para hidrólise do bagaço de cana. Pereira (2019) utilizou diferentes estratégias de imobilização de celulasas e a que apresentou melhor custo benefício foi a realizada por ligação covalente multipontual. Dentre vários outros trabalhos analisados, a ligação covalente enzima-suporte é o método de imobilização mais estudado e promissor.

3.8 Parâmetros de imobilização

Com a imobilização enzimática é comum que ocorra mudanças nas propriedades da enzima, podendo ser melhoradas por meio da modificação química da enzima solúvel para derivados imobilizados (GUISAN, 2006).

A imobilização se mostrou uma ferramenta muito poderosa para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas se adequadamente projetada, como estabilidade, atividade, especificidade, seletividade e redução da inibição (MATEO *et al.*, 2007). Alguns fatores levam à alteração dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação aos valores da enzima livre, fatores estes (MARTINS, 2007):

1- *Modificação química*: ao se realizar uma modificação de uma proteína (ligação da enzima a um suporte) é provável que ocorra mudanças conformacionais, por mais leves que sejam. Este efeito não pode ser alterado, e, portanto, é característico de cada sistema enzima-suporte;

2- *Efeitos difusionais*: a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é diretamente proporcional à concentração de enzimas. Em uma mesma reação catalisada por uma enzima imobilizada a velocidade é limitada pela velocidade de difusão do substrato para a enzima, na superfície ou no interior do suporte. Limitações na difusão decorrentes da imobilização podem exercer efeitos profundos no comportamento catalítico, diminuindo a atividade do biocatalisador;

3- *Efeitos eletrostáticos*: a concentração de espécies químicas importantes (íons H^+ , moléculas de substrato) no microambiente pode gerar um efeito inibitório e complicações difusionais.

3.9 Suportes para imobilização de enzimas

O suporte utilizado para imobilizar a enzima de interesse influenciará suas propriedades após imobilização. A interação entre os dois fornece uma enzima imobilizada com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (LIMA, 2016). Um suporte adequado para imobilização de proteínas requer o cumprimento de algumas características (MATEO *et al.*, 2007):

- Superfície do suporte compatível com a superfície da enzima, para que ocorra uma interação intensa entre enzima e suporte;
- O suporte deve apresentar alta densidade superficial de grupos reativos, ou seja, com uma elevada carga de grupos reativos na superfície do suporte haverá grandes chances de alta carga de imobilização;
- Os grupos reativos na proteína e o suporte devem ser os mais reativos possíveis entre si, apresentando centros estéricos mínimos durante a reação;
- Os grupos reativos envolvidos na imobilização devem ser estáveis o suficiente para permitir que a interação enzima-suporte seja a mais duradoura possível;
- Após a imobilização a superfície do suporte deve se tornar inerte;

Os suportes podem ser classificados de acordo com sua origem em materiais orgânicos e inorgânicos. Os materiais orgânicos em especial os polímeros podem ser naturais ou sintéticos. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte de acordo com as características desejadas (MENDES *et al.*, 2016).

Existe uma variedade de polímeros naturais em especial os insolúveis em água, polissacarídeos como celulose, amido, agarose, quitosana, proteínas como gelatina e albumina, colágeno e alginato, que têm sido amplamente usados como suportes para imobilizar enzimas. Apresentam 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 e apresentam ainda alta resistência térmica e mecânica (SHELDON e VAN PELT, 2016; PEREIRA, 2019).

Suportes inorgânicos na maioria dos casos, polímeros inorgânicos como sílica, zeólitos, sílicas mesoporosas, poliestireno, polivinílicos, nylon, bentonita e entre outros, são mais adequados para o uso industrial devido às suas propriedades físicas, elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos

e ataque de microrganismos. Contudo, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas é obtida com matrizes orgânicas, provavelmente, devido à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos (SHELDON e VAN PELT, 2016; MARTINS 2007; PEREIRA, 2019)

Os suportes podem ser classificados quanto a sua morfologia, podem ser porosos, não porosos e estrutura em gel. Os materiais porosos apresentam uma elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, no entanto as aberturas dos poros deve ser suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato não comprometendo a difusividade do material (MENDES *et al.*, 2016).

Os materiais não porosos eliminam a resistência à transferência de massa interna, a acomodação das moléculas de enzima é apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com moléculas de substrato, no entanto a área disponível para imobilização fica restrita a superfície do material, logo uma redução de área disponível (MENDES *et al.*, 2016; PEREIRA, 2019).

Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas destacam-se os orgânicos naturais agarose, quitosana e alginato visto pelo grande número de trabalhos relatados na literatura (MENDES *et al.*, 2016; PEREIRA, 2019; QUEISSADA e SILVA, 2020; MARTINS, 2007; JESUS *et al.*, 2018).

3.10 Quitosana

A quitosana tem despontado nos últimos anos como um biomaterial de grande potencialidade para aplicação em vários campos, passando por medicina, biotecnologia, alimentos, etc. Atualmente, a quitosana é extraída em larga escala como um subproduto da indústria pesqueira, a partir do exoesqueleto de crustáceos, como o caranguejo e camarão (BEPPU, 1999).

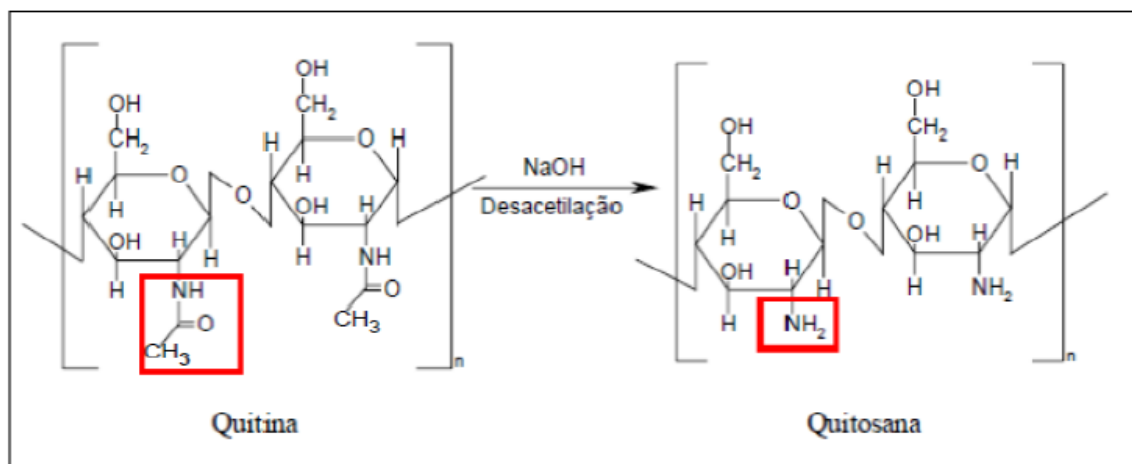
A quitosana é um polímero natural de baixo custo, renovável, biodegradável e insolúvel em água de grande importância econômica e ambiental (PINHEIRO 2017; MENDES *et al.*, 2016).

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (PEREIRA, 2019). Quitina significa caixa de proteção,

um polissacarídeo (carboidrato) estrutural que está presente na parede celular de microrganismos, como fungos e leveduras, e no exoesqueleto de artrópodes e crustáceos como o caranguejo e camarão (MELLO, 2009; DANTAS, 2019). O exoesqueleto dos crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos os consideram poluentes, logo sua utilização pode provocar uma expressiva redução nos impactos ambientais (MARTINS, 2007).

A quitina (poli- β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glicosamina) pode ser desacetilada para produzir quitosana (poli- β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose) a partir da reação de hidrólise dos grupos acetila da quitina em meio básico (ZADINELO, 2018). Sendo que a única diferença estrutural entre estas é o grau de acetilação, ou seja, a quantidade de grupos amino-acetilados presente na molécula como pode ser visto na Figura 18 (DANTAS, 2019). As propriedades físico-químicas da quitina e dos derivados N-desacetilados (quitosana) podem ser diferentes em função de uma variação de 70 a 95% no seu grau de desacetilação, logo é imprescindível determinar esses parâmetros para processos subsequentes de imobilização enzimática (TRIGUEIRO, 2015).

Figura 18: Desacetilação alcalina da quitina (TRIGUEIRO 2015).



A molécula de quitosana possui muitos grupos amino (-NH_2) e grupos hidroxila (-OH) na cadeia molecular o que lhe confere várias propriedades, uma delas de grande estudo atualmente é a utilização como suporte para imobilização de enzimas. Vários trabalhos são encontrados na literatura que utilizam a quitosana como suporte (ZADINELO, 2018).

Mendes *et al.* (2011) em seu artigo relata, a aplicação de quitosana como suporte para imobilização de diferentes enzimas em muitas aplicações industriais e biomédicas, incluindo tratamento de águas residuais, suporte cromatográfico, transportadores para liberação controlada de drogas e imobilização enzimática. Diferentes configurações geométricas na imobilização de enzimas por diferentes protocolos para posterior aplicação são relatadas em seu trabalho.

Pinheiro (2017) em seu estudo propõe um novo suporte heterofuncional de quitosana-divinilssulfona para imobilização de enzimas. A quitosana foi ativada com divinilssulfona (DVS) em três valores de pH diferentes de tampão de carbonato de sódio. A enzima escolhida para realizar a imobilização foi lipase B de *Candida antarctica*. Os resultados mostraram que o suporte ativado com divinilssulfona é muito promissor e melhorou a estabilidade da enzima.

Mello (2009), em seu trabalho, estudou a enzima pepsina imobilizada em membranas liofilizadas de quitosana e O-carboximetilquitosanareticuladas ou não com glutaraldeído. Como resultado, a pepsina imobilizada na membrana de quitosana apresentou bons resultados demonstrando que o processo de liofilização é viável.

Magro (2020), em seu trabalho, buscou por meio do desenvolvimento de biocatalisadores compostos por pectinases e celulases imobilizadas, melhorar a eficiência do processo produtivo de clarificação e a qualidade dos sucos de frutas. Duas metodologias de imobilização com partículas magnéticas foram testadas, CLEAs-magnéticos e a imobilização na superfície da partícula magnética ativada com glutaraldeído. Ambas não tiveram bons resultados. Em seguida, buscando preparar biocatalisadores com alta estabilidade, aliada a boas propriedades magnéticas, estudou-se diferentes metodologias de recobrimento das partículas magnéticas com quitosana, alcançando 3 diferentes biocatalisadores com distintos tamanhos Nano, Micro e Macro, com Macro obtendo melhores valores de estabilidade.

Pereira (2019), em seu trabalho, estudou a imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Diferentes estratégias de imobilização de celulases foram estudadas. Imobilizados em gel de quitosana ativada com glutaraldeído apresentaram melhores resultados.

Jesus *et al.* (2018), utilizaram o caldo bruto da celulase com uma atividade inicial de 2520 U/kg para imobilização em esferas de quitosana, usando como agente ativador o glutaraldeído. Foram estudados os efeitos da quantidade do caldo bruto, da

quantidade das esferas e do agente ativador sobre o rendimento de imobilização, a atividade do biocatalisador e o sobrenadante do processo.

Martins (2007), estudou a imobilização de celulasas em géis de quitosana. As celulasas foram imobilizadas em géis de quitosana e quitosana-alginato ativados com glutaraldeído e glicidol para posterior hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Os melhores derivados foram obtidos com quitosana-alginato, ativados com glicidol com temperatura de imobilização de 27°C e pH 7,0 sendo 11,2 vezes mais estáveis que a enzima livre, com rendimento em torno de 40,6% e atividade recuperada em torno de 56,3%.

Adriano (2008) preparou e caracterizou derivados de enzimas industriais em quitosana. Várias estratégias foram analisadas com objetivo de melhorar e promover uma imobilização covalente multipontual de quimotripsina, carboxipeptidase A e celulase em quitosana. Foram utilizados em consórcio com a quitosana, alginato de sódio, gelatina e κ -carragenana.

Como visto a quitosana é o meio suporte mais utilizado para imobilização enzimática, na literatura existem vários outros trabalhos de pesquisa a respeito do tema. No contexto global de crise energética, se faz necessário o estudo e aperfeiçoamento do uso da quitosana como meio suporte para enzimas que possam atuar na hidrólise de materiais lignocelulósicos servindo de substrato nos processos fermentativos de produção de etanol.

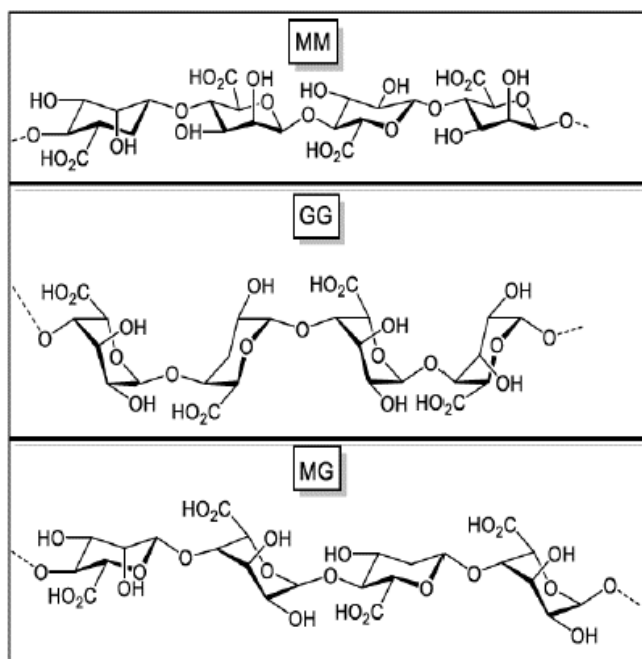
3.11 Alginato de sódio

Os alginatos são polissacarídeos aniônicos e hidrofílicos de ocorrência natural, comumente produzidos a partir de vários gêneros de algas marrons e algumas bactérias, sendo um dos mais abundantes materiais biossintetizados (HACKENHAAR, 2021).

O alginato é um copolímero linear com a fórmula química $C_{76}H_{76}O_{2}$, constituído de unidades de ácidos α -L-gulurônicos (G) e β -D-manurônicos (M) e é extensamente utilizado devido às suas propriedades espessantes, estabilizantes e gelificantes. Os meros podem ser agrupados em blocos sequenciais com a variação dos grupos (MM,

GG e MG) como mostrado na Figura 19, influenciando nas suas propriedades (MÜLLER *et al.*, 2011; CACURO, 2019).

Figura 19: Estruturas químicas das unidades méricas do alginato distribuídas em diferentes sequências de monômeros (CACURO, 2019).



O alginato representa mais de 40% da massa seca de algas marinhas pardas e é extraído como alginato de sódio (ZERBINI, 2020). O alginato de sódio ocorre como pó fino ou grosso quase inodoro e insípido, de cor branco amarelada. É bastante hidrossolúvel, formando uma solução coloidal viscosa.

Algumas aplicações possíveis com o alginato são:

- *Indústria alimentícia*: aditivos alimentares, modifica e melhora a textura de certos alimentos, como por exemplo, molhos e emulsões, alimentos reestruturados, geleias e sobremesas (HACKENHAAR, 2021);
- *Bioprocessos*: O alginato de sódio tem aplicação na geleificação para vários fins como imobilização enzimática, formação de membranas e encapsulação de drogas (MARTINS, 2007);
- *Biomedicina*: áreas de cicatrização de feridas, administração/liberação controlada de medicamentos, cultura celular *in vitro* e engenharia de tecidos (HACKENHAAR, 2021).

Também encontra aplicação na indústria têxtil e de papel. Atualmente vem sendo utilizado em aplicações inovadoras na área médica, farmacêutica e de engenharia (MÜLLER *et al.*, 2011).

3.12 Princípios da formação de hidrogéis

Os hidrogéis podem ser sintetizados a partir de materiais naturais ou sintéticos, alguns são citados na Tabela 3. Os hidrogéis naturais apresentam propriedades vantajosas como: biocompatibilidade; biodegradabilidade e reconhecimentos de moléculas biológicas. Os hidrogéis sintéticos não apresentam propriedades bioativas, o que diminui o campo de aplicação desses materiais, principalmente nas áreas biomédicas (AOUADA e MATTOSO, 2009).

Tabela 3: Principais polímeros naturais e sintéticos utilizados na síntese de hidrogéis (Adaptado de AOUADA e MATTOSO, 2009; BRANT, 2008).

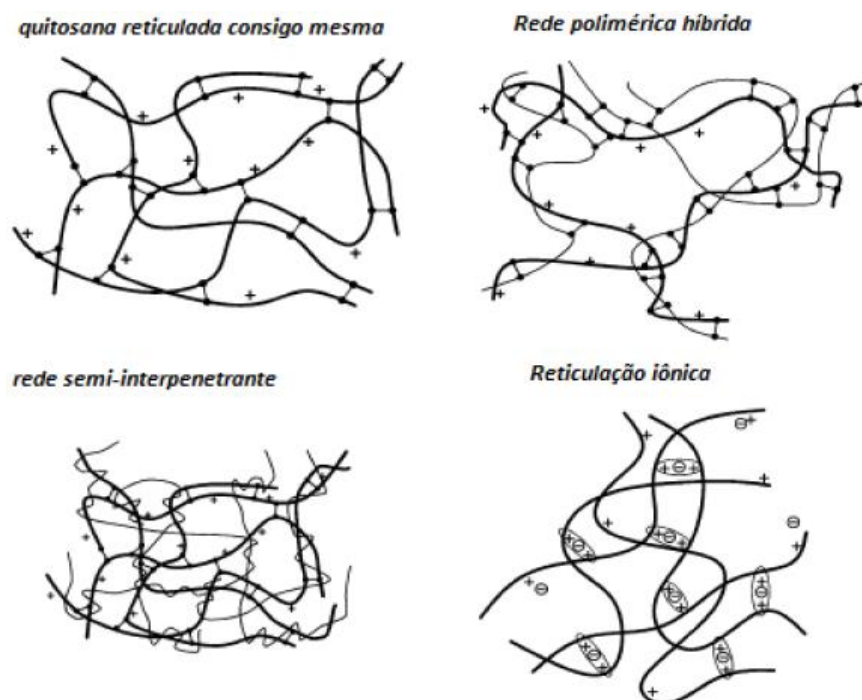
<i>Polímeros naturais</i>	<i>Polímeros sintéticos hidrofílicos</i>
Quitosana	Poli(álcool vinílico) PVA
Alginato	Poli(etileno glicol)
Carboximetilcelulose	Poli(<i>N</i> -vinil-2-pirrolidona)
Metilcelulose	Poli(metacrilato de metila)
Colágeno	Poli(ácido lático)
Gelatina	Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)
Ácido hialurônico	Poli(ácido glicólico)

A quitosana possui uma alta porcentagem de nitrogênio (6,89%) quando comparado com a celulose sintética substituída (1,25%), este fato confere a quitosana um potente agente geleificante, ou seja, a facilidade na formação de géis (BECARO, 2008). Assim como a quitosana, o alginato também tem a capacidade de formar géis quando estão na presença cátions bivalentes Ca^{++} por exemplo, independentemente da temperatura (HACKENHAAR, 2021; SALOMÃO, 2017).

Hidrogéis são biomateriais poliméricos tridimensionais hidrofílicos com alta capacidade de absorção de água e/ou fluídos biológicos (MENDES, 2009). Os hidrogéis de quitosana, considerada como um polímero catiônico, podem apresentar

ligações covalentes entre as cadeias ou podem ser formados pela interação iônica com polímeros aniônicos como o alginato (ABREU, 2008; GONSALVES *et al.*, 2007). Hidrogéis à base de quitosana reticulada covalentemente podem ser divididos em três tipos no que diz respeito à sua estrutura, sendo a primeira estrutura a quitosana reticulada consigo mesma, a segunda estrutura uma rede polimérica híbrida e uma terceira estrutura sendo uma rede polimérica semi ou totalmente interpenetrada, ilustrados na Figura 20 (BERGER *et al.*, 2003).

Figura 20: Estrutura dos hidrogéis de quitosana (Adaptado de BERGER *et al.*, 2003).



Hidrogéis obtidos por reticulações químicas são conhecidos como hidrogéis do tipo químico ou permanente, pois uma vez obtidas, as redes não poderão mais ser dissolvidas, ao contrário dos hidrogéis obtidos por interações físicas (forças de van der Waals e pontes de hidrogênio), que podem ser dissolvidos por meio de mudanças no meio, seja pela variação do pH, temperatura e outros (AOUADA e MATTOSO, 2009)

Devido à sua versatilidade e vantagens tecnológicas sobre outros materiais poliméricos, os hidrogéis têm sido aplicados em diferentes campos, desde indústrias, medicina e até o agronegócio (AOUADA e MATTOSO, 2009).

3.13 Modificação química do suporte.

A imobilização de enzimas por ligação covalente ocorre por formação de complexos estáveis entre grupos funcionais de enzimas e um suporte através de ligações covalentes. Os grupos funcionais enzimáticos que podem ser utilizados no acoplamento covalente incluem: grupo amino, grupo carboxílico, grupo fenólico, grupo sulfidril, grupo tiol, grupo imidazol, grupo indol e grupo hidroxila (NGUYEN e KIM, 2017). A distância entre os grupos funcionais deve se manter inalterados na enzima após qualquer mudança conformacional para evitar a modificação do sítio ativo e consequentemente perda de atividade enzimática e aumento da estabilidade da enzima (MATEO *et al.*, 2007).

Nem todos os suportes possuem grupos funcionais disponíveis para ligações covalentes com os grupos funcionais das enzimas, com isso é necessário realizar algumas modificações na superfície do suporte visando formar grupos reativos, possibilitando que haja reações covalentes entre esses grupos formados e grupos funcionais das enzimas (HACKENHAAR, 2021).

A modificação química do suporte promove uma maior densidade de reticulações além de promover uma maior estabilidade química e física da quitosana e seus derivados (complexos polieletrólitos e matrizes híbridas) através de ligações bi- ou multipontuais. A modificação química é alcançada quando se emprega agentes de ativação (PEREIRA, 2019). O emprego desses agentes pode ser realizado misturando-os diretamente em uma matriz ou através da aplicação em matrizes pré-formadas, na qual os grupos funcionais do suporte na superfície são modificados para produzir grupos reativos (HACKENHAAR, 2021; MENDES *et al.*, 2011).

As ativações mais usadas são com reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos e grupos aldeídos em especial por glutaraldeído. O glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na ativação de suportes, devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis (MENDES *et al.*, 2011).

Ao se empregarem aldeídos monofuncionais (formaldeído) ou bifuncionais (glioxal e glutaraldeído) como agentes de reticulações, o processo ocorre via adição nucleofílica da amina da quitosana à carbonila dos agentes. A reação de eliminação subsequente produz as correspondentes bases de *Schiff* (GONSALVES *et al.*, 2007).

O glutaraldeído vem sendo muito estudado como agente de ativação de diferentes suportes no emprego das mais variadas enzimas conhecidas. Pereira (2019), estudou a imobilização de celulasas comerciais por diferentes métodos, reticulações e ligação covalente em gel de quitosana ativado com glutaraldeído. Os biocatalisadores tiveram seus desempenhos avaliados em hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por um processo *organosolv*. Os géis Imobilizados em gel de quitosana ativada com glutaraldeído apresentaram melhores resultados. As celulasas 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.

Polleto *et al.* (2014), em seu trabalho, estudou a aplicação de celulasas imobilizadas na desconstrução da biomassa holocelulose de braquiária. Celulasas de um extrato bruto comercial foram imobilizadas por ligação covalente em quitosana ativada com glutaraldeído. As atividades do biocatalisador foram (em U/g): 0,92 (α -celulose); 8,69 (celobiose); 4,74 (carboximetilcelulose) e 0,13 (avicel). O desempenho da enzima imobilizada em relação à enzima solúvel aumentou de 5,9% aos 30 minutos de hidrólise para 11% após 18 horas de hidrólise, mostrando que o biocomposto adquiriu uma melhor estabilidade após a imobilização.

Martins (2007), em seu estudo, imobilizou dois diferentes coquetéis enzimáticos em géis de quitosana e quitosana-alginato ativados com glutaraldeído e glicidol para posterior hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. O derivado híbrido de quitosana 2,5% - alginato 2,5% apresentou 42,2% de rendimento de imobilização com 46,3% de atividade recuperada sendo 5,5 vezes mais estável que a enzima livre.

Jesus *et al.*, (2018) utilizaram o caldo bruto da celulase com uma atividade inicial de 2520 FPU/kg para imobilização em esferas de quitosana, usando como agente ativador o glutaraldeído. Foram estudados os efeitos da quantidade do caldo bruto, da quantidade das esferas e do agente ativador sobre o rendimento de imobilização, a atividade do biocatalisador e o sobrenadante do processo. O melhor desempenho foi obtido com uma adsorção primária de celulasas e posterior ativação com glutaraldeído e realizado uma nova imobilização com 53,6% como rendimento de imobilização, 9,3% de atividade recuperada e uma atividade no biocatalisador de 124,2 FPU/kg.

Silva (2012) teve como objetivo em seu trabalho encontrar fungos celulolíticos produtores de enzimas que sejam eficientes nos processos de degradação da biomassa lignocelulósica. Doze fungos celulolíticos previamente isolados pelo

Laboratório de Biotecnologia Industrial (UNESP – Assis) foram selecionados e posteriormente cultivados em bagaço de cana-de-açúcar. A partir dos extratos obtidos, o complexo enzimático teve sua atividade quantificada. Posteriormente, foi imobilizado enzimas de origem comercial em microesferas de alginato e de hidrogéis (alginato/quitosana) ativados com glutaraldeído, mostrando resultados promissores.

Adriano (2008), em seu trabalho de tese, analisou várias estratégias várias estratégias com objetivo de melhorar e promover uma imobilização covalente multipontual de quimotripsina, carboxipeptidase A e celulase em quitosana. Géis híbridos com diferentes estruturas internas foram obtidos usando alginato de sódio, gelatina e κ -carragenana, bem como, variando a concentração de polímeros, 2,5-5,0% (m/v) e os agentes de ativação (glutaraldeído, glicidol e epicloridrina). Derivados de quimotripsina tiveram um incremento de estabilidade de 34 min a 55°C preparados em quitosana pura 2,5% ativada com glutaraldeído a pH 7,0 e a 4°C, para 468 min a 65°C, para quitosana 2,5%-carragenana 2,5% com adição de 5% de *S.cerevisiae* e ativado com epicloridrina com tempo de imobilização de 72h a pH 10,05 a 25°C e reduzido. Sendo 9900 vezes mais estável que a enzima livre. Derivados de carboxipeptidase A quando ativado com glutaraldeído mostrou uma melhor estabilização de 5,3 vezes, já para o ativado com epicloridrina foi de 8,8 vezes. Ensaio de imobilização da celulase e sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar foram realizados e o derivado obtido com quitosana-alginato ativado com glutaraldeído/glicidol sendo este derivado 20 vezes mais estável que a enzima livre.

Lima (2016) estudou a imobilização de celulase em nanopartículas magnéticas encapsuladas em poli(metacrilato de metila). Para concentração de 5% (v/v) de glutaraldeído e 100 mg/mL de enzima, foi obtido 49% de eficiência de imobilização. A celulase imobilizada apresentou a mesma faixa de pH ótimo, comportamento semelhante para a estabilidade térmica e ampliação da faixa ótima de temperatura. A capacidade de reuso foi testada e 69% da atividade enzimática inicial foi mantida após oito ciclos de uso.

4. Material e Métodos

Capítulo destinado a descrever materiais, equipamentos, procedimentos experimentais necessários para a realização do estudo e cálculos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Todos os procedimentos foram realizados no laboratório multidisciplinar II da Faculdade Venda Nova do Imigrante, na unidade II em Venda Nova do Imigrante – ES.

4.1 Materiais

4.1.1 Enzimas

Foram utilizadas preparações de celulasas de origem microbiana fornecidas pela empresa **Novozymes A/S**. (Celluclast 1.5 L), celulase que hidrolisa ligações (1,4)- β -D-glicosídica em celulose e outros β -D-glucanas com Atividade de 700 EGU/g e 14% em (m/m).

4.1.2 Suportes utilizados na imobilização enzimática

Para o preparo dos suportes foram utilizados: quitosana ($C_{12}H_{24}N_2O_9$) (cód. Q06289RA), alginato de sódio, (cód. AS09191RA) âmbos da marca Exôdo®. Os suportes forma confeccionados para uma imobilização covalente.

4.1.3 Reagentes e substratos

Foi utilizado glutaraldeído da marca Dinâmica, 25% em água (P.A.), utilizado para ativação do suporte de quitosana. A dosagem da atividade hidrolítica do complexo enzimático foi determinado utilizando papel de filtro Whatman nº1, Ghose (1987).

4.1.4 Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: espectrofotômetro visível digital MICROPROCESSADO DPT - QUIMIS (Q898DPT); balança analítica (Gehaka mod. AG 200); banho maria com agitação e controle de temperatura marca Quimis; Bomba de infusão para seringa.

4.2 Metodologia experimental

4.2.1 Preparo das partículas de quitosana e quitosana/alginato

O preparo dos suportes foi realizado conforme a Figura 21, em duas etapas. Primeiramente quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% (v/v) para o preparo de três grupos de partículas suportes, cada um nas seguintes concentrações: 2,0%; 3,5% e 5,0% (m/v). As soluções resultantes foram deixadas em agitação para homogeneização por 10 minutos para completa solubilização. Os sistemas solubilizados foram gotejados em solução de NaOH 1M em uma razão de 1:10 (v/v) sob agitação leve e a uma altura de aproximadamente 8 cm do nível da solução básica. Terminado o gotejamento, as partículas foram deixadas em repouso por 24h à temperatura ambiente e posteriormente foram lavadas com água destilada até a neutralidade da água de lavagem. As partículas possuem uma aparência conforme mostra a Figura 22.

A segunda etapa foi o preparo dos suportes a base de quitosana e alginato. Foram preparados três grupos de partículas suportes com concentrações de quitosana e alginato idênticas de 2,0%; 3,5% e 5,0% (m/v) em cada grupo e seguindo os mesmos procedimentos da etapa anterior. As partículas obtidas tiveram uma aparência conforme mostrado na Figura 22.

Figura 21: Aparato utilizado para preparação das partículas (Suportes)

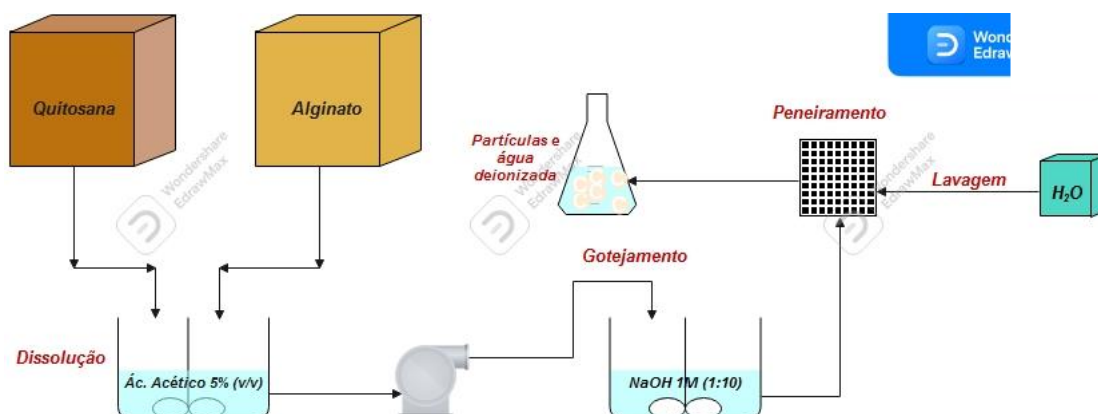


Figura 22: Partículas de quitosana e quitosana/alginato em diferentes concentrações.



4.2.2. Ativação dos suportes

A ativação do suporte foi realizada com glutaraldeído 5% (v:v) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 por 1h a 25°C sob agitação branda (razão $m_{gel} : V_{total}$ de 1:10). Depois da ativação, as partículas foram lavadas com excesso de tampão fosfato 0,1 mM pH 7,0 e água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído segundo o processo descrito pela Figura 23. As partículas ativadas são mostradas na figura 24.

Figura 23: Aparato utilizado para ativação das partículas com glutaraldeído

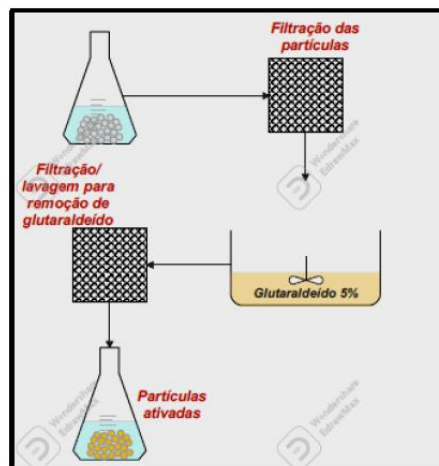
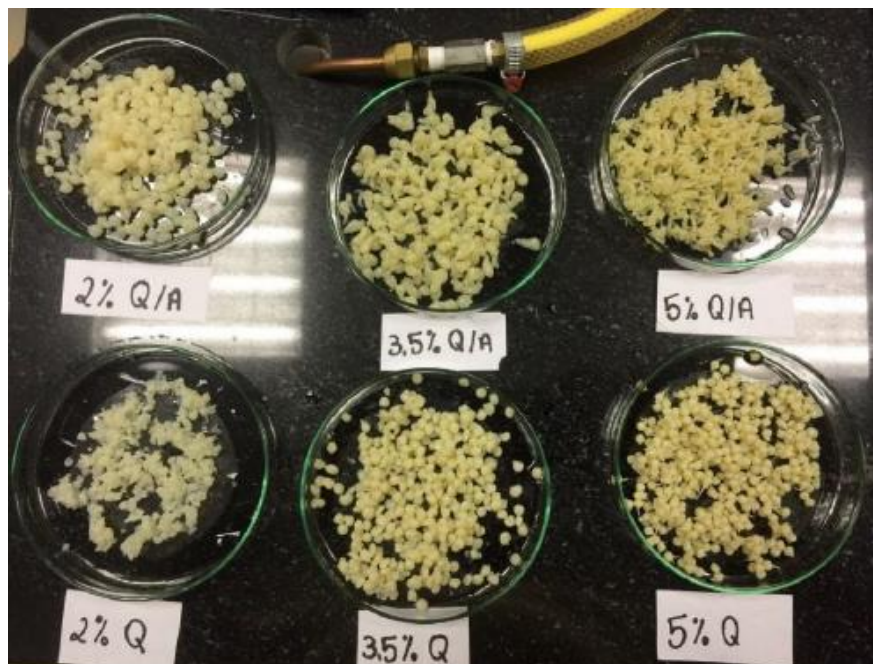


Figura 24: Partículas de quitosana e quitosana/alginate ativadas com glutaraldeído.



4.2.3 Imobilização covalente das celulasas em matrizes de quitosana e quitosana/alginate

Os géis de quitosana e quitosana/alginate ativados com glutaraldeído foram utilizados para imobilização do complexo celulolítico. A imobilização foi realizada em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 com razão $m_{gel}:V_{total}$ (1:10). Foi fornecido ao suporte uma razão

de 10 mg de proteína por grama de suporte a um tempo de imobilização de 24 horas. Após decorrido o tempo de imobilização, o gel foi lavado com água destilada em abundância para a remoção de enzima residual e tampão até pH neutro. Após a imobilização, foi quantificada no sobrenadante, a atividade hidrolítica residual.

4.2.4 Atividade celulolítica

A solução enzimática de trabalho foi preparada diluindo-se a solução original em tampão citrato na razão (Solução original / Solução de trabalho, 1:160).

A atividade da celulase total foi determinada pela hidrólise de papel de filtro Whatman Nº1 (MANDELS *et al.*, 1976, *apud* ADRIANO, 2007). A reação foi conduzida em frascos de vidro de 20 mL contendo 1,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), 50 mg de papel de filtro picado Whatman Nº1 (3,0%*m/v*) e 0,5 mL de amostra previamente diluída (enzima livre) ou 200mg de derivado (enzima imobilizada). Os tubos foram incubados a 50°C por 60 min sob agitação. Após 1 hora, a reação foi interrompida adicionando 2 ml de DNS. A liberação de açúcar redutor foi quantificado pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) segundo Miller (1957). A mistura reacional foi aquecida a 100 °C por 5 min e, após o resfriamento adicionou-se 10 ml de água destilada e mediu-se a absorbância em 540 nm. Análise conduzida em duplicata. Para o branco, substituiu-se a amostra por tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e também não houve adição de papel de filtro.

A unidade utilizada foi a FPU (Filter Paper Unit). Uma unidade FPU é dada pela produção de um μmol de açúcar redutor por minuto nas condições descritas, conforme descrito na Equação 3:

$$At\left(\frac{\text{FPU}}{\text{ml}}\right) = \frac{C_{AR} \cdot V_R}{V_{SE} \cdot t_H \cdot 0,18} \quad (3)$$

onde:

C_{AR} → Concentração de açúcar redutor (mg/mL);

V_R → Volume reacional (mL);

V_{SE} → Volume de enzima (mL);

t_H → tempo da hidrólise (min);

0,18 → 1 μmol de glicose

4.2.5 Determinação das propriedades bioquímicas da celulase livre e imobilizada

Reações catalisadas por enzimas sofrem influências significativas com variações em parâmetros cinéticos enzimáticos como concentração de enzima, concentração de ligantes (substratos, inibidores e ativadores), pH, força iônica e temperatura. Ao se estudar cada parâmetro separadamente é possível determinar um ponto ótimo de operação. Neste trabalho foram estudadas a influência do pH, temperatura e estabilidade térmica.

4.2.6 Influência do pH

A atividade da celulase foi quantificada em faixas de pH que variaram de 2,0 a 8,0. Foi calculada a atividade da celulase livre e imobilizada pelo método do filtro de papel Whatman nº1 descrito no item 4.4. Foram utilizados tampão citrato 50 mM na faixa de pH de 2,0 a 5,0, tampão fosfato 50 mM na faixa de pH de 7,0 a 8,0 e temperatura de 50°C.

4.2.7 Influência da temperatura

A influência da temperatura sobre a atividade da celulase livre e imobilizada foi observada empregando a reação de hidrólise do papel de filtro Whatman nº 1, conforme metodologia descrita no item 4.4, na faixa de temperatura entre 20 a 80 °C.

4.2.8 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das enzimas livres e imobilizadas foi avaliada através do preparo de soluções em tampão citrato 50 mM, pH 4,8 e temperatura de 65°C. A atividade enzimática das enzimas livres e imobilizadas no início foi denominada de 100% e as leituras das atividades subsequentes expressa como porcentagem da atividade inicial foram feitas em intervalos de tempo pré-determinados. O modelo proposto por Sadana e Henley (1987) para avaliar a desativação enzimática é bem satisfatório no qual estima-se o tempo de meia vida ($t_{1/2}$). Fatores de estabilidade (FE) foram obtidos como a razão entre o tempo de meia vida dos derivados e o tempo de meia vida da celulase livre. A constante de desativação térmica foi calculada pela Equação 4, utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987).

$$AR = (1 - \alpha) \cdot e^{-kd \cdot t} + \alpha \quad (4)$$

Onde:

$AR \rightarrow$ atividade relativa (A/A_0);

$\alpha \rightarrow$ razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial (A_0);

$Kd \rightarrow$ constante de inativação térmica de primeira ordem (h^{-1})

$t \rightarrow$ tempo de incubação da solução enzimática (h)

O tempo de meia vida (tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial) pode ser calculado pela Equação 5:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{kd \cdot (1 - \alpha)} \quad (5)$$

$t_{1/2} \rightarrow$ tempo de meia-vida da enzima.

4.3 Cálculo dos parâmetros de imobilização

4.3.1 Rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização foi calculado com base na atividade enzimática oferecida na solução de imobilização e a atividade enzimática presente na solução após o processo de imobilização, calculado pela Equação 6:

$$RI(\%) = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \cdot 100 \quad (6)$$

onde:

RI → porcentagem de proteína imobilizada (%);

A_0 → atividade oferecida no início da imobilização (FPU/g de gel);

A_f → atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (FPU/g de gel).

4.3.2 Atividade recuperada

Determinada pela relação entre a atividade hidrolítica contida no gel e as atividades inicial e final presentes no sobrenadante, calculado pela Equação 7 (MENDES *et al.*, 2016):

$$AR_R(\%) = \frac{A_{gel}}{A_0 - A_f} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:

AR_R → atividade recuperada (%);

A_{gel} → atividade hidrolítica aparente do derivado imobilizado (FPU/g de suporte)

A_0 → atividade oferecida no início da imobilização (FPU/g de proteína);

$A_f \rightarrow$ atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (FPU/g de proteína).

4.3.3 Fator de estabilidade

O fator de estabilidade (FE) foi calculado pela relação entre o tempo de meia-vida da celulase imobilizada e a celulase livre, medidos a 65°C através da hidrólise do papel de filtro Whatman nº1 segundo metodologia do item 4.4, calculado pela Equação 8 (MENDES *et al.*, 2016):

$$FE = \frac{t_{1/2}^{imobilizada}}{t_{1/2}^{livre}} \quad (8)$$

onde:

$FE \rightarrow$ fator de estabilidade;

$t_{1/2}^{imobilizada} \rightarrow$ tempo de meia-vida para a celulase imobilizada;

$t_{1/2}^{livre} \rightarrow$ tempo de meia-vida para a Celulase livre.

4.4 Avaliação da interação enzima – suporte

O tipo de interação enzima suporte (ligação química (covalente) ou interação física (adsorção física)) foi avaliado incubando-se enzimas imobilizadas em meio fortemente iônico (NaCl 0,5M) sob suave agitação por 24 horas. Caso a enzima estivesse interagindo com o suporte por interações físicas, esta dessorveria ao passar do tempo. Com a formação de ligações de natureza covalente entre enzima e suporte, a celulase permaneceria imobilizada nos suportes devido à natureza irreversível destas ligações.

4.5 Ajuste da carga enzimática

Após o estudo da variação da concentração de quitosana, e fixado o pH e tempo de imobilização, a carga enzimática foi ajustada para que o catalisador atingisse seu máximo desempenho de hidrólise.

O estudo da carga enzimática foi realizado em suportes a base de quitosana 3,5% e quitosana 3,5% / alginato 3,5%, respeitando o protocolo de imobilização já realizado anteriormente e variando a carga enzimática de 20,0 a 1280,0 mg_{de proteína}/g_{suporte}. O rendimento de imobilização foi quantificado pela Equação 6 e a atividade do biocatalisador foi quantificado de acordo com o subitem 4.2.4.

4.6 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando celulase livre e imobilizada

4.6.1 Preparo do material

Os resíduos lignocelulósicos foram obtidos junto ao laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Espírito Santo previamente já caracterizados com o teor de componentes expressos na Tabela 3.

Tabela 3: teor dos componentes lignocelulósicos do bagaço da cana-de-açúcar e casca de café.

Componente	<i>Bagaço de cana-de-açúcar</i> <i>(ZORTEA, 2022)</i>	<i>Casca de café</i> <i>(Fonte:Autor)</i>
Celulose	37,07	28,76
Hemicelulose	28,51	7,66
Lignina	18,96	15,71

Os materiais foram levados a estufa de secagem a temperatura de 40°C por 24 horas. Terminado o processo de secagem os materiais foram triturados e posteriormente

levados a um agitador de peneiras para padronizar o material de forma passante em peneira de 50 mesh (ALVES, 2018).

4.6.2 Pré-tratamento do material

O pré-tratamento dos materiais foi conduzido em duas etapas, uma etapa ácida para remoção da hemicelulose e uma etapa básica para remoção da lignina. O tratamento ácido foi conduzido pesando-se 50 g dos resíduos, o qual foi autoclavado a 127°C e 30 minutos em meio a solução com ácido sulfúrico diluído (1% v/v) com fração sólido/líquido de 1:10. Posteriormente os resíduos foram filtrados e lavados até o pH da água de lavagem se aproximar do neutro e, em seguida, secos em estufa a 60°C, por 24 horas (LIMA, 2016; REZENDE *et al.*, 2011).

Para determinar a porcentagem de massa que foi solubilizada após o pré-tratamento, calculou-se o rendimento mássico através da Equação 9 (PRATTO, 2015).

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} * 100 \quad (9)$$

m_{final} → massa seca de material lignocelulósico após o pré-tratamento (g)

$m_{inicial}$ → massa seca de material lignocelulósico antes do pré-tratamento (g)

R → Rendimento mássicos (%)

A etapa básica foi conduzida em autoclave com temperatura de 127°C por 30 minutos em meio a uma solução alcalina de hidróxido de sódio (1% m/v). A fração sólido/líquido é de 1:10. Em seguida os resíduos foram filtrados e lavados com água deionizada até pH da água de lavagem se aproximar do neutro, posteriormente sendo secos em estufa a 60°C, por 24 horas. Com material seco foi calculado o rendimento de extração pela Equação 9 (LIMA, 2016 e REZENDE *et al.*, 2011).

4.6.3 Ensaios de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos utilizando celulase livre e imobilizada

Ensaios de conversão foram obtidos utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar e casca de café. A sacarificação ocorreu utilizando enzima livre e imobilizada, de modo a compará-los ao longo de oito dias de reação a 50°C e pH 4,8, aproximadamente.

A uma suspensão de 2,5% (m/v) de substrato celulósico em tampão citrato de sódio 0,05M e pH 4,8, foi adicionada enzima livre (8 FPU.g⁻¹ de substrato) ou enzima imobilizada (8 FPU.g⁻¹ de substrato). Os imobilizados apresentam atividade teoricamente imobilizada de 2,93 FPU.g⁻¹ de gel para o suporte a base de quitosana e 28,93 FPU.g⁻¹ de gel para o suporte de quitosana/alginato. O biocatalisador utilizado se deu pela facilidade de manuseio junto a metodologia, equipamentos e equacionamento matemático e para comparar os dois suportes utilizados. A conversão da reação foi determinada através do método de DNS para quantificação dos açúcares redutores ao longo do tempo. As condições foram semelhantes às utilizadas por Adriano (2008).

Ensaios de sacarificação em bateladas sequências foram realizadas, respeitando o mesmo protocolo reacional de hidrólise dos resíduos descritos anteriormente, no entanto foi utilizado somente como substrato o bagaço de cana-de-açúcar e as bateladas foram conduzidas a cada 48 horas.

Bateladas sequenciais foram realizadas, utilizando-se celulase imobilizada de modo a avaliar a reusabilidade do biocatalisador. Após cada batelada, o catalisador do meio foi filtrado, lavado com água deionizada e adicionado de volta ao reator, com adição de um novo quantitativo de substrato e tampão citrato. A conversão da reação foi determinada através do método de DNS para quantificação dos açúcares redutores ao longo do tempo. O rendimento de conversão no processo de bateladas sequências foi calculado de acordo com a Equação 10:

$$\%_{convers\tilde{a}o} = \frac{C_{inicial}}{C_{final}} * 100 \quad (10)$$

onde

%conversão = rendimento de conversão

C_{inicial} → Concentração inicial de açúcares redutores na primeira batelada (g/L)

C_{final} → Concentração de açúcares redutores na batelada de análise (g/L)

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização do extrato enzimático (Celluclast)

A Celluclast® 1.5 L (celulase) é uma preparação enzimática que além de conter as enzimas do complexo celulolítico: endo, exocelulases e β -glicosidase, contém uma série de outras pequenas proteínas que funcionam como impurezas no processo de imobilização. Além disso, a solução enzimática comercial apresenta agentes estabilizantes (cloreto de sódio e sorbitol) e conservantes (sorbato de potássio) de acordo com a fabricante, protegendo a enzima contra autólise ou inativação. Estes compostos, mesmo não possuindo grupos aminos livres que poderiam formar ligações covalentes com o suporte, podem se adsorver a ele, bloqueando centros ativos possíveis de ligação com a enzima (Adriano, 2008).

A atividade enzimática calculada e alguns dados disponíveis pelo fabricante são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Características do complexo enzimático Celluclast 1.5 L

Características	Valores
Atividade enzimática (FPU/ml) calculado	441,28
Atividade enzimática (FPU/g de proteína) calculado	50,66
Concentração de celulase % (m/m) Fabricante	14

5.2 Parâmetros de imobilização dos diferentes suportes de quitosana.

O procedimento de confecção das partículas de quitosana seguiram procedimentos semelhantes aos empregados nos trabalhos de Martins (2007), Adriano (2008), Pereira (2019) e Silva (2012).

Enzimas foram imobilizadas em suportes à base de quitosana com diferentes concentrações (2 a 5%) ativados com glutaraldeído, ambas as diferentes concentrações seguiram os mesmos protocolos de imobilização. Foi utilizado um carregamento de 10 mg de proteína / grama de gel. Tempo de imobilização de 24 horas a uma temperatura média de 25°C e pH 7,0. Os resultados obtidos, rendimento de imobilização (%), atividade recuperada (%) e atividade do biocatalisador (FPU/g de proteína) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de imobilização dos diferentes suportes de quitosana sob as mesmas condições de imobilização.

SUPORTE	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (FPU/g)		ATIVIDADE RECUPERADA (%)	RENDIMENTO IMOBILIZAÇÃO (%)	
Quitosana - 2,0%	3,75	±0,27	19,52	72,57	±0,01
Quitosana - 3,5%	1,65	±0,03	7,79	80,11	±0,01
Quitosana - 5,0%	1,78	±0,14	8,10	82,94	±0,01

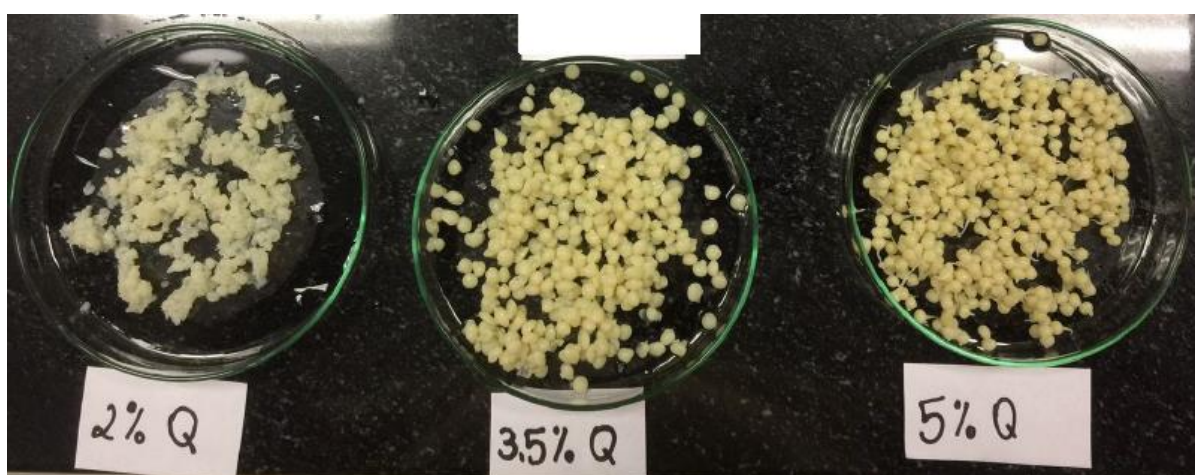
Pode-se observar que o rendimento de imobilização como esperado, foi melhor no suporte com quitosana-5,0% com valor de 82,94% devido ao maior número de reticulações esperadas no suporte, logo maior número de ligações dos grupos terminais da enzima são esperadas com o suporte ativado. No entanto, a atividade enzimática e atividade recuperada da enzima imobilizada teve um melhor desempenho quando imobilizada em suportes de quitosana-2,0%, com valores de 3,75 FPU/g para atividade enzimática e 19,52% de atividade recuperada. Os valores para atividade enzimática e atividade recuperada são maiores para esse biocatalisador, possivelmente, devido a superfície do suporte contendo 2% de quitosana possuir um menor número de pontos de ligações entre enzima-suporte. Este fato se explica devido a carga enzimática disponibilizada para a imobilização ser inferior a quantidade de reticulações do suporte, as ligações enzima-suporte realizadas pelos grupos terminais de ambos, ocorre perfeitamente, no entanto o suporte ainda possui reticulações livres, e não tendo enzimas para imobilização, a cadeia lateral da enzima imobilizada acaba realizando interações cruzadas (pontes de

hidrogênio, interações de Wan der Walls, entre outras) com as reticulações livres do suporte, fazendo com que ocorra uma modificação estrutural no sítio ativo da enzima, com isso comprometendo sua atividade, ocorrendo até, inibição.

Pereira (2019) conclui em seu trabalho que o rendimento de imobilização e desempenho de hidrólise reduzem drasticamente quando a concentração de quitosana no preparo do gel é aumentada de 0,5% para 2,0% m/v, quando se utiliza uma carga de enzimas de 134 mg de proteína/g de suporte, devido ao aumento de reticulações no suporte que interagem de diferentes formas com a enzima, comprometendo seu desempenho. Silva (2012) em seu trabalho relata que a elevação da atividade enzimática do biocatalisador não acompanha o aumento da concentração de quitosana no suporte, que pode ser explicada pelo fato de baixas concentrações de enzima e do agente bifuncional tendem a induzir ligações cruzadas intramolecular, entre a mesma enzima ou até mesmo induzir as enzimas a se ligarem ao suporte de diferentes formas com isso comprometendo o sítio ativo da enzima.

Um fato importante é que, uma baixa concentração de quitosana no suporte acaba não oferecendo uma resistência mecânica adequada no reator. Como visto na Figura 25, suportes com 2% de quitosana não possuem uma resistência mecânica satisfatória podendo sofrer degradação devido as forças de cisalhamento no interior do reator, logo a concentração de quitosana no suporte e enzimas tem que ser tal que possibilite uma recuperação do biocatalisador e não se deteriore no interior do reator.

Figura 25: Suportes de quitosana com diferentes aspectos visuais (inconsistência mecânica).



5.3 Parâmetros de imobilização dos diferentes suportes de quitosana/alginato.

O procedimento de confecção das partículas de quitosana/alginato seguiram procedimentos semelhantes aos empregados nos trabalhos de Martins (2007) e Adriano (2008).

Enzimas imobilizadas em suportes à base de quitosana/alginato ativados com glutaraldeído foram produzidas com diferentes concentrações de quitosana e alginato (2 a 5% de ambos) seguindo os mesmos protocolos de imobilização para as diferentes concentrações. Foi utilizado um carregamento de 10mg de proteína / grama de gel, tempo de imobilização de 24 horas a uma temperatura média de 25°C e pH de 7,0. Foi analisado o rendimento de imobilização (%), atividade recuperada (%) e atividade do biocatalisador (FPU/g de proteína) com os resultados apresentados na Tabela 6:

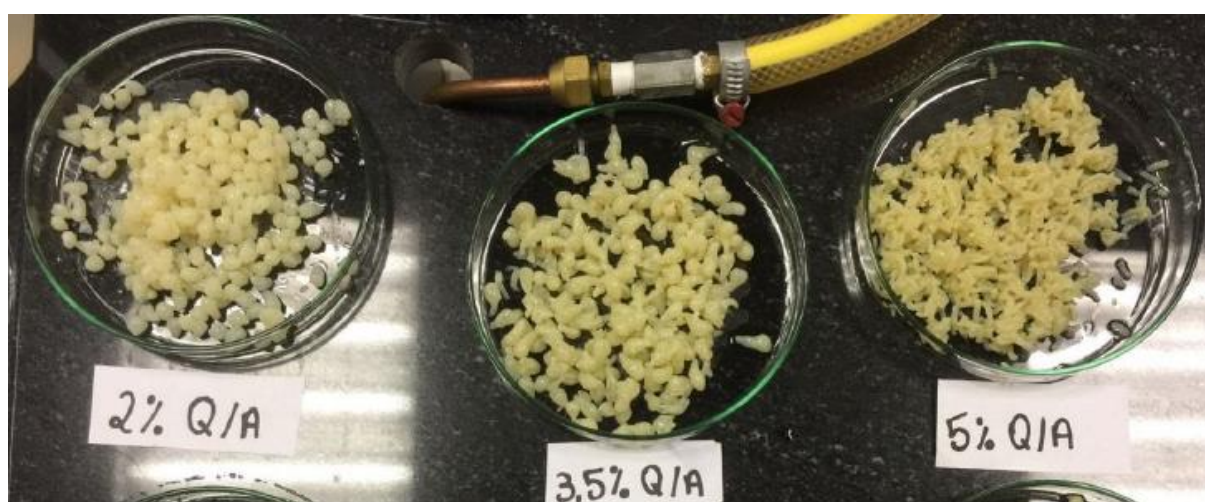
Tabela 6: Parâmetros de imobilização dos diferentes suportes de quitosana/alginato sob as mesmas condições de imobilização.

SUPORTE	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (FPU/g)		ATIVIDADE RECUPERADA (%)	RENDIMENTO (%)	
Quitosana - 2,0%; Alginato - 2,0%	1,93	±0,03	9,21	79,14	±0,04
Quitosana - 3,5%; Alginato-3,5%	2,09	±0,14	9,42	83,60	±0,04
Quitosana - 5,0%; Alginato - 5,0%	1,84	±0,04	8,11	85,23	±0,00

Como esperado, suportes com maior teor de quitosana tendem a ter um maior rendimento de imobilização enzimática. O suporte com 5,0% de quitosana e 5,0% de alginato imobilizou 85,23% das enzimas disponíveis na solução, devido ao maior número de reticulações esperadas no suporte, logo maior número de ligações dos grupos terminais da enzima são esperadas com o suporte ativado. O melhor desempenho da atividade enzimática 2,09FPU/g e atividade recuperada 9,42% foi das enzimas imobilizadas em suportes de quitosana-3,5% e alginato-3,5%. Segundo Martins (2007), a quitosana interage formando ligações de hidrogênio com alginato, com isso o alginato funciona como um inerte, diminuindo a grande reatividade do

agente ativador, melhorando assim a interação enzima-suporte e evitando possíveis regiões de inibição. Suportes híbridos de quitosana/alginate possuem um comportamento melhor quando comparado com quitosana somente. Esses resultados podem ser otimizados variando a concentração fornecida ao suporte de proteínas e variando as concentrações de alginate no suporte para melhorar as condições mecânicas e químicas. Adriano (2008) relata que um fator importante para não se atingir 100% de rendimento de imobilização é a quantidade de proteínas menores (impurezas) que competem com proteínas maiores pelos grupos ativados do suporte. Suportes híbridos de quitosana/alginate como apresentado na Figura 26, apresentam uma boa resistência mecânica visualmente ao cisalhamento no interior do reator em concentrações menores que 5% de quitosana e 5% de alginate, concentrações superiores possuem uma alta viscosidade o que dificulta a produção de partículas (suportes).

Figura 26: Suportes de quitosana/alginate em diferentes concentrações com enzimas imobilizadas.



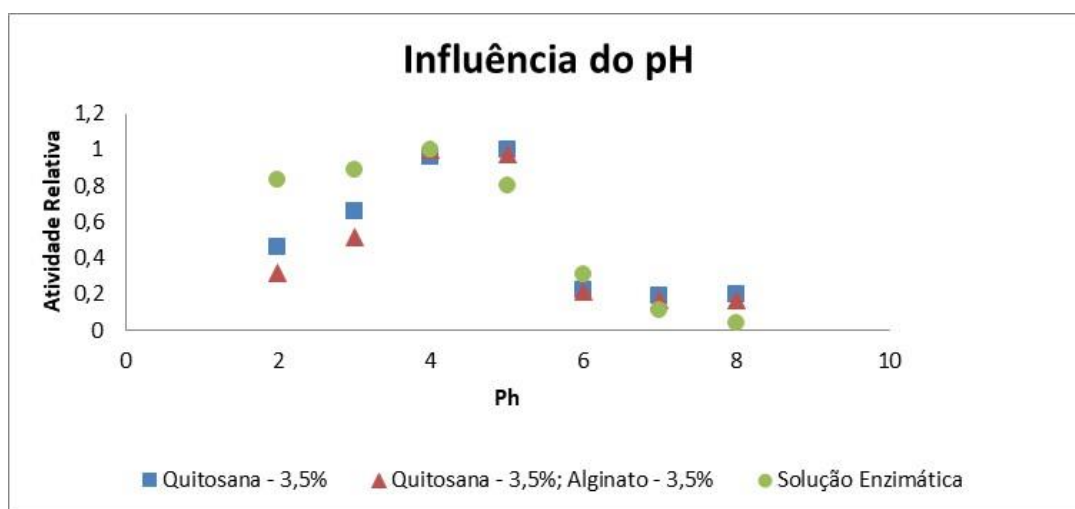
5.4 Influência do pH

As enzimas em sua maioria apresentam um valor de pH ótimo na qual sua atividade é máxima. Valores acima ou abaixo desse ponto ótimo acabam afetando negativamente na atividade enzimática. O pH do meio desempenha um papel fundamental, pois determina as cargas dos aminoácidos que constituem a enzima. A alteração destas está relacionada com as alterações conformacionais da molécula do

biocatalisador. A estabilidade da atividade enzimática bem, como a formação do complexo enzima-substrato, está diretamente ligado ao comportamento ácido-base do meio, as cargas elétricas do substrato, concentração de substrato e temperatura (GAMA, 2003).

A influência do pH foi estudada nas três condições de trabalho, 1- solução enzimática, 2- enzimas imobilizadas em quitosana 3,5% e 3- enzimas imobilizadas em quitosana-3,5% alginato-3,5% ativadas com glutaraldeído. Foi escolhido os biocatalisadores descritos pois tiveram melhores desempenhos quando comparado a suportes com mesma concentração de quitosana e quitosana/alginato tanto nos parâmetros já estudados, tanto nas características mecânicas. O ensaio foi realizado através da hidrólise do papel de filtro Whatman nº1 a temperatura de 50°C. Os resultados estão apresentados na Figura 27:

Figura 27: influência do pH na atividade enzimática da solução enzimática, suporte quitosana - 3,5% e suporte híbrido quitosana/alginato - 3,5%.



As celulasas solúveis possuem uma maior atividade em regiões ácidas. No presente trabalho, a enzima celulase Celluclast 1.5 da Novozymes possui um pH ótimo em torno de 4 e valores semelhantes são encontrados nos trabalhos de Adriano (2008) e Martins (2007) com um pH ótimo em torno de 4,5.

Enzimas imobilizadas tiveram desempenhos diferentes quando comparados com as enzimas solúveis. Enzimas imobilizadas em suportes de quitosana-3,5% tiveram um melhor desempenho em pH 5. Enzimas imobilizadas em suportes quitosana-3,5%;alginato-3,5% tiveram um desempenho semelhante aos suportes descritos

anteriormente com desempenho em uma faixa ótima de trabalho de pH 4 a 5. Esses desempenhos são satisfatórios, visto que a atividade enzimática teve seu desempenho em condições menos severas de pH. Em processos a nível industrial não haveria a necessidade da adição de grandes concentrações de um produto químico para abaixar muito o pH, pois com a utilização dos suportes o processo se desenvolveria em condições mais amenas em torno de pH 5. Os resultados na Figura 27 também mostram que em pH alcalino acima de 7, os biocatalisadores possuem desempenho melhor que as enzimas solúveis.

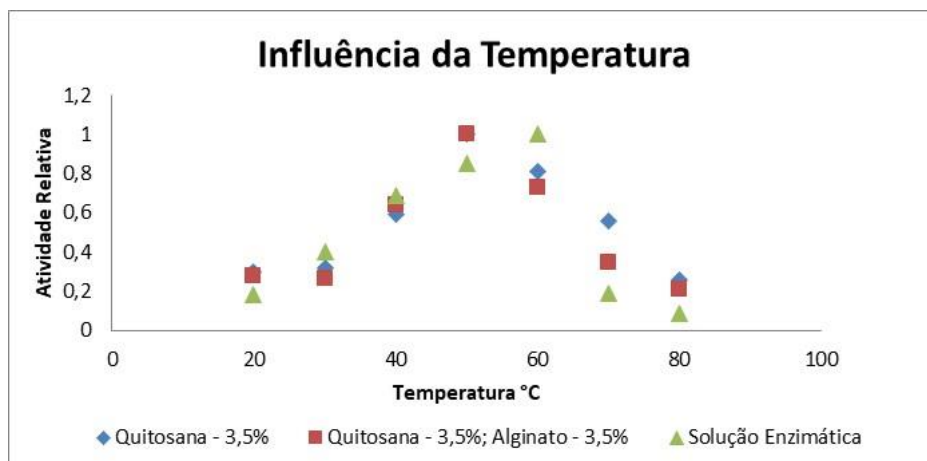
Castro e Pereira Jr. (2009) fizeram observações que celulasas produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0), enquanto bactérias chegam a produzir celulasas altamente ativas em valores de pH alcalinos, logo a melhor celulase a ser empregada vai ser em função do processo de hidrólise determinado e do custo benefício.

Milagre e Teixeira (2020) mostram que o uso dos biocatalisadores dentro dos princípios da química verde se mostra muito promissor pois é possível promover condições reacionais brandas e seguras que acontecem em água e produtos pouco tóxicos, sendo desnecessária grandes correções de pH para o processo se tornar viável.

5.5 Influência da temperatura

A influência da temperatura foi estudada nas três condições de trabalho, 1-solução enzimática, 2- enzimas imobilizadas em quitosana 3,5% e 3- enzimas imobilizadas em quitosana-3,5% alginato-3,5% ativadas com glutaraldeído pois tiveram melhores desempenhos quando comparado a suportes com mesma concentração de quitosana e quitosana/alginato. O ensaio foi realizado através da hidrólise do papel de filtro Whatman nº1 em pH 4,8 e avaliado a atividade enzimática nas três condições em uma faixa de temperatura de 20 a 80°C. Os resultados estão apresentados na Figura 28:

Figura 28: influência da temperatura na atividade enzimática da solução enzimática, suporte quitosana - 3,5% e suporte híbrido quitosana/alginato - 3,5%.



Celulases solúveis no meio possuem uma atividade maior em temperaturas até 60°C. Em temperaturas acima desse valor, a atividade enzimática cai drasticamente; logo não é recomendado temperaturas acima de 60°C. Trabalhos semelhantes corroboram com esses valores. Martins (2007), em suas análises obteve para celulases Celluclast 1,5 L, fornecidas pela Novozymes uma temperatura ótima de 55°C. Adriano (2008), como o mesmo coquetel enzimático obteve atividade relativa que a enzima solúvel atua bem em temperatura de aproximadamente 60°C.

Enzimas imobilizadas tiveram desempenhos diferentes quando comparados com as enzimas solúveis. Enzimas imobilizadas em suportes de quitosana-3,5% tiveram um melhor desempenho em temperaturas em torno de 50°C. Em temperaturas acima de 50°C, a queda da atividade enzimática foi gradual, 81% da atividade relativa a temperatura de 60°C e 56% a temperatura de 70°C, logo celulases imobilizadas em suportes a base de quitosana-3,5% suportam bem a variação de temperatura.

Enzimas imobilizadas em suportes híbridos quitosana-3,5%;Alginato-3,5% tiveram desempenhos semelhantes aos suportes a base de quitosana. Celulases imobilizadas nos suportes híbridos tiveram um melhor desempenho em temperaturas em torno de 50°C. Em temperaturas acima de 50°C a queda da atividade enzimática foi gradual, 73% da atividade relativa a temperatura de 60°C e 35% a temperatura de 70°C, um desempenho inferior às enzimas imobilizadas no suporte a base de quitosana, logo celulases imobilizadas em suportes a base de quitosana-3,5%;alginato-3,5% suportam bem a variação de temperatura em faixas mais curtas de trabalho, até 60°C

aproximadamente, em temperaturas acima de 60°C o alginato não mantém sua estrutura geleificante.

A nível industrial as enzimas celulases imobilizadas possuem um desempenho melhor que as enzimas solúveis pois possuem uma atividade enzimática maior em temperaturas menores quando comparado com enzimas solúveis, sendo um ponto positivo, pois quanto menor a temperatura, menos energia é gasta no processo para aquecimentos.

Teixeira e Milagre (2020) mostram que biocatalisadores dentro da química verde são muito eficientes pois trabalham em condições de temperatura ambiente o que é um ponto muito positivo uma vez que demanda uma quantidade menor de energia, ponto este corroborado com os resultados obtidos, já que o biocatalisador apresentou uma atividade enzimática maior em condições mais brandas de temperatura.

5.6 Estabilidade térmica

Os resultados para o ensaio estão demonstrados na Figura 29, seguido da Tabela 7 com os tempos de meia vida ($t_{1/2}$), constante de inativação térmica (K_d) e fator de estabilidade (FE) para cada biocatalisador analisado.

Figura 29: influência da temperatura na estabilidade térmica da solução enzimática, suporte quitosana - 3,5% e suporte híbrido quitosana/alginato - 3,5%.

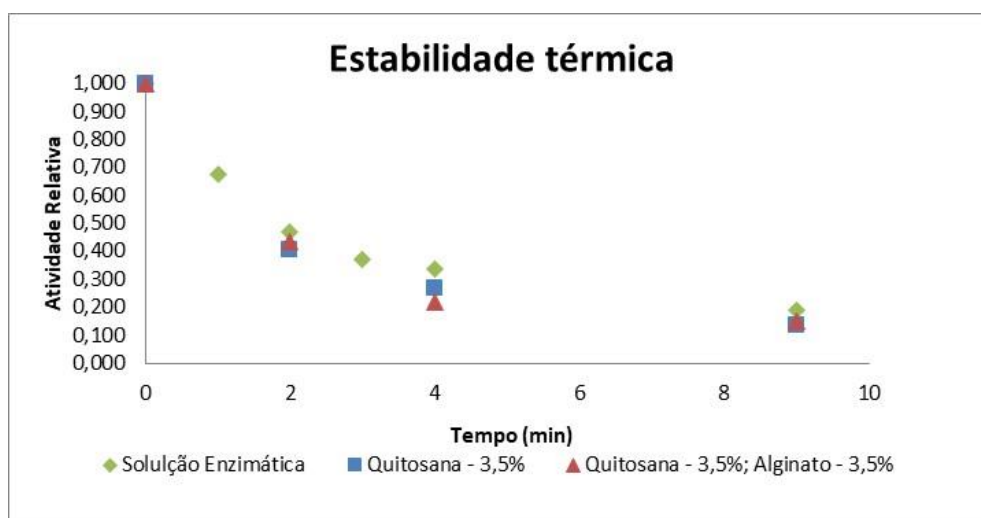


Tabela 7: Estabilidade térmica a 65 °C para as celulasas livres e imobilizadas ativados com glutaraldeído.

BIOCATALISADOR	Tempo de meia vida($t_{1/2}$)min	Constante de inativação (kd) min^{-1}	Fator de estabilidade (FE)
Enzima livre	1,80	0,38	1,00
Quitosana - 3,5%	1,76	0,39	0,98
Quitosana - 3,5%; Alginato-3,5%	1,60	0,43	0,89

Os dados obtidos no ensaio não condizem com os resultados obtidos no ensaio da influência da temperatura. Algum fenômeno influenciou no desempenho inferior de enzimas imobilizadas frente às enzimas solúveis, uma explicação pode ter sido a baixa carga de enzimas na imobilização que acaba reduzindo a atividade enzimática. Deve-se obter biocompostos imobilizados com uma carga maior fornecida de enzimas e posterior um novo estudo, visto que enzimas imobilizadas não tiveram uma redução drástica na variação da temperatura. A imobilização enzimática deve ser realizada com uma elevada carga enzimática devido a complexa estrutura da celulase, em baixas cargas na imobilização as enzimas imobilizadas tendem a ter o mesmo desempenho das enzimas em solução ou até mesmo com desempenhos inferiores.

5.7 Testes de Dessorção Enzimática

O teste de dessorção tem por finalidade a eliminação de toda enzima eventualmente apenas adsorvida no suporte, que não tenha estabelecido ligação covalente com os grupos reativos do suporte.

Após realizado a etapa de imobilização enzimática foi realizado o teste de dessorção enzimática em que os biocompostos foram incubados em soluções de NaCl 0,5M durante 24 horas sob agitação moderada.

Nenhuma atividade foi detectada nas soluções de incubação dos derivados realizada pelo método DNS já descrito, o que indica que a enzima efetivamente ligou-se ao suporte covalentemente.

5.8 Ajuste da carga enzimática

Com o fornecimento da carga enzimática variável na imobilização, foi possível determinar a melhor carga de enzimas fornecida ao suporte, bem como a melhor composição para o suporte (quitosana ou quitosana/alginato). A imobilização de celulases deve ser analisada com cuidado, pois as enzimas celulolíticas são agrupadas em pelo menos 15 das mais de 80 famílias estruturais conhecidas de glicosil hidrolases e classificando-as ainda em 4 dos 14 agrupamentos de família comum com base em semelhanças estruturais, logo podem ter desempenhos diferentes frente a diferentes substratos (SANDGREN *et al.*, 2005 *apud* GOYARI e SINGH, 2019).

Os processos hidrolíticos da biomassa não são triviais devido as complexas interações entre hemicelulose, celulose e lignina, bem como a natureza cristalina da celulose (CASTRO e PEREIRA JR., 2009). Essa não é a única complexidade do processo hidrolítico, já que a atuação do complexo celulolítico ainda não é completamente elucidada devido a estrutura complexa da celulose, as diferentes celulases estruturais. Nesse sentido diferentes celulases são necessárias para degradar completamente o polímero e liberar glicose (SPEROTTO, 2014).

Desta maneira, o excesso de proteína oferecida na imobilização poderia acarretar em uma imobilização seletiva comprometendo o processo de hidrólise do polissacarídeo visto que a celulase atua como um complexo de enzimas.

As Figuras 30 e 31 apresentam os resultados de rendimento de imobilização e o desempenho das enzimas imobilizadas em suportes de quitosana 3,5% e quitosana 3,5% / alginato 3,5%, na hidrólise do papel de filtro. Os suportes que apresentaram melhores desempenhos de imobilização e resistência mecânica foram os utilizados nesse estudo.

Figura 30: Rendimento de imobilização com variação da carga enzimática oferecida a diferentes composições do suporte.

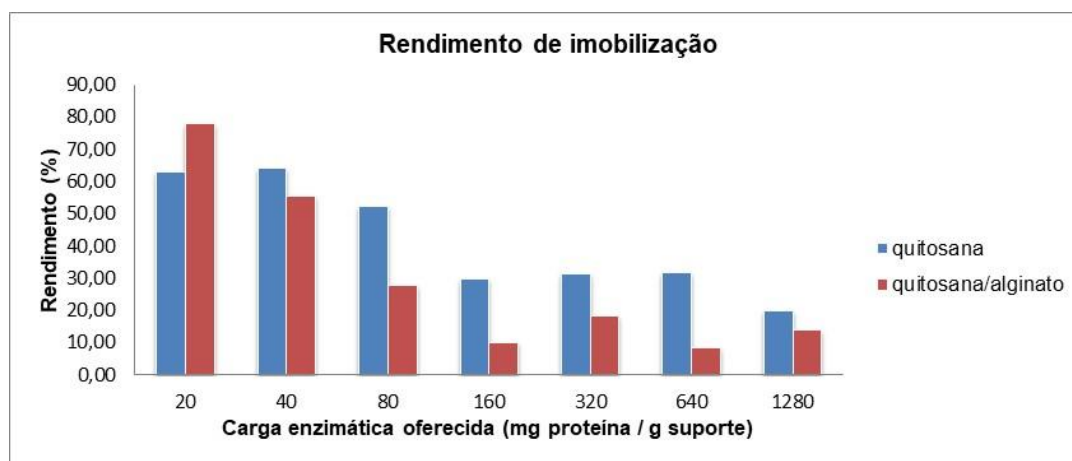
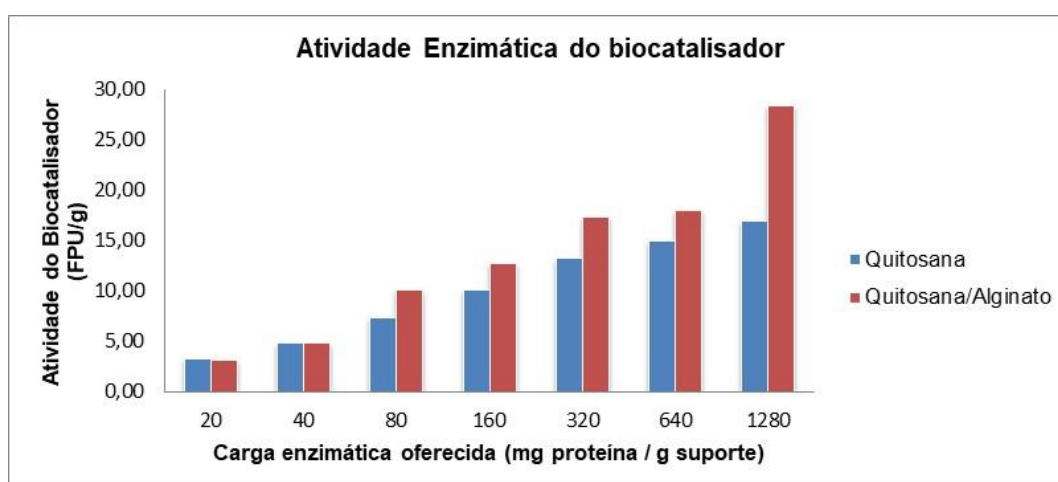


Figura 31: Atividade enzimática dos biocatalisadores quitosana e quitosana/alginato após o fornecimento de diferentes cargas enzimáticas na imobilização.



Ao analisar as duas figuras é possível observar que é esperado o rendimento de imobilização diminuir com o aumento do fornecimento de enzimas. O rendimento máximo alcançado no processo se dá no suporte quitosana-3,5% / alginato-3,5% com carga enzimática de 20 mg_{proteína}/g_{suporte}, com 78,13% de rendimento de imobilização e o que obteve menor rendimento de imobilização também foram os suportes de quitosana/alginato com valores de 8,45% para 640 mg_{proteína}/g_{suporte} e 13,79% para 1280 mg_{proteína}/g_{suporte}. No entanto quando é analisado somente a atividade enzimática obtida no biocatalisador, aquela que obteve a maior atividade após o processo foi o suporte de quitosana/alginato com carga de 1280 mg_{proteína}/g_{suporte} com atividade média de 28,438 FPU/g_{suporte}, sendo cerca de 60% superior a atividade do

biocatalisador em suporte de quitosana com fornecimento da mesma carga enzimática na imobilização e 63% superior ao biocatalisador em mesmo suporte, mas com o fornecimento da metade da carga enzimática na imobilização. Os resultados podem ser melhor visualizados na Tabela 8. O fornecimento de baixas cargas enzimáticas na imobilização compromete o desempenho de hidrólise, provavelmente por vários motivos, um deles é que algumas enzimas sofrem inativação por ter ligação das cadeias laterais ao suporte, realizando assim uma ligação multipontual das enzimas ao suporte com isso modificando o sítio ativo. Como a celulase é na verdade um complexo enzimático que inclui várias enzimas, algumas podem não ter se ligado ao suporte comprometendo assim a atividade do biocatalisador tanto pela falta de uma enzima do complexo celulolítico como pela dificuldade do substrato encontrar o sítio ativo da enzima específica, já que cada enzima do complexo atua em um único substrato. O fornecimento de uma alta carga enzimática na imobilização como visto nos resultados é preferível visto que a quantidade de grupos ativos em uma solução é limitada, logo uma imobilização enzimática será preferível com quanto mais grupos ativos tiver na solução (HAN *et al.*, 2018). O complexo enzimático possui enzimas que desempenham diversas funções até a liberação de unidades de glicose finais, o excesso de uma carga enzimática possibilita a imobilização de todo o complexo bem como a redução da distância entre cada grupo ativo eliminando o efeito da difusividade enzima-substrato. Pereira (2019), em seu trabalho utilizou em processo semelhante, como suporte de quitosana 0,5% com fornecimento de cargas enzimáticas de 40,2 a 1340 mg_{proteína}/g_{suporte}, com rendimento máximo de imobilização de 80% para um fornecimento de 40,2 mg_{proteína}/g_{suporte} e uma atividade máxima alcançada com uma carga de 134 mg_{proteína}/g_{suporte}, mostrando que cargas superiores levaram a uma imobilização seletiva comprometendo a hidrólise. Han *et al.*, (2018) imobilizou celulasas em suportes inorgânicos e concluiu que o aumento da carga enzimática na imobilização melhorou a atividade enzimática, mas após uma certa carga a atividade acaba diminuindo devido ao efeito do impedimento estérico, no qual um grande número de enzimas é fixadas ao suporte, fazendo com que o espaço entre estas se tornem cada vez menor e, com isso modificando a estrutura da enzima e consequentemente o sítio ativo ou regiões de ligação ao substrato. Estudos sobre a influência da carga enzimática na imobilização ainda são escassos.

O alginato pode ser utilizado sozinho como meio suporte ou combinado como foi o caso com a quitosana. A interação da quitosana com o alginato ocorre por meio de

uma reticulação iônica (BERGER *et al.*, 2004). A interação entre poliânions e policátions faz com que a densidade de reticulações na superfície do suporte aumente (BAI; WU, 2021), assim como a característica das reticulações, promovendo uma maior estabilidade da enzima imobilizada, não comprometendo seu centro catalítico. A presença do alginato melhorou a atividade enzimática na imobilização. Li *et al.*, (2019) em trabalho semelhante mostra como o alginato de sódio melhora as propriedades da enzima imobilizada bem como as propriedades do suporte e infere que a concentração de 3,5% é o ideal para o suporte.

Tabela 8: Atividade enzimática dos biocatalisadores frente as diferentes cargas enzimáticas na imobilização.

Carga enzimática (mg/g_{suporte})	Quitosana-3,5%		Quitosana-3,5%/Alginato-3,5%	
	Atividade média (FPU/g)		Atividade média (FPU/g)	
20	3,240	±0,102	3,174	±0,145
40	4,772	±0,375	4,832	±0,154
80	7,380	±0,634	5,767	±0,453
160	10,130	±0,333	12,760	±0,579
320	13,224	±0,124	17,393	±1,921
640	14,977	±0,378	18,045	±0,561
1280	16,993	±0,005	28,438	±0,891

5.8 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos e reuso do biocatalisador

5.8.1 Tratamento ácido e alcalino dos resíduos lignocelulósicos

Entre as diferentes tecnologias de pré-tratamento, a explosão a vapor, um efeito térmico, é considerado o mais bem-sucedido e amplamente utilizado, e quando combinado a um ácido e (ou) uma base, efeitos químicos, junto a efeitos mecânicos de fracionamento, que atuam em conjunto sobre a biomassa possuem efeitos benéficos maiores ainda na separação dos constituintes majoritários da biomassa, (DUQUE *et al.*, 2016).

O pré-tratamento ácido é considerado eficaz e econômico na hidrólise da hemicelulose. Tratamentos alcalinos são eficientes para promover o rompimento das paredes celulares lignocelulósicas por dissolução de hemicelulose, lignina e sílica. Dentre os álcalis que podem ser utilizados o que demonstra maior eficiência frente a todos os outros é o hidróxido de sódio (REZENDE *et al.*, 2011).

O presente estudo não teve como objetivo estudar as diferentes tecnologias de pré-tratamentos, tão pouco o seu efeito combinado, logo a tecnologia utilizada foi a que a literatura aponta como sendo a mais eficiente, um efeito mecânico com fracionamento da biomassa tornando-a com tamanho menor que 50 mesh, seguido de uma explosão a vapor em meio ácido para solubilização da hemicelulose e posteriormente uma segunda explosão a vapor em meio alcalino, para solubilização da lignina. A Tabela 9 mostra o rendimento de cada etapa (ácida e alcalina) no tratamento de explosão a vapor em meio ácido e posterior meio alcalino.

Tabela 9: Rendimento mássico de solubilização após as etapas de pré-tratamento dos resíduos.

Rendimento de extração (%)		
Etapas	Bagaço Cana-açúcar	Casca de café
1ª etapa (ácida)	74,51	49,36
2ª etapa (alcalina)	66,73	59,1
$\frac{Etapa1 * Etapa2}{100}$	49,72	29,17

A maior parte dos trabalhos que estudam a hidrólise de resíduos lignocelulósicos abordam como pré-tratamento do material uma etapa básica somente. Wanderley (2012) aplicou como pré-tratamento a explosão a vapor em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, com rendimento de solubilização de 50%. Pratto (2015) aplicou também como pré-tratamento da palha da cana-de-açúcar a explosão a vapor em meio alcalino, com rendimento de solubilização de 50,50%. Comparando os dois valores mencionados com o resultado obtido na 2ª etapa, pode-se concluir que o rendimento obtido neste trabalho foi superior, mostrando que uma etapa ácida anterior melhora a deslignificação alcalina. Silva (2017), avaliou os efeitos combinados dos pré-tratamentos de explosão a vapor e deslignificação alcalina, o resíduo que sofreu um tratamento de explosão em meio ácido teve um rendimento de 76,18% e posteriormente um rendimento de 58,63% na deslignificação alcalina, tendo um

rendimento combinado das duas etapas de 44,66%. Os resultados encontrados se aproximam dos resultados obtidos por Silva (2017), com rendimento combinado de 49,72% e pode refletir em uma melhor conversão enzimática.

Ensaio de pré-tratamento da casca de café para posterior hidrólise não são uniformes, oferecendo metodologias diferentes e, logo, resultados não comparativos. Silva (2019), no pré-tratamento da casca de café como matéria prima em processos fermentativos avaliou a variação de condições na hidrólise alcalina, como o tempo e a concentração do hidróxido de sódio no processo e o restante semelhante ao aplicado nesse trabalho, obtendo uma biomassa recuperada de 55% e uma baixa concentração de glicose na solução em condições de 100 mg/g de NaOH e 60 min, mostrando que a explosão a vapor nessas condições proporciona uma maior recuperação da biomassa e menor degradação da celulose. Kumar *et al.* (2019) estudaram a sacarificação de alguns resíduos lignocelulósicos, inclusive a casca de café, pré-tratados em diferentes condições. A casca de café possuía *in natura* 50,7 % ($\pm 0,11$) de celulose, 24,3% ($\pm 0,03$) de hemicelulose e 15,6% ($\pm 0,03$) de lignina, após o tratamento com H₂SO₄ (2%) os resultados obtidos foram 56,18% ($\pm 0,03$) de celulose, 21,01% ($\pm 0,21$) de hemicelulose e 11,31% ($\pm 0,21$) de lignina, para o pré-tratamento com NaOH (2%) os resultados obtidos foram 58,81% ($\pm 0,10$) de celulose, 20,31% ($\pm 0,10$) de hemicelulose e 9,98% ($\pm 0,11$) de lignina, por final para o tratamento de explosão a vapor os resultados obtidos foram 58,5% ($\pm 0,05$) de celulose, 20,8% ($\pm 0,08$) de hemicelulose e 10,2% ($\pm 0,08$) de lignina, isso mostra que o ganho percentual de celulose na biomassa após cada tratamento foi pequeno e a extração de lignina e celulose também foi pequeno, podendo comprometer a hidrólise em sequência. Collazo-Bigliardi *et al.* (2018) estudaram o isolamento e caracterização da celulose microcristalina e nanocristais de celulose da casca de café, na etapa de pré-tratamento do resíduo. Foi aplicado um tratamento alcalino com NaOH 4% a temperatura ambiente e refluxo de 3 sob agitação constante, obtendo como resultado para a casca de café *in natura* 35,4% ($\pm 0,9$) de celulose, 18,2% ($\pm 1,3$) de hemicelulose e 23,2% ($\pm 0,5$) de lignina. Após o pré-tratamento os resultados foram de 52,6% ($\pm 1,1$) de celulose, 19,0% ($\pm 0,2$) de hemicelulose e 20,4% ($\pm 0,6$) de lignina, mostrando um ganho de celulose na biomassa mas não extraíndo a lignina da composição conferindo ainda uma complexidade a estrutura da biomassa. Comparando os resultados obtidos no presente trabalho para a casca de café com os obtidos pelos autores descritos anteriormente, verificou-se uma extração maior da hemicelulose e lignina no pré-

tratamento e uma maior disponibilização de celulose e, conseqüentemente, uma maior área superficial para o ataque enzimático.

5.8.2 Hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos utilizando enzima livre e imobilizada

Os resultados apresentados nas Figuras 32 e 33 mostram os perfis de concentração de açúcares redutores liberados em função do tempo na hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar e da casca de café, tendo como catalisadores: enzima livre e imobilizada em quitosana com atividade enzimática média de 2,93FPU/g de suporte e quitosna/alginato com atividade média de 28,48FPU/g de suporte. Nota-se que a enzima livre apresentou velocidade de reação menor desde o início em ambos substratos, resultando em uma menor conversão quando comparado aos imobilizados. Esse comportamento é devido a maior estabilidade reacional do imobilizado, fato não presenciado na reação catalisada pela enzima solúvel. A ausência de efeitos difusionais favorecem a reação catalisada pela enzima solúvel nas primeiras horas do processo, ausência essa não esperada para o imobilizado devido à dificuldade de o substrato encontrar o centro catalítico, ainda assim o desempenho foi melhor mostrando que o processo de imobilização melhora a atividade enzimática. Vale ressaltar que ambas as hidrólises foram submetidas sob as mesmas razões de atividade enzimática por massa de substrato.

Figura 32: Concentração de açúcares liberados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por enzimas solúveis e imobilizadas.

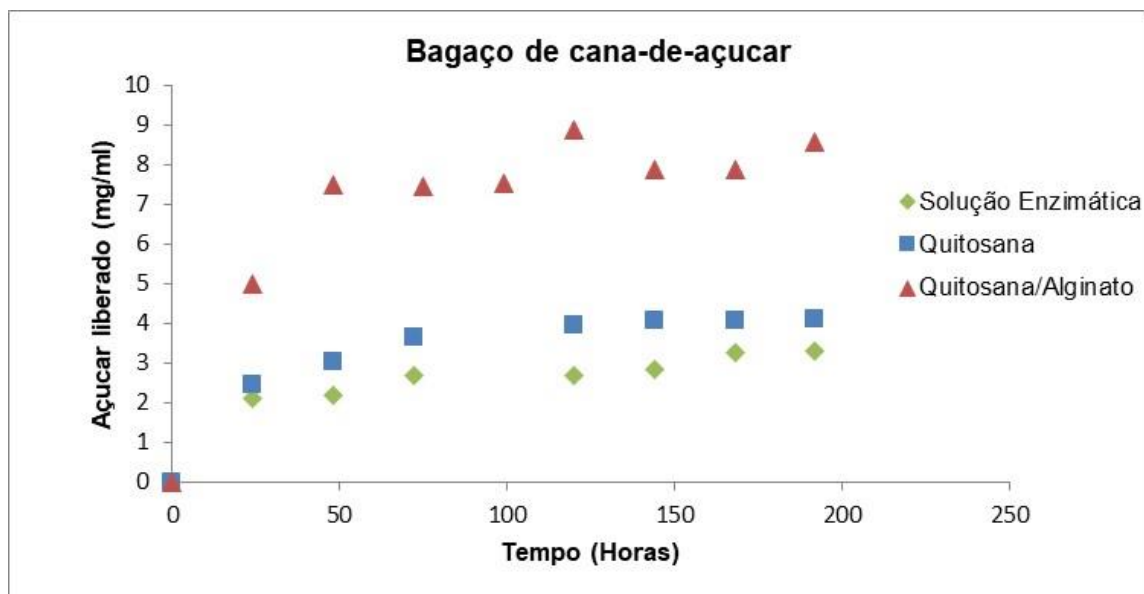
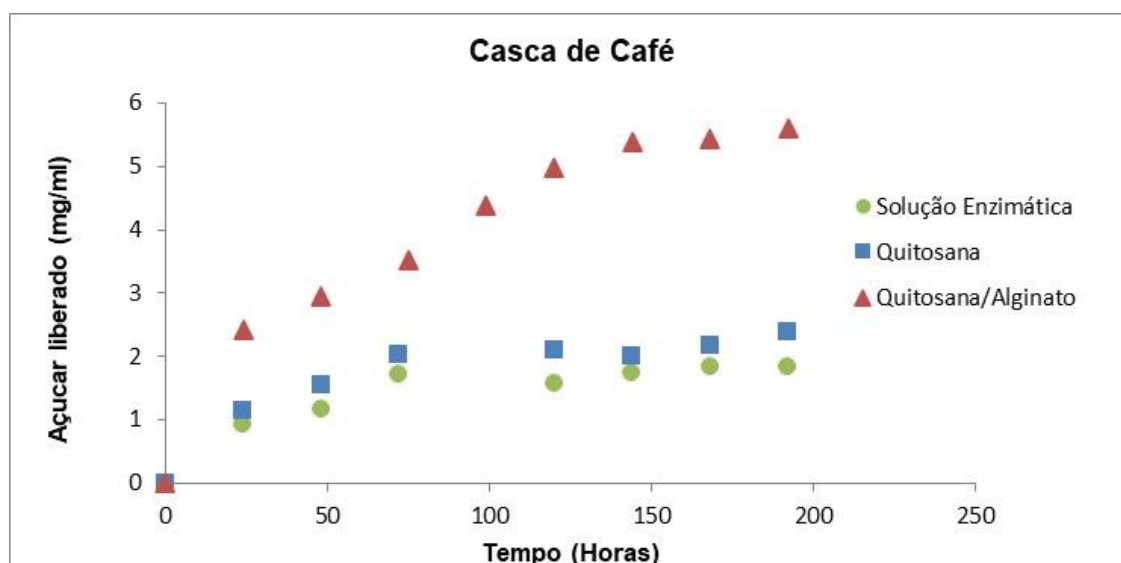


Figura 33: Concentração de açúcares liberados na hidrólise da casca de café por enzimas solúveis e imobilizadas.



Os resultados obtidos para a casca de café e bagaço da cana-de-açúcar reafirmam que o processo de hidrólise de resíduos lignocelulósicos devem ser estudados de acordo com cada resíduo (substrato), para que as condições operacionais sejam determinadas de forma que os processos se tornem viáveis. Sob as mesmas condições operacionais, é possível observar que a hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar liberou um maior teor de açúcares na solução comparado com a casca de café,

sendo que ambas foram submetidas aos mesmos processos de pré-tratamento. Um fato importante é que além dos componentes majoritários na biomassa, a casca de café possui componentes como proteínas (8-11%), cafeína (1%) e taninos (5%), sendo que esses dois últimos podem não ser vantajosos a diversas possibilidades relacionadas ao uso da casca de café como matéria-prima em bioprocessos devido ao seu potencial tóxico, logo podendo atuar como inibidores enzimáticos ou limitadores do processo (SILVA, 2019).

Analisando a hidrólise do bagaço, realizada durante oito dias, foi verificado que o desempenho das enzimas imobilizadas foi superior às enzimas solubilizadas, mostrando uma maior estabilidade dos híbridos no processo e melhor interação enzima-substrato. Comparando a solução enzimática com enzimas imobilizadas em quitosana nas primeiras 24 horas de processo, observou-se um desempenho semelhante dos dois biocatalisadores e, com o decorrer do processo fica evidente o melhor desempenho das enzimas imobilizadas, com uma maior liberação de açúcares. Com 48 horas de hidrólise, o híbrido é capaz de liberar em torno de 28% a mais de açúcares quando comparado com a hidrólise realizada pela solução enzimática, já com 120 horas o híbrido foi capaz de hidrolisar 32% a mais, representando um ganho significativo no processo. Ao final das 192 horas de processo, houve um pequeno incremento na concentração de açúcares liberados na hidrólise realizada pelos dois biocatalisadores, em torno de 20%, o que pode não ser viável industrialmente considerando o tempo gasto para um pequeno adicional de açúcares liberados.

A hidrólise do bagaço realizada pelo imobilizado em quitosana/alginato teve um desempenho muito superior comparado aos outros dois biocatalisadores. Seu desempenho foi ascendente na liberação de açúcares até as primeiras 75 horas, após este tempo o comportamento foi quase uma constante, tendo pequenos incrementos. De 24 para 75 horas de processo, o incremento na liberação de açúcares foi de aproximadamente 33,32%, de 75 para 192 horas o incremento foi de aproximadamente 13%, o que pode representar um ganho insignificante de açúcares liberados pelo espaço de tempo do processo. Logo o tempo ideal de hidrólise seria de 72 horas, qualquer tempo superior não haverá grandes ganhos na liberação de açúcares o que industrialmente é negativo. Quando comparamos os resultados obtidos pelos dois biocatalisadores o imobilizado em quitosana/alginato teve um desempenho muito superior, com conversão de 2,1 vezes superior ao imobilizado em

quitosana, confirmando que a imobilização enzimática deve ser realizada com alta carga de enzimas para que o complexo sistema estrutural da celulose possa ser rompida e que suportes híbridos oferecem uma melhor estabilidade enzimática com ganhos nas propriedades do suporte quando comparados separadamente (LIAO *et al.*, 2008; ADAM *et al.*, 2012).

A hidrólise da casca do café obteve um desempenho diferente quando comparado com o bagaço, podemos presumir que somente um método ou conjunto de pré-tratamentos não é o suficiente para condicionar todos os resíduos lignocelulósicos e a interação enzima-substrato não é uniforme frente as diferentes fontes de materiais. O perfil de concentração de açúcares liberados na hidrólise foram semelhantes para a solução enzimática e enzimas imobilizadas em quitosana, com um desempenho pouco melhor do biocatalisador imobilizado e desempenho muito superior para enzimas imobilizadas em quitosana/alginato. Isso mostra que o limitante do processo não é o catalisador, mas a condição da biomassa frente a formação do complexo enzima-substrato e a carga enzimática na imobilização. A hidrólise realizada pela solução enzimática teve um perfil ascendente de liberação de açúcares até as primeiras 72 horas, após esse tempo não houve uma liberação expressiva mostrando que as enzimas sofreram inibição pelas condições de processo, concentração de açúcares e presença de elementos que de alguma forma podem ter contribuído para inativação das enzimas. Já a hidrólise realizada pelo híbrido de enzimas em quitosana/alginato teve um desempenho ascendente na liberação de açúcares durante todo tempo reacional, mostrando que o substrato e as condições reacionais não inativaram por completo o biocatalisador. Freitas (2016) obteve na hidrólise da casca de café 29,04 g/L de glicose utilizando 10% m/v de biomassa e 20 FPU/g de substrato na forma de solução durante 48 horas. Shankar *et al.* (2019) obteve 14,38 g/L de açúcares redutores na hidrólise da casca de café utilizando 10% m/v de biomassa na solução e 50 mg de proteína no processo na forma de solução. Os resultados obtidos no presente trabalho se mostram satisfatórios visto que a carga de substrato foi de 2,5% m/v, 4 vezes menor e uma carga enzimática de 8 FPU/g_{de substrato}, 2,5 vezes menor, liberando cerca de 2,4 g/L de açúcares redutores, qualquer acréscimo na massa de substrato ou na atividade enzimática representa um ganho de açúcares hidrolisados.

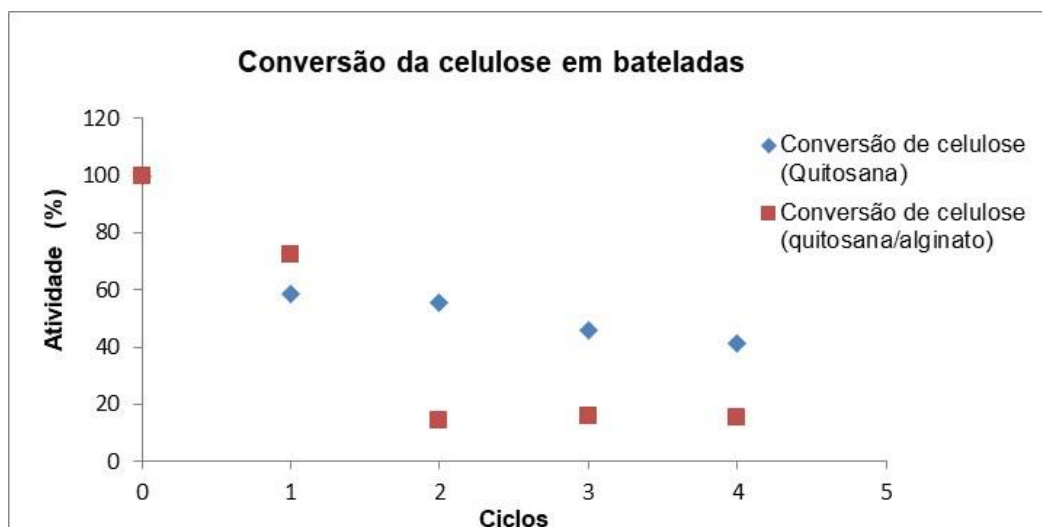
Como na hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar, a hidrólise da casca de café pelos dois biocatalisadores imobilizados mostra resultados bem diferentes, corroborando com o que já foi dito sobre carga enzimática na imobilização, utilização de compostos diferentes como suporte e características do substrato. Uma outra contribuição para um desempenho melhor do alginato no meio suporte na hidrólise do respectivo resíduo, se dá pela capacidade de adsorção física de íons metálicos e compostos orgânicos que podem atuar como inibidores enzimáticos.

Adriano (2008) utilizou 8,8% m/v de substrato pré-tratado e 4,3 FPU/g de substrato de enzimas solúveis e imobilizadas, o desempenho foi semelhante nas primeiras 48 horas, a partir desse ponto o desempenho do imobilizado foi superior que as enzimas solúveis chegando a uma conversão total da celulose de aproximadamente 75% com um substrato de 88% de celulose. Os resultados mostram que concentrações menores de substrato o híbrido tem um desempenho melhor que os obtidos pelas enzimas solúveis devido a não existência dos efeitos difusos e quanto maior o teor de celulose no substrato maior a tendência de liberação de açúcares já que os produtos não possuem grande influência sobre o imobilizado quando a imobilização é realizada com cargas de enzimas ideais.

5.8.3 Reuso do biocatalisador em bateladas sequenciais

A viabilidade da reutilização de celulase imobilizada foi analisada durante uma sequência de quatro bateladas. Utilizou-se o derivado a base de quitosana com atividade média de 3,24 FPU/g de suporte e derivado a base de quitosana/alginato com atividade média de 28,48 FPU/g de suporte, uma carga de substrato de 2,5% m/v e uma atividade oferecida de 8 UFP/g de substrato, parâmetros utilizados para acompanhar a linha de raciocínio empregado na hidrólise dos resíduos lignocelulósicos no item anterior.

A Figura 34 mostra a hidrólise do substrato em 4 bateladas em que o substrato após um ciclo de 48 horas era retirado descartado e o híbrido lavado com água destilada e inserido em uma nova etapa de hidrólise por mais 48 horas.

Figura 34: desempenho do biocatalisador em ciclos.

No ciclo zero o híbrido tem uma conversão total com 100% de sua atividade; na primeira reutilização, ciclo 1, sua atividade cai para 59% da atividade inicial para o biocatalisador tendo como suporte a quitosana, e fecha o 4º ciclo com tempo total de 240 horas e uma atividade de 41% da atividade inicial, uma perda de aproximadamente 59%. Para o biocatalisador que tem como suporte quitosana/alginato, a atividade decai para 72% no primeiro ciclo e fecha o 4º ciclo com uma atividade de 15% da atividade inicial, com perda de 85% da atividade.

O complexo celulolítico é composto por várias enzimas que atuam sinergicamente na hidrólise da celulose e, como é de conhecimento o complexo sofre inibição por formação de produtos e parte dessas enzimas não retornam com sua atividade inicial em outra hidrólise na sequência, comprometendo a viabilidade do processo. Mesmo com esse fato, as enzimas adquiriram uma estabilidade com viabilidade para uso subsequente.

Para os híbridos de quitosana/alginato o desempenho teve uma queda grande no terceiro ciclo, muito provavelmente devido a degradação do suporte, onde as interações quitosana-alginato são do tipo iônica, uma interação fraca que pode ser revertida com variações de pH e temperatura ou até mesmo a prolongados tempos de hidrólise a temperatura de 50°C. Logo, a necessidade de estudos e pesquisas para tornar o suporte que contem alginato menos suscetíveis ao desgaste, visto que é uma tecnologia muito promissora e incentivadora na continuidade da pesquisa.

6. Conclusões e sugestões

6.1 Conclusões

Celulase imobilizada em quitosana e quitosana/alginato ativada com glutaraldeído mostra vantagens significativas quando comparadas à enzima livre em solução. Os resultados obtidos permitiram verificar que há uma influência positiva na adição de copolímeros no protocolo de imobilização de celulase em quitosana. O rendimento de imobilização não é um parâmetro de grande valia em processos de imobilização visto que altos valores de rendimento não refletem em grandes atividades alcançadas no biocatalisador imobilizado.

Celulases imobilizadas em quitosana com composição de 2 a 5% no suporte tiveram um rendimento de imobilização de 76,14 a 89,43%, rendimento maior de acordo com o aumento de quitosana no suporte. No entanto, a atividade enzimática diminui com o aumento de quitosana no suporte, tendo uma carga enzimática baixa e fixa durante a imobilização, variando de 3,46 a 1,38 FPU/g de suporte, à atividade enzimática diminui de acordo que aumenta a concentração de quitosana no suporte devido ao maior número de reticulações na superfície do suporte, o que mostra a possibilidade de ligações multipontuais afetando o sítio ativo da enzima e prejudicando sua ação, imobilização deficiente de enzimas que compõem o complexo enzimático e a baixa difusividade dos substratos frente a enzima correspondente. Para os suportes com 3,5% de quitosana o tempo de meia vida é de 1,76 min para o imobilizado e 1,80 min para enzima livre, o fator de estabilidade de 0,98 para o imobilizado é muito próximo da enzima livre o que mostra que o imobilizado tem propriedades bioquímicas muito semelhantes às enzimas livres mostrando que a imobilização nesses casos tem o ganho somente na reutilização do biocatalisador imobilizado mas custos adicionais de imobilização.

Adicionando um copolímero à quitosana, no caso o alginato, com composição de 2 a 5% de ambos, há uma melhor estabilidade na atividade do biocatalisador variando de 1,64 a 1,83 FPU/g de suporte, a adição de alginato ao suporte nesse caso não funciona como um estabilizador e as vantagens não são alcançadas devido a baixa carga na imobilização.

O ajuste da carga enzimática mostrou que a imobilização enzimática para suportes contendo quitosana e quitosana/alginato sob condições de excesso de proteína se mostraram muito satisfatórias com ganhos sucessivos na atividade do biocatalisador. A imobilização deve ser realizada com uma razão de excesso de enzimas, para que o complexo possa ter a maior quantidade das diferentes enzimas contidas no suporte. O alginato atuou em consórcio com a quitosana, promovendo a estabilização do biocatalisador e impedindo as ligações multipontuais que comprometem o sítio ativo. Como resultado, as enzimas imobilizadas nos suportes de quitosana/alginato tiveram uma atividade enzimática 1,67 vezes superior as enzimas imobilizadas em quitosana. A hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas imobilizadas mostrou ser promissor no desenvolvimento de um processo industrial, pois os resultados mostraram uma conversão de 2,59 vezes em relação a enzima livre na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e 3,04 vezes em relação a enzima livre na hidrólise da casca de café, viabilizando um custo mais acessível em bioprocessos industriais para processos hidrolíticos.

A reutilização do biocatalisador é um fato que pode ser utilizado nos processos, com 54% em média de atividade enzimática retida no suporte em 3 ciclos de hidrólise, mostrando uma economia considerável na necessidade de reposição enzimática na forma solúvel, porém mais estudos devem ser realizados.

Por ser um suporte de fácil obtenção e o processo de imobilização simples, tornam-se estes biocatalisadores promissores na aplicação e desenvolvimento de processos industriais envolvendo a biocatálise de materiais lignocelulósicos para as mais finalidades possíveis o que estimula a continuidade dos estudos visando sua otimização.

6.2 Sugestões

Como continuidade deste trabalho, pode-se sugerir:

- Pesquisar a influência da geometria do suporte nas propriedades cinéticas e nos parâmetros de imobilização;
- Pesquisar as atividades enzimáticas entre as celulasas em relação a diferentes resíduos lignocelulósicos;

- Pesquisar a influência da seletividade enzimática na imobilização quando o suporte é submetido a um grande excesso de carga enzimática;
- Pesquisar os efeitos da perda de carga enzimática na reutilização do biocatalisador em bateladas sequenciais;
- Otimização dos protocolos de imobilização utilizados nesse trabalho;
- Realizar a modelagem matemática da cinética de hidrólise de resíduos lignocelulósicos catalisados por celulasas imobilizadas em quitosana/alginato e quitosana com outros copolímeros.

7. Referências bibliográficas

ABREU, Flávia Oliveira Monteiro da Silva. **Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos**. 2008. Tese (Doutor em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ADAM, Farook et al. The utilization of rice husk sílica as a catalyst: Review and recent progress. *Catalysis Today*, [s. l.], v. 190, p. 2-14, 1 ago. 2012.

ADRIANO, Wellington Sabino. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. Orientador: Profa.Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano. 2008. 185 f. Tese (Doutor em Engenharia Química) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, São Carlos-SP, 2008.

ALVES, Rosângela Cristina. **Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na solubilização de hemicelulose e produção de açúcares fermentáveis**. 2018. Dissertação (Mestre em biotecnologia aplicada) - Universidade Estadual Paulista, [S. l.], 2018.

ALVIM, J. C.; ALVIM, F. A. L. S.; SALES, V. H. G.; SALES, P. V. G.; OLIVEIRA, E. M.; COSTA, A. C. R. Biorrefinarias: Conceitos, classificação, matérias primas e produtos. *Journal of Bioenergy and Food Science*. Macapá, v.1, n. 3, p. 61-77, out./dez. 2014. DOI: 10.18067/jbfs.v1i3.22

ALVIM, Jonas Chaves et al. **Biorrefinarias: conceitos, classificação, matérias primas e produtos**. JBFS, [S. l.], v. 1, p. 61-77, 15 jan. 2015.

AOUADA, Fauze Ahmad; MATTOSO, Luiz Henrique Capparelli. **Hidrogéis biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento EMBRAPA, [s. l.], ed. 1, 2009.

BAI, Yuan; WU, Wei. The neutral protease immobilization : Physical characterization of sodium alginate-chitosan gel beads. *Research Square*, [s. l.], 20 jul. 2021.

BECARO, Aline Aparecida. **Imobilização e estabilização de D-hidantoinase para produção de N-carbomil-D-fenilglicina**. Orientador: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano. 2008. 125 f. Dissertação (Mestre em biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2008.

BENEVIDES, Lorena Coelho. **Pirólise do bagaço de laranja: Análise cinético dos estágios de secagem e desvolatilização**. Orientador: Prof. Dr. Taisa Shimosakai de Lira. 2015. 80 f. Dissertação (Mestre em energia) - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus-ES, 2015.

BEPPU, Marisa Masumi. **Estudo da calcificação "IN VITRO" de quitosana**. Orientador: Cesar C. Santana. 1999. 137 f. Tese (Doutor em Engenharia Química) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Campinas, 1999.

BERGER, J et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, [S. l.], p.

19-34, 30 set. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9). Acesso em: 20 jul. 2022.

BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 57, p. 19-34, 2004.

BIGLIARDI, Soffia Collazo *et al.* Isolation and characterisation of microcrystalline cellulose and cellulose nanocrystals from coffee husk and comparative study with rice husk. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], 2018.

BORTALOZZO, Nara Gustinelli. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Basso. 2011. 77 f. Dissertação (Mestre em Ciência) - Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2011.

BRANT, Antônio J. C. **Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana e poli(N-vinil-2-pirrolidona)**. 2008. 170 f. Tese (Doutor em química) - Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2008.

BRENA, Beatriz *et al.* Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *In*: GUISAN, Jose M *et al.* **Immobilization of Enzymes and Cells: Methods in Molecular Biology**. 30. ed. New York: Springer, 2013. v. 1051, cap. Chapter 2, p. 15-31. ISBN 978-1-62703-549-1.

CACURO, THIAGO AGUIAR. **Compósitos de Alginato como Material Inteligente, Modulação de Solubilidade e Objeto de Ensino**. Orientador: : Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman. 2019. 121 f. Tese (Doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, Sorocaba, 2019.

CÂMARA, Maurício Melo. **Modelagem e simulação da hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio em meio alcalino**. 2012. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, 2012.

CANTONE, Sara *et al.* Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], p. 453-468, 25 mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C3CS35464D>. Acesso em: 4 jun. 2022.

CASTRO, Aline Machado de; JUNIOR., Nei Pereira. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, [S. l.], ano 1, v. 33, p. 181-188, 25 nov. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>. Acesso em: 8 fev. 2022.

CNA. Panorama do Agro. *In*: CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Panorama do Agro**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>. Acesso em: 5 mar. 2022.

COELHO, José Mauro. Brasil avança no setor de biocombustíveis. **Gov.br**, [s. l.], 12 jul. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/energia-minerais-e-combustiveis/2021/07/brasil-avanca-no-setor-de-biocombustiveis#:~:text=Os%20biocombust%C3%ADveis%20s%C3%A3o%20derivados%20de,%C3%ADndice%20de%20emiss%C3%A3o%20de%20poluentes>. Acesso em: 2 abr. 2022.

COELHO, Maria Alice Zarur *et al.* Introdução a Bioprocessos. *In*: RIBEIRO, Bernardo Dias *et al.* **Microbiologia industrial: Bioprocessos**. [S. l.: s. n.], 2018. v. 1, cap. 8.

DAHIYA, Anju. Reducing enzyme costs, novel combinations and advantages of enzymes could lead to improved cost-effective biofuels production: reducing enzyme costs increases the market potential of biofuels. *In*: BIOENERGY: **Biomass to Biofuels**. [S. l.: s. n.], 2015. cap. 25, p. 407-412. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407909-0.00025-0>. Acesso em: 17 set. 2022.

DANTAS, Julia Maria de Medeiros. **Hidrólise de quitosana a partir de quitosanases e enzimas não-específicas imobilizadas**. Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos. 2019. 84 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

DUQUE, A *et al.* Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment. *In*: MUSSATTO, Solange I. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. [S. l.: s. n.], 2016. cap. 15, p. 349-368. ISBN 978-0-12-802323-5.

EPE. EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis). Ministério de Minas e Energia. 02/07/2021. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2020, [S. l.], 2 jul. 2021.

FLORENCIO, Camila. **Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de Trichoderma spp.** Orientador: Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas. 2011. 86 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, São Carlos, 2011.

FREITAS, Wagner Luis da Costa. **Estudo da casca de café como matéria prima em processos fermentativos**. Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva. 2016. 118 f. Tese (Doutor em ciências) - Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2016.

GAMBARATO, Bruno Chaboli. **Isolamento e caracterização de ligninas de palha de cana-de-açúcar**. Orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves. 2014. 108 f. Tese (Doutor em ciências) - Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2014.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *In*: PURE & App. Chem: **International union of pure and applied chemistry**. 2. ed. [S. l.: s. n.], 1987. v. 59, p. 257-268.

GONSALVES, Arlan de Assis *et al.* Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 34, ed. 7, p. 1215-1223, 2007.

GOYARI, Sailendra; SINGH, Thangjam Anand. Cellulases: The Biomass Transformers to Biofuel Precursors. *In*: SARANGI, Prakash Kumar; NANDA, Sonil. **BIOTECHNOLOGY FOR SUSTAINABLE ENERGY AND PRODUCTS**. [S. l.: s. n.], 2019. cap. 2, p. 32-49.

GRAND VIEW RESEARCH. Market Analyses Report: Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report, 2030. *In*: **Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report, 2030**. [S. l.]: Grand View Research, 2020. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesso em: 10 ago. 2022.

GUISAN, Jose M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. *In*: GUISAN, Jose M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. [S. l.]: Humana Press, 2006. cap. 1, p. 1-11.

HACKENHAAR, Camila Regina. **Desenvolvimento de uma matriz de alginato e gelatina entrecruzada com genipina para imobilização de β -galactosidase**. Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz. 2021. 71 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Porto Alegre-RS., [S. l.], 2021.

HAN, J. *et al.* Preparation and characterization of Fe₃O₄-NH₂@4-arm-PEG-NH₂, a novel magnetic four-arm polymer-nanoparticle composite for cellulase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 130, p. 90-98, 15 fev. 2018.

JESUS, J. Nascimento de. Imobilização da celulase presente em caldo fermentado em um suporte a base de quitosana. **Scientia Plena**, [S. l.], ano 6, v. 14, p. 25/05/2018, 23 jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2018.064202>. Acesso em: 5 jun. 2021.

Li, LJ., Xia, WJ., Ma, GP. *et al.* A study on the enzymatic properties and reuse of cellulase immobilized with carbon nanotubes and sodium alginate. **AMB Expr** **9**, 112 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0835-0>

Liao Wei, *et al.* Kinetic Modeling of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Differently Pretreated Fibers From Dairy Manure. *Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. 2008 Oct 15 [cited 2023 May 10];101:441-451. DOI 10.1002/bit.21921.

LIMA, Janaina de Souza. **Imobilização de celulase em nanopartículas magnéticas encapsuladas em poli(metacrilato de metila)**. Orientador: Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira. 2016. 85 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

LOURENÇON, Tainise Vergara *et al.* Lignina frente a fungos apodrecedores de madeira. **Embrapa**, Paraná, n. 422, 2020. Disponível em: ISSN 1980-3982. Acesso em: 5 mar. 2022.

MAGRO, Lucas Dal. **Desenvolvimento de biocatalisadores compostos por pectinases e celulases imobilizadas para a clarificação de sucos de frutas**. Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues. 2020. 310 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, v.6, p.2-34. **1976**.

MARTINS, RAFAEL ELIAS. **Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana**. 2007. 100 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, SÃO CARLOS - SP, 2007.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. Aminoácidos e proteínas. *In: Bioquímica básica*. 2. ed. [S. l.: s. n.], 1999. cap. 2.1v

MATEO, Cesar *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Science Direct**, [S. l.], v. 40, p. 1451–1463, 30 jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>. Acesso em: 4 jun. 2022.

MELLO, Karine Gargioni P. C. de. **Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e O-carboximetilquitosana**. Orientador: Profº. Dr. Bronislaw Polakiewick. 2009. 99 f. Tese (Doutor) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDES, Adriano A *et al.* Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química nova**, [S. l.], v. 34, ed. 5, p. 831-840, 2011.

MENDES, Adriano A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suportes. *In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro. Biotecnologia Aplicada à agro&industria: Fundamentos e aplicações*. [S. l.: s. n.], 2016. v. 4, cap. 15, p. 529-568.

MENDES, Adriano Aguiar. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. Orientador: Prof. Dr. Raquel de Lima Camargo Giordano. 2009. 225 f. Tese (Doutor em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, [S. l.], 2009.

MENDES, Carolina Rosai. **AVALIAÇÃO DE ESFERAS DE QUITOSANA COMO ADSORVENTE DO CORANTE ACID BLUE 25**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada.) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

MENDES, Thais Demarchi; PACHECO, Thályta Fraga. Guia prático para caracterização de enzimas. **Embrapa**, Brasília, 2021.

MORAES, Flávio Faria de *et al.* Imobilização de enzimas e sua estabilização. *In: BON, Elba Pinto da Silva et al. Enzimas em biotecnologia*. [S. l.: s. n.], 2008. cap. 6, p. 123-151.

MORAIS, Sérgio Antônio Lemos de *et al.* Análise da madeira de pinus oocarpa parte i – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Sociedade de Investigações Florestais**, [s. l.], v. 29, ed. 3, p. 461-470, 2005.

MORDOR INTELLIGENCE. INDUSTRIAL ENZYMES MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2022 - 2027). In: **Global Industrial Enzymes Market**. [S. l.], 2021. Disponível em: https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market?gclid=CjwKCAiA68ebBhB-EiwALVC-NhXjNwsSjPFfpjI3-YIRIANKuoNPAw7dHbk641cjQ6fD9gH6sTcv7RoC8GYQAvD_BwE. Acesso em: 10 ago. 2022.

MÜLLER, José Miguel *et al.* Produção de Alginato por Microrganismos. *Polímeros*, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, ano 2011, v. 21, ed. 4, p. 305-310, 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

NGUYEN, Hoang Hiep; KIM, Moonil. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, [S. l.], p. 157-163, 21 nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>. Acesso em: 21 jul. 2022.

OLIVEIRA, Rodrigo Lira de *et al.* Monitoramento tecnológico da aplicação de enzimas celulolíticas: panorama mundial e brasileiro. **Scientific Journal of Environmental Sciences and Biotechnology**, Garanhuns, ano 2021, v. 7, n. 2, p. 48-58, 31 ago. 2021.

OSBON, Yauheniya; KUMAR, Manish. Biocatalysis and Strategies for Enzyme Improvement. In: *BIOCATALYSIS and Strategies for Enzyme Improvement*. San Marcos, Texas, USA: **IntechOpen**, 2019. cap. 1, p. 1-22.

Pacheco, Thályta Fraga. Guia prático para caracterização de enzimas / Thályta Fraga Pacheco, Thais Demarchi Mendes. – Brasília, DF : **Embrapa Agroenergia**, 2021. PDF (58 p.). – (Documentos / Embrapa Agroenergia, ISSN 2177-4439 ; 35)

PACHECO, Thályta Fraga. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **Embrapa**, Brasília, 2011.

PEREIRA, Mariana Bisinotto. **Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos**. Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez. 2019. 78 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química.) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2019.

PETRI, Denise F. S; OGEDA, Thais Lucy. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA. **Quim. Nova**, [s. l.], ano 2010, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 20 jul. 2010.

PETROBRAS. Petrobras. Biocombustíveis: 50 perguntas e respostas sobre esse novo mercado. [S. l.: s. n.], 2007. 46 p. E-book (46).

PINHEIRO, Bruna Bandeira. **Quitosana ativada com divinilssulfona como um novo suporte para imobilizar e estabilizar enzimas**. Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciana Rocha Barros Gonçalves. 2017. 54 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

POLLETO, C.M. *et al.* Aplicação de celulases imobilizadas na hidrólise de brachiaria brizantha. **COBEQ**, Florianópolis, 2014. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

POLYORGANIC. Porque Usar Enzimas em Alvejantes e Detergentes em Pó para Roupas. *In: Blog*. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://polyorganic.com.br/porque-usar-enzimas-em-alvejantes-e-detergentes-em-po-para-roupas/>. Acesso em: 6 ago. 2022.

PRATTO, Bruna. **Hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar: estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística**. 2015. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, [S. l.], 2015.

QUEISSADA, Daniel Delgado; SILVA, Jesiel Alves da. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, [S. l.], p. 272-286, 16 mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14295/holos.v20i2.12378>. Acesso em: 2 jun. 2022.

REZENDE, Camila Alves *et al.* Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **BioMed**, [S. l.], 2011.

RIBAS, Raphaela. Shell e Raízen firmam acordo de dez anos para produção de etanol de segunda geração. *In: Negócios*. Rio de Janeiro: O GLOBO, 7 nov. 2022. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/economia/negocios/noticia/2022/11/shell-e-raizen-firmam-acordo-de-dez-anos-para-producao-de-etanol-de-segunda-geracao.ghml>. Acesso em: 14 nov. 2022.

SADANA, Ajit; HENLEY, James P. Single-Step Unimolecular Non-First-Order Enzyme Deactivation Kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 30, p. 717-723, 14 abr. 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.260300604>. Acesso em: 20 jul. 2022.

SALIBA, Eloísa de O. S. *et al.* Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química. *Ciência Rural*, [S. l.], ano 5, v. 31, p. 917-928, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000500031>. Acesso em: 5 mar. 2022.

SALOMÃO, Evelyn de Andrade. **Purificação e caracterização bioquímica das amilases produzidas por *Aspergillus sp.* e *Neurospora crassa* exo-1: imobilização da enzima em alginato de sódio**. Orientador: Prof.^a Dra. Giovana Cristina Giannesi. 2017. 69 f. Dissertação (Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS, 2017.

SANTOS, Fernando A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim. Nova**, Viçosa – MG, ano 5, v. 35, p. 1004-1010, 13 jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>. Acesso em: 1 mar. 2022.

SHANKAR, Kumar *et al.* Saccharification of the pretreated husks of corn, peanut and coffee cherry by the lignocellulolytic enzymes secreted by *Sphingobacterium* sp. ksn for the production of bioethanol. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], 2019.

SHELDON, Roger A; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], p. 6223-6235, 27 mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>. Acesso em: 4 jun. 2022.

SILVA, Douglas Fernandes. **Seleção de microrganismos celulolíticos, imobilização e aplicação das celulasas, produzidas e comercial, na hidrólise da celulose**. 2012. 86 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 2012.

SILVA, Nayara Clarisse Soares. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico da casca de café na hidrólise enzimática e produção de biogás**. 2019. Dissertação (Mestre em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, [S. l.], 2019.

SILVA, Tiago Alves Lopes. **Avaliação do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por ácido cítrico e hidróxido de sódio sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2017. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis) - Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.], 2017.

SILVA, Wanessa Braz da *et al.* Monitoramento tecnológico da aplicação de enzimas celulolíticas: panorama mundial e brasileiro. **GEAMA**, [s. l.], p. 48-58, 2021.

SOUSA, Helena Manuela Pala Dias de. **Aplicação de celulasas e Xilanases na reciclagem de fibras de papel**. Orientador: Prof. Dr. Miguel Gama. 2002. 409 f. Dissertação (Doutor em Engenharia Química) - Universidade de Minho, Braga, 2002.

SOUZA, Daniela Tatiane de *et al.* Celulose: pontos de vista. Documentos, [s. l.], ano 2015, n. 18, julho 2015. *E-book* (40p).

SOUZA, Daniela Tatiane. **Celulose: pontos de vista**. Brasília: [s. n.], 2015. 40 p. Disponível em: ISSN 2177-4439. Acesso em: 7 mar. 2022.

SOUZA, Juliana Rodrigues de. **Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em Engenharia de tecidos**. Orientador: Profº. Dr. Reinaldo Giudici. 2017. 144 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SPEROTTO, Raul Antonio. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. Lajeado: [s. n.], 2014. ISBN 978-85-8167-077-5.

TEIXEIRA, Iris S.; MILAGRE, Cintia D. F. **Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores**. Quim. Nova, Araraquara – SP, ano 6, v. 43, p. 773-786, 24 abr. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170538>. Acesso em: 5 mar. 2022.

TOUSHIK, Sazzad Hossen *et al.* Functional Applications of Lignocellulolytic Enzymes in the Fruit and Vegetable Processing Industries. **Food Science**, [s. l.], p. 585-593, 2017.

TRIGUEIRO, Gildênia Pinto dos Santos. **Desenvolvimento de filmes de quitosana com insulina para liberação controlada de fármaco**. Orientador: Prof. Dr. Hélio de Lucena Lira. 2015. 49 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2015.

WANDERLEY, Maria Carolina de A. **Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *saccharomyces cerevisiae* Ufpeda 1238 em processos shf**. 2012. Dissertação (Mestre em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2012.

WU, Jin Chuan; JUTURU, Veeresh. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **ScienceDirect**, [s. l.], p. 188-203, 2014.

WWF. WWF. Potencial de produção sustentável de biocombustíveis no Brasil - 2030. **WWF-Brasil**, [S. l.], p. 1-40, 17 jun. 2021. *E-book* (40p.).

ZADINELO, Izabel Volkweis. **Avaliação de elemento filtrante à base de quitosana na aquicultura**. Orientador: Dr. Robie Allan Bombardelli. 2018. 109 f. Tese (Doutor em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2018.

ZERBINI, Mariana Taíse. **Imobilização e caracterização bioquímica da enzima beta-glicosidase (BG-LFA**. 2020. 101 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2020.

ZORTEA, Luciana Ferreira. **Obtenção de nanocelulose do resíduo de bagaço de cana-de-açúcar para o reforço em máscaras cirúrgicas de tecido não-tecido (tnt)**. 2022. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, [S. l.], 2022.