

# IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE COMERCIAL EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Pietra C. P. Gonçalves<sup>1</sup>, Bruna Pratto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI, São Bernardo do Campo, Brasil.  
uniepigonalves@fei.edu.br, brunapratto@fei.br

**Resumo:** No presente trabalho foi realizada a imobilização do complexo celulolítico *CellicCtec2* em nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-quitosana. As partículas foram sintetizadas por coprecipitação e ativadas em diferentes concentrações de glutaraldeído, enzimáticas e pH. A máxima eficiência de imobilização obtida foi de 78% (2,44% w/w de glutaraldeído, 7,02 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>suporte</sub> ativado e pH 5,81) e a maior atividade enzimática recuperada foi de 89,6% (0,25% w/w de glutaraldeído, 10 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>suporte</sub> ativado e pH 7).

## 1. Introdução

O aumento da produção de biocombustíveis, como o etanol, é crucial para o desenvolvimento de uma matriz energética mais sustentável. A obtenção de etanol de segunda geração (2G), requer etapas de pré-tratamento da biomassa e de hidrólise enzimática - cujas enzimas comercialmente utilizadas são chamadas celulases, esta última com a finalidade de fornecer plataformas açucaradas para posterior fermentação.

No entanto, o alto custo dos complexos enzimáticos utilizados na etapa de hidrólise dos polissacarídeos torna o processo economicamente desafiador [1]. A imobilização das enzimas surge como uma solução promissora, permitindo a recuperação e reutilização do biocatalisador em bateladas subsequentes, reduzindo assim o custo do processo [2]. Matrizes de alginato e quitosana são comuns devido à sua eficiência e baixo custo, porém, a recuperação das enzimas imobilizadas com esses materiais é laboriosa e custosa, inviabilizando o processo em larga escala.

Como alternativa, suportes magnéticos podem facilitar a recuperação das enzimas pela aplicação de um campo magnético externo, mesmo na presença de outros sólidos, como em hidrolisados lignocelulósicos [3].

## 2. Metodologia

Inicialmente, nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foram preparadas usando o método convencional de coprecipitação. Em resumo, a fim de formar os precipitados de magnetita, uma mistura de 0,04 M de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,02 M de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2:1) e 1 g de quitosana foi dissolvida em 800 mL de ácido acético (2% v/v) sob proteção de nitrogênio. Essas nanopartículas foram ativadas em diferentes concentrações da solução de glutaraldeído (0,25 a 3% v/v), com o propósito de oferecer os grupos aldeídos para posterior imobilização.

Após a ativação do suporte, a enzima foi imobilizada em diferentes concentrações de pH de imobilização, glutaraldeído e enzima, conforme o planejamento experimental DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis das variáveis independentes do planejamento DCCR da imobilização das enzimas.

Variável	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Conc. De glutaraldeído (% v/v)	0,25	0,81	1,625	2,44	3
Conc. de enzima (mg <sub>proteína</sub> /g <sub>suporte</sub> )	5	7,02	10	12,02	15
pH	5	5,81	7	7,81	9

A imobilização ocorreu sob agitação suave a 25 °C por 24 h. Após esse período, a solução de enzima remanescente após imobilização foi quantificada quanto ao teor de proteínas de Bradford.

Essa análise permite calcular a porcentagem de imobilização, conforme equação 1:

$$E_i (\%) = 1 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde  $C_i$  é a concentração de proteína da solução de celulase antes da imobilização e  $C_f$  é a concentração de proteína do filtrado após a imobilização.

Após a lavagem das partículas, a enzima foi caracterizada com relação à sua atividade enzimática a partir da metodologia descrita por GHOSE (1987), conforme a equação 2:

$$A (UI) = \frac{dP}{dt} \times V_r \times FD \quad (2)$$

Onde  $\frac{dP}{dt}$  é a velocidade inicial de reação em  $\frac{g_{glicose}}{L \cdot min}$ ;  $V_r$  é a velocidade de reação em L; FD é o fator de diluição do preparo enzimático utilizado para a imobilização.  $MM_{glicose}$  é a massa molar de glicose em  $\frac{g_{glicose}}{\mu mol_{glicose}}$ .

A atividade recuperada ( $A_R$ ) após imobilização foi calculada conforme equação 3:

$$A_R (\%) = \left( \frac{A_d}{A_i * E_i (\%)} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Onde  $A_i$  é a atividade da enzima livre antes da imobilização,  $A_d$  é a atividade total observada no derivado ao final do processo de imobilização.

## 3. Resultados e Discussão

A síntese in-situ das nanopartículas-quitosana, representou a utilização de um método que incorpora a coprecipitação das nanopartículas e o recobrimento com quitosana de forma simultânea. As partículas produzidas

demonstraram boa dispersão e estabilidade em solventes hidrofílicos, como água e etanol.

Além disso, exibiram um notável caráter magnético (Figura 1) quando expostas a um campo magnético externo.

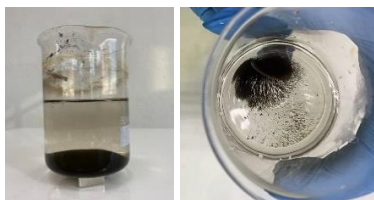


Figura 1 - Nanopartículas Magnéticas revestidas com quitosana

A análise semi-quantitativa de Rietveld exposta na Figura 2 mostra que 66,1% (base mássica) do material cristalino é composto por óxido de ferro na forma magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), enquanto 33,9% se mostra como goetita ( $\alpha\text{-FeO(OH)}$ ). O refinamento mostrou que as partículas de magnetita têm um diâmetro de  $9,25 \pm 0,56$  nm; enquanto as partículas de goetita possuem um tamanho de  $11,92 \pm 0,16$  nm.

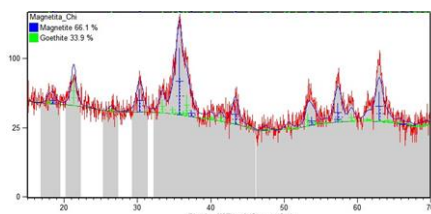


Figura 2 - Difratoograma de partículas magnéticas

Os resultados da ANOVA para ambas a eficiência de imobilização e atividade recuperada são apresentados na Tabela 2. Os dados revelam que a máxima eficiência de imobilização alcançada foi de 78% no experimento 2, enquanto o maior nível de atividade enzimática recuperada foi de 89,6% conforme mostrado na tabela 2, no experimento 9.

Tabela 2 – Resultados do planejamento DCCR no estudo da imobilização de celulasas em nanopartículas magnéticas.

Ensaio	Concentração de glutaraldeído (%v/v)	Concentração de enzima ( $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$ )	pH de imobilização	Eficiência de imobilização (%)	Atividade recuperada (%)
2	+1 (2,44)	-1 (7,02)	-1 (5,81)	78,06	15,54
9	-1,68 (0,25)	0 (10)	0 (7)	19,14	89,58

Para melhor interpretação dos resultados, as superfícies de resposta dos modelos polinomiais de segunda ordem foram exibidas graficamente na Figura 3 e 4. Assim, é possível encontrar não somente um ponto ótimo de operação, mas também uma região de operação que maximize a variável-resposta.

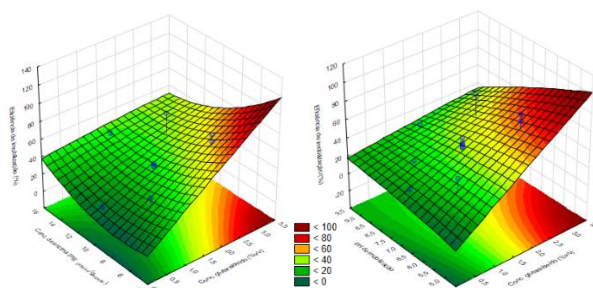


Figura 3 - Superfícies de resposta para eficiência de imobilização

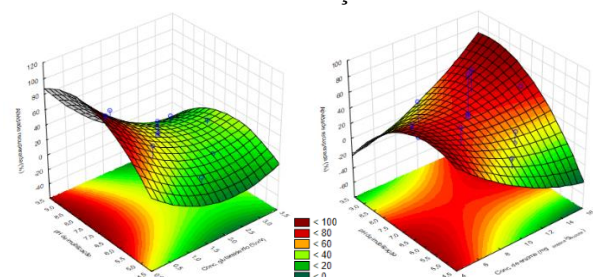


Figura 4 - Superfícies de resposta para a atividade recuperada

A partir dos resultados experimentais e das análises das superfícies de resposta, observa-se que uma maior quantidade de agente reticulante utilizada na ativação do suporte resulta em um aumento na quantidade de grupos aldeídos disponíveis para reagir com a enzima. Isso promove a formação de ligações covalentes entre os grupos amino das enzimas, melhorando a eficiência da imobilização.

No entanto, mesmo com uma alta eficiência de imobilização, a atividade catalítica recuperada foi baixa. Em altas concentrações de glutaraldeído, as fortes interações entre as enzimas e os suportes podem induzir distorções estruturais e reduzir o grau de liberdade das enzimas imobilizadas, comprometendo sua capacidade de catalisar reações específicas e resultando em uma atividade catalítica reduzida. Além disso, o bloqueio dos sítios ativos da enzima pode ocorrer, obstruindo o acesso do substrato e diminuindo significativamente a atividade catalítica.

#### 4. Conclusões

Esses resultados indicam um cenário promissor, sugerindo a imobilização em suportes magnéticos como uma solução eficiente para a reutilização de celulasas. Estudos futuros investigarão as melhores condições de imobilização que maximizem simultaneamente a eficiência de imobilização, atividade enzimática recuperada e estabilidade em ciclos de bateladas de hidrólise.

#### 5. Referências

- [1]ELIAS, Andrew Milli et al. Applied Energy, v. 282, 2021. p. 116133.
- [2]KHOSHNEVISAN, Kamyar et al. Magnetochemistry, v. 5, 2019. 2, p. 36.
- [3]KOPP, Willian et al. Materials Science and Engineering: B, v. 193, 2015. p. 217-228.