



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANO BRISOLA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM CELULOSE E EM
NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA**

Londrina
2018

JULIANO BRISOLA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM CELULOSE E EM
NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer.

Londrina
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B859i Brisola, Juliano.
Imobilização de lipase em celulose e nanocristais de celulose bacteriana / Juliano Brisola. - Londrina, 2018.
98 f.: il.

Orientador: César Augusto Tischer.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Celulose bacteriana - Teses. 2. Hidrólise - Teses. 3. Nanotecnologia - Teses. 4. Biotecnologia - Teses. I. Tischer, César Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

JULIANO BRISOLA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM CELULOSE E NANOCRISTAIS DE
CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMIDADORA

Orientador: Prof. Dr César Augusto Tischer
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr Renato Marcio Ribeiro Viana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 27 de Fevereiro de 2018.

*Queria escrever todas as plantas e pessoas, todos os rios.
Os muros, as cores, os homens.
As senhoras de idade, as caixas de correio, os espanhóis.
Os olhos e as ruas, os tamanhos e larguras, as alturas.
As pernas, os falos, os pêlos, os pulsos.*

*Queria escrever o ritmo das pedras, das estradas calçadas.
Das margaridas. Escrever o que manda e o que obedece.
O que cresce e o que padece de amparo. O que afunda,
o que eclode. Escrever o que não sabe e o que não cabe
Em lugar nenhum.*

*E viver a escrita das coisas. Não as coisas
Que não me cabem. Coisas e pessoas não me cabem
E sem cabimento me atravessam.
Pessoas passam depressa demais entre meus poros. E vão.
Eu tenho uma imagem presa na garganta.
Ser gente me arranha. Quero voltar a ser palavra.*

-

Viviane Mosé

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e as agências de fomento, CAPES, CNPQ e Fundação Araucária pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência durante a orientação e acima de tudo pela sua amizade e pelo incentivo para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Dra. Paula Cristina de Sousa Faria Tischer, pelas vezes que me ajudou no laboratório e pela prontidão em tirar dúvidas que iam surgindo durante a pesquisa, e pela amizade adquirida durante este período.

A Mestra Sabrina Alves de Oliveira, pelas vezes que me ajudou no laboratório, pelo esclarecimento das dúvidas durante a pesquisa, e pela amizade adquirida durante o curso.

Também agradeço as técnicas do laboratório de espectroscopia, Vanessa, Drielle e Mayara pelo auxílio nas análises de RMN, FT-IR e TG, e pela amizade adquirida e pela convivência. Agradeço ao técnico de laboratório Nelson pelo auxílio no laboratório e pela amizade.

Agradeço a todos os mestrandos e doutorandos do programa pela amizade, convívio, apoio e troca de experiências e porque durante este percurso me fizeram crescer como pessoa e profissional.

À minha família pelo apoio, compreensão e companheirismo e carinho que mesmo diante de todos os empecilhos, sempre me apoiaram e me motivaram para que eu estudasse e buscasse novos conhecimentos.

BRISOLA, Juliano. **Imobilização de Lipase em celulose e nanocristais de celulose bacteriana**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A celulose é o biopolímero mais abundante encontrado na natureza, formada por monômeros de celobiose unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). Os vegetais são os principais meios de obtenção da celulose, mas alguns microrganismos também são capazes de produzir, em especial a bactéria *Gluconacetobacter xylinus*. A celulose bacteriana (CB) é sintetizada pura. A CB apresenta alta cristalinidade e retenção de água que faz com que esta tenha uma aplicação em setores como no tratamento de queimaduras, na indústria de cosméticos e no setor alimentício. Devido a suas características químicas e estruturais, a celulose é um material interessante para a imobilização de enzimas de grande valor econômico, como a lipase. Objetivou-se neste trabalho imobilizar lipase em Nanocristais de celulose e celulose bacteriana por ligação covalente. Foram produzidas membranas por fermentação e nanocristais de celulose por hidrólise ácida, em seguida caracterizadas por FT-IR, RMN, DRX e Termogravimetria. Após a caracterização o material foi condensado com ácido succínico e caracterizado novamente pelas mesmas técnicas, após as caracterizações no material succinilado, este foi funcionalizado com lipase e caracterizado novamente por FT-IR, RMN E DRX. Após a caracterização foi realizado o estudo da atividade da enzima imobilizada e quantificada o total de enzimas imobilizadas. Através das caracterizações foi possível observar que houve a funcionalização da celulose com ácido succínico e a imobilização da lipase. Pelo estudo da atividade enzimática, foi possível inferir que após a imobilização a enzima manteve a sua atividade tanto na celulose quanto na membrana de celulose.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter*. Triacilglicerol. Suspensão. Enzimas. Reação de hidrólise.

BRISOLA, Juliano. **Lipase immobilization in bacterial cellulose and nanocrystal cellulose**. 2018. 98 p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant biopolymer found in nature, formed by monomers of cellobiose bound by β -type glycosidic bonds (14). Plants are the main producers of cellulose, some microorganisms, especially the bacterium *Gluconacetobacter xylinus*. Bacterial cellulose (CB) is synthesized without lignin and other contaminating polymers found in vegetable cellulose. The CB has high crystallinity and water retention that makes it have an application in sectors such as the production of artificial furs, the cosmetics industry and the food industry. Due to its chemical and structural characteristics, cellulose is an interesting material for the immobilization of enzymes of great economic value, such as lipase. The objective of this work was to immobilize lipase in nanocrystal cellulose and bacterial cellulose by covalent binding. Membranes were produced by fermentation and nanocrystal cellulose by acid hydrolysis, then characterized by FT-IR, NMR, XRD and Thermogravimetry. After characterization the material was condensed with succinic acid and characterized again by the same techniques, after the characterizations in the succinylated material, it was functionalized with lipase and characterized again by FT-IR, NMR and DRX. After the characterization, the immobilized enzyme activity was studied and the total immobilized enzymes were quantified. Through the characterization it was possible to observe that cellulose was functionalized with succinic acid and lipase immobilization. By the study of the enzymatic activity, it was possible to infer that after the immobilization the enzyme maintained its activity in both the cellulose and the cellulose membrane.

Keywords: *Gluconacetobacter*. Triacylglycerol. Suspension. Hydrolysis reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Química da Celulose.....	16
Figura 2. Comparação nas dimensões das fibras de celulose.	18
Figura 3. Transformação da celulose nativa em vários polimorfos.....	19
Figura 4. Transformação da celulose nativa em vários polimorfos.....	20
Figura 5. Biossíntese da celulose bacteriana	22
Figura 6. Fluxograma de cultivo e produção de nanocristais de celulose celulose bacteriana.....	31
Figura 7. Reação de Succinilação da nanocristais de celulose e da membrana de celulose.	32
Figura 8. Reação de Imobilização de Lipase na membrana de celulose e nos cristais de celulose.....	33
Figura 9. Membrana de Celulose produzida pelo processo de Fermentação. Nanocristais de celulose nativa liofilizada obtido através da Reação de Hidrólise.....	39
Figura 10. Espectro de Infravermelho (FT-IR) da membrana de celulose nativa, succinilada e imobilizada com Lipase	40
Figura 11. Espectro de Infravermelho (FT-IR) da Nanocristais de celulose nativa (NCB), Nanocristais de celulose succinilada (NCB-suc) e da Nanocristais de celulose imobilizada com Lipase (NCB-lip).....	41
Figura 12. Espectro de ^{13}C -RMN de estado sólido de Membrana de Celulose succinilada.....	42
Figura 13. Espectro de ^{13}C -RMN de estado sólido de da nanocristais de celulose succinilada.....	43
Figura 14. Espectro de UV-Vis da membrana de celulose succinilada e funcionalizada com lipase. B: Espectro de UV-Vis da nanocristais de celulose succinilada funcionalizada com lipase.....	44
Figura 15. Imagens de TEM dos nanowhiskers nativos (A) e nanowhiskers succinados (B).....	45
Figura 16. Distribuição do diâmetro e comprimento da NCB nativa, succinilada e conjugada com lipase.	47
Figura 17. Curva TG/TGA para membrana de celulose nativa.....	49
Figura 18. Curva TG/TGA para membrana de celulose succinilada.....	49

Figura 19. Curva TG/TGA para membrana de celulose com lipase imobilizada.....	51
Figura 20. Curva TGA/DTGA nanocristais de celulose nativa	51
Figura 21. Curva TGA/DTGA nanocristais de celulose funcionalizado com ácido succínico.	51
Figura 22. Curva TGA/DTGA nanocristais de celulose funcionalizado com lipase	52
Figura 23. Fotografias das suspensões em relação ao tempo (1h, 3h, 6h, 24h, 144h).	53
Figura 24. Mudança da densidade óptica das partículas da nanocristais de celulose em relação ao tempo, $\lambda = 270$ nm.	54
Figura 25. DRX da celulose e nanocristais de celulose nativa, succinilada e imobilizada com lipase.....	55
Figura 26. Curva Padrão de BSA para a Quantificação de Proteínas totais.....	57
Figura 27. Deslocamento químico típico de ^1H RMN para o óleo Vegetal (A); Reação com lipase não imobilizada (B); Reação com lipase imobilizada na membrana (C); Reação com lipase imobilizada em nanocristais de Celulose (D).....	59
Figura 28. Reação de Hidrólise Catalisada pela Lipase	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio de cultura para o crescimento de <i>Acetobacter hansenii</i>	30
Tabela 2. Análise da degradação térmica das amostras	32
Tabela 3. Concentração de Lipase imobilizada na membrana e na nanocristais de celulose bacteriana.	33
Tabela 4. Comprimento e diâmetro médio dos Nanocristais nativos, succiniliados e imobilizados com lipase	46
Tabela 5. Análise da degradação térmica das amostras.	48

LISTA DE ABREVIações

CNC	Celulose Nanocristalina
CNF	Nanofibrilas De Celulose
MFC	Microfibrilas De Celulose
ATP	Adenosina Trifosfato
ADP	Adenosina Difosfato
UDP	Uridina Difosfato
CeS	Complexo Celulose Sintase
TM	Membranas Transmembranares
GT-A	Membranas-Integrada Glicosiltransferase-A
GT	Membranas-Integrada Glicosiltransferase
BcSA	<i>Bacterial cellulose synthase subunit A</i>
c-di-GMP	diquanosina monofosfato cíclica
GTP	GUANOSINA TRIFOSFATO
TEMPO	<i>2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl</i>
NCB Nat	Nanocristais de celulose Nativa
NCB Suc	Nanocristais de celulose Funcionalizada com Ácido Succínico
NCB Lip	Nanocristais de celulose Conjugada com Lipase
Cel Nat	Membrana de Celulose Nativa
Cel Suc	Membrana de Celulose Funcionalizada com Ácido Succínico
Cel Lip	Membrana de Celulose Conjugada com Lipase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.	CELULOSE BACTERIANA.....	16
2.2.	NANOCRISTAIS DE CELULOSE	18
2.3.	Biossíntese e produção da celulose.....	20
2.4.	Aplicação da Celulose e da Nanocristaís de celulose Bacteriana	23
2.5.	Lipases, características e suas aplicações.....	24
3.	OBJETIVOS	28
3.1.	OBJETIVO GERAL	28
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.	METODOLOGIA.....	29
4.1.	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DA CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE	29
4.1.1.	<i>Produção Da Celulose</i>	29
4.1.2.	<i>Produção da Nanocristaís de celulose</i>	30
4.2.	PREPARO DO ANIDRIDO SUCCÍNICO.....	31
4.3.	SUCCINILAÇÃO DA CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA	32
4.4.	IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NA CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA.....	33
4.5.	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	33
4.6.	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	34
4.7.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	34
4.8.	ANÁLISE ESTRUTURAL DAS MEMBRANAS E NANOCRISTAIS DE CELULOSES NATIVA E MODIFICADA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹³ C RMN).....	35
4.9.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	35
4.10.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹ H RMN).....	36
4.11.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS IMOBILIZADAS	36

4.12.	DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DA NANOCRISTAIS DE CELULOSE NATIVA, SUCCINILADA E IMOBILIZADA COM LIPASE.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1.	PRODUÇÃO DE CELULOSE POR FERMENTAÇÃO ESTÁTICA E PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE.....	38
5.2.	CARACTERIZAÇÃO CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FT-IR).....	39
5.3.	CARACTERIZAÇÃO CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	41
5.4.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	44
5.5.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA – TGA	48
5.6.	ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA NANOCRISTAIS DE CELULOSE	52
5.7.	ESTUDO DA CRISTALINIDADE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	55
5.8.	QUANTIFICAÇÃO DE LIPASES IMOBILIZADA NA MEMBRANA E NA NANOCRISTAIS DE CELULOSE.....	56
5.9.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE POR RMN ¹ H- RMN	57
6.	CONCLUSÃO.....	62
7.	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO	73
	ANEXO A – Artigo submetido no periódico Carbohydrates Polymers.....	74

1. INTRODUÇÃO

A celulose é o polímero mais abundante na natureza sendo que a unidade repetidora desse polissacarídeo é a celobiose, que é constituída, constituída de duas moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), sendo que cada molécula de glicose está rotacionada a 180° em relação a molécula vizinha. Este polímero está chamando a atenção nos mais diversos setores, pois é biodegradável e apresenta propriedades interessantes como inércia química, alta resistência mecânica e a temperatura.

Em relação ao arranjo cristalino são encontradas 7 polimorfos diferentes da celulose e da nanocristais de celulose, sendo definidos como: I $_{\alpha}$, I $_{\beta}$, II, III $_1$, III $_2$, IV $_1$ e IV $_2$, o tipo de arranjo cristalino encontrado na celulose dependerá da fonte obtida. A celulose do tipo I $_{\alpha}$, I $_{\beta}$ possui estrutura triclínica e monoclínica, respectivamente e as disposições das suas cadeias são paralelas, estas são denominadas como celulose nativa, pois quando extraídas da natureza encontram-se sob esta forma.

Grande parte da celulose obtida provém das plantas como o algodão e a madeira, entretanto há microrganismos que também são produtores, tais como algumas bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Sarcina*. A bactéria do gênero *Gluconacetobacter* em especial a *Gluconacetobacter xylinus* e a *Gluconacetobacter hansenii* são utilizadas para a produção comercial da celulose, devido a sua alta produtividade, e a versatilidade na escolha do substrato, sendo a sua celulose denominada celulose bacteriana.

As estruturas químicas da celulose de origem vegetal e de origem bacteriana são idênticas, entretanto diferem-se em relação ao tamanho das fibrilas formadas. Outra diferença é que a celulose de origem vegetal possui lignina e hemicelulose associadas à sua estrutura, portanto pode-se observar que a celulose de origem bacteriana possui uma maior facilidade em purificar quando comparado com a celulose de origem bacteriana.

A celulose possui domínios cristalinos em sua estrutura, que ocorrem alternados por regiões amorfas. Esses domínios cristalinos são regiões altamente ordenadas com um diâmetro variando de 1-100 nm, a proporção de regiões amorfas e cristalinas variam de acordo com a fonte de celulose. De acordo com as

propriedades e as dimensões das celuloses obtidas estas podem ser classificadas e denominadas como, celulose cristalina, whiskers ou nanofibras, em geral esses materiais são classificados de acordo com a sua dimensão, a celulose nanocristalina (CNC) possui um diâmetro de 1 nm, enquanto que as nanofibrilas de celulose (CNF) possuem um diâmetro de 10 nm, já as microfibrila de celulose (MFC) possuem um diâmetro de 10 μm .

A celulose bacteriana por possuir elevada pureza, é comumente utilizada para preparar celulose nanocristalina, também conhecida como, nanocristais de celulose ou whiskers. O método mais utilizado para a obtenção da nanocristais de celulose é através da hidrólise ácida combinada com temperatura, no qual o ácido irá hidrolisar as fases amorfas presentes na membrana de celulose, restando-se somente domínios cristalinos. Por possuir alta ordenação, os arranjos cristalinos da celulose não são hidrolisados quando em presença do ácido. Os ácidos mais utilizados para a reação de hidrólise são os ácidos sulfúrico e clorídrico, entretanto o ácido sulfúrico confere uma maior estabilidade para as nanopartículas devido a carga negativa fornecida pelo íon sulfato.

A maior aplicação comercial da celulose bacteriana é na utilização no tratamento de queimaduras e feridas, assim como, um substituto da pele artificial, pois este material possui biocompatibilidade com a pele, não é tóxico e promove uma rápida cicatrização. Entretanto a nanocristais de celulose bacteriana é um material interessante como emulsificante, devido a sua alta estabilidade quando em suspensão aquosa.

Por possuir alta inércia química, biocompatibilidade e propriedades mecânicas interessantes, vêm intensificando-se os estudos da celulose bacteriana e da nanocristais de celulose na fabricação de compósitos e também como suporte de moléculas de interesse comercial, tais como enzimas.

As lipases são enzimas pertencentes a triacilglicerol acilhidrolase (EC 3.1.1.3) é uma enzima com uma grande versatilidade em aplicações, usadas em reações de hidrólise de alcólise, acidólise, amilólise, interesterificação, fazendo com que seja aplicada em vários ramos industriais, tais como, alimentos, detergentes, cosméticos, indústrias químicas e biomédicas e também em indústrias de biodiesel. Entretanto a recuperação desta enzima em processos laboratoriais e até mesmo industriais torna-se inviável devido ao alto custo de recuperação. Um método para a

sua recuperação é imobilizar em um tipo de suporte, porém a maioria dos processos de imobilização enzimática descrita na literatura é por adsorção, sendo que há poucos relatos na literatura que discutem a eficiência da imobilização por ligação covalente.

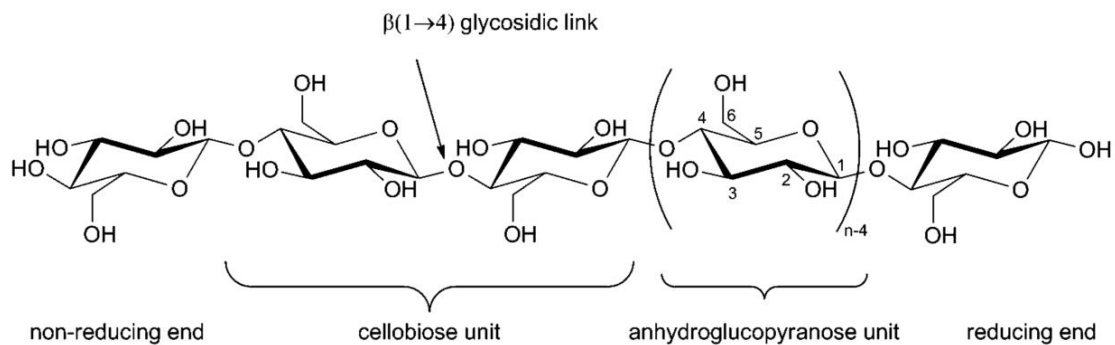
Inferindo-se que a celulose possui características interessantes como matriz imobilizadora, objetivou-se estudar neste trabalho a imobilização da lipase na membrana de celulose bacteriana e nanocristais de celulose por meio de uma ligação química e avaliar as características do novo material obtido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CELULOSE BACTERIANA

A celulose (figura 1), é o nome trivial para (1→4) β-D-glicopirranose, de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ (FU; ZHANG; GUANG, 2013), este polímero é formado por cadeias poliméricas lineares de monômeros de celobiose, que é constituída de duas moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β(1→4), sendo que cada molécula de glicose está rotacionado a 180° em relação a molécula vizinha (EYLEY; THIELEMANS, 2014). A estrutura em cadeira é a estrutura mais difundida na literatura, porém a celulose pode apresentar outras conformações de baixa energia, a *gauche-gauche*, a *gauche-trans gauche* e a *trans-gauche*, estas conformações são resultantes dos ângulos de torção dos átomos O5-C5-C6-O6 e C4-C5-C6-O6, estas conformações de baixa energia fazem com que as cadeias de celulose tenham uma maior possibilidade de realizar ligações de hidrogênio.

Figura 1. Estrutura Química da Celulose.



Fonte: Eyley; Thielemans, 2014

Este polímero vêm sendo estudado ao longo dos anos devido a sua abundância e biodegradabilidade (CASTRO et al., 2011; EYLEY; THIELEMANS, 2014; SHI et al., 2014). Entre os organismos produtores de celulose, as plantas são os maiores produtores, sendo encontrado na parede celular. Comercialmente a madeira e o algodão são as principais fontes para a obtenção da celulose, estima-se que a produção anual de celulose está entre 10^{11} a 10^{12} toneladas/ano, sendo que a sua maior aplicação concentra-se na fabricação de papel (KUDLICKA; BROWN,

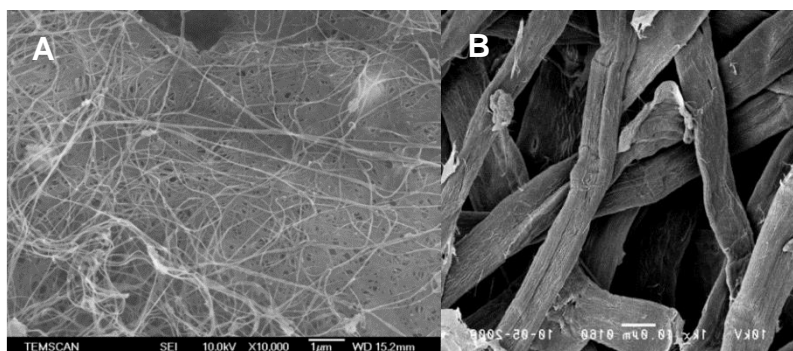
1996; DONINI et al., 2010; EYLEY; THIELEMANS, 2014; NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016). Alguns microrganismos também são produtores de celulose, tais como, algumas bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Sarcina* (SULAEVA et al., 2015). As bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, em especial a espécie *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) e a espécie *Gluconacetobacter hansenii* (*G. hansenii*) são bactérias comumente utilizadas para a produção de celulose (ambas denominadas comercialmente como *G. xylinus*) devido a sua alta produtividade, cerca 15,3 g.L⁻¹, e a versatilidade na escolha do substrato (DONINI et al., 2010; KUO et al., 2015).

O *G.xylinus* produz celulose sob forma de microfibrilas de 10-20 nm de diâmetro, que são excretadas para o meio de cultura (LEE et al., 2015). Quando compara-se a celulose de origem vegetal com a de origem bacteriológica, suas composições químicas são idênticas, porém diferem-se em relação à sua morfologia, em geral as fibrilas da celulose vegetal possuem um maior diâmetro e comprimento do que em relação à celulose de origem bacteriana (DONINI et al., 2010). Segundo Ververis et al., (2004), as dimensões da fibra da celulose vegetal dependerá do tipo de vegetal do qual ocorreu a extração, sendo que essas dimensões podem variar (CACICEDO et al., 2015). Quando comparados a celulose de origem vegetal com a de origem bacteriana por microscopia eletrônica de varredura, mostrado na figura 2, pode-se observar que as fibras da celulose vegetal são maiores do que a de origem bacteriana. Outra diferença entre a celulose vegetal e bacteriana é que a celulose de origem bacteriana não possui lignina e hemicelulose associados em sua estrutura, fazendo com que a purificação da celulose bacteriana seja mais fácil quando comparada com a celulose vegetal (QIU et al., 2016).

As cadeias de celulose bacteriana se agregam para formar longos feixes de celulose, que tem comprimento de 1,5 mm aproximadamente, essas microfibrilas tem uma maior área superficial quando comparado à celulose das plantas, fazendo com que tenham uma maior retenção de água (LIMA et al., 2015), a hidrofiliidade e a reatividade química da celulose pode ser explicado devido à alta quantidade de grupos hidroxilas presentes em sua estrutura, já as propriedades físicas são compreendidas através da ligação de hidrogênio dos grupos hidroxilas com as cadeias de celulose vizinhas ou com os resíduos de glicoses adjacentes, esta

ligação confere à celulose uma alta estabilidade química, fazendo com que seja insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, mesmo sendo hidrofílico (CHEN; ZOU; HONG, 2015).

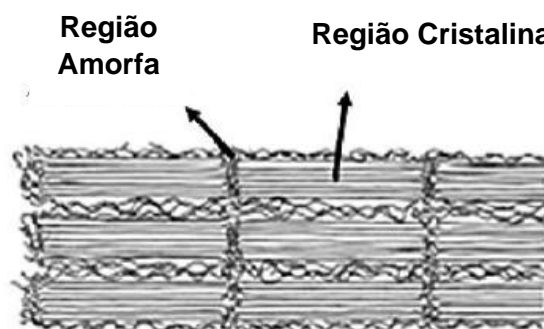
Figura 2. Comparação nas dimensões das fibras de celulose. A. Celulose de origem bacteriana B. Celulose de origem Vegetal.



2.2. NANOCRISTAIS DE CELULOSE

A celulose possui domínios cristalinos em sua estrutura no qual são separados por regiões amorfas, figura 3. Esses domínios cristalinos são regiões altamente ordenadas com uma dimensão variando de 1-100 nm, a proporção de regiões amorfas e cristalinas variam de acordo com a fonte de celulose. Segundo De Jesus Silva, (2009), a formação das regiões cristalinas ocorre devido a ação combinada da polimerização da celulose comandada por processos enzimáticos, em contrapartida, a formação das regiões amorfas ocorre devido à alteração do processo de cristalização e conseqüentemente da má formação dos cristais. De acordo com as propriedades e as dimensões das celulosas obtidas estas podem ser classificadas e denominadas como, celulose cristalina, whiskers ou nanofibras, em geral esses materiais são classificadas de acordo com a sua dimensão, a celulose nanocristalina (CNC) possui um comprimento de 1 nm, enquanto que as nanofibrilas de celulose (CNF) possui um comprimento de 10 nm, já as microfibrila de celulose (MFC) possui um comprimento de 10 µm (EYLEY; THIELEMANS, 2014; LIN; DUFRESNE, 2014; GARCÍA et al., 2016; NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016).

Figura 3. Morfologia Celulose Bacteriana.



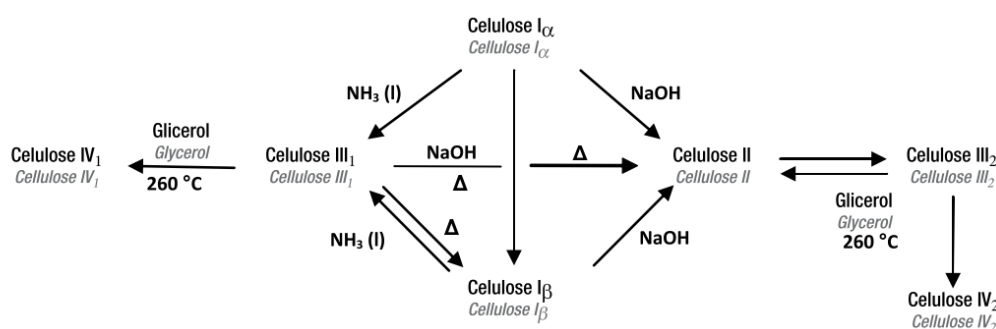
Fonte: De Jesus Silva, 2009

A nanocristais de celulose bacteriana pode ser produzida realizando-se uma hidrólise empregando ácido mineral (sulfúrico ou clorídrico). O ácido hidrolisa as regiões amorfas da celulose, restando apenas os domínios cristalinos (HEGGSET; CHINGA-CARRASCO; SYVERUD, 2017). Este método foi descrito primeiramente por Ranby em 1949, ao utilizar ácido sulfúrico na hidrólise. A nanocristais de celulose ao final do processo apresenta grupos sulfatos em sua superfície, e o tamanho dos cristais obtidos podem variar de 3 -35 nm de espessura e 200 – 500 nm de comprimento (NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016), porém deve-se escolher corretamente o ácido e a concentração a ser utilizada, pois de acordo Roman,(2004) a alta concentração de grupos sulfatos na superfície da celulose diminui a termoestabilidade dos cristais formados, contudo o ácido sulfúrico é ainda o melhor ácido a ser utilizado, pois este tem a capacidade de formar melhores cristais do que o ácido clorídrico.

Em relação à estrutura cristalina são encontrados 7 polimorfos diferentes da celulose e da nanocristais de celulose, sendo definidos como: I_{α} , I_{β} , II, III_1 , III_2 , IV_1 e IV_2 , o tipo de morfologia encontrado na nanocristais de celulose dependerá da fonte obtida. A celulose do tipo I_{α} , I_{β} possui estrutura triclínica e monoclínica, respectivamente e as disposições das suas cadeias são paralelas, a celulose do tipo II possui uma estrutura monoclínica com cadeias antiparalelas, a celulose do tipo III_1 e III_2 possui uma estrutura monoclínica com cadeias paralelas e antiparalelas respectivamente. (DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009; FARIA-TISCHER et al., 2015).

Em geral a celulose e a nanocristais de celulose do tipo I é denominada como celulose nativa, pois a celulose encontrada na natureza possui essa morfologia. As outras morfologias são obtidas através do uso de reações químicas sendo possível converter um tipo de celulose em outro como exemplificado na figura 4 (DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009).

Figura 4. Transformação da celulose nativa em vários polimorfos.



Fonte: DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, (2009)

Uma característica interessante da nanocristais de celulose, é que quando obtida através da hidrólise, utilizando ácido sulfúrico, formam-se suspensões altamente estáveis quando está em solução aquosa devido à alta quantidade de grupos fosfatos (ROMAN; WINTER, 2004), devido a isto, a nanocristais de celulose pode ser um produto promissor para a aplicação nos mais diversos segmentos, sob forma de aditivos, adesivos, revestimentos de tintas, substituição óssea, reparação dos dentes, aerogéis, cosméticos e alimentos (RAHBAR SHAMSKAR; HEIDARI; RASHIDI, 2015).

Além do ácido sulfúrico o ácido clorídrico é também utilizado para a produção de Nanocristais, entretanto estes formam suspensões menos estáveis quando comparado com as suspensões obtidos a partir do ácido sulfúrico (NIU et al., 2017). Por isso, diversas pesquisas têm tido como objetivo de melhorar o processo de obtenção de nanocristais de celulose a partir de diferentes fontes. Niu et al., (2017), produziu nanocristais de celulose esféricas a partir de uma mistura de ácido sulfúrico e clorídrico acompanhado por ultrassom. Já Geiger; Zimmermann; Sixta, (2017) produziu nanocristais de celulose utilizando tensão de cisalhamento, Goelzer *et al.*, (2009) produziu nanoesferas de celulose a partir da casca de arroz.

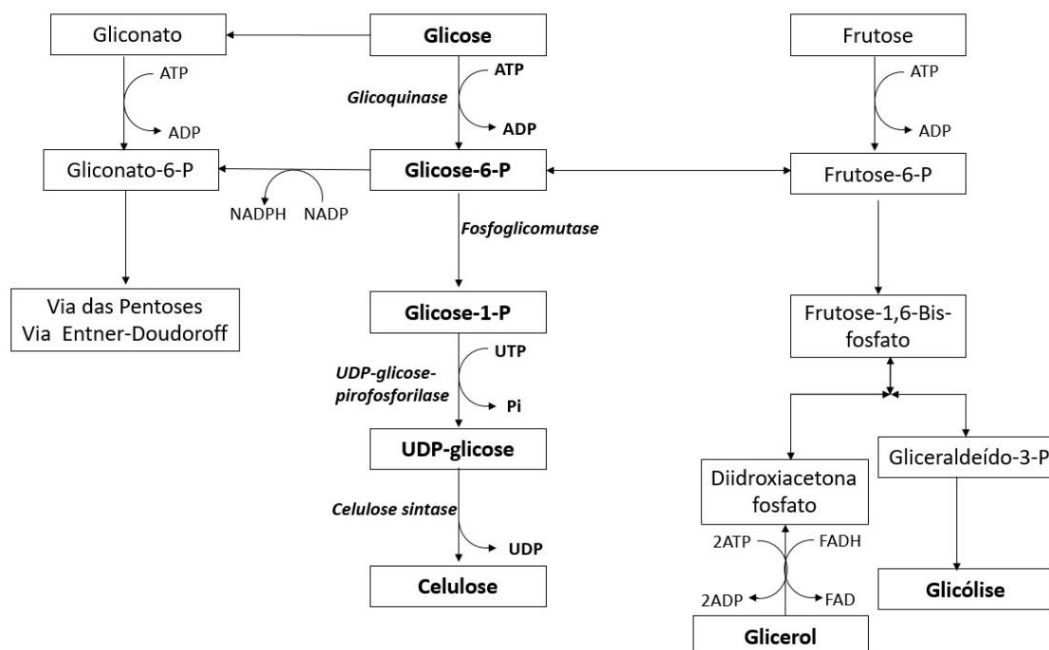
2.3. Biossíntese e produção da celulose bacteriana

A celulose obtida por *Gluconacetobacter* foi descrito pela primeira vez por Louis Pasteur como “*um tipo de pele escorregadia e úmida*”, mas só foi descrito cientificamente pela primeira em 1886 por Brown, ele identificou a formação de uma película sob o vinagre, e observou que apresentava a mesma composição química da celulose presente nas plantas, mais tarde o mesmo autor identificou que as bactérias acéticas eram responsáveis pela formação desta membrana (FORESTI; VAZQUEZ; BOURY, 2016).

A via bioquímica mais compreendida é a polimerização da glicose em celulose, porém outros substratos podem também produzir celulose bacteriana, como mostrado na figura 5, nesta via algumas enzimas específicas são requeridas, primeiramente a glicose é convertida em glicose-6-fosfato dependente de ATP, numa segunda etapa a glicose-6-fosfato é convertida à glicose-1-fosfato pela enzima fosfoglicomutase, a glicose-1-fosfato sofre uma reação pela enzima UDP-glicose-pirofosforilase, transformando-se em uridina difosfato glicose (UDP-glicose), utilizando uma molécula de uridina trifosfato, liberando uma molécula de pirofosfato, a UDP-glicose será usada como precursora para a produção da celulose bacteriana, (RECOUVREUX, 2008).

O *Gluconacetobacter xylinus* é uma bactéria gram-negativa, que produz celulose aerobiamente (LEE, *et al.*, 2015), a polimerização da celulose é produzida pelo complexo celulose sintase (CeS) (OMADJELA *et al.*, 2013). Este complexo pode variar de espécie para espécie, entretanto todas possuem uma subunidade catalítica, em procariotos é denominada BcSA (*Bacterial cellulose synthase subunit A*), em eucariotos é denominada CesA (*hereafter, CeS refers to pro-and eukaryotic enzymes*) (MCNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015). Vale ressaltar que a celulose é produzida no interior da célula e é transportada para o exterior durante a síntese, este processo é realizado por membranas integradas na membrana glicosiltransferases que acoplam o alongamento do polímero com translocação (OMADJELA *et al.*, 2013).

Figura 5. Biossíntese da celulose bacteriana.



Fonte: Adaptado de Recroveux, (2008).

A produção de celulose é regulada pela enzima celulose sintase, que é ativada alostericamente pela molécula diquanosina monofosfato cíclica (c-di-GMP), a molécula c-di-GMP é sintetizada pela enzima diguanilato ciclase a partir de duas moléculas de guanosina trifosfato (GTP), a concentração de c-di-GMP é controlada pela enzima fosfodiesterase que degrada a molécula c-di-GMP, na *Gluconacetobacter xylinus* os genes que codificam as enzimas que sintetizam e degradam o c-di-GMP estão organizados em um único operon que contém três diguanilato ciclase e três fosfodiesterase, ambas possuem estrutura primária e o domínio GGDEF (RECOUVREUX, 2008).

Em geral a produção da celulose bacteriana ocorre em meio estático, no qual ocorre o crescimento de uma membrana na superfície do meio de cultura, em geral este processo é o mais utilizado para a produção pois é o mais barato, entretanto há um esforço constante para que se desenvolva um processo industrial a um baixo custo e com matérias-primas acessíveis (CAMPANO et al., 2015). Lin et al., 2014 produziram celulose bacteriana utilizando um biorreator de disco rotativo obtendo uma produtividade de $0,24 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, Czaja; Romanovicz; Brown, 2004, obteve um rendimento de 10 g.L^{-1} produzindo em um reator estático.

A fonte de carbono mais utilizada para a produção da celulose bacteriana é a glicose, porém, alguns trabalhos sugerem a utilização de fontes de carbonos, mais baratas, tais como, glicerol, maltose, xilose e subprodutos provenientes da agroindústria, a fim de que possa reduzir o custo de produção e aumentar o rendimento, já que 65% do valor da celulose comercial está relacionado com o custo de produção (CHAWLA et al., 2009; TSOUKO et al., 2015).

O pH ótimo para a produção da celulose bacteriana pelo microrganismo *Gluconacetobacter* é entre 4 a 6, a produção de celulose decresce em pH menor do que 4, isto porque há um acúmulo de ácidos acético, láctico e glucônico no meio de crescimento (CHAWLA et al., 2009; BILGI et al., 2015)

2.4. Aplicação da Celulose e dos Nanocristais Bacteriano

A celulose bacteriana é utilizada como sobremesa das Filipinas, sendo produzido a partir da nata de coco (FORESTI; VAZQUEZ; BOURY, 2016), no entanto a maior aplicação comercial é no tratamento de queimaduras e feridas, assim como, um substituto artificial da pele, pois este material possui biocompatibilidade com a pele, não é tóxico e promove uma cicatrização mais rápida (DE OLIVEIRA BARUD et al., 2016).

Devido a esta propriedade de cicatrização, a celulose bacteriana vem ganhando mercado na área biomédica e biotecnológica, neste sentido o mercado brasileiro começou a comercializar celulose bacteriana nos seguintes nomes comerciais: Biofil[®], Bionext[®] e a Membracel[®]. Com objetivo de desenvolver novos produtos com uma maior capacidade de cicatrização, vários trabalhos têm realizado combinações da celulose bacteriana com outras substâncias.

Há alguns trabalhos que combinaram outras substâncias na celulose com o objetivo de potencializar a cicatrização. Qiu et al., (2016), produziram celulose bacteriana e em seguida absorveu na celulose um glicosídeo denominado vacarin, aumentando o processo de cicatrização. Lopes et al., (2014) produziram um híbrido de celulose e ácido hialurônico, um material promissor no processo de cicatrização, e como resultado obtiveram membranas mais hidrofílicas e hidrofóbicas do que a celulose nativa. Ribeiro-Viana et al., (2016), produziram celulose bacteriana e ligou com colágeno com objetivo de obter um material com um maior poder de

cicatrização. Há também aplicações como molde do nervo ciático como cita o trabalho Zhu et al., (2014), no qual avaliou-se o aumento da recuperação do nervo ciático em ratos ao empregar celulose.

A celulose bacteriana e os nanocristais de celulose vêm ganhando interesse na utilização como transporte e como imobilização de moléculas de interesse, devido às suas características, tais como, inércia química, alta resistência mecânica, biocompatibilidade, não ser tóxica (LIU; CHEN, 2016) . Dentre as técnicas de imobilização comumente utilizada a adsorção é o processo mais fácil em executar, este processo consiste em adsorver moléculas na superfície da celulose é a técnica como nos trabalhos de Frazão et al., 2014 no qual adsorve lacase sob a celulose bacteriana e no trabalho de Kim et al., 2017 que imobilizou lipase sobre a celulose usando a mesma técnica.

Embora este processo apresenta certa facilidade em realizar, o processo de adsorção apresenta certas desvantagens como, a dessorção da molécula de interesse da matriz para o meio, devido a alterações de pH e temperatura (LIU; CHEN, 2016). Com objetivo de melhorar a imobilização alguns trabalhos utilizaram grupos químicos covalentemente ligados, substituindo a hidroxila da celulose por grupos mais reativos, como demonstrado nos trabalhos de Ribeiro-Viana et al., 2016 e de Yin et al., 2011, realizaram uma ligação covalente entre o ácido succínico e a celulose bacteriana, substituindo a hidroxila do carbono 6 pelo ácido succínico. Além do ácido succínico, outras moléculas podem ser utilizadas como grupos reativos (ou espaçadores), tais como grupos amidas como a glicina (LIU; CHEN, 2016), ou pode-se utilizar da estratégia em oxidar a cadeia de celulose utilizando o reagente 2,2,6,6- tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), a escolha do método dependerá das características química da molécula a ser imobilizada (LAI et al., 2013, 2014).

Esta técnica de imobilização via-ligação molecular pode ser interessante para a imobilização de enzimas para aplicação industrial, já que a imobilização gera uma automação e economia do processo (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012), entre as enzimas de alto interesse industrial estão a lactase e a lipase.

2.5. Lipases, características e suas aplicações

A lipase (triacilglicerol acilhidrolase EC 3.1.1.3) é uma enzima com uma grande versatilidade em aplicações, usadas em reações de hidrólise de alcólise, acidólise, amilólise, interesterificação, fazendo com que seja aplicada em vários ramos industriais, tais como, alimentos, detergentes, cosméticos, indústrias químicas e biomédicas e também em indústrias de biodiesel (WU; WU; SU, 2016).

A alta aplicabilidade da lipase se dá pelo fato desta enzima poder catalisar uma ampla faixa de reações, tais como, reações de esterificação (formação da ligação éster), transesterificação, nestas reações vêm ganhando papel fundamental como biocatalisador de reações orgânicas e na produção de biodiesel. Entretanto nestas reações o controle da atividade de água é crucial, pois o excesso de água pode ocasionar a reação de hidrólise ao invés da reação de esterificação (MESSIAS et al., 2011). Outra aplicabilidade da lipase é nas reações de hidrólise, no qual estas clivam a ligação éster de triacilglicerídeo presentes em óleos e gordura produzindo glicerol e ácidos graxos, e isto faz com que tenha aplicação na área farmacêutica e alimentícia (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO, 2004; NICOLÁS; LASSALLE; FERREIRA, 2017). Outra característica interessante é que as lipases atuam numa faixa ampla de pH e temperatura e são capazes de manter-se ativas mesmo na presença de ácidos e solventes orgânicos (MESSIAS et al., 2011; SALIHU; ALAM, 2015).

Há vários microrganismos produtores de lipases, desde fungos, tais como *Botryosphaeria ribis*, *Candida rugosa*, *C. cylindracea*, fungos do gênero *Aspergillus* até bactérias tais como *Acinetobacter*, *Aeribacillus*, *Bacillus aerius*, *Geobacillus*, *Lactococcus*, *Microbacterium*, *Pelosinus fermentus* (MESSIAS et al., 2011; JAVED et al., 2017).

As lipases podem ser classificadas de acordo com sua regioesletividade catalítica, podendo ser não específica, ou seja, hidrolisam triacilglicerídeo em ácidos graxos, porém atacam qualquer posição do substrato. Já as lipases específicas catalisam atacam o ácido graxo na posição 1 e 3 dos triacilglicerídeo e não hidrolisam ligações estères em posições secundárias. As lipases de ácidos graxos específicos possuem uma regioesletividade em catalisar ligações ester de ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação do tipo cis na posição C9 (JAVED et al., 2017).

O método majoritariamente utilizado para a produção de lipase é através de processos biotecnológicos, entretanto há lipases que são extraídas de plantas e animais (ANDRADE et al., 2014). Por processo biotecnológico, a fermentação submersa é a mais utilizada quando o microrganismo é um fungo filamentoso ou bactéria, entretanto é relatado na literatura produção de lipases por fermentação em estado sólidos (PANDEY, 2003). O meio de cultivo para produção de lipases em geral é um meio rico contendo fontes de nitrogênio, carbono. Trabalhos científicos têm avaliado a utilização resíduos agroindústrias para a produção de lipase, como por exemplo o realizado por Andrade e Cols., 2014 que produziram lipase a partir de óleo de soja enriquecido com serina, histidina e ácido glutâmico.

Comercialmente a lipase é comumente produzida pela levedura *Candida antarctica*, esta levedura produz dois tipos de lipase (CALA e CALB), sendo que CALA é mais resistente a soluções ácidas do que a CALB (KIRK; WU, 2002).

Sendo essa uma enzima de ampla aplicação e de alto valor econômico, têm-se buscado imobilizar a lipase por diferentes técnicas e em diferentes suportes com objetivo de recuperar, como por exemplo no trabalho de Zhao *et al.*, 2017 que imobilizou em alginato. Alshehri *et al.*, 2016 imobilizou lipase em magnetita para fazer reação de esterificação.

2.6. Técnicas de imobilização para Lipase

As técnicas de imobilização vêm sendo amplamente utilizada por possuir vários mecanismos. O termo imobilização é referido quando uma molécula de interesse é confinada a uma matriz ou suporte, em geral este suporte é um polímero que pode ser de origem orgânica, inorgânica ou natural, as principais características que este suporte deve apresentar é que este deva possuir estabilidade, resistência química e compatibilidade química com a enzima. O suporte inorgânico comumente utilizado para a imobilização é a sílica, enquanto que o suporte de origem orgânica mais utilizado é o epóxi metacrilato, entretanto estes suportes apresentam a desvantagem de não serem biodegradáveis.

Os suportes de origem natural, como a celulose bacteriana, podem ser a chave para contornar este problema, já que a celulose apresenta todas as

características ideais para ser utilizado como suporte (DATTA, et al, 2012; LIU; CHEN, 2016).

Dentre os mecanismos de imobilização encontrado na literatura, estes podem ser imobilização física (adsorção e aprisionamento), químico (ligação covalente), em geral a imobilização química apresenta a vantagem de conferir uma alta estabilidade entre o suporte e a enzima, porém esta técnica é mais difícil de realizar, quando comparada com os métodos físicos (LIU; CHEN, 2016).

A imobilização física é uma técnica fácil de realizar, contudo esta apresenta a desvantagem de não conferir uma alta estabilidade na imobilização, já que a enzima ou molécula imobilizada pode-se desprender da matriz ao alterar pH e temperatura. Entre os métodos físicos estão relatados a imobilização por adsorção e por aprisionamento, onde no primeiro, a enzima é imobilizada na matriz por interações de Van der Waals, atrações eletrostática, já no método de aprisionamento a enzima é mantida entre as cadeias do suporte (LIU; CHEN, 2016).

Na imobilização química é realizada uma ligação covalente entre a enzima e a celulose, em geral este método apresenta uma maior dificuldade pois há a necessidade de adicionar grupos espaçadores entre a matriz e a enzima, no qual os resíduos de aminoácidos da enzima (NH_2 , COOH , SH) irá se ligar com os grupos espaçadores, pois estes possuem grupos mais reativos do que as hidroxilas encontradas na celulose, e diminuem o impedimento estérico entre a matriz e a enzima, após adicionar o grupo espaçador na celulose, a celulose é denominada de celulose funcionalizada (LIU; CHEN, 2016).

A escolha do grupo espaçador dependerá das características da enzima a ser imobilizada, os grupos espaçadores mais utilizados para realizar a imobilização é a da glicina (grupo reativo NH), o grupo epóxi, o anidrido succínico (grupo reativo carboxila), esses grupos espaçadores realizarão uma ligação C-N, substituindo uma hidroxila da molécula de glicose pelo grupo espaçador, o reagente TEMPO (2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl) irá oxidar as hidroxilas da celulose tornando-as mais reativas (BADGUJAR; BHANAGE, 2016; LIU; CHEN, 2016; RIBEIRO-VIANA et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Produzir celulose bacteriana e nanocristais de celulose bacteriana a partir da celulose, e em seguida funcionalizá-las com lipases e avaliar a atividade enzimática.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção de celulose bacteriana utilizando glicose como substrato;
- Produção de nanocristais de celulose bacteriana a partir da membrana de celulose;
- Funcionalizar com anidrido succínico a celulose bacteriana e nanocristais de celulose;
- Imobilizar por ligação covalente lipase na celulose e nos nanocristais de celulose succinilada;
- Avaliar a atividade de hidrólise da enzima imobilizada nos nanocristais de celulose e na membrana de celulose;
- Quantificar a enzima imobilizada na membrana de celulose e nos nanocristais de celulose.
- Caracterizar os nanocristais de celulose e celuloses bacteriana funcionalizadas e não funcionalizadas através das técnicas: Espectroscopia de infravermelho (FT-IR), Difração de Raio-x, Ressonância magnética nuclear (RMN), Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM) e Termogravimetria;

4. METODOLOGIA

4.1. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DA CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE

4.1.1. *Produção Da Celulose*

A bactéria utilizada neste estudo para a produção das membranas de celulose foi a *Gluconacetobacter hansenni* ATCC23769 proveniente da fundação André Toselho, Campinas, São Paul (Brasil). A cepa *G. Hansenni* foi estocada em glicerol 30% a -80°C em tubos de fundo cônico tipo Eppendorf

.O meio de cultivo usado para a produção de celulose foi o meio de Hestrin-Schramm's modificado, descrito na tabela 1 e a celulose foi produzida como descrito por Goelzer et al. (2009). Para a ativação da cepa, foram adicionados quatro tubos de fundo cônico (Eppendorfs) em 80 mL de meio de Hestrin-Schramm's modificado e então mantido sob agitação a 110 rpm a 28°C por 2 dias. Após os 2 dias de crescimento a células em suspensão foram transferidas para um Ernlmeyer contendo 720 mL de meio Hestrin-Schramm's, misturadas e todo o volume foi transferidos para potes 22x36 cm e acondicionados em estufa em uma temperatura de 28°C por 10 dias em fermentação estática, para que ocorresse o crescimento da membrana. Após os 10 dias de fermentação as membranas produzidas foram retiradas do meio e lavadas com água destilada para a retirada de possíveis resíduos de meio e depois foram acondicionadas em hidróxido de sódio 4% para eliminar sujeiras proveniente do substrato e foram lavadas com água destilada exaustivas vezes até que o pH da membrana atingir o valor de 7. Depois de lavadas e neutralizada as membranas foram secas em estufa a uma temperatura de 70°C, o fluxograma de produção das membranas de celulose está descrito na figura 6.

Tabela 1. Composição do meio de cultura para o crescimento de *Acetobacter hanseni*

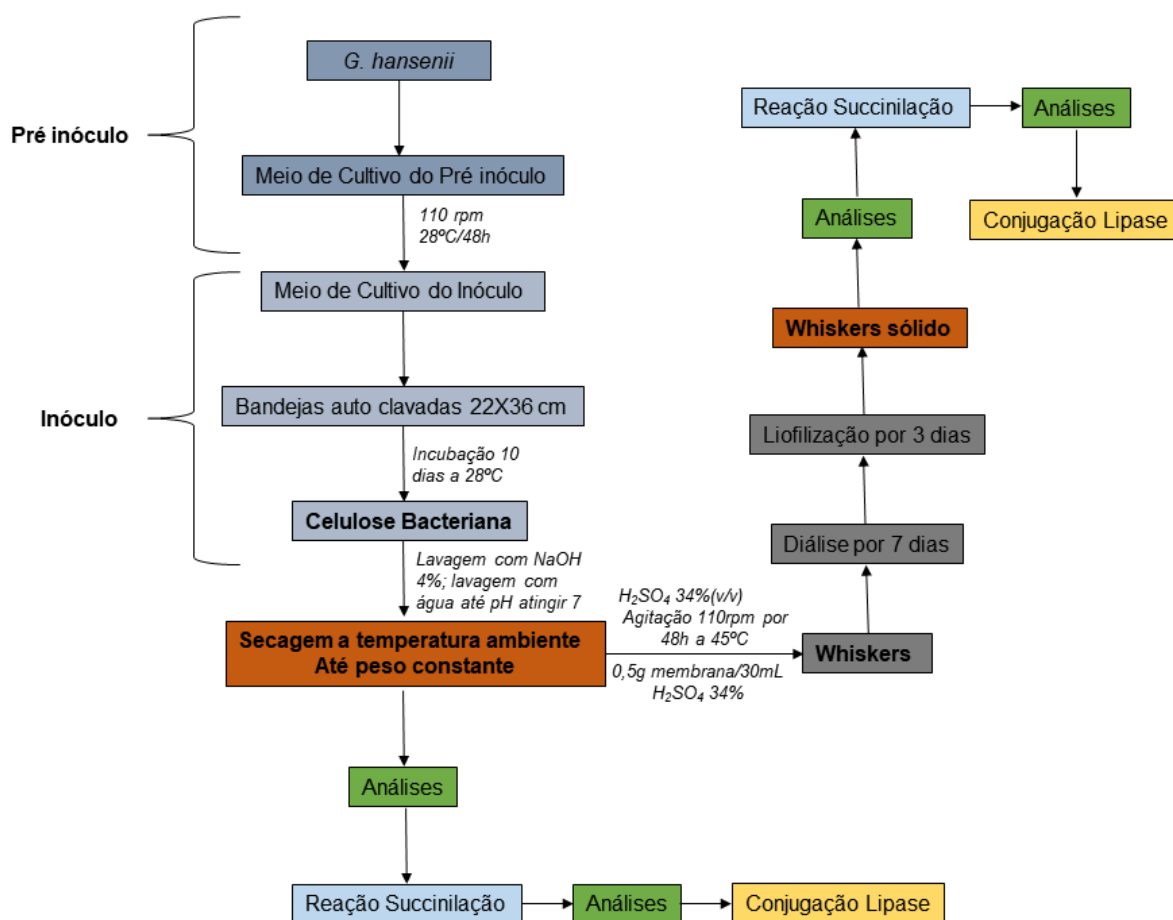
Substancia	Pré-inóculo	Inóculo
	Quantidade	Quantidade
Glicose	3,200 g	32,000 g
Levedura	0,400 g	4,000 g
NaHPO₄	0,400 g	4,000 g
Peptona	0,400 g	4,000 g
Ácido cítrico	0,092 g	0,920 g
Água destilada	80,000 mL	800,000 mL

Fonte: (GOELZER et al., 2009)

4.1.2. Produção da Nanocristais de celulose

Os nanocristais de celulose foi produzida conforme o fluxograma da figura 6. A celulose seca foi adicionada em um balão de fundo redondo juntamente de ácido sulfúrico 34% (0,5 g de membrana seca/30 mL solução de ácido) e levadas a agitação por 48 h sob a temperatura de 45°C, em seguida as amostras foram neutralizadas com hidróxido de sódio 25%. O neutralizado foi transferido em sacos de diálise, sendo dialisados por 5 dias. Em seguida as amostras foram retiradas da diálise e submetidas a liofilização por 3 dias para a obtenção de nanocristais de celulose.

Figura 6. Fluxograma de cultivo e produção de nanocristais de celulose bacteriana.



Fonte: Adaptado de Goelzer et al., 2009

4.2. PREPARO DO ANIDRIDO SUCCÍNICO

O anidrido succínico foi sintetizado de acordo com Ribeiro-Viana, et al. (2016) como descrito: 4 g de ácido succínico e 6,4 mL de anidrido acético foram adicionados em um balão de fundo redondo sob refluxo. A reação ocorreu a 100°C por uma hora. Após a reação, foi a mistura permaneceu em repouso por duas horas a temperatura ambiente, e depois foi acondicionada a 8°C por 30 min. O precipitado formado foi lavado com éter dietílico 3 vezes, e em seguida armazenado em um dessecador.

4.3. SUCCINILAÇÃO DA CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA.

Para a reação de succinilação, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro-Viana; Faria-Tischer; Tischer, 2016. As membranas de celuloses bacterianas e nanocristais de celuloses, foram lavadas previamente com metanol e diclorometano para eliminar o excesso de água.

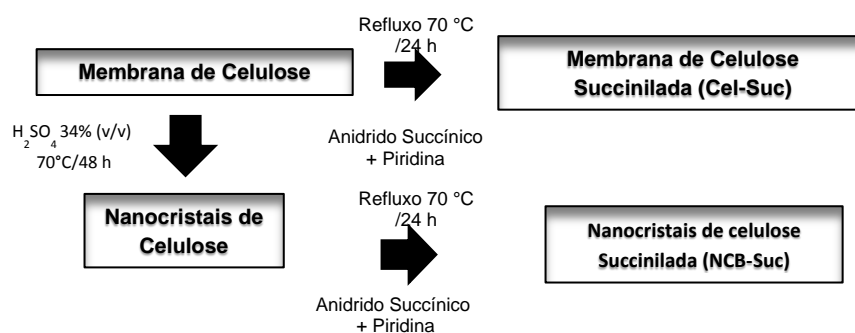
Para a reação de succinilação as celuloses foram imersas em um balão de fundo redondo contendo uma solução de diclorometano, 200 μ L de piridina e anidrido succínico, em seguida este sistema foi submetido ao refluxo por 24h a 70°C, a estequiometria da reação é apresentada na tabela 2. Após este período o produto obtido foi lavado com água destilada por três vezes seguido de etanol. Em seguida as celuloses foram secas à temperatura ambiente. Na figura 7 é apresentado a reação de succinilação.

Tabela 2. Relação Estequiométrica para a Reação de Succinilação da NCB e da membrana de celulose.

Substância	Massa Molar (g/mol)	Proporção
Celulose ou NCB	162	1
Anidrido Succínico	100,06	40
Piridina	84,93	200 μ L
Diclorometano	79,1	20 mL

Fonte: Ribeiro-Viana; Faria-Tischer; Tischer, 2016.

Figura 7. Reação de Succinilação da nanocristais de celulose e da membrana de celulose.



Fonte: Ribeiro et al, 2016

4.4. IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NA CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA

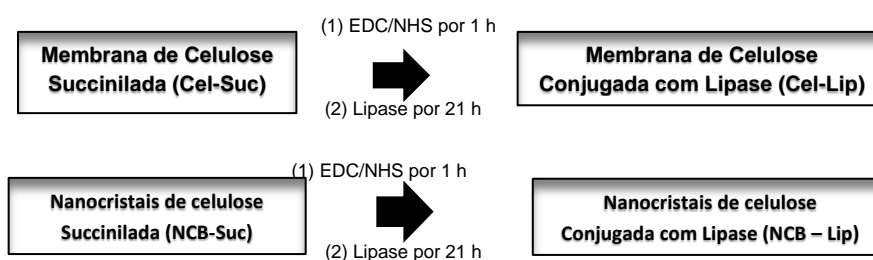
A imobilização da enzima foi realizada seguindo a metodologia proposta por Ribeiro-Viana; Faria-Tischer; Tischer, 2016: em um balão de fundo redondo foram adicionados de celulose ou nanocristais de celulose ambos já succinilados, EDC (3-(ethyliminomethyleneamino)-N,N-dimethylpropan-1-amine). A reação foi mantida a temperatura ambiente por uma hora, em seguida foi adicionado à membrana lipase, o sistema foi submetido a agitação por 21 h. Depois deste tempo as membranas foram lavadas três vezes com água destilada, e secas à temperatura ambiente, figura 8. A relação estequiométrica para a reação é apresentada na tabela 3.

Tabela 3. Relação Estequiométrica para a Reação de conjugação da Lipase para a NCB e da membrana de celulose.

Substância	Massa Molar (g/mol)	Proporção
Celulose ou NCB	162	1
EDC	191,7	1
NHS	115,8	0,3
Lipase	200.000	1 mL
Água	18	5 mL

Fonte: Ribeiro-Viana; Faria-Tischer; Tischer, 2016

Figura 8. Reação de Imobilização de Lipase na membrana de celulose e nos cristais de celulose



Fonte: Ribeiro et al, 2016

4.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Para análise de difração de raios-X θ - 2θ foi empregado difratômetro Panalytical X' Pert PRO MPD do Laboratório de Análises por Raios-X da

Central Multiusuária de Laboratórios de pesquisa da UEL (LARX-UEL). O Feixe monocromático incidente de Cu (K α) foi excitado a 40 Kv e 30 mA, a taxa de varredura utilizada foi de 0,002°/S e os registros foram de 5 a 60° (2 θ) (DE OLIVEIRA et al., 2017).

O índice de cristalinidade foi determinado pelo método de Segal (Equação 1), onde I_{am} é a intensidade do halo amorfo em 18.05° (2 θ) e I_{002} é a intensidade do pico de difração 002 da celulose.

$$IC(\%) = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.6. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).

Para a caracterização das celulosas nativas e modificadas, as amostras foram secas a temperatura ambiente e lidas diretamente no equipamento. Para as nanocristais de celulosas nativas e modificadas as amostras foram misturas com Brometo de Potássio (KBr), trituradas e prensadas com o auxílio de uma prensa hidráulica para que então formasse uma pastilha, foram então realizadas as leituras de transmitância em um aparelho de FT-IR (Shimadzu FTIR-8300, Japão) com uma resolução de 4 cm⁻¹ no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹, no laboratório da central multiusuária de pesquisa da UEL.

4.7. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) da membrana nativa e modificada e da nanocristais de celulose nativa e modificada foi realizada em uma termobalança Shimadzu TGA 50 (Japão), no laboratório de espectroscopia da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da UEL. As amostras foram aquecidas de 25°C a 800°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min. Para a análise dos dados foi utilizado o software OriginPro 8.

4.8. ANÁLISE ESTRUTURAL DAS MEMBRANAS E NANOCRISTAIS DE CELULOSES NATIVA E MODIFICADA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (^{13}C RMN)

Para a caracterização das membranas de celuloses nativa e modificadas e dos nanocristais de celulose nativa e modificada. Para a execução das análises as membranas foram picotadas e colocadas no tubo de RMN e analisadas no RMN. Para análises dos Nanocristais, estes foram colocados diretamente no tubo e analisadas no RMN. As análises foram realizadas em um equipamento ADVANCE 400 marca Bruker, localizado no laboratório de espectroscopia da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da UEL, operando a 100,6MHz para carbono (^{13}C), usando a técnica de polarização cruzada (CP) no ângulo mágico (MAS).

Através dos espectros foi possível calcular o índice de cristalinidade das membranas e das nanocristais de celulose usando a equação 4, onde o I_c é o índice de cristalinidade, I é o valor da integração do pico cristalino do C4 e I_α é o valor da integração do pico amorfo do C4. Os espectros foram analisados utilizando o software SpinWorks 4.

$$I_c = \{I/(I_\alpha + I)\} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

4.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As foram preparadas amostras de nanocristais de celulose na concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e sonicadas por 5 minutos. Posteriormente 1 gota da amostra foi depositada sobre a grade de cobre, com filme Formvar (400 mesh – Ted Pella), após 10 minutos mais 1 gota foi depositada sobre a grade e posteriormente o contraste foi obtido pela coloração negativa com acetato de uranila. As amostras foram armazenadas até completa secagem e as análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia eletrônica e Microanálise da UEL (LMEM), usando o microscópio de transmissão Jeol JEM 1200EX-II.

Para medir o tamanho das partículas foi utilizada o programa imageJ, no qual foi medido o comprimento e diâmetro de todas as partículas obtida nas imagens do microscópio eletrônico de varredura. Após a aferição do diâmetro e do

comprimento, foi elaborado um gráfico de histogramas de frequência em relação ao diâmetro e comprimento.

4.10. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹H RMN)

A determinação da atividade da lipase imobilizada foi determinada através da relação de ácidos graxos livre nas amostras, segundo a metodologia proposta por CARNEIRO et al, 2005; SILVA, *et al.*, 2016, com modificações como descrito no parágrafo que segue.

Para a amostra controle 1 mL de óleo de girassol foi adicionado em um tubo de ensaio com 1mL de água destilada e 20 µL de lipase (Lipolase 100I[®], novozymes), para as enzimas imobilizadas foram feitas as mesmas soluções, porém foi adicionado 20 mg de enzima imobilizada em celulose e 20 mg de enzima imobilizada em nanocristais de celulose. O sistema foi colocado em mesa agitadora a 200 rpm por 3 dias a temperatura ambiente, após a reação foi coletado o sobrenadante e analisado por ¹H RMN. A quantificação de ácidos graxos livres foi feita a partir dos valores da integração dos picos dos hidrogênios α-carbonil metilênicos contados como 6, (equação 5) e sua razão frente aos C1 e C3-CH₂-O do glicerol, contados como 4 hidrogênios.

$$\%TG/FFA = (\text{área do pico metileno glicerol} \times 100) / 4 \quad \text{Equação 3}$$

Para a análise de ¹H RMN foi utilizado um espectrômetro da Bruker Avance III 400 MHz do Laboratório da central Multiusuária de pesquisa da Universidade estadual de Londrina, o equipamento foi operado a uma frequência de 400,6 MHz. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e calibrado de acordo com o sinal do solvente (CDCl₃: δ = 77,00 ppm).

4.11. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS IMOBILIZADAS

A determinação da concentração de proteínas imobilizadas na membrana e na nanocristais de celulose foi determinada baseando-se na metodologia proposta

por Atacan et al. (2017); Atacan et al. (2016), no qual 5 μ L de Tripsina (21,91 μ g/mL) foi adicionado em 20 mg de celulose nativa e modificada e em 20 mg de NCB nativa e modificada e em seguida adicionou-se 495 μ L de tampão fosfato pH =8 0,2 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_3$). O sistema foi acondicionado em estufa sob a temperatura de 37 °C por 13 h em condições estáticas. Após a reação, foi determinado a concentração de proteínas pelo método de Bradford, 1976.

4.12. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DA NANOCRISTAIS DE CELULOSE NATIVA, SUCCINILADA E IMOBILIZADA COM LIPASE

Foram preparadas uma solução de NCB-Natv, NCB-Suc e NCB-Lip todas na concentração de 1 mg/mL, estas amostras foram sonicadas em um banho de ultrassom por 1h e 20min, para obter uma solução mais homogênea. Para cada amostra, foi realizado a varredura da absorvância, sendo que a maior absortividade ocorreu em 270nm. 5 mL de cada amostra foi transferida para em frascos e deixado em repouso, sendo que em intervalos de tempos de 0, 1, 3, 6, 24 e 144 horas foi realizada a fotografia destas amostras. Uma alíquota de cada amostra foi colocada em cubeta e a absorvância foi medida no espectrofotômetro de duplo feixe de varredura com alcance no UV/Vis Jenway 6850 a medida foi realizada em 270nm nos tempos 0, 1, 3, 6, 24 e 144 horas. Ao mesmo tempo em que foi realizado a fotografia, foi realizado a leitura da Absorvância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE CELULOSE POR FERMENTAÇÃO ESTÁTICA E PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Após o período de 10 dias de fermentação, foi observado a formação de membranas de celulose no sobrenadante do meio mostrado na figura 9A, conforme observado também por Qiu et al., (2016), essas membranas foram retiradas com o auxílio de uma pinça e posteriormente deixadas em repouso em NaOH 2% (m/v) por 24 h a temperatura ambiente e lavadas exaustivamente com água destilada para eliminação de resíduos e também para neutralizar as membranas. As membranas de celuloses nativas foram denominadas Cel-Natv.

Para a obtenção da nanocristais de celulose uma fração das membranas foram submetidas a hidrólise por 48 h. Após 48 horas de reação de hidrólise, foi possível observar que a nanocristais de celulose obtida se apresentava sob forma de pequenas fibrilas (Figura 9B). O rendimento de produção da nanocristais de celulose foi de 30%. No trabalho de Niu *et al.*, 2017, foi obtido um rendimento de 68% ao produzir nano esferas de celulose a partir de celulose comercial utilizando uma mistura de ácido sulfúrico e clorídrico. Rambabu *et al.*, 2016 obteve um rendimento entre 35-45% de nanofibrilas de celulose extraídas de pinhas através de tratamento alcalino. O uso do ácido sulfúrico para a hidrólise é amplamente utilizado pois torna a nanocristais de celulose mais estável quando presente em suspensão devido as cargas SO_3 , entretanto a termoestabilidade do nanocristal é reduzida. O ácido clorídrico é também utilizado, porém apresenta uma baixa estabilidade quando está em suspensão em água, devido à baixa carga (TRACHE et al., 2016; VASCONCELOS, FITTIPALDI et al., 2017).

Figura 9. **A:** Membrana de Celulose produzida pelo processo de Fermentação. **B:** Nanocristais de celulose Nativa liofilizada obtido através da Reação de Hidrólise.

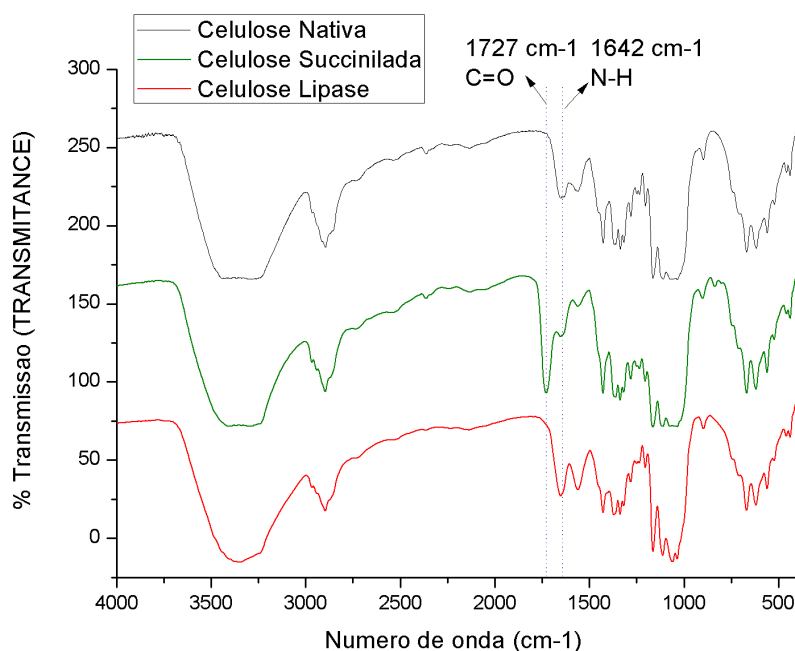


Fonte: O próprio Autor.

5.2. CARACTERIZAÇÃO CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FT-IR)

Os Espectro vibracionais da membrana de celulose bacteriana nativa, succinilada e imobilizada com lipase estão apresentadas na figura 10. Quando comparado a membrana de celulose nativa com a membrana de celulose funcionalizada com ácido succínico, é possível observar o aparecimento da banda em 1727 cm^{-1} na membrana de celulose succinilada, este sinal é responsável pelo estiramento da ligação éster (DE OLIVEIRA et al., 2017). Em todos os materiais analisados, é possível observar uma banda de absorção em 3360 cm^{-1} responsável pela vibração do estiramento OH, a banda de absorção em 2894 cm^{-1} é devida ao estiramento C-H, a banda em 1636 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=C associado com a molécula de água já o aumento absorbância em 1642 cm^{-1} , já as bandas entre 1370 cm^{-1} é atribuída a ligação C-H, a banda em 1340 cm^{-1} é atribuída ao estiramento simétrico COOH e a banda em 1157 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-O-C (NIU et al., 2017). Na membrana de celulose e na nanocristais de celulose imobilizada com lipase, pode ser observado uma nova banda em 1640 cm^{-1} sendo esta responsável pelo grupo amida, derivado de resíduos de aminoácidos da lipase (RIBEIRO et al, 2016).

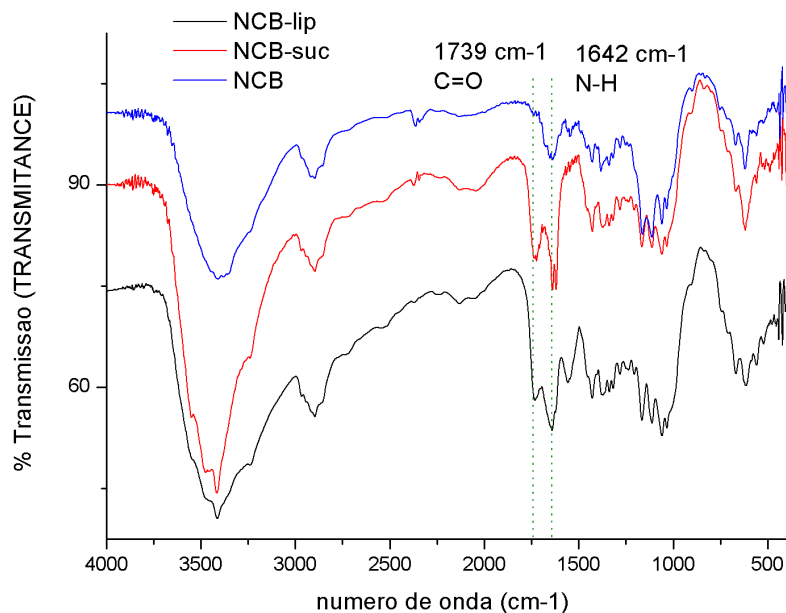
Figura 10. Espectro de Infravermelho (FT-IR) da membrana de celulose nativa, succinilada e imobilizada com Lipase.



Fonte: O próprio Autor.

De maneira semelhante os espectros de FT-IR da nanocristais de celulose, figura 11, apresentaram bandas de absorção similar ao espectro das membranas. A nanocristais de celulose succinilada (NCB-suc) apresentou uma banda intensa em 1739 cm^{-1} que corresponde à vibração de estiramento de ligação éster, a alta absorção em 3419 cm^{-1} deve a vibração do estiramento OH, a absorção em 2885 cm^{-1} é característica da ligação C-H. É possível observar que ao imobilizar a lipase, ocorreu uma diminuição da banda em 1730 cm^{-1} e um aumento na banda em 1640 cm^{-1} , isto é uma boa evidência que o ácido succínico está fazendo uma ligação covalente com a lipase e conseqüentemente aumentando a banda de absorção em $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$. Quando observado a celulose nativa, pode-se observar a formação de uma banda em 1635 cm^{-1} indicativa de grupo OH da água absorvida na estrutura do polissacarídeo, sendo esta banda próxima do grupo amida, o que demanda atenção uma vez que pode-se confundir os resultados. Nesse sentido foi necessário realizar a análise de UV-Vis da celulose nativa e imobilizada (figura 14), pois a celulose nativa não possui grupos cromóforos que absorvam na região do UV-Vis, diferentemente da lipase que possui resíduos de tirosina, triptofano e etc (SILVA et al., 2016b).

Figura 11. Espectro de Infravermelho (FT-IR) da Nanocristais de celulose nativa (NCB), Nanocristais de celulose succinilada (NCB-suc) e da Nanocristais de celulose imobilizada com Lipase (NCB-lip).

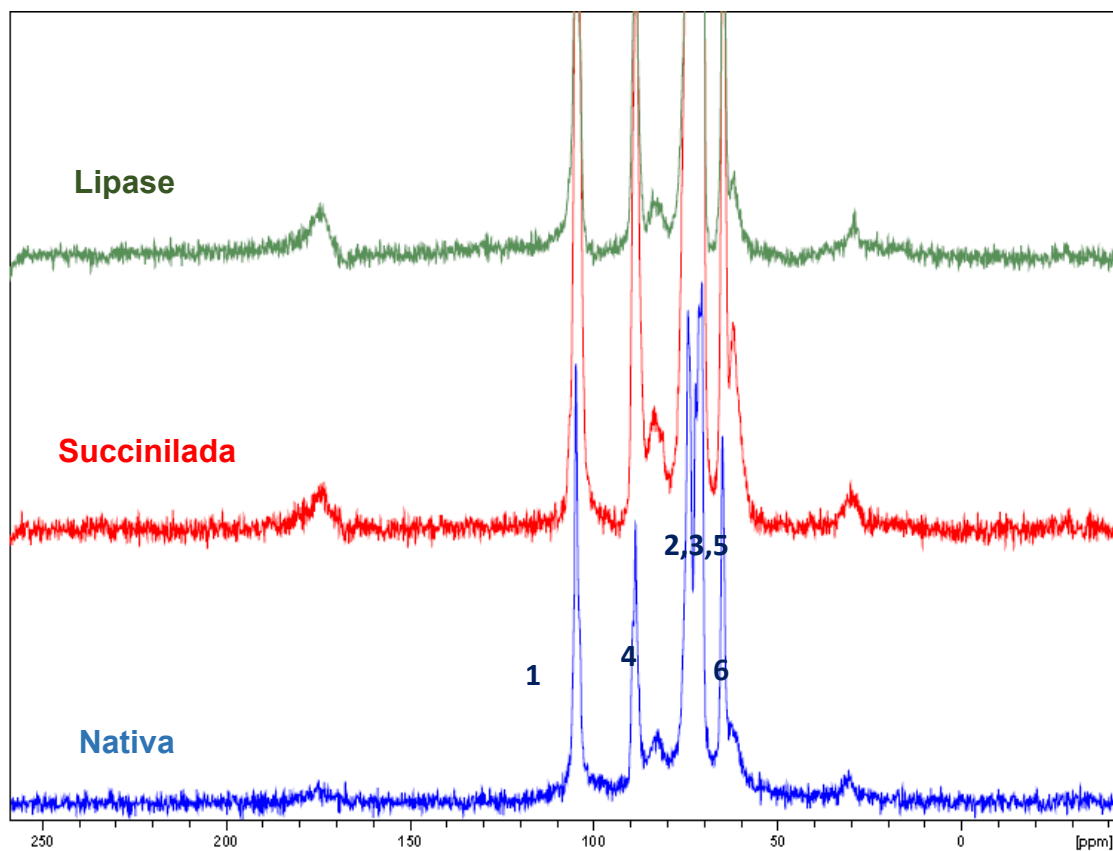


Fonte: O próprio Autor.

5.3. CARACTERIZAÇÃO CELULOSE E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

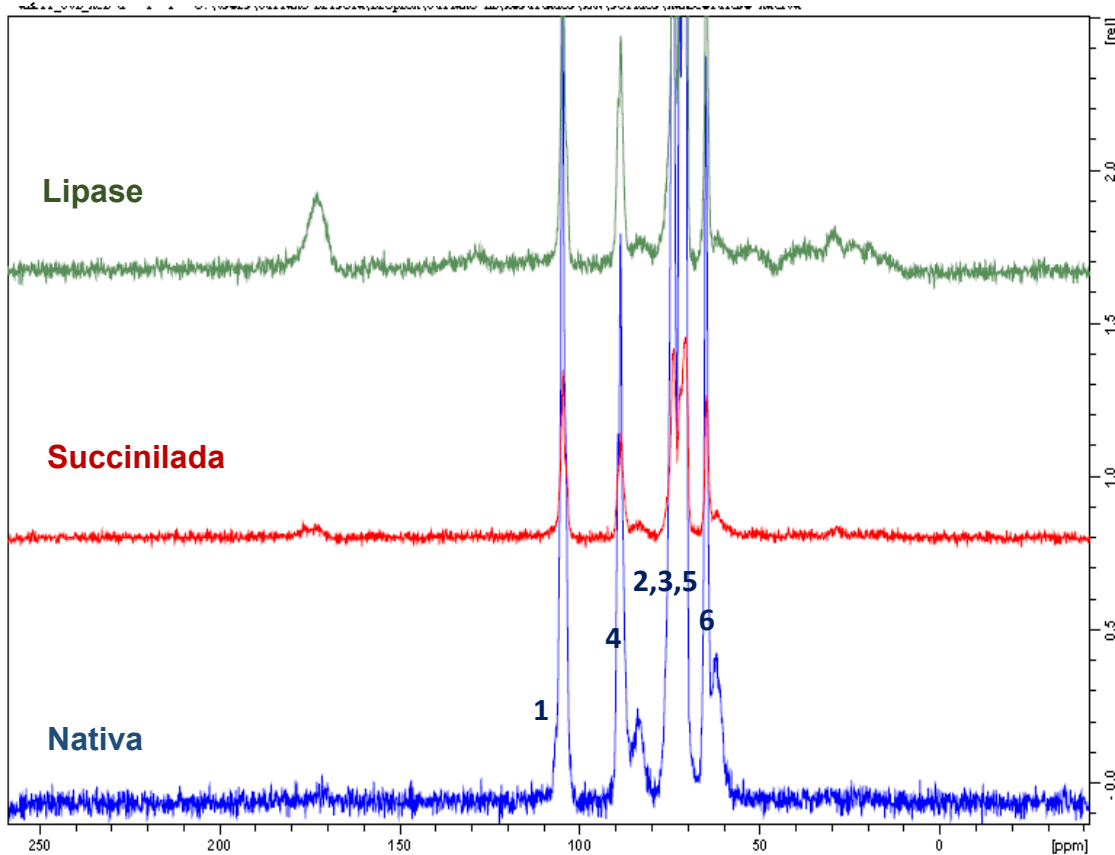
Os espectros de RMN da membrana de celulose e da nanocristais de celulose corroboram com os resultados de FT-IR. Nas figuras 12 e 13 são mostrados os espectros de ^{13}C RMN no estado sólido da membrana de celulose e da nanocristais de celulose, respectivamente. Nestes espectros é possível observar um sinal intenso com deslocamento químico entre 102-108 ppm atribuível ao C_1 tanto de regiões amorfas como de cristalinas, o deslocamento entre 81-93 ppm sinal dos C_4 também de regiões cristalinas e amorfas, sendo que o maior sinal corresponde à parte cristalina e o menor sinal à parte amorfa; os sinais com deslocamento entre 60-64 ppm são atribuídos aos C_6 , cristalinos e amorfos; os sinais relativos aos demais carbonos das unidades anidroglicoses, C_2 , C_3 , C_5 , são observados entre 73-79 ppm (DUBEY *et al.*, 2017; NIU *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2016).

Figura 12. Espectro de ^{13}C -RMN de estado sólido de Membrana de Celulose nativa produzida por *G. hansenii*; Membrana succinilada e Membrana Imobilizada com Lipase



Fonte: O próprio Autor.

Figura 13. Espectro de ^{13}C -RMN de estado sólido da Nanocristais de celulose produzida por *G. hansenii*. Nanocristais de celulose Succinilada e Nanocristais de celulose Imobilizada com Lipase



Fonte: O próprio Autor.

Os espectros apresentados na figura 12 mostram a membrana de celulose e nanocristais de celulose após a reação com anidrido succínico. De maneira geral os mesmos sinais de C1 a C6 são observados, com alterações na intensidade o que indica mudança na cristalinidade. Quando é realizada a derivatização com anidrido succínico na membrana e na nanocristais de celulose, é possível observar um sinal comum em 174 ppm, característico para o grupo carbonila do ácido succínico (RIBEIRO et al, 2016), isto indica fortemente que as celulosas, tanto da membrana como do material nanoparticulado proveniente da hidrólise foram succiniladas.

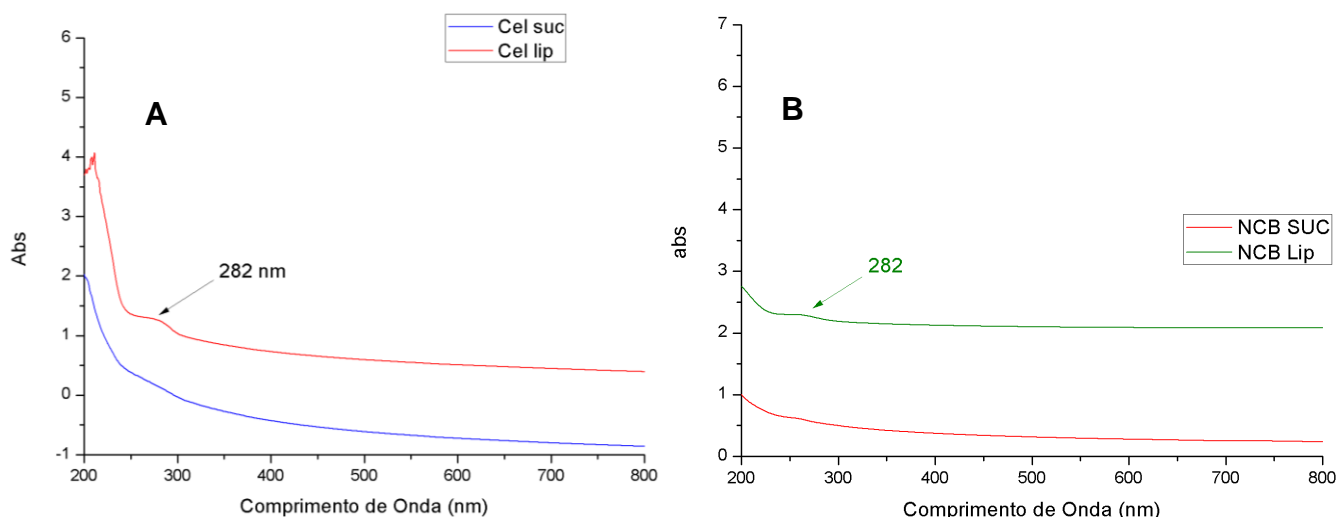
Ao imobilizar a enzima lipase na membrana de celulose succinilada e na nanocristais de celulose, foi possível observar, além dos sinais descritos acima para a celulose, tanto nativa como a nanocristais de celulose, uma sequência de picos entre 15 e 50 ppm e em 174 ppm como mostrado na figura 12 e 13. De acordo

Lopes *et al.*, (2014); Ribeiro et al 2016 este sinal pode ser atribuído a resíduos alifáticos de aminoácidos de peptídeos presente na lipase.

Ao realizar a análise de UV-Vis da membrana de celulose e da nanocristais de celulose immobilizada com lipase, figura 14 A e 12 B, pode-se observar a formação de banda em 282 nm, esta absorbância pode estar relacionada à resíduos de aminoácidos (histidina) esta absorbância não é observada na nanocristais de celulose e da membrana succinilada.

Ao analisar o índice de cristalinidade (%IC) através da integração da área do C_4 das membranas e da nanocristais de celulose, pode-se verificar que a membrana de celulose apresentou uma cristalinidade de 59,90% e a nanocristais de celulose um índice de 76,74%, quando estas foram funcionalizadas com ácido succínico a membrana apresentou um índice de 70,30% e a nanocristais de celulose um índice de 74,04% e quando immobilizadas com lipase a membrana apresentou um índice de 68,58% e a nanocristais de celulose um índice de 69,25%, pode-se perceber que a medida em que foi modificando tanto a celulose quanto a nanocristais de celulose, a cristalinidade reduziu, isto porque o a modificação química pode ter ocorrido em regiões amorfas da celulose (RIBEIRO-VIANA et al, 2016).

Figura 14. A: Espectro de UV-Vis da membrana de celulose succinilada e funcionalizada com lipase. **B:** Espectro de UV-Vis da nanocristais de celulose succinilada funcionalizada com lipase.

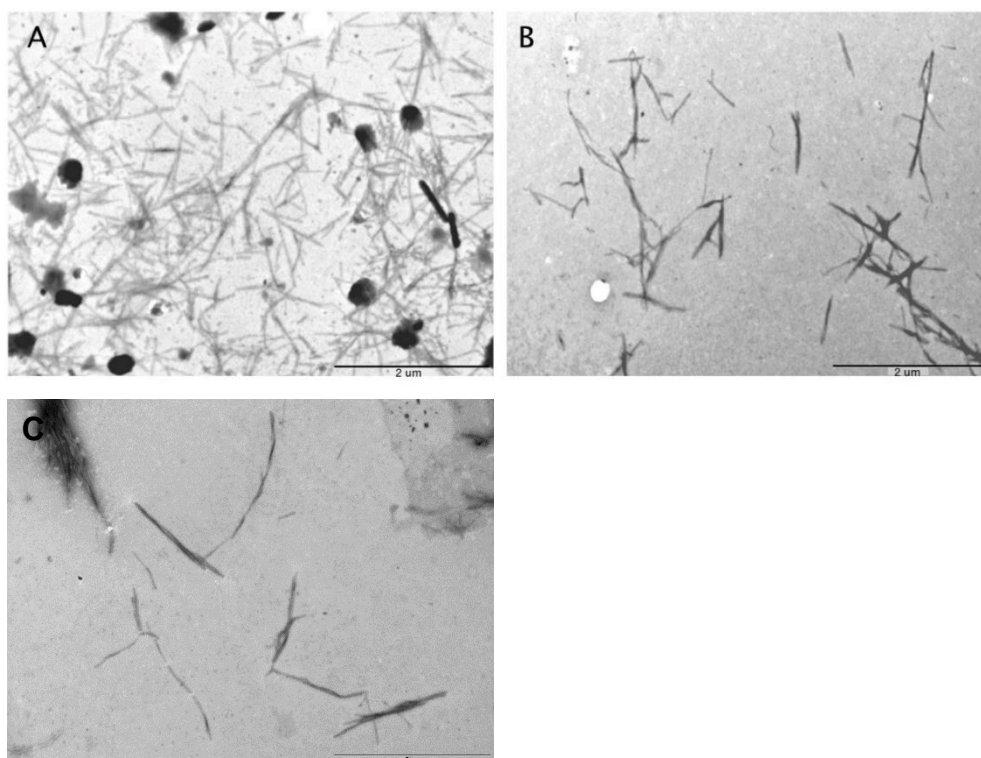


Fonte: O Próprio Autor.

5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A morfologia dos nanocristais de celulose foi estudada através da microscopia eletrônica de transmissão. Através da microscopia eletrônica de transmissão, figura 15 é possível observar que ao realizar a hidrólise ácida houve a fragmentação da membrana celulose formando pequenas nanofibrilas em formato de agulhas, isto evidencia o isolamento da nanocristais de celulose. Ao realizar a reação de succinilação em seguida a conjugação com a lipase da nanocristais de celulose foi possível observar que os Nanocristais não alteraram sua forma, a distribuição do tamanho das partículas após a hidrólise é mostrada na figura 16. Em ambos os materiais analisados foram obtidas partículas com um diâmetro médio de 30 a 40 nm e um comprimento médio de 300 a 400 nm e a razão de aspecto média foi de 13, tabela 4. Autores como Pandey et al., (2012); An; Ema, (2016); Geiger et al, (2017), em seus trabalhos também encontraram partículas em forma de agulhas com uma alta razão de aspecto. Cherian *et al.*,(2010) ao realizar hidrólise alcalina da celulose de fibras presente no abacaxi, obteve partículas de tamanho semelhante com deste trabalho, com comprimento variando de 200-300 nm e diâmetro variando de 5 -60 nm.

Figura 15. Imagens de TEM dos nanocristais nativos (A). nanocristais succinilados (B). Nanocristais imobilizados com Lipase.



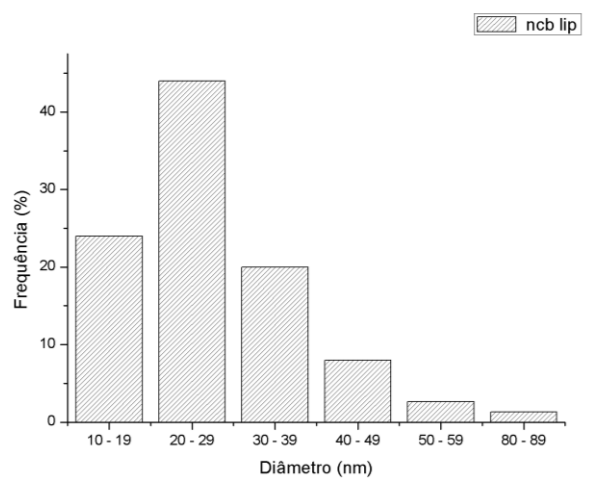
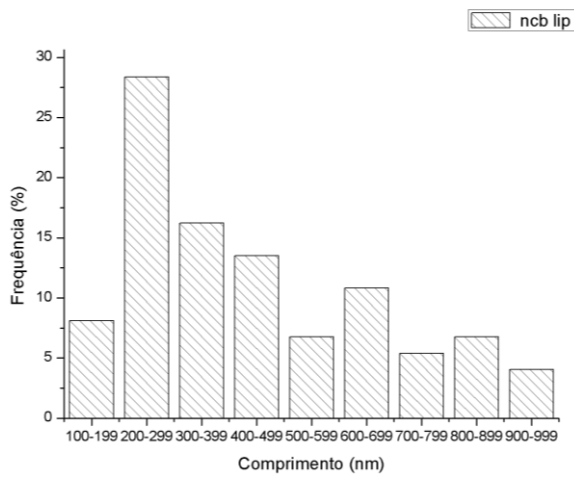
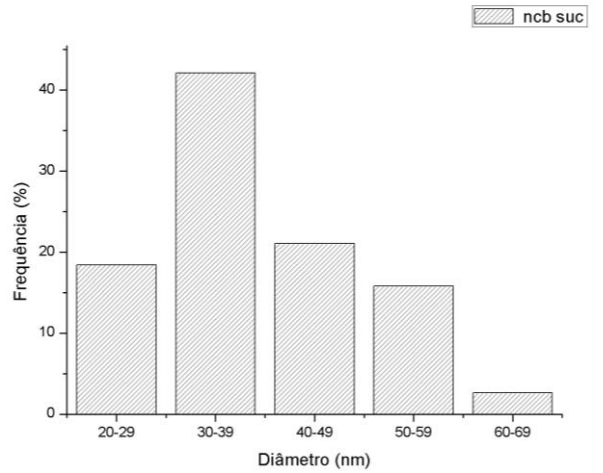
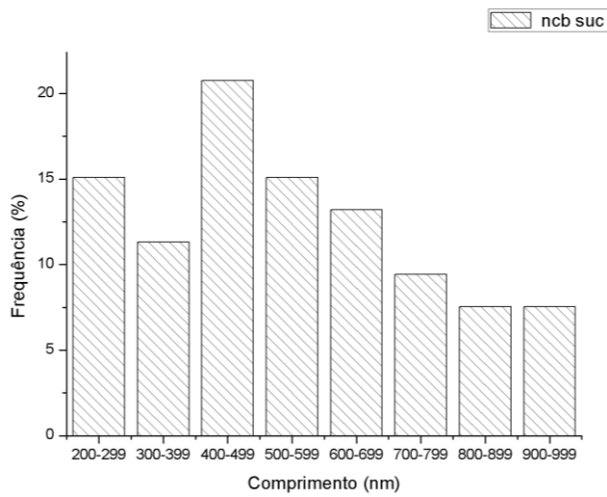
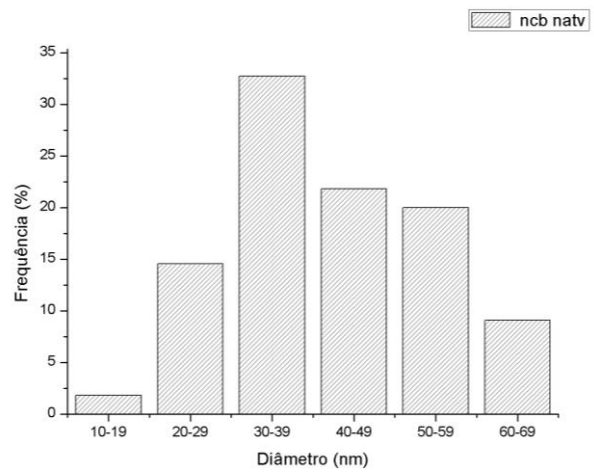
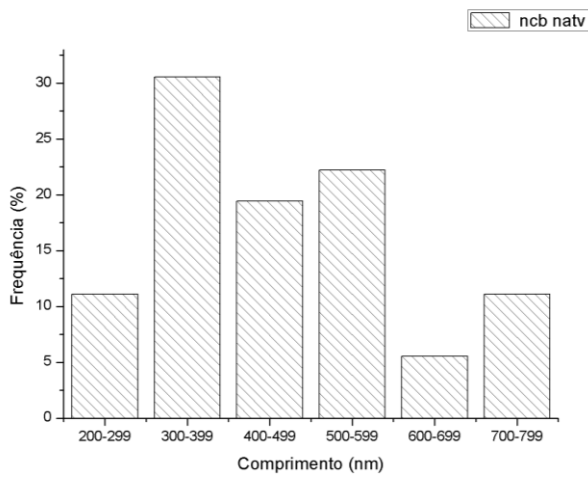
Fonte: O Próprio Autor.

Tabela 4. Comprimento e diâmetro médio dos Nanocristais nativos, succiniliados e imobilizados com lipase

Amostra	Diâmetro (nm)	Comprimento (nm)	Razão de Apectro (C/D)
NCB-Nat	39	450	4 - 29 (13)
NCB-Suc	41	538	4 - 39 (14)
NCB-Lip	27	444	6 - 44 (17)

Fonte: O Próprio Autor.

Figura 16. Distribuição do diâmetro e comprimento da NCB nativa, succinilada e conjugada com lipase.



5.5. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA – TGA

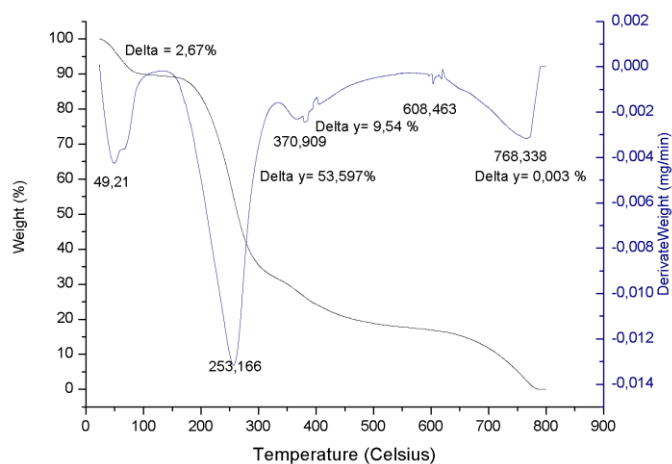
As curvas de TGA das membranas nativa, succinilada e imobilizada com lipase estão apresentadas nas figuras 17, 18 e 19. Através da tabela 5, foi possível observar que todas as membranas apresentaram três taxas de degradação. O primeiro estágio de degradação foi responsável pela perda de massa devido à evaporação de água e outros componentes de baixo peso molecular, na membrana nativa a quantidade de água perdida foi de 2,67% na temperatura de 49,21°C, na membrana de celulose succinilada a perda foi de 11,094% na temperatura de 48,64°C, na membrana imobilizada com lipase a perda foi de 6,683% na temperatura de 55,24°C. O segundo estágio de degradação é responsável pela perda de massa decorrente do processo de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas. Pode-se observar que para a membrana nativa a perda de massa foi de 53,60% na temperatura de 253,16°C, para a membrana succinilada a perda de massa foi de 49,168% na temperatura de 259,17°C e para a celulose imobilizada com lipase a perda de massa foi de 50,38% na temperatura de 269,83°C. Comparando-se a membrana de celulose nativa com a membrana succinilada, pode-se observar que ao adicionar o grupo succínico conferiu uma maior estabilidade de degradação para a membrana, pois houve um aumento de temperatura. De maneira análoga, ao adicionar a enzima lipase na membrana, pode-se observar que a temperatura de degradação da membrana aumentou, quando comparado com a membrana nativa e com a membrana succinilada, isto mostra que ao adicionar as estruturas proteicas da enzima na membrana de celulose bacteriana há um aumento da estabilidade térmica.

Tabela 5. Análise da degradação térmica das amostras

Membranas	Temperatura °C	Perda de Massa (%)	Nanocristais de celulose	Temperatura °C	Perda de Massa (%)
<i>Cel. Nativa</i>	49,21	2,67	<i>NCB. Nativa</i>	49,56	19,95
	253,16	53,6		252,42	58,18
<i>Cel. Suc</i>	48,64	11,094	<i>NCB. Suc</i>	49,56	9,45
	259,17	49,17		258,28	55,64
<i>Cel. Lip</i>	55,24	6,7	<i>NCB. Lip</i>	49,56	15,78
	269,83	50,4		278,54	58,18

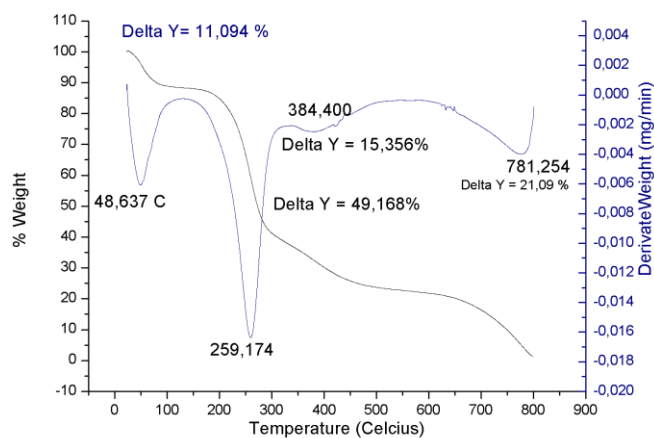
Fonte: O Próprio Autor.

Figura 17. Curva TG/TGA para membrana de celulose nativa.



Fonte: O Próprio Autor.

Figura 18. Curva TG/TGA para membrana de celulose succinilada.

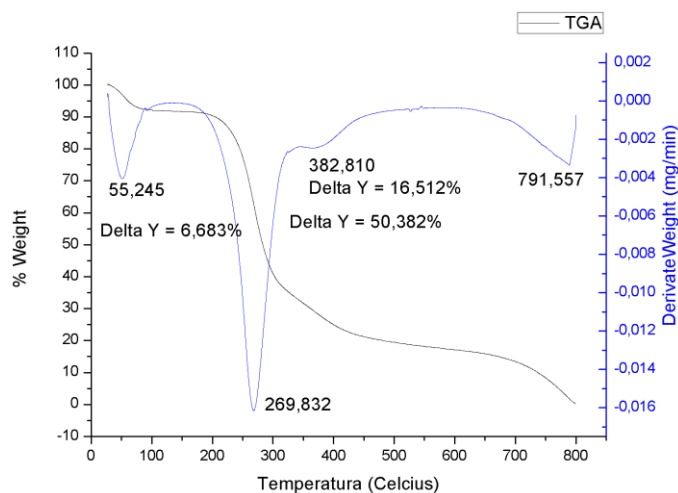


Fonte: O Próprio Autor.

É possível observar também que as membranas apresentaram degradação em 370°C, 384°C e 382°C para as membranas nativa, succinilada e com lipase respectivamente.

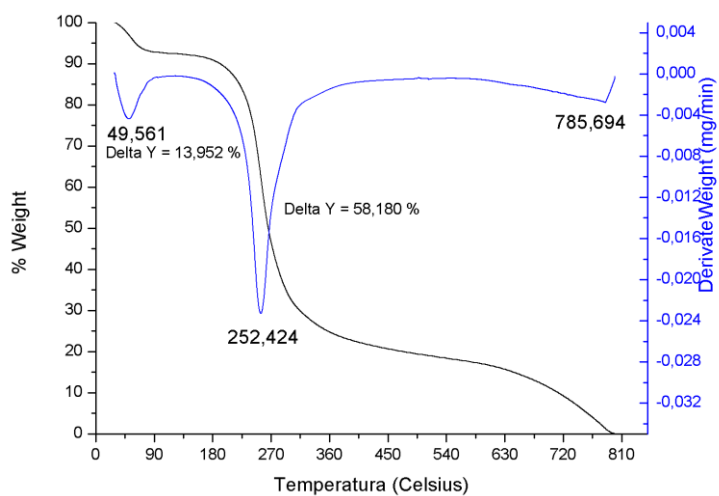
Os gráficos de TGA para nanocristais de celulose nativa, succinilada e imobilizada com lipase, figura 20, 21 e 22 apresentaram taxa de degradação com o mesmo perfil, entretanto diferenciaram-se em relação à temperatura. O primeiro estágio de degradação é responsável pela perda de massa devido à perda de água.

Figura 19. Curva TG/TGA para membrana de celulose com lipase imobilizada.

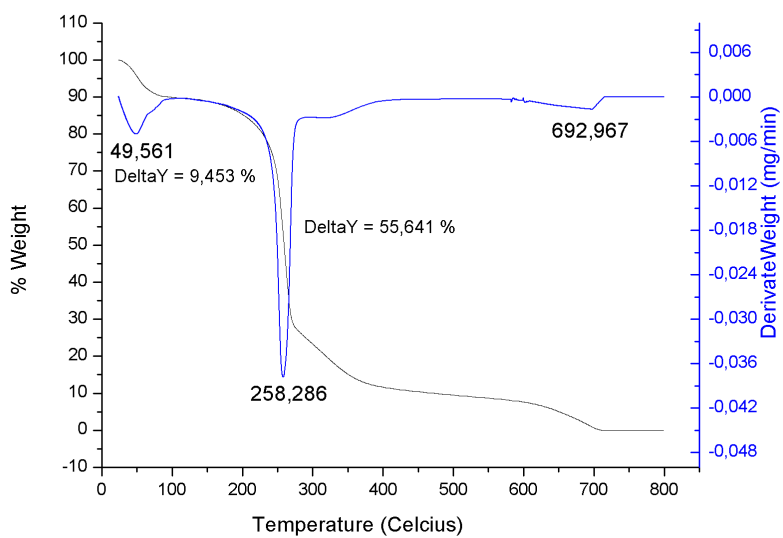


Fonte: O Próprio Autor.

Na nanocristais de celulose nativa, succinilada e com lipase imobilizada (figuras 20 a 22) a perda ocorreu na temperatura de 49,56°C com uma perda de 13,95% para a nanocristais de celulose nativa e 9,45% para a celulose succinilada e 15,78% na nanocristais de celulose imobilizada com lipase. Já no segundo estágio de degradação houve perda de massa responsável pelo processo de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas. Para a nanocristais de celulose nativa, a perda ocorreu em 252,42°C com uma perda de 58,18%. Na nanocristais de celulose succinilada a perda ocorreu em 258,28°C com uma perda de 55,64%. Na nanocristais de celulose imobilizada com lipase a perda de massa ocorreu em 278,54°C com uma perda de 58,18%. De maneira semelhante com as membranas, ao funcionalizar a nanocristais de celulose com ácido succínico, foi percebido um aumento da estabilidade térmica em relação a nanocristais de celulose nativa, e ao imobilizar lipase na nanocristais de celulose houve um aumento ainda maior na estabilidade térmica.

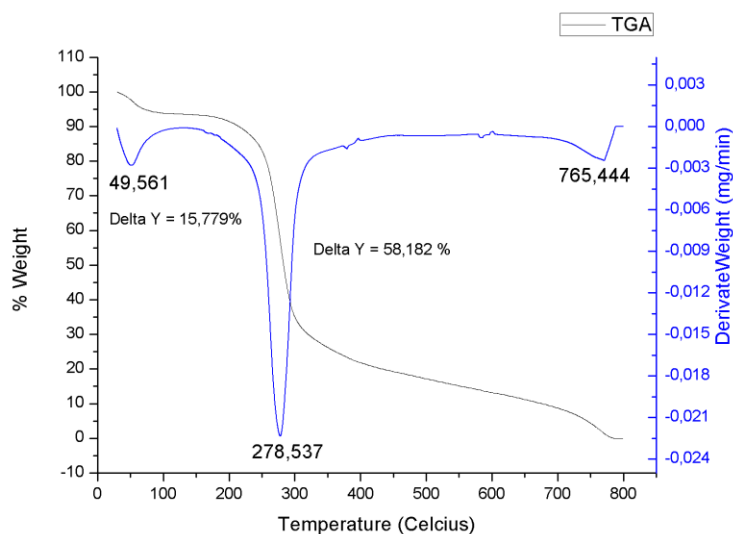
Figura 20. Curva TGA/DTGA nanocristais de celulose nativa.

Fonte: O Próprio Autor.

Figura 21. Curva TGA/DTGA nanocristais de celulose funcionalizado com ácidosuccínico.

Fonte: O Próprio Autor.

Figura 22. Curva TGA/DTGA nanocristais de celulose funcionalizado com lipase.



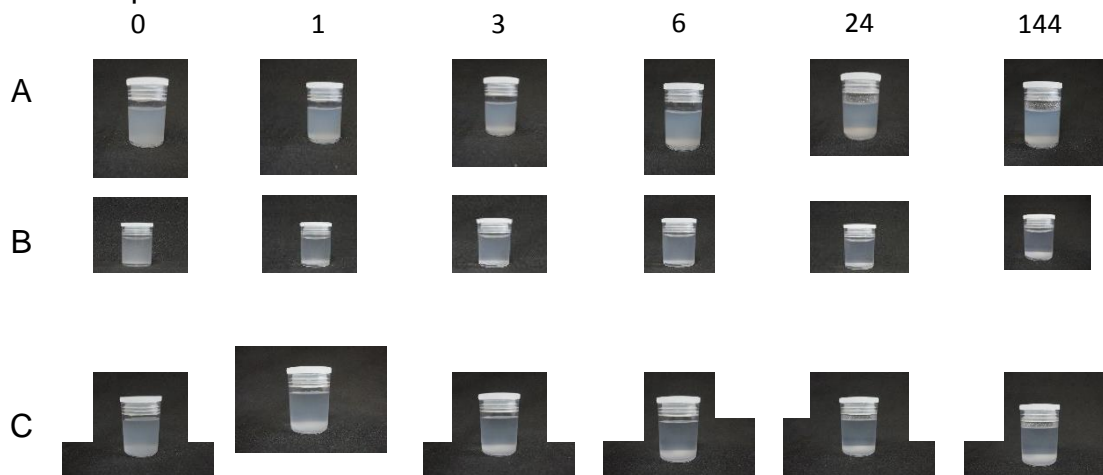
Fonte: O Próprio Autor.

Comparando-se os gráficos de TG da membrana nativa e da nanocristais de celulose nativa, pode-se observar que a temperatura de maior perda de massa foi de 253,166°C e 252,424°C, respectivamente. Isto pode-se estar relacionado ao fato das cargas sulfatos provenientes da reação de hidrólise que diminuem a estabilidade térmica da nanopartícula (GEIGER; ZIMMERMANN; SIXTA, 2017).

5.6. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA NANOCRISTAIS DE CELULOSE

A figura 23 mostra as fotografias das suspensões das nanopartículas em relação ao tempo. Como pode-se observar a suspensão em todo o experimento apresentou-se sob uma única fase se assemelhando a uma suspensão leitosa. Como pode-se observar, a suspensão permaneceu-se estável, sem grandes variações na absorvidade, como é mostrado na figura 24.

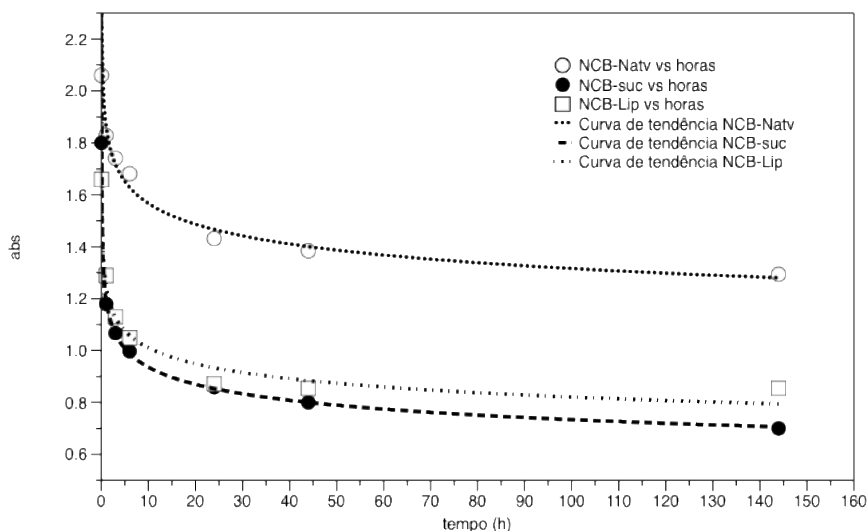
Figura 23. Fotografias das suspensões em relação ao tempo (1h, 3h, 6h, 24h, 144h). A: suspensão de nanocristais de celulose nativa. B: nanocristais de celulose succinilada. C: Nanocristais de celulose imobilizada com lipase.



Fonte: O Próprio Autor.

O estudo da estabilidade da nanocristais de celulose avalia as propriedades físico químicas da nanocristais de celulose sob certo tempo de estocagem. Através da análise foi possível observar que a nanocristais de celulose permaneceu estável por até 4 dias, entretanto foi possível observar que houve uma queda da absorvância. Segundo Jesus Silva; D'Almeida, 2009; Niu *et al.*, 2017; Vasconcelos, *et al.*, 2017, a alta estabilidade deve-se as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de Van der Waals entre as partículas, e também pelo fato da nanocristais de celulose estar carregada negativamente com grupos SO_4^{2-} decorrente do processo de hidrólise, no qual conferem uma maior estabilidade dos nanocristais, entretanto reduz a termoestabilidade. O decréscimo da densidade ótica se dá pelo fato destas interações tornarem-se mais fracas com partículas maiores (GEIGER; ZIMMERMANN; SIXTA, 2017; NIU *et al.*, 2017).

Figura 24. Mudança da densidade óptica das partículas da nanocristais de celulose em relação ao tempo, $\lambda = 270$ nm.



Fonte: O próprio Autor.

A equação para as curvas de variação da absorvância em relação ao tempo para as nanocristais de celulosas indicando a sua estabilidade em suspensão foram:

- nativa (NCB): $y = 1,8654.x^{-0.075762}$
- succinilada (NCB-suc): $y = 1,1936.x^{-0.10568}$
- funcionalizada (NCB-lip): $y = 1,2436.x^{-0.090195}$

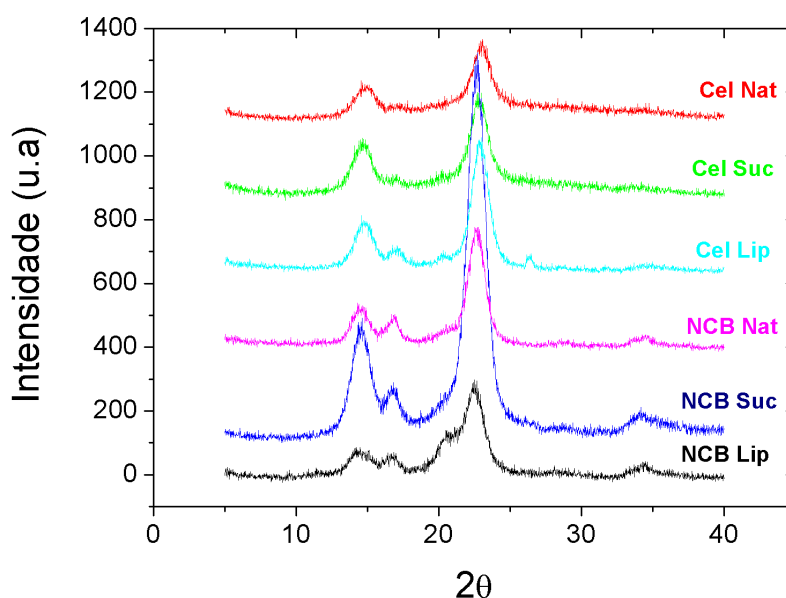
Como pode-se observar a partir da figura 24, ao funcionalizar a nanocristais de celulose com ácido succínico e com lipase foi verificado um decréscimo da absorvância, isto sugere que o ácido succínico e as cargas dos resíduos de aminoácidos da lipase desestabilizam as nanopartículas quando em suspensão aquosa.

Vários autores sugerem modificações na metodologia de hidrólise da nanocristais de celulose, a fim de que se obtenha um material com uma maior estabilidade quando em suspensão. Martínez-Sanz; et al, (2011)[em seu trabalho testou várias concentrações de ácidos em diferentes, já Niu *et al.*, (2017) associou a técnica de ultrassom associado com uma mistura de ácido clorídrico e sulfúrico e temperatura para obter uma nanocristais de celulose esférica e com alta estabilidade.

5.7. ESTUDO DA CRISTALINIDADE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A difração de raios – X é uma ferramenta que elucidada o tipo de arranjo cristalino. Foi realizado esta técnica a fim de verificar se a modificação química alteraria a cristalinidade da membrana de celulose e na celulose. Na Figura 25 são mostrado os perfis de difração da membrana de celulose e da nanocristais de celulose nativa, funcionalizada com ácido succínico e imobilizada com lipase.

Figura 25. Difratoograma da celulose bacteriana e dos nanocristais de celulose nativa, succinilada e imobilizada com lipase.



Fonte: O Próprio Autor.

Foi possível observar 3 picos característicos em $14,6^\circ$, $16,8^\circ$ e $22,6^\circ$ (figura 25) sendo que estes são respectivos aos índices de Miller 101, 10 $\bar{1}$ e 002 características da celulose do tipo I (GOELZER et al., 2009).

O índice de cristalinidade das amostras foi calculado a partir dos resultados de DRX. O índice de cristalinidade dos nanocristais de celulose nativa, funcionalizada com ácido succínico e com lipase foi de 70%, 83% e 70%, respectivamente. Enquanto da membrana nativa, funcionalizada com ácido succínico e com lipase foi de 76 %, 42 % e 80 %, respectivamente. Comparando-se a membrana de celulose com a nanocristais de celulose, pode-se observar que a

esta última tem uma maior cristalinidade. A membrana de celulose por apresentar maiores quantidades de regiões amorfas em comparação com a nanocristais de celulose, por consequência apresenta uma menor cristalinidade (FUNARI et al., 2013).

5.8. QUANTIFICAÇÃO DE LIPASES IMOBILIZADA NA MEMBRANA E NA NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Na tabela 5 estão apresentados os resultados das quantidades de lipase imobilizada na celulose e nos nanocristais nativa, succinilada e conjugada com lipase.

Tabela 5. Concentração de Lipase imobilizada na membrana e na nanocristais de celulose bacteriana.

Amostra	μg Lipase/mg celulose; nanocristais de celulose	Massa total de suporte (mg)
<i>cel-natv</i>	0	18
<i>cel-suc</i>	0	17
<i>cel-lip</i>	9,7 \pm 2,90	25
<i>ncb-natv</i>	0	20
<i>ncb-suc</i>	0	10
<i>ncb-lip</i>	26,63 \pm 2,70	11

Fonte: O próprio Autor.

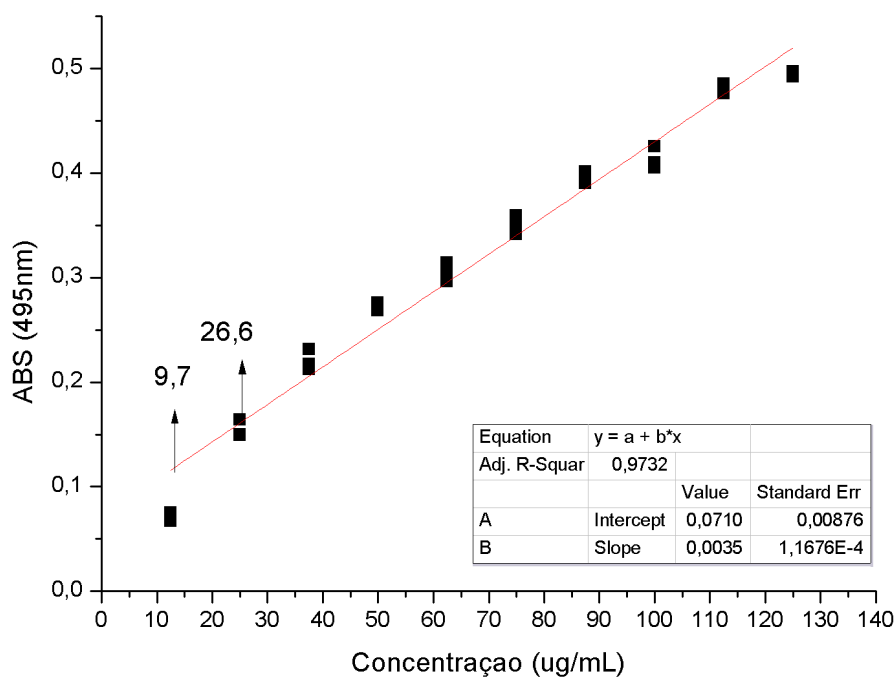
A quantificação de proteínas usando clivagem a partir de proteases vem sendo estudada nos últimos anos. Atacan et al (2017); Atacan et al (2016) imobilizaram tripsina em magnetita e através desta realizaram a digestão de caseína presente em amostras de leite. Wang *et al.*, 2016 também desenvolveu um reator imobilizado com tripsina e quimotripsina, a fim de se digerir amostras complexas de proteínas.

O método de Bradford é um método em que se baseia na formação de um complexo estável da proteína com o Reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 sendo que este absorve luz em 595 nm podendo ser quantificado por espectroscopia de UV-Vis a fim de determinar a concentração total de proteínas numa amostra utilizando uma curva padrão de BSA (BRADFORD, 1976). Por ser um método barato, rápido robusto e bem descrito na literatura e amplamente aceita na comunidade científica, esta técnica vem sendo utilizada na quantificação de lipases,

como por exemplo nos trabalho de Wang, X. *et al.*, 2017 e Nicolás; Lassalle; Ferreira, 2017 que quantificaram a concentração de lipases imobilizadas.

Na tabela 5 estão apresentadas as quantidades de lipase imobilizada que foi determina na membrana e na nanocristais de celulose após a digestão enzimática pelo método de Bradford utilizando como curva padrão o BSA (figura 26). A quantificação foi feita a partir da absorbância líquida, descontando-se o valor da absorbância da tripsina. Como pode-se observar, houve uma maior imobilização nos nanocristais de celulose do que na membrana, isto pode estar relacionado ao fato das partículas de nanocristais de celulose possuírem uma maior área superficial em relação as microfibrilas *et al*, 2015). Wang, X. *et al.*, 2017 em seu experimento, conseguiu imobilizar por adsorção 75 µg/mg de lipase em sua resina, isto pelo fato de a adsorção ser um método menos específico quando comparado com a imobilização por ligação covalente. Porém a imobilização tem a vantagem de realizar uma ligação mais forte dando uma maior estabilidade para enzima (ATACAN *et al* 2017; EYLEY; THIELEMANS, 2014).

Figura 26: Curva Padrão de BSA para a Quantificação de Proteínas totais.



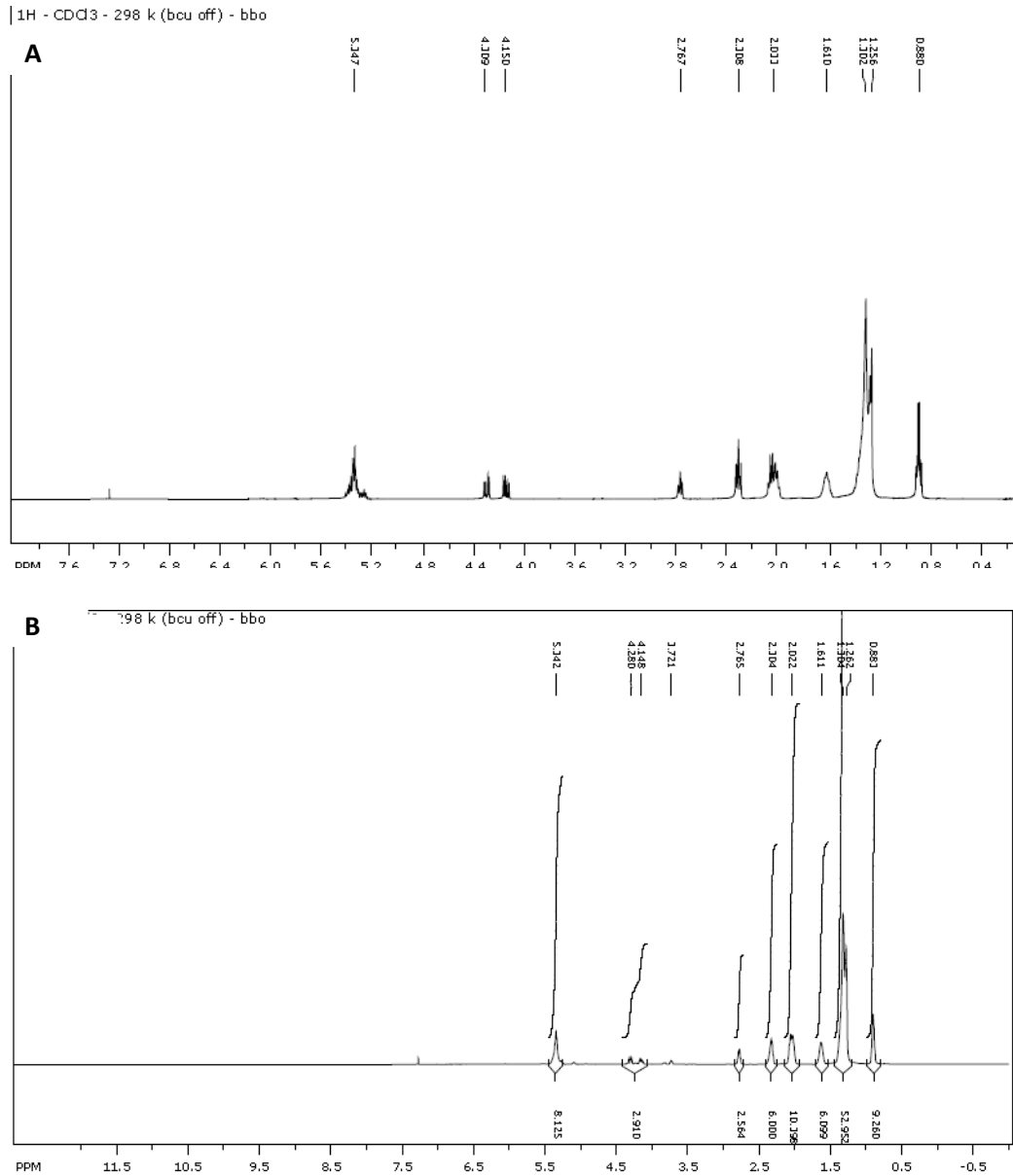
Fonte: O Próprio Autor.

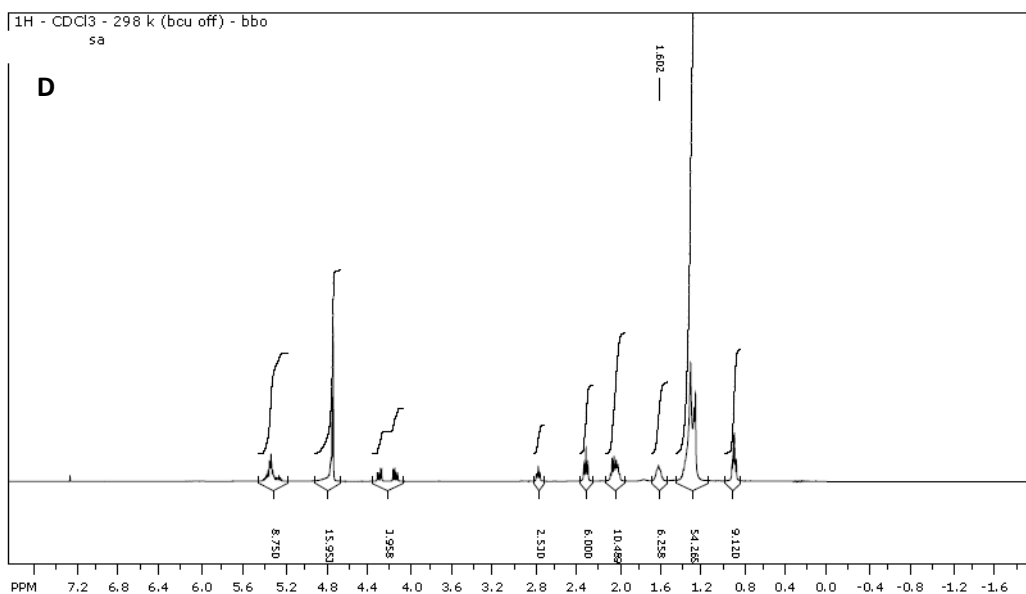
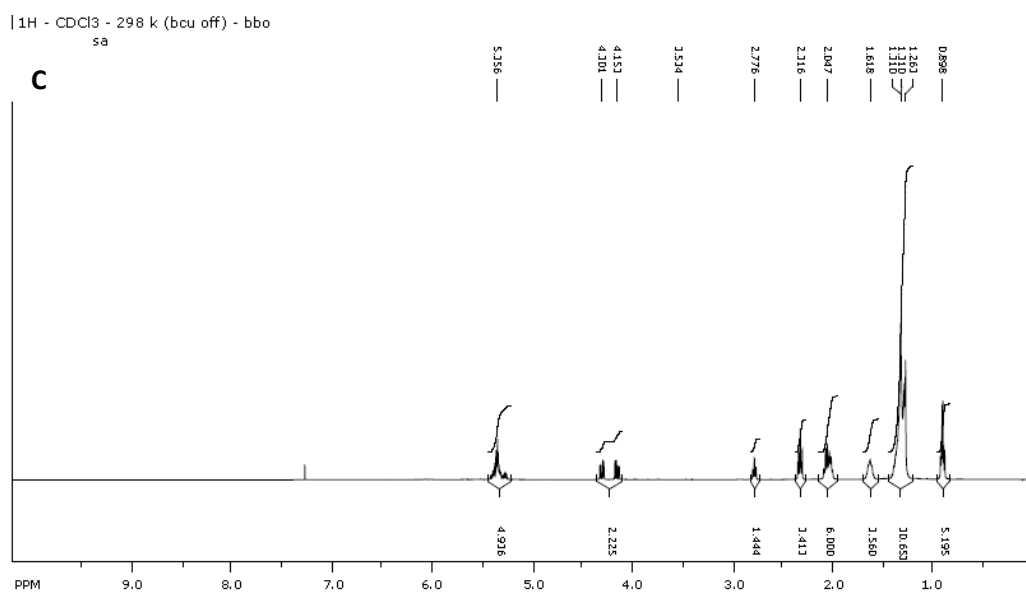
5.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE POR RMN ¹H- RMN

Os Triacil glicerídeos são compostos majoritários encontrados nos óleos vegetais, e os deslocamentos químicos de ¹H RMN são bem definidos na literatura. A figura 27 mostra o deslocamento químico de ¹H RMN típico de um óleo vegetal. Segundo Carneiro et al, 2005 os picos responsáveis pelos ácidos graxo insaturados são encontrado em um deslocamento entre δ 5.40 – 5.26 ppm sendo definido como hidrogênio oleofínico no qual também inclui os carbonos do glicerol. Os hidrogênios do carbono do metileno glicerol aparecem na região de δ 4.32 – 4.10 ppm. Para os hidrogênios do carbono do bis-alílico os deslocamentos aparecem entre δ 2.80 – 2.70 ppm. Para os hidrogênios do α – Carbonil metilênico os deslocamentos estão entre δ 2.35 – 2.20 ppm. Os hidrogênios do carbono alílico estão entre δ 2.10 – 1.90 ppm. Para os sinais hidrogênios do carbono do β – Carbonil metilênicos os sinais estão entre δ 1,70- 1.50 ppm. Para outros ácidos graxos metilênicos os sinais estão entre δ 1.40 – 1.15 ppm. Os sinais responsáveis pelo carbono dos grupos metils dos ácidos graxos são de δ 0.88 ppm. Ao realizar a hidrólise dos triacilglicerídeos observa-se que há quebra da ligação éster do triacilglicerídeo liberando glicerol e ácidos graxos livres, figura 28. Os sinais dos hidrogênios do α -carbonil metilênico (δ 2.35-2.2ppm) se encontram conservados a ambiente químicos, sendo este integrados como valor padrão de 6. Quando foi realizado a reação de hidrólise, observou-se uma diminuição da área do sinal do metileno glicerol (δ 4.32-4.10 ppm) , indicando que houve a reação de hidrólise e conseqüentemente a liberação de ácidos graxos para o meio. Esta variação pode ser calculada através dos picos de integração (Equação 1) dos espectros e então determinada a concentração de ácidos graxos livres na amostra como mostra a tabela 4. Como pode-se observar na tabela, ao realizar a reação de hidrólise com a lipase livre a porcentagem de triacilglicerídeo da amostra diminui para 72 %, quando realizado a reação de hidrólise com a membrana succinilada o teor de triacilglicerídeos foi de 69 % e já no nanocristal de celulose o teor de triacilglicerídeo foi de 73 %. Isto indica que a lipase permaneceu ativa mesmo após a imobilização na membrana de nos Nanocristais de celulose, sendo que a imobilização pode ser verificada através da quantificação de proteína e pelo ¹³C RMN.

$$\% \text{Ácidos graxos livres (AGL)} = (\text{área do pico metileno glicerol} \times 100) / 4 \text{ Eq. 1}$$

Figura 27. Deslocamento químico típico de ^1H RMN para o óleo Vegetal (A); Reação com lipase não imobilizada (B); Reação com lipase imobilizada na membrana (C); Reação com lipase imobilizada em nanocristais de Celulose (D)





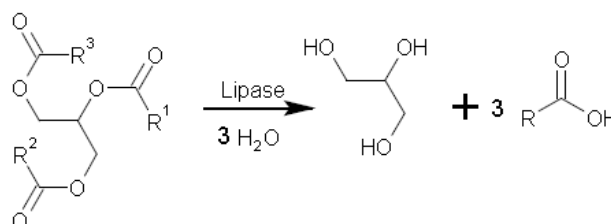
Fonte: O próprio Autor

Tabela 4. Valores de Integração dos sinais de ^1H característicos para ácidos graxos de TAG ou livres e valores percentuais relativos de TAG/AGL (em negrito), obtidos dos espectros de ^1H -RMN após reação de hidrólise com membrana (Óleo+Cel-lip) e nanocristais de celulose (Óleo+NCBW-lip) funcionalizadas com lipase.

Tipo de ^1H	δ (ppm)		Óleo	Óleo+enzima livre	Óleo+Cel-lip	Óleo+NCBW-Lip
	max	min				
Olefinico	5,4	5,3	8,69	8,13	8,13	8,32
Gli CH ₃	4,3	4,1	3,91	2,91	2,79	2,93
bis-alílico	2,8	2,7	2,53	2,56	2,59	2,67
α -carbonil metileno	2,4	2,2	6	6	6	6
alílico	2,1	1,9	10,5	10,4	10,36	10,19
β -carbonil metilênico	1,7	1,5	6,09	6,1	6,01	6,18
Metilênico	1,4	1,2	53,3	52,96	53,32	52,23
carbonos metílicos do ácido linolênico	1,0	1,0	9,15	9,26	9,42	8,84
% Triglicerídeos/ ácidos graxo livres			97,9	72,76	69,87	73,25

Fonte: O Próprio autor.

Figura 28. Reação de Hidrólise Catalisada pela Lipase.



Fonte: O Próprio Autor.

A imobilização das lipases vem sendo comumente estudadas devido a sua aplicabilidade industrial. Trabalhos como o de Wu; et al, 2016; Zhao *et al.*, 2017; Zaak *et al.*, 2017 imobilizaram lipases entretanto a imobilização frequentemente utilizada é por absorção, trabalhos como os de Sharma; et al (2013) e Ribeiro et al (2016), sugerem uma imobilização covalente pois esta proporciona uma maior estabilidade na imobilização.

6. CONCLUSÃO

1. Foi possível concluir que a funcionalização da celulose e dos nanocristais de celulose bacteriana com ácido succínico se mostraram métodos eficientes para a imobilização de enzimas, evidenciadas através das técnicas de (RMN, FT-IR, DRX e TG/DTG).
2. Através da técnica de Bradford aliado com a reação da tripsina, foi possível determinar a concentração de lipase que foi imobilizada na membrana e nos Nanocristais de celulose bacteriano;
3. Os Nanocristais de celulose apresentaram uma maior Cristalinidade em relação as membranas evidenciadas através dos difratogramas.
4. Os Nanocristais apresentaram uma boa razão de aspecto e apresentaram uma boa estabilidade quando em suspensão aquosa, mesmo após a funcionalização e imobilização com lipase, evidenciados através das análises de TEM e estabilidade;
5. Através da técnica de ^1H RMN foi possível determinar a concentração de triacilglicerídeo antes e após a reação com a lipase e, portanto, mostrar que a lipase continuou ativa mesmo após a imobilização na celulose e nos Nanocristais de celulose;

7. REFERÊNCIAS

ALSHEHRI, S. M.; YAMAUCHI, Y.; LEE, Y.; WU, K. C. commercial lipase acrylic resin for biodiesel production. 2016.

AN, A.; EMA, Z. The fast and effective isolation of nanocellulose from selected cellulosic feedstocks. v. 148, p. 251–258, 2016.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. de M.; DEKKER, R. F. .; REZENDE, M. I.; MESSIAS, J. M.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean meal supplemented with amino acids, and some physicochemical properties of the enzyme. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 169–177, 2014. Disponível em: <<http://www.orbital.ufms.br/index.php/Chemistry/article/view/577>>.

ATACAN, K.; ÇAKIROĞLU, B.; ÖZACAR, M. Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 148–155, 2017.

ATACAN, K.; ÇAKIROĞLU, B.; ÖZACAR, M. Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in the bovine milk. **Food Chemistry**, v. 212, p. 460–468, 2016.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of α -amino ester compounds. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1420–1433, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.008>>.

BILGI, E.; BAYIR, E.; SENDEMIR-URKMEZ, A.; HAMES, E. E. Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. v. 254, p. 248–254, 1976.

CACICEDO, M. L.; CASTRO, M. C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.;

TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO, G. R.

Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications.

Bioresource Technology, v. 213, p. 172–180, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071>>.

CAMPANO, C.; BALEA, A.; BLANCO, A.; NEGRO, C. Enhancement of the

fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 1–35, 2015.

CARNEIRO, P.; REDA, S.; CARNEIRO, E. H NMR Characterization of Seed Oils

from Rangpur Lime (Citrus limonia) and “ Sicilian” Lemon (Citrus limon). **Annals of**

Magnetic ..., v. 4, n. 3, p. 64–68, 2005. Disponível em:

<<http://www.auremn.org.br/Annals/2005-vol4-num3/2005-vol4-num3-64-68.pdf>>.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J. L.; CARO, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN,

P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter*

swingsii sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96–102, 2011.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. a.; SINGHAL, R. S. Microbial cellulose:

Fermentative production and applications (Review). **Food Technology and**

Biotechnology, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, L.; ZOU, M.; HONG, F. F. Evaluation of fungal laccase immobilized on natural

nanostructured bacterial cellulose. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–10, 2015.

CHERIAN, B. M.; LEÃO, A. L.; DE SOUZA, S. F.; THOMAS, S.; POTHAN, L. A.;

KOTTAISAMY, M. Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibres by steam

explosion. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 3, p. 720–725, 2010.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial

cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3, p. 403–

411, 2004. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61>>.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G. Aplicações Sintéticas de Lipases

Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, p. 1–9, 2012.

DE JESUS SILVA, D.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel (Brazil)**, v. 70, n. 7, p. 34–52, 2009.

DE OLIVEIRA, S. A.; DA SILVA, B. C.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; URBANO, A.; DE SOUSA FARIA-TISCHER, P. C.; TISCHER, C. A. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 642–653, 2017.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G.; DA SILVA, R. R.; DA SILVA BARUD, H.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; DE OLIVEIRA, O. B.; RIBEIRO, S. J. L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.059>>.

DONINI, Í. A. N.; DE SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecletica Quimica**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DUBEY, S.; KUMAR, R.; AGARWAL, P.; SINGH, J.; SINHA, N.; SINGH, R. P. International Journal of Biological Macromolecules From rotten grapes to industrial exploitation : Komagataeibacter europaeus SGP37 , a micro-factory for macroscale production of bacterial nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 52–60, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.016>>.

EYLEY, S. S.; THIELEMANS, W. Surface modification of cellulose nanocrystals. **Nanoscale**, v. 6, n. 14, p. 7764–79, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937092>>.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A.; HEUX, L.; LE DENMAT, S.; PICART, C.; SIERAKOWSKI, M. R.; PUTAUX, J. L. Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles. **Materials Science and Engineering C**, v. 51, p. 167–173, 2015.

FORESTI, M. L.; VAZQUEZ, A.; BOURY, B. Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances. **Carbohydrate Polymers**, 2016.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716310621>>.

FRAZÃO, C. J. R.; SILVA, N. H. C.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; XAVIER, A. M. R. B.; TAVARES, A. P. M. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 5, p. 500–508, 2014.

FU, L.; ZHANG, J.; GUANG, Y. Present status and application BC for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1432–1442, 2013.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; JOSÉ, A.; BOLZANI, S. Nanocristais de celulose a partir de celulose Bacteriana. v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

GARCÍA, A.; GANDINI, A.; LABIDI, J.; BELGACEM, N.; BRAS, J. Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 26–38, 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669016303880>>.

GEIGER, T.; ZIMMERMANN, T.; SIXTA, H. The chemical-free production of nanocelluloses from microcrystalline cellulose and their use as Pickering emulsion stabilizer. **Carbohydrate Polymers**, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.028>>.

GOELZER, F. D. E.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; VITORINO, J. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; TISCHER, C. A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 546–551, 2009.

HEGGSET, E. B.; CHINGA-CARRASCO, G.; SYVERUD, K. Temperature stability of nanocellulose dispersions. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 114–121, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.077>>.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>>.

KIM, J. H.; PARK, S.; KIM, H.; KIM, H. J.; YANG, Y.-H.; KIM, Y. H.; JUNG, S.-K.; KAN, E.; LEE, S. H. Alginate/bacterial cellulose nanocomposite beads prepared using *Gluconacetobacter xylinus* and their application in lipase immobilization.

Carbohydrate Polymers, v. 157, p. 137–145, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.074>>.

KIRK, O.; WU, M. Lipases from *Candida antarctica* : Unique Biocatalysts from a Unique Origin Abstract : n. V, p. 0–5, 2002.

KUDLICKA, K.; BROWN, R. M. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 65, n. 1–2, p. 17–24, 1996.

KUO, C.; CHEN, J.; LIOU, B.; LEE, C. Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Food Hydrocolloids**, 2015.

LAI, C.; SHENG, L.; LIAO, S.; XI, T.; ZHANG, Z. Surface characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose. **Surface and Interface Analysis**, v. 45, n. 11, p. 1673–1679, 2013.

LAI, C.; ZHANG, S.; CHEN, X.; SHENG, L. Nanocomposite films based on TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose and chitosan. **Cellulose**, v. 21, n. 4, p. 2757–2772, 2014.

LEE, B.; LOPEZ-FERRER, D.; KIM, B. C.; NA, H. Bin; IL, Y.; WEITZ, K. K.; WARNER, M. G.; HYEON, T.; LEE, S.; RICHARD, D.; KIM, J.; MANUSCRIPT, A.; LEE, B.; LOPEZ-FERRER, D.; KIM, B. C.; NA, H. Bin; IL, Y.; WEITZ, K. K.; WARNER, M. G.; HYEON, T.; LEE, S.; RICHARD, D.; KIM, J.; MANUSCRIPT, A.; DENNIS, M. K.; FIELD, A. S.; BURAI, R.; RAMESH, C.; WHITNEY, K.; BOLOGA, C. G.; OPREA, T. I.; YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, S.; SKLAR, L. a; HATHAWAY, H. J.; ARTERBURN, J. B.; PROSSNITZ, E. R.; MANUSCRIPT, A. NIH Public Access. **Changes**, v. 11, n. 2, p. 309–318, 2012.

LEE, C. M.; GU, J.; KAFLE, K.; CATCHMARK, J.; KIM, S. H. Cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strains ATCC 53524 and ATCC 23768: Pellicle formation, post-synthesis aggregation and fiber density. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p.

270–276, 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861715006098>>.

LIMA, R. L.; SANTOS, B.D., SANTOS, V.M., BARUD, S. H., HENRIQUE, A. M., PASQUINI, D. PECORARO, E. RIBEIRO, S. Nanocristais de Celulose a Partir de celulose bacteriana. **Quimica Nova**, v. XY, n. 0, p. 1–8, 2015.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302–325, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305714002493>>.

LIN, S. P.; HSIEH, S. C.; CHEN, K. I.; DEMIRCI, A.; CHENG, K. C. Semi-continuous bacterial cellulose production in a rotating disk bioreactor and its materials properties analysis. **Cellulose**, v. 21, n. 1, p. 835–844, 2014.

LIU, Y.; CHEN, J. Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 2016. Disponível em: <<http://jbc.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0883911516637377>>.

LOPES, T. D.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; GREIN, A.; TISCHER, C. A.; FARIA-TISCHER, P. C. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. **Int J Biol Macromol**, v. 67, p. 401–408, 2014a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704166>>.

LOPES, T. D.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; GREIN, A.; TISCHER, C. A.; FARIA-TISCHER, P. C. D. S. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 401–408, 2014b.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 228–236, 2011.

MCNAMARA, J. T.; MORGAN, J. L. W.; ZIMMER, J. A molecular description of cellulose biosynthesis. **Annual review of biochemistry**, v. 84, p. 895–921, 2015. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84930751196&partnerID=tZOtx3y1>>.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z. da; LIMA, V. M. G. de; GIESE, C.; DEKKER, R. F.

H.; BARBOSA, A. de M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011. Disponível em:

<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/8297>>.

NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, N. M.; BRAS, J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. **Industrial Crops and Products**, p. 1–10, 2016.

NICOLÁS, P.; LASSALLE, V. L.; FERREIRA, M. L. Quantification of immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) using ICP-AES combined with Bradford method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 97, p. 97–103, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.11.009>>.

NIU, F.; LI, M.; HUANG, Q.; ZHANG, X.; PAN, W.; YANG, J.; LI, J. The characteristic and dispersion stability of nanocellulose produced by mixed acid hydrolysis and ultrasonic assistance. **Carbohydrate Polymers**, v. 165, p. 197–204, 2017.

OMADJELA, O.; NARAHARI, A.; STRUMILLO, J.; MÉLIDA, H.; MAZUR, O.; BULONE, V.; ZIMMER, J. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 44, p. 17856–61, 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3816479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PANDEY, J. K.; KIM, C. S.; CHU, W. S.; CHOI, W. Y.; AHN, S. H.; LEE, C. S. Preparation and structural evaluation of nano reinforced composites from cellulose whiskers of grass and biodegradable polymer matrix. **Journal of Composite Materials**, v. 46, n. 6, p. 653–663, 2012. Disponível em:

<<http://jcm.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0021998312438174>>.

QIU, Y.; QIU, L.; CUI, J.; WEI, Q. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 303–309, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.016>>.

RAHBAR SHAMSKAR, K.; HEIDARI, H.; RASHIDI, A. Preparation and evaluation of nanocrystalline cellulose aerogels from raw cotton and cotton stalk. **Industrial Crops**

and Products, v. 93, p. 203–211, 2015.

RAMBABU, N.; PANTHAPULAKKAL, S.; SAIN, M.; DALAI, A. K. Production of nanocellulose fibers from pinecone biomass : Evaluation and optimization of chemical and mechanical treatment conditions on mechanical properties of nanocellulose films. v. 83, p. 746–754, 2016.

RECOUVREUX. Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos. **Tese de doutorado em Engenharia Química Universidade Federal de Santa Catarina**, v. Único, p. 145, 2008.

RIBEIRO-VIANA, R. M.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 21–28, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.033>>.

ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1671–1677, 2004.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86–96, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>>.

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93–100, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.05.006>>.

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>>.

SILVA, H. R.; PRETE, C. E. C.; ZAMBRANO, F.; DE MELLO, V. H.; TISCHER, C. A.; ANDRADE, D. S. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 10, 2016a. Disponível em: <<http://www.amb-express.com/content/6/1/10>>.

SILVA, R. D.; SIERAKOWSKI, M. R.; BASSANI, H. P.; ZAWADZKI, S. F.; PIRICH, C.

L.; ONO, L.; DE FREITAS, R. A. Hydrophilicity improvement of mercerized bacterial cellulose films by polyethylene glycol graft. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 599–605, 2016b.

SULAEVA, I.; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.009>>.

TRACHE, D.; HUSSIN, M. H.; HUI CHUIN, C. T.; SABAR, S.; FAZITA, M. R. N.; TAIWO, O. F. A.; HASSAN, T. M.; HAAFIZ, M. K. M. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. **International Journal of Biological Macromolecules Biological Macromolecules**, v. 93, p. 789–804, 2016.

TSOUKO, E.; KOURMENTZA, C.; LADAKIS, D.; KOPSAHELIS, N.; MANDALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; PALOUKIS, F.; ALVES, V.; KOUTINAS, A. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 2015.

VASCONCELOS, FITTIPALDI, N.; PESSOA, J.; FEITOSA, A.; MIGUEL, F.; PAULO, J.; MORAIS, S.; KARINE, F.; SÁ, M. De; SOUZA, M. De; FREITAS, M. De. Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions : Properties and morphological features. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 425–431, 2017.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; CHRISTODOULAKIS, N.; SANTAS, P.; SANTAS, R. Fiber dimensions, lignin and cellulose content of various plant materials and their suitability for paper production. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 3, p. 245–254, 2004.

WANG, B.; SHANGGUAN, L.; WANG, S.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; LIU, F. Preparation and application of immobilized enzymatic reactors for consecutive digestion with two enzymes. **Journal of Chromatography A**, v. 1477, p. 22–29, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.027>>.

WANG, X.; LI, D.; QU, M.; DURRANI, R.; YANG, B.; WANG, Y. Immobilized MAS1 lipase showed high esterification activity in the production of triacylglycerols with n-3 polyunsaturated fatty acids. **Food chemistry**, v. 216, p. 260–7, 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596418>>.

WU, S.-C.; WU, S.-M.; SU, F.-M. Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, n. April, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4994>>.

YIN, X.; YU, C.; ZHANG, X.; YANG, J.; LIN, Q.; WANG, J.; ZHU, Q. Comparison of succinylation methods for bacterial cellulose and adsorption capacities of bacterial cellulose derivatives for Cu²⁺ ion. **Polymer Bulletin**, v. 67, n. 3, p. 401–412, 2011.

ZAAK, H.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; OTERO, C.; SASSI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, p. 67–74, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.07.001>>.

ZHAO, K.; CAO, X.; DI, Q.; WANG, M.; CAO, H.; DENG, L.; LIU, J.; WANG, F.; TAN, T. Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase. **Renewable Energy**, v. 103, p. 383–387, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.11.035>>.

ZHU, C.; LI, F.; ZHOU, X.; LIN, L.; ZHANG, T. Kombucha-synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 5, p. 1548–1557, 2014.

ANEXO

ANEXO A

Artigo submetido no periódico Carbohydrates Polymers.

COVALENT IMOBILIZATION OF LIPASE ON CELLULOSE AND NANOCRYSTAL CELLULOSE BACTERIAL

Authors: Juliano Brisola, Gabriel Jonathan Dousa Andrade, Sabrina Oliveira, Renato Marcio Ribeiro Viana, Paula Cristina de Sousa Faria Tischer, Cesar Augusto Tischer

Address:

Abstract

Cellulose from *Gluconacetobacter hansenii* is highly pure, retains a huge amount of water and have high thermal resistance. It is synthesized as a thin film at the surface of production medium, with the same basic structure and synthetic pathway observed on plants, insoluble in water but polar, with highly organized sections interleaved with amorphous regions. The crystalline portions could be obtained by strong acid hydrolysis giving the cellulose chains in nanometric scale, the called nanocrystal cellulose whiskers. Lipase are a class of enzyme that has a great economic value but could form aggregates that reduces strongly his activity. This work has the goal to immobilize the lipase on native cellulose membranes as well on nanocrystal cellulose. For that membranes was produced by *G. hansenii* on Hestrin-Shram medium using glucose by 10 days at 28°C. The mambranes was hydrolyzed with sulfuric acid after neutralized with sodium. After the membranes and nanocristais de celulose were functionalized with succinic acid and then functionalized with lipase. After lipase functionalization, the activity of the immobilized enzyme and the total of immobilized enzymes were quantified. Through the characterization it was possible to observe that cellulose was functionalized with succinic acid and lipase immobilization. It was possible to infer that after immobilization the enzyme maintained its activity in both cellulose and cellulose membrane.

1. Introduction

The bacterial cellulose is the most polymer in the nature, and it have interesting property as biodegradability, chemical inertia, high temperature and mechanical resistance. The cellulose is made linear polymer chain of celobiose, it is constituied two glucose molecules linked β (1 \rightarrow 4), and each glucose molecule is rotated 180° in relation to neighboring molecule (Eyley & Thielemans, 2014; Fu, Zhang, & Guang, 2013).

The plant is the major production of cellulose, commercially, cotton and wood is the main raw material. However, some microorganism as genus bacterium *Gluconacetobacter* are able to produce cellulose. The cellulose bacterial is structurally similar to plant, but is free of hemicelluloses and poliphenols (lignin and tannin), and consequently the fibrils is more smaller, and consequently the bacterial cellulose is the more critaliny than plant cellulose (Donini et al., 2010; Kudlicka & Brown, 1996; Nechyporchuk, Belgacem, & Bras, 2016)

The cellulose have domain crystalline and they are separated by amorphous regions, these domains are highly ordered regions with a size ranging from 1 - 100 nm, defined as nanocrystal cellulose, cellulose nanocrystals or whiskers. The proportion of crystalline regions varies according to the source of cellulose(Donini et al., 2010; García, Gandini, Labidi, Belgacem, & Bras, 2016; Lin & Dufresne, 2014; Nechyporchuk, Belgacem, & Bras, 2016).

The most common method to obtain nanocrystal cellulose is through acid hydrolysis, using sulfuric acid and temperature, in which sulfuric acid hydrolyzes the amorphous regions of the cellulose, remaining only Nanocrystals, because they are resistant to acid attack due to their high structural organization (Heggset, Chinga-Carrasco, & Syverud, 2017). 7 different morphologies of cellulose and nanocrystal cellulose are defined as: I α , I β , t, II, III1, III2, IV1 and IV2 cellulose of microbial origin is type I, the latter being defined as native cellulose, cellulose of the type I α has triclinic structure, whereas type I β has a monoclinic structure, type II cellulose has a monoclinic structure with antiparallel chains, type III1 and III2 cellulose has a monoclinic structure with parallel and antiparallel chains, respectively, it is possible to convert the structure to another through chemical reactions (De Jesus Silva & D'Almeida, 2009; Faria-Tischer et al., 2015).

Due to the high stability when in suspension, the nanocrystals de cellulose has been applied as stabilizers, however the cellulose Nanocrystals and even the cellulose membrane itself have been used as support for immobilization of molecules of industrial interest, however the methods described in the literature for such immobilizations are by adsorption since this is a method of easy execution. Immobilization is an interesting immobilization strategy, since immobilization tends to be more stable than adsorption.

Lipases are enzymes belonging to triacylglycerol acylhydrolase (EC 3.1.1.3) is an enzyme with great versatility in applications, used in reactions of hydrolysis of alkanolysis, acidolysis, amylolysis, interesterification, causing it to be applied in several industrial branches, such as , food, detergents, cosmetics, chemical and biomedical industries and also in biodiesel industries (Dalla-vecchia & Nascimento, 2004; Wu, Wu, & Su, 2016). However, the recovery of this enzyme in laboratory and even industrial processes becomes impracticable due to the high cost of recovery. One method for its recovery is to immobilize on a type of support that is chemically stable and that maintains enzyme activity. In this study it was proposed to immobilize lipase in cellulose and in cellulose Nanocrystals by means of a covalent bond.

2. Material and Methods

2.1. Materials

The reagents were obtained by Sigma-Aldrich and were used without purification. The pyridine and dimethylformamide was dried in molecular sieve (3 Å) for 48 h. The lipase used was lipase from commercial source (Lipolase 100L, batch LAP40080), kindly donated by Novozymes Latin America (Araucária, Paraná, Brazil). The bacterium used in this study was *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769, obtained by the André Tosello Foundation, Campinas, São Paulo, and was stored at -80 °C in glycerol. *G. hansenii* was grown in culture medium containing 4% glucose, based on Hestrin-Scharamm's medium. The Hestrin-Scharamm's medium is composed of 3.2 gL⁻¹ glucose, 0.4 gL⁻¹ yeast extract, 0.4 gL⁻¹ peptone, 0.4 gL⁻¹ Na₂HPO₄ and 0.092 gL⁻¹ of citric acid. All media were sterilized at 121 °C and 1.02 atm for 20 min.

2.2. Production Bacterial Cellulose

The microorganism used was *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769, the strain were cultivated in Hestrin-Schramm medium. The cellulose was produced according with Goelzer, Faria-Tischer, Vitorino, Sierakowski, & Tischer, 2009 by inoculating 80mL of pre-inoculum in 720 mL Hestrin-Schramm médium, which were then mixed and distributed in polypropylene box. The production was performed statically for 10 days at 28°C. After the fermentation the membranes was washed in water and immersed in NaOH 2 % (m/V) by 24 h and then washed with water several times until of water equal pH =7.

2.3. Production Native Nanocrystal cellulose

The nanocristais de celulose was produced using hydrolysis acid. The membrane cellulose was dried until constant weight then it was perforated and placed inside a round bottom flask and added sulfuric acid 34 % (v/v), following the ratio of 0.5 g dry membrane / 30 mL acid. After reaction, the material was neutralized with 25% NaOH and dialyzed in dialysis bags (inlab 25x16mm 25Å) for 5 days. After dialysis the material was frozen in Falcon tube and lyophilized for 3 days.

2.4. Analytical methods

2.4.1. NMR state solid

To obtain the ¹³C spectra of native and modified cellulose membranes and native and modified nanocrystal cellulose, the analyzes were performed on a Bruker brand ADVANCE II 400 MHz equipment, located in the spectroscopy laboratory of the UEL research laboratories multiuser center, operating at 100.6MHz for carbon (¹³C) at 25°C, using the magical angle cross-polarization technique (MAS). Through the spectra it was possible to calculate the crystallinity index of membranes and nanocrystal cellulose using equation 1, where I_c is the crystallinity index, I is the integration value of the C4 crystalline peak and I_α is the integration value of the amorphous peak of C4. The spectra were analyzed using SpinWorks 4 software.

$$I_c = I / (I_\alpha + I) \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

2.4.2. Analysis of Fourier transform infrared spectroscopy

To obtain infrared spectra, an apparatus of the brand Shimadzu FTIR-8300 Japan, with a resolution of 4 cm⁻¹ in the range of 4000 to 400 cm⁻¹, was used in transmittance mode. The native and modified cellulose membranes were dried in greenhouses at 70 ° C until constant weight and read directly. For the reading of native and modified nanocrystal cellulose, pellets were produced by mixing 5 mg of nanocrystal cellulose in KBr, and pressing into a hydraulic press after mixing.

2.4.3. Thermogravimetric Analysis (TGA)

All samples were characterized by thermal degradation. A Shimadzu device, model TGA-50, was used. The experiments were conducted at a temperature of 25 ° C to 800 ° C with a heating rate of 10 K.min⁻¹ in N₂ atmosphere at a rate of 50 mL.min⁻¹. For the analysis was used 5 mg of sample that were placed under the alumina. The empty alumina was used as reference.

2.4.4. Diffraction of X - rays Analysis

All samples were analyzed by X-ray diffraction θ - 2θ in which a Panalytical X'PERT PRO MPD type equipment was used. A monochromatic incident beam of Cu (K₂) was used at 40 Kv and 30 mA. The scanning rate used was 0.002° / S and the records were 5 to 60° (2θ). The crystallite size was measured by the Scherrer equation (equation 2), where K is 0.90, the wavelength is $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ and θ is the diffraction angle from the sample in degrees and β is the width at half height (FWHM) at 2θ radians.

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta_{2\theta} \cdot \cos\theta} \quad \text{Equation 2}$$

2.4.5. UV-Vis Analysis

UV-Vis analyzes of the cellulose membranes were made using a Shimadzu UV-2600 UV-vis spectrometer equipped with a film support (P / N 204-58909) in a 200-800nm sweep.

2.4.6. *Transmission Electronic Microscopy*

The nanocrystal cellulose samples were prepared at the concentration of 0.1 mg.mL⁻¹ and sonicated for 5 minutes. Subsequently 1 drop of the sample was deposited on the copper grid with Formvar (400 mesh - Ted Pella) film, after 10 minutes another drop was deposited on the grid and the contrast was later obtained by negative staining with uranyl acetate. The samples were stored until complete drying and the analyzes were carried out in the Laboratory of Electron Microscopy and Microanalysis of UEL (LMEM) using the Jeol JEM 1200EX-II transmission microscope.

2.4.7. *Determination of Lipase Activity by ¹H NMR*

The determination of immobilized lipase activity was determined by the ratio of free fatty acids in the samples, according to the methodology proposed by Carneiro, Reda, & Carneiro, 2005 with modifications as described: For the control sample, 1 ml of sunflower oil was added in a test tube with 1 ml of distilled water and 20 µL of lipase (Lipolase 100I®, novozymes). For the immobilized enzymes, the same solutions were made, but 20 mg of enzyme immobilized on cellulose and 20 mg of lipase immobilized enzyme. The system was placed on shaker table at 200 rpm for 3 days at room temperature, after the reaction the supernatant was collected and analyzed by ¹H NMR. The quantification of free fatty acids was made from the values of the integration of the peaks of α-carbonyl methylene hydrogens counted as 6 (equation 5) and its ratio to the C1 and C3-CH₂-O of the glycerol counted as 4 hydrogens.

$$\% \text{ TG / FFA} = (\text{peak area methylene glycerol} \times 100) / 4 \text{ Equation 5}$$

For the analysis of ¹H NMR a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer from the Laboratory of the Uel Multiuser Research Center was used, the equipment was operated at a frequency of 400.6 MHz. Chemical shifts were expressed in ppm and calibrated according to the solvent signal (CDCl₃: δ = 77.00 ppm).

2.4.8. *Immobilized Protein Determination*

The determination of the concentration of immobilized proteins in the membrane and in the nanocrystal cellulose was determined based on the methodology proposed by Atacan, Çakiroğlu, & Özacar, 2016; in which 5 µL of Trypsin (21.91 µg / mL) was added in 20 mg of native and modified cellulose and 20 mg of native and modified

NCB, followed by addition of 495 μ l of phosphate buffer pH = 8 0.2 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_3 / \text{NaH}_2\text{PO}_3$). The system was conditioned under a temperature of 37 °C for 13 h under static conditions. After the reaction, the protein concentration was determined by the method of Bradford, 1976.

2.5. Chemical Reactions

2.5.1. Succinic Acid Preparation

Succinic anhydride was synthesized according to Ribeiro-Viana, Faria-Tischer, & Tischer, 2016 as described: 4 g of succinic acid and 6.4 ml of acetic anhydride were added in a round bottom flask under reflux. The reaction occurred at 100 ° C for one hour. After the reaction, the mixture was allowed to stand for two hours at room temperature, and then conditioned at 8 ° C for 30 min. The precipitate formed was washed with diethyl ether, repeatedly, and then stored in a low humidity environment.

2.5.2. Succinylation reaction of cellulose and bacterial nanocrystals de cellulose

For the succinylation reaction, it was performed according to the methodology described by Ribeiro-viana; Faria-Tischer; Tischer, 2016. The membranes of bacterial celluloses and nanocrystal celluloses were prewashed with methanol and dichloromethane to remove excess water.

For the succinylation reaction the celluloses were immersed in a round-bottomed flask containing a dichloromethane solution, 200 μ l succinic anhydride pyridine, then this system was refluxed for 24h at 70 ° C, the reaction stoichiometry was 1 mol of cellulose / 40 mol of anhydride. After this time the product obtained was washed with distilled water three times followed by ethanol. Thereafter the celluloses were dried at room temperature.

2.5.3. Immobilization of lipase in bacterial cellulose and nanocrystals de cellulose

The immobilization of the enzyme was performed following the methodology proposed by Ribeiro-Viana, Faria-Tischer, & Tischer, 2016: in a round bottom flask were added cellulose or nanocrystal cellulose, EDC (3- (ethyliminomethyleneamino) - N, N-dimethylpropan-1-amine). The reaction was kept at room temperature for one hour, then lipase was added to the membrane, the system was shaken for 21 h. After this time the membranes were washed three times with distilled water, and dried at

room temperature. The stoichiometric ratio for the reaction was 1 mol of cellulose / 1 mol EDC / 1 mol NHS / 0.08 mol of lipase.

2.5.4. Spectroscopic analysis of membranes and succinylated nanocrystal cellulose and lipase

When compared to the native cellulose membrane with the cellulose membrane functionalized with succinic acid, Figure 1A, it is possible to observe the appearance of the band at 1727 cm^{-1} on the succinylated cellulose membrane, this signal is responsible for stretching the ester bond (de Oliveira et al., 2017). In all the analyzed materials, it is possible to observe an absorption band at 3360 cm^{-1} responsible for the vibration of the OH stretch, the absorption band at 2894 cm^{-1} is due to the CH stretch, the peak at 1636 cm^{-1} is attributed to stretch $\text{C}=\text{C}$ associated with the water molecule since the absorbance increase at 1642 cm^{-1} , since the bands between 1370 cm^{-1} is attributed to CH bending, the band at 1340 cm^{-1} is attributed to the symmetrical stretch COOH and the band at 1157 cm^{-1} is attributed to the COC stretch (Niu et al., 2017). In the cellulose membrane and in lipase immobilized nanocrystal cellulose, a new band at 1640 cm^{-1} can be observed being responsible for the amine group, derived from lipase amino acid residues.

Figure 1

Similarly, the FT-IR spectra of the nanocrystal cellulose, Figure 1B, showed absorption bands similar to the membrane spectrum. The succinylated nanocrystal cellulose (NCB-suc) had an intense band at 1739 cm^{-1} responsible for the ester-bond stretching vibration, the high absorption at 3419 cm^{-1} owing to the vibration of the OH stretch, the absorption at 2885 cm^{-1} is responsible by the CH connection.

The NMR spectra of the cellulose membrane and nanocrystal cellulose corroborate with the results of FT-IR. In figure 2 and 3 the solid state ^{13}C NMR spectrum of native cellulose membrane and succinic acid functionalized and lipase immobilized nanocrystal cellulose, respectively, are shown. In this spectrum it is possible to observe a chemical shift between 102-108 ppm responsible for C1, the shift between 81-93 ppm is responsible for the sign of C4, the crystalline and amorphous region, being that the largest signal is responsible for the crystalline part and the smallest signal is responsible for the amorphous part, the displacement between 60-70 ppm is

responsible for the C6 signal, crystalline and amorphous and the signals between 73-79 ppm is responsible for C2, C3, C5 (Dubey et al., 2017; Niu et al., 2017; Ribeiro-Viana et al., 2016).

Figure 2

Figure 3

2.5.5. Transmission Electronic Microscopy

The morphology of the nanocrystal cellulose crystals was studied by transmission electron microscopy. Through transmission electron microscopy, figure 4 shows that when the acid hydrolysis was carried out there was fragmentation of the cellulose membrane forming small nanofibrils in the shape of needles, this shows the isolation of the nanocrystals of cellulose. When carrying out the succinylation reaction after the conjugation with the lipase of the nanocrystal cellulose it was possible to observe that the Nanocrystals did not alter their shape, the particle size distribution after the hydrolysis is shown in figure 5. In both materials analyzed, particles with an average diameter of 30 to 40 nm and an average length of 300 to 400 nm were obtained and the average aspect ratio was 13. Authors such as Pandey et al., 2012; An; Ema, 2016; Geiger; Zimmermann; Sixta, 2017, in their works also found particles in the form of needles with a high reason of aspect. Cherian et al., 2010 when performing alkaline hydrolysis of fiber cellulose present in pineapple, obtained particles of similar size with this work, with length ranging from 200-300 nm and diameter ranging from 5-60 nm.

Figure 4

Figure 5

2.5.6. Analysis of Thermogravimetry

The TGA curves of native, succinylated and immobilized membranes with lipase and the native, succinylated and lipase immobilized nanocrystal cellulose are shown in figure 6. It is possible to observe that all the membranes had three similar degradation rates. The first stage of degradation was responsible for the loss of

water, in the native membrane the amount of water lost was 2.67% at the temperature of 49.21 °C, in the succinylated cellulose membrane the loss was 11.094% at the temperature of 48.637 ° C, in the lipase immobilized membrane the loss was 6.683% at the temperature of 55.245 ° C. The second stage of degradation is responsible for the loss of mass. It can be observed that for the native membrane the loss of mass was 53.597% at the temperature of 253.166 °C, for the succinylated membrane the loss of mass was of 49,168% in the temperature of 259,174 °C and for lipase immobilized with lipase the loss of mass was 50.382% at the temperature of 269.832 ° C. Comparing the native cellulose membrane with the succinylated membrane, it can be observed that when adding the succinic group conferred a greater stability of degradation to the membrane, because there was a temperature increase. Similarly, by adding the enzyme lipase to the membrane, it can be seen that the degradation temperature of the membrane increased, when compared to the native membrane and to the succinylated membrane, this shows that when adding enzymes in the bacterial cellulose membrane there is a increased thermal stability. It is also possible to observe that the membranes presented degradation at 370 ° C, 384 ° C and 382 ° C for the native, succinylated and lipase membranes respectively. The TGA graphs for native, succinylated and lipase immobilized nanocrystal cellulose presented degradation rate with the same profile, however they differed in relation to temperature. The first stage of degradation is responsible for the loss of mass through the loss of water. In native, succinylated and immobilized lipase the loss occurred at a temperature of 49,561 °C with a loss of 13.952% for native nanocrystal cellulose and 9.453% for succinylated cellulose and 15.779% in lipase immobilized nanocrystal cellulose. Already in the second stage of degradation was responsible for the loss of mass. For native nanocrystal cellulose, the loss occurred at 252,424 ° C with a loss of 58.18%. In succinylated nanocrystal cellulose the loss occurred at 258,286 °C with a loss of 55.641%. In lipase immobilized nanocrystal cellulose the mass loss occurred at 278, 537 ° C with a loss of 58.182%. In a similar way with the membranes, when the nanocrystal cellulose was functionalized with succinic acid, an increase in the thermal stability was observed in relation to the native nanocrystal cellulose, and in the immobilization of lipase in the nanocristais de celuloze there was an even greater increase in the thermal stability. Comparing the TG graphs of the native membrane and the native nanocrystal cellulose, it can be

observed that the temperature with the greatest mass loss was 253,166 °C and 252,424 °C, respectively. This can be related to the fact that sulfate loading from the hydrolysis reaction decreases the thermal stability of the nanoparticle (Geiger, Zimmermann, & Sixta, 2017).

Figure 6

2.5.7. X-Ray Diffraction Analysis

X - ray diffraction is a tool that elucidates the type of crystalline arrangement. This technique was performed to verify if the chemical modification would alter the crystallinity of the cellulose membrane and cellulose. Figure 7 shows the diffraction profiles of cellulose membrane and native nanocrystal cellulose, functionalized with succinic acid and immobilized with lipase. It is possible to observe 3 characteristic peaks at 14.6°, 16.8° and 22.6°, and these are related to the Miller 101, 10 $\bar{1}$ - and 002 indices demonstrating to be a type I cellulose and nanocrystal cellulose (Goelzer et al., 2009)

The crystallinity index of the nanocrystal cellulose was also verified by the XRD technique. The crystallinity index of the native nanocrystal cellulose, functionalized with succinic acid and lipase was 70%, 83% and 70%, respectively. While the native membrane, functionalized with succinic acid and lipase was 76%, 42% and 80%, respectively. Comparing the cellulose membrane with the nanocrystal cellulose, it can be observed that the nanocrystal cellulose contains a higher crystallinity. The cellulose membrane presents higher amounts of amorphous regions in comparison to the nanocrystal cellulose, therefore it presents a lower crystallinity (Funari, Castrogamboa, José, & Bolzani, 2013).

Figure 7.

2.5.8. Quantification of lipase immobilized on membrane and nanocrystals de cellulose

The amount of membrane immobilized proteins and cellulose Nanocrystals is shown in Table 1. Quantification of proteins using cleavage from proteases has been studied in recent years (Atacan et al., 2016; Atacan, Çakıroğlu, & Özacar, 2017); immobilized trypsin in magnetite and through it carried out the digestion of casein

present in milk samples. Wang et al., 2016 also developed a reactor immobilized with trypsin and chymotrypsin in order to digest complex protein samples.

The Bradford method is a method based on the formation of a stable protein complex with the Coomassie Brilliant Blue G-250 Reagent, which absorbs light at 595 nm and can be quantified by UV-Vis spectroscopy to determine the concentration of proteins in a sample using a standard BSA curve (Bradford, 1976) As a cheap, fast and robust method well described in the literature and widely accepted in the scientific community, this technique has been used in the quantification of lipases, as for example in Wang et al., 2017 and Nicolás, Lassalle, & Ferreira, 2017 that quantified the concentration of immobilized lipases.

Table 1

2.5.9. Evaluation of Hydrolysis Activity by NMR (1 H NMR)

After these characterizations, the cellulose membrane and the lipase immobilized nanocrystal cellulose were submitted to hydrolysis reaction using oil as substrate and in sequence analyzed by Nuclear Magnetic Resonance of prótons. Vegetable oils are basically made up of triglycerides, and their structure consists of one unit of glycerol and three fatty acids, and there is a large variety of fatty acids bound to glycerol, the ratio found in α -carbonyl methylene oils in oils is of 4: 6, and the methylene hydrogens of glycerol and α -carbonylic hydrogens are well conserved to chemical reactions, and quantification using 1 H-NMR can be accomplished by integrating the area of these peaks.

After the NMR analysis it was possible to observe chemical shift between 5.4 and 5.26 ppm is responsible for the oleophilic hydrogens, the shift between 4.32 and 4.10 ppm is responsible for the signal of the hydrogen of the methylene glycerol, the displacement between 2.70 and 2.80 ppm is due to the signal of the bis-allylic hydrogens, the signals between 2.20 and 2.35 ppm are due to the signals of the hydrogens of the α -carbonyl methylenes, the shift between 1.90 and 2.10 ppm is responsible for the signal of allylic hydrogens, the displacement between 1.50 and 1.70 ppm is responsible for the β -carbonyl methylene the displacement between 1.15 and 1.4 ppm is responsible for the hydrogens of the methylene groups the

displacement between 0.95 and 1 is responsible for the signals of the hydrogens of the methylene groups of the carboxylic acid group Carneiro, Reda, & Carneiro, 2005. The hydrolysis reaction was quantified according to Carneiro 2005, in which the alpha-carbonyl peaks were compared, since the latter remained stable after the hydrolysis reaction with the methylene glycerol peaks. In this study, it can be observed that the free triglycerides content in the samples containing the free lipase, the membrane and the lipase immobilized nanocrystals de cellulose after the hydrolysis reaction was 72.76%, 69.87%, 73.5%, respectively. This indicates that the enzyme continued to exert its catalytic activity after immobilization, it was observed that the membrane immobilized with lipase presented a better hydrolysis reaction.

Immobilization of lipases has been commonly studied due to its industrial applicability. Works like (Wu, Wu, & Su, 2016; Zaak, Fernandez-Lopez, Otero, Sassi, & Fernandez-Lafuente, 2017; Zhao et al., 2017) immobilized lipases however the frequently used immobilization is by absorption, works such as Ribeiro-Viana, Faria-Tischer, & Tischer, 2016; Sharma, Chaurasia, & Dalai, 2013 suggest a covalent immobilization since this provides greater stability in immobilization.

2.5.10. *Stability Analysis of Nanocrystal cellulose*

Figure 8 shows the photographs of nanoparticle suspensions with respect to time, as can be seen from figure 8 the suspension throughout the experiment was presented under a single phase resembling a milky suspension. As can be seen, the suspension remained stable, without great variations in the absorptivity, as shown in figure 8 D. The study of the stability of the nanocrystals de cellulose evaluates the physical properties of the nanocrystals de cellulose during a certain time of storage. Through the analysis it was possible to observe that the nanocrystal cellulose remained stable for up to 4 days, however it was possible to observe that there was a decrease in absorbance. De Jesus Silva & D'Almeida, 2009; Niu et al., 2017; The high stability is due to the electrostatic, hydrophobic and Van der Waals interactions between the particles, and also because the nanocrystal cellulose is negatively charged with SO₄²⁻ groups due to the hydrolysis process, in which they confer

greater stability of the nanoparticle, but reduces the thermostability of the nanocrystals. The decrease in optical density is due to the fact that these interactions become weaker with larger particles (Geiger et al., 2017; Niu et al., 2017) As can be seen from figure , when functionalizing the nanocrystal cellulose with succinic acid and with lipase a decrease in the absorptivity was observed, this suggests that the succinic acid that the charges of the amino acid residues of the lipase destabilize the nanoparticles when in aqueous suspension. It is reported in the literature modifications in the methodology of hydrolysis of the nanocrystal cellulose, in order to obtain a material with a greater stability when in suspension. (Martínez-Sanz, Lopez-Rubio, & Lagaron, 2011) in his work tested various concentrations of acids in different, already (Niu et al., 2017) associated the ultrasound technique associated with a mixture of hydrochloric and sulfuric acid and temperature to obtain spherical nanocrystal cellulose and with high stability.

Figure 8

3. Discuss

It is possible to observe that when immobilizing the protein, a decrease of the band at 1730 cm^{-1} and an increase in the band at 1640 cm^{-1} , this is good evidence that succinic acid is covalently bonding to the lipase and consequently increasing the absorption band at $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$. When observed the native cellulose, it is possible to observe the formation of a band in 1635 cm^{-1} responsible for the OH group of the water absorbed in the polysaccharide structure, this band being close to the amine group, and in turn the results can be confused. In this sense it was necessary to perform the UV-Vis analysis of the native and immobilized cellulose (Figure 1B), because the native cellulose does not have chromophoric groups that absorb in the region of UV-Vis, unlike the lipase possessed by lipase, in which it possesses residues of tyrosine, tryptophan and the like (Silva et al., 2016)

When succinic acid functionalization is performed on the membrane and nanocrystal cellulose, it is possible to observe a peak at 174 ppm , this peak is responsible for the carbonyl group of succinic acid (Ribeiro-Viana et al., 2016) this strongly indicates that the membrane was functionalized with succinic acid. By immobilizing the lipase enzyme on the succinylated cellulose membrane and nanocrystal cellulose, it was possible to observe a peak sequence between 15 and 50 ppm and at 174 ppm .

According to (Lopes, Riegel-Vidotti, Grein, Tischer, & Faria-Tischer, 2014; Ribeiro-Viana, Faria-Tischer, & Tischer, 2016) this signal can be attributed to aliphatic amino acid residues of peptides present in lipase.

By analyzing the crystallinity index (% CI) by integrating the C4 area of the membranes and the nanocrystal cellulose, it can be verified that the cellulose membrane presented a crystallinity of 59.90% and the nanocrystal cellulose an index of 76.74%, when these were functionalized with succinic acid the membrane had an index of 70.30% and the nanocrystal cellulose had an index of 74.04% and when immobilized with lipase the membrane presented an index of 68.58% and the nanocrystal cellulose an index of 69, 25%, it can be seen that as the cellulose and nanocrystal cellulose were modified, the crystallinity reduced, this is because the chemical modification may have occurred in amorphous regions of the cellulose and twisting the fibers (Ribeiro-Viana et al., 2016).

The quantification was done from the liquid absorbance, discounting the value of the absorbance of the trypsin. As can be observed, there was a greater immobilization in the nanocrystal cellulose than in the membrane, this may be due to the fact that the nanocrystal cellulose particles have a larger surface area in relation to the microfibrils (LIMA, R. L.; SANTOS, B.D., SANTOS, V.M., BARUD, S. H., HENRIQUE, A. M., PASQUINI, D. PECORARO, E. RIBEIRO, 2015). (Wang et al., 2017) in his experiment, was able to adsorb 75 μg / mg of lipase in its resin, that is, adsorption is a less specific method when compared to immobilization by covalent attachment. However, immobilization has the advantage of having a stronger binding giving greater stability to the enzyme ((Atacan et al., 2017; Eyley & Thielemans, 2014).

4. Conclusions

It was possible to conclude that the functionalization of bacterial cellulose and sucrose nano-cellulose were efficient methods for the immobilization of enzymes, evidenced by NMR (FT-IR, XRD and TG / DTG). Not only was it possible to detect the persistence of lipase in the cellulose membrane and cellulose nanocrystals, but also after enzymatic hydrolysis, it was possible to quantify the enzyme content that was immobilized in the cellulose nanocrystals and in the cellulose membrane using the Bradford method.

Immobilization by covalent bonding proved to be an effective method both in the cellulose membrane and in the cellulose nanocrystals, since after immobilization it was evidenced that the enzyme continued to exert its enzymatic activity through the analysis of free glycerides;

The cellulose nanoparticles had a higher crystallinity in relation to the membranes and that these also showed good stability when in aqueous suspension, even after functionalization and immobilization with lipase.

5. References

- Atacan, K., Çakiroğlu, B., & Özacar, M. (2016). Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in the bovine milk. *Food Chemistry*, 212, 460–468. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.011>
- Atacan, K., Çakiroğlu, B., & Özacar, M. (2017). Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 148–155. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.023>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, 254, 248–254.
- Carneiro, P., Reda, S., & Carneiro, E. (2005). H NMR Characterization of Seed Oils from Rangpur Lime (Citrus limonia) and “ Sicilian” Lemon (Citrus limon). *Annals of Magnetic ...*, 4(3), 64–68. Retrieved from <http://www.auremn.org.br/Annals/2005-vol4-num3/2005-vol4-num3-64-68.pdf>
- Dalla-vecchia, R., & Nascimento, G. (2004). Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. *Química Nova*, 27(4), 623–630.
- De Jesus Silva, D., & D’Almeida, M. L. O. (2009). Nanocristais de celulose. *O Papel (Brazil)*, 70(7), 34–52.
- de Oliveira, S. A., da Silva, B. C., Riegel-Vidotti, I. C., Urbano, A., de Sousa Faria-Tischer, P. C., & Tischer, C. A. (2017). Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 642–653. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.077>
- Donini, Í. A. N., De Salvi, D. T. B., Fukumoto, F. K., Lustri, W. R., Barud, H. S., Marchetto, R., ... Ribeiro, S. J. L. (2010). Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Ecletica Química*, 35(4), 165–178. <http://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>
- Dubey, S., Kumar, R., Agarwal, P., Singh, J., Sinha, N., & Singh, R. P. (2017). International Journal of Biological Macromolecules From rotten grapes to industrial exploitation : Komagataeibacter europaeus SGP37 , a micro-factory for macroscale production of bacterial nanocellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 52–60. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.016>
- Eyley, S. S., & Thielemans, W. (2014). Surface modification of cellulose nanocrystals. *Nanoscale*, 6(14), 7764–79. <http://doi.org/10.1039/c4nr01756k>
- Faria-Tischer, P. C. S., Tischer, C. A., Heux, L., Le Denmat, S., Picart, C., Sierakowski, M. R., & Putaux, J. L. (2015). Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles. *Materials Science and Engineering C*, 51, 167–173. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.025>
- Fu, L., Zhang, J., & Guang, Y. (2013). Present status and application BC for skin

- tissue repair. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1432–1442.
- Funari, C. S., Castro-gamboa, I., José, A., & Bolzani, S. (2013). Nanocristais de celulose a partir de celulose Bacteriana, 36(10), 1605–1609.
- García, A., Gandini, A., Labidi, J., Belgacem, N., & Bras, J. (2016). Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. *Industrial Crops and Products*, 93, 26–38. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.004>
- Geiger, T., Zimmermann, T., & Sixta, H. (2017). The chemical-free production of nanocelluloses from microcrystalline cellulose and their use as Pickering emulsion stabilizer. *Carbohydrate Polymers*. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.028>
- Goelzer, F. D. E., Faria-Tischer, P. C. S., Vitorino, J. C., Sierakowski, M. R., & Tischer, C. A. (2009). Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. *Materials Science and Engineering C*, 29(2), 546–551. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.013>
- Heggset, E. B., Chinga-Carrasco, G., & Syverud, K. (2017). Temperature stability of nanocellulose dispersions. *Carbohydrate Polymers*, 157, 114–121. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.077>
- Kudlicka, K., & Brown, R. M. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 65(1–2), 17–24. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80050-1](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80050-1)
- LIMA, R. L.; SANTOS, B.D., SANTOS, V.M., BARUD, S. H., HENRIQUE, A. M., PASQUINI, D. PECORARO, E. RIBEIRO, S. (2015). Nanocristais de Celulose a Partir de celulose bacteriana. *Quimica Nova*, XY(0), 1–8.
- Lin, N., & Dufresne, A. (2014). Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*, 59, 302–325. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>
- Lopes, T. D., Riegel-Vidotti, I. C., Grein, A., Tischer, C. A., & Faria-Tischer, P. C. (2014). Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. *Int J Biol Macromol*, 67, 401–408. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.047>
- Martínez-Sanz, M., Lopez-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2011). Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 228–236. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.021>
- Nechyporchuk, O., Belgacem, N. M., & Bras, J. (2016). Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.09.044>
- Nicolás, P., Lassalle, V. L., & Ferreira, M. L. (2017). Quantification of immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) using ICP-AES combined with Bradford method. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 97–103. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.11.009>

- Niu, F., Li, M., Huang, Q., Zhang, X., Pan, W., Yang, J., & Li, J. (2017). The characteristic and dispersion stability of nanocellulose produced by mixed acid hydrolysis and ultrasonic assistance. *Carbohydrate Polymers*, *165*, 197–204. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.048>
- Ribeiro-Viana, R. M., Faria-Tischer, P. C. S., & Tischer, C. A. (2016). Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes. *Carbohydrate Polymers*, *148*, 21–28. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.033>
- Sharma, A., Chaurasia, S. P., & Dalai, A. K. (2013). Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Catalysis Today*, *207*, 93–100. <http://doi.org/10.1016/j.cattod.2012.05.006>
- Silva, R. D., Sierakowski, M. R., Bassani, H. P., Zawadzki, S. F., Pirich, C. L., Ono, L., & de Freitas, R. A. (2016). Hydrophilicity improvement of mercerized bacterial cellulose films by polyethylene glycol graft. *International Journal of Biological Macromolecules*, *86*, 599–605. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.115>
- Wang, X., Li, D., Qu, M., Durrani, R., Yang, B., & Wang, Y. (2017). Immobilized MAS1 lipase showed high esterification activity in the production of triacylglycerols with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, *216*, 260–7. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.041>
- Wu, S.-C., Wu, S.-M., & Su, F.-M. (2016). Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, (April). <http://doi.org/10.1002/jctb.4994>
- Zaak, H., Fernandez-Lopez, L., Otero, C., Sassi, M., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. *Enzyme and Microbial Technology*, *106*, 67–74. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.07.001>
- Zhao, K., Cao, X., Di, Q., Wang, M., Cao, H., Deng, L., ... Tan, T. (2017). Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase. *Renewable Energy*, *103*, 383–387. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2016.11.035>

Attached

Figure 1: (A) Infrared Spectrum (FT-IR) of native cellulose membrane, succinylated and immobilized with Lipase. (B): Infrared Spectrum (FT-IR) of succinylated nanocrystals de celulose. (C) UV-vis Spetrum Succinylated membrane and immobilized with lipase. (D) UV-Vis Spectrum succinylated nanocrystal cellulose and immobilized with lipase.

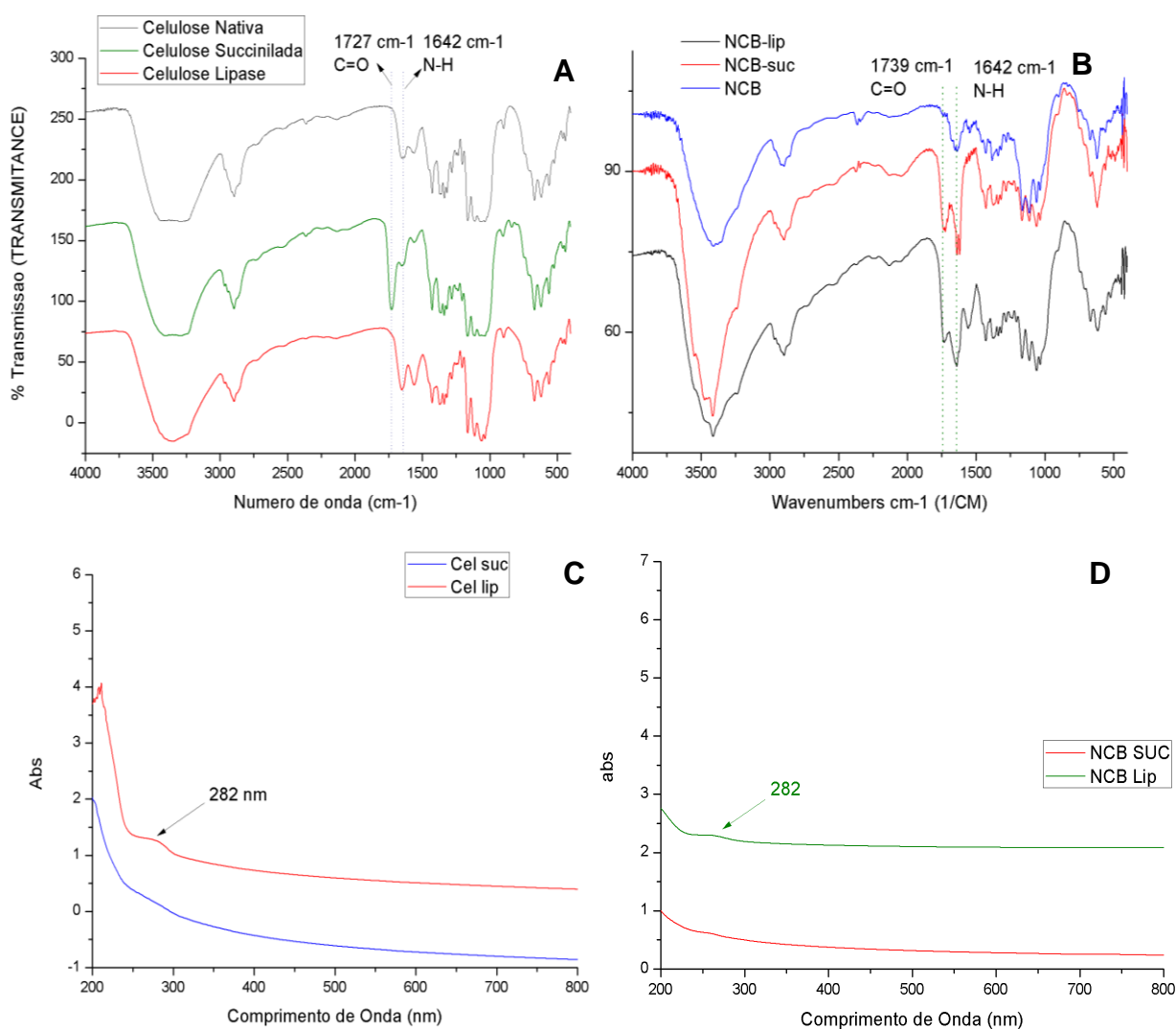


Figure 2: ¹³C-RMN solid state spectrum for the native cellulose (A) succinylated cellulose; (B) immobilized with lipase (

Figure 2: Solid state ^{13}C -NMR spectrum of cellulose Nanocrystals **(A)** Native cellulose nanocrystals; **(B)** Cellulose Nanocrystals Functionalized with Succinic Acid; **(C)** Cellulose Nanocrystals Conjugated with Lipase.

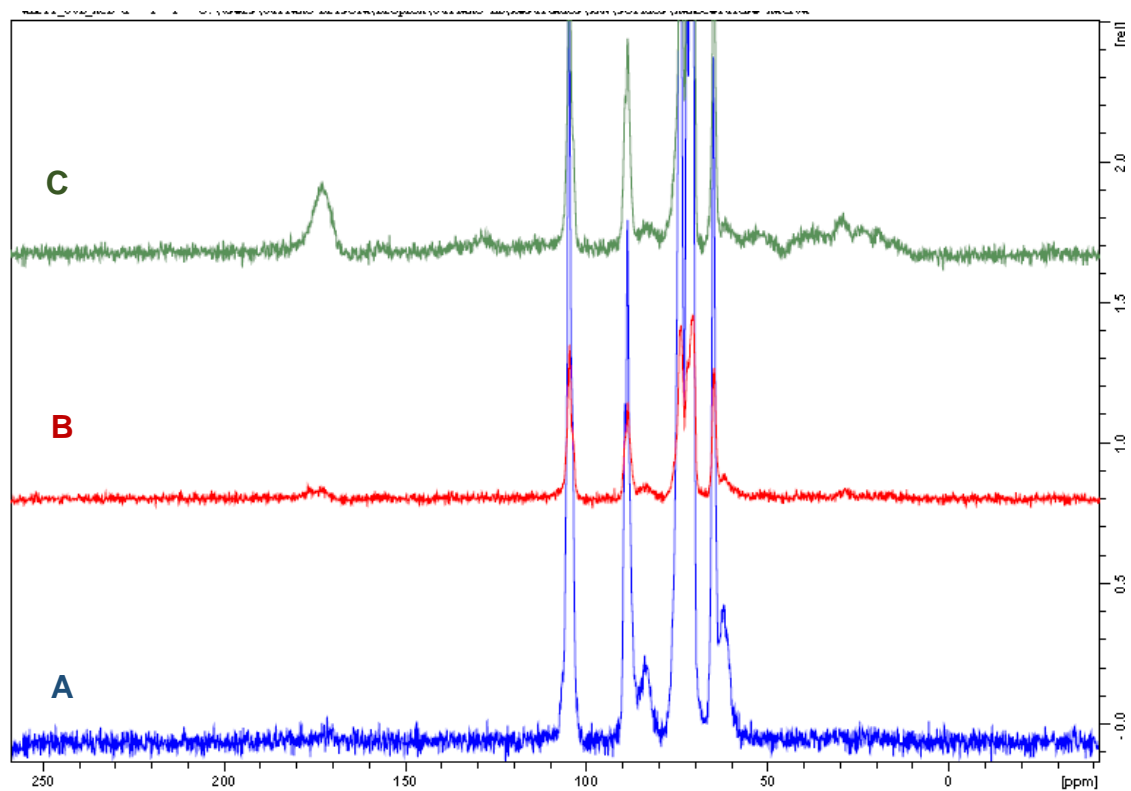


Figure 3: ^{13}C NMR spectra of bacterial cellulose, functionalized with succinic acid and lipase conjugated: Native **(A)**; Functionalized with succinic acid **(B)**; lipase conjugated **(C)**

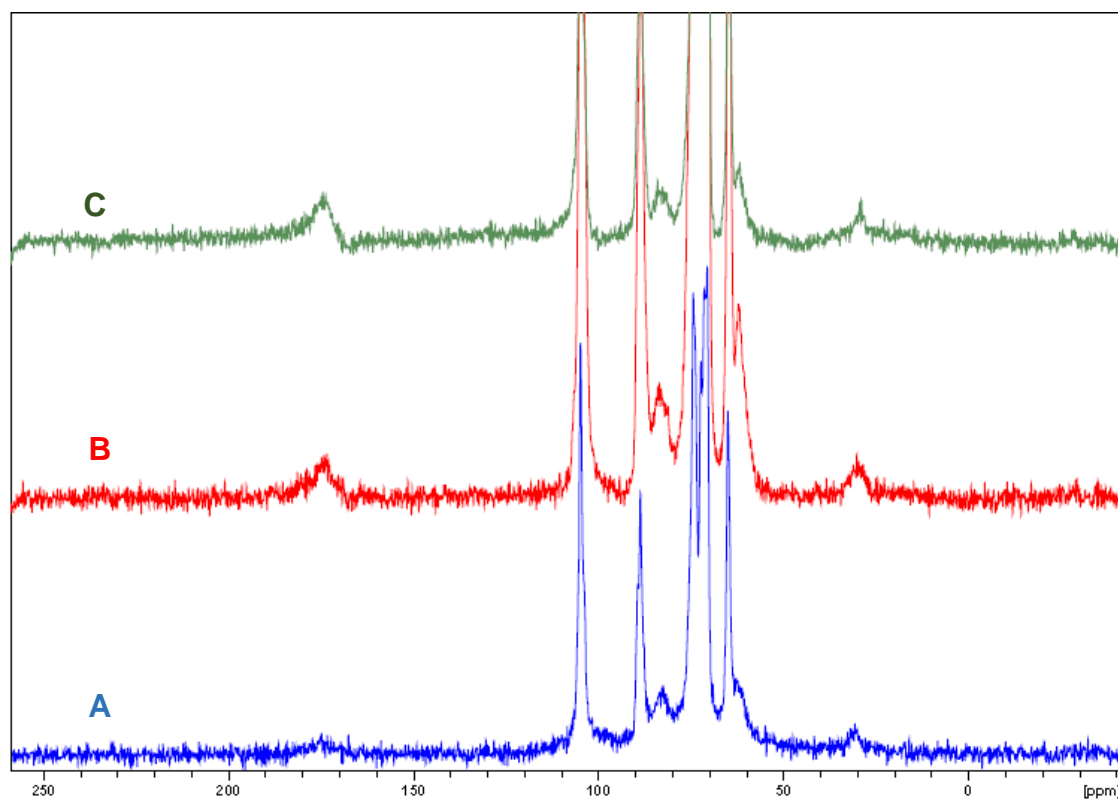


Figure 4: TEM images of native nanocrystals cellulose **(A)** succinated nanocrystals cellulose **(B)**. Nanocrystals conjugated with lipase

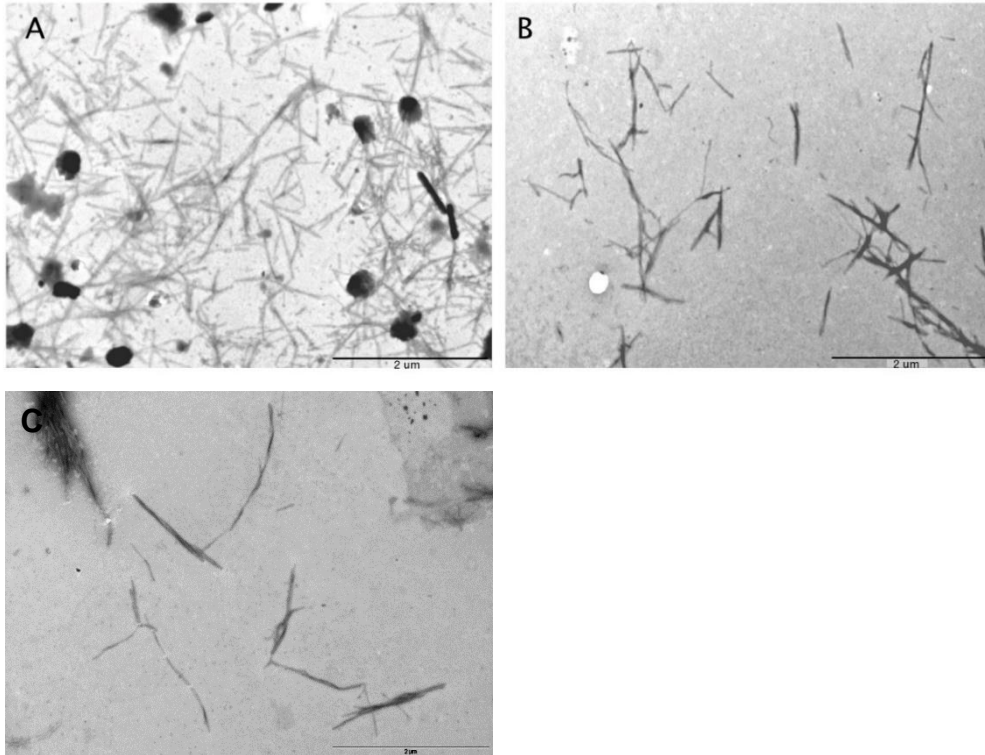


Figure 5: Distribution of the diameter and length of the native, succinylated and lipase-conjugated NCB.

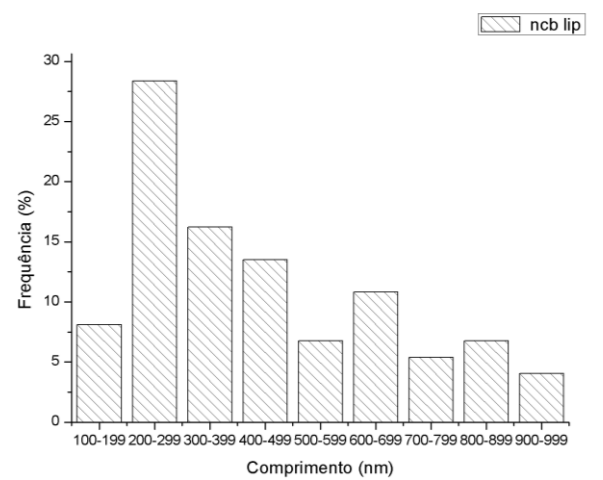
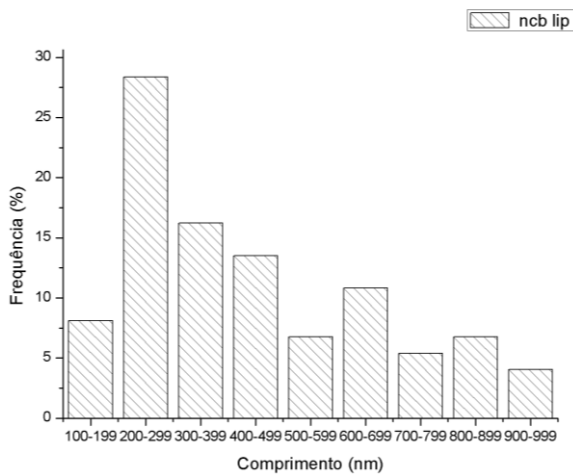
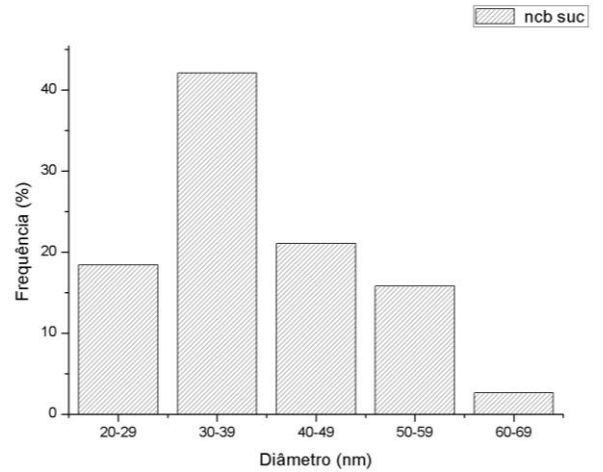
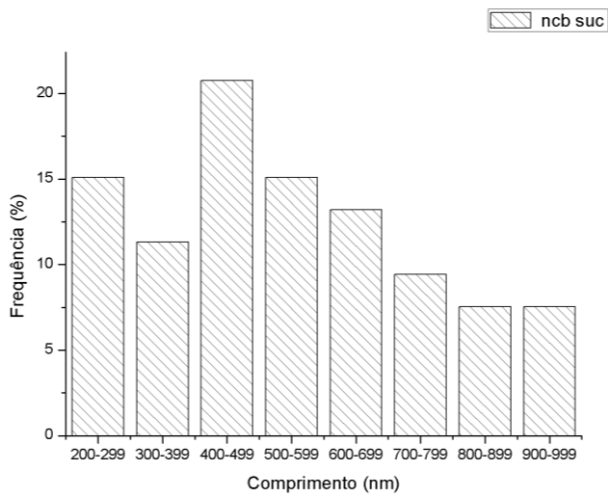
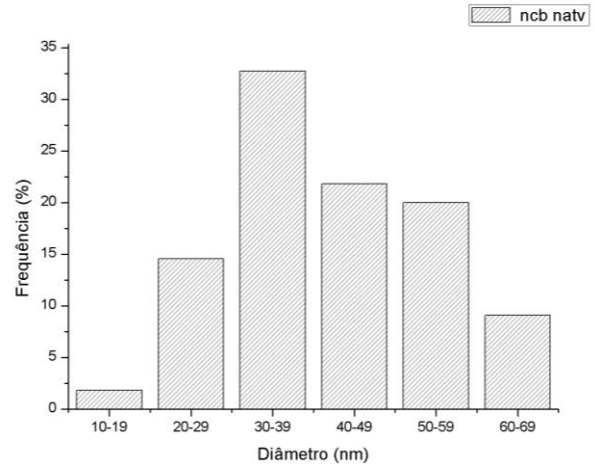
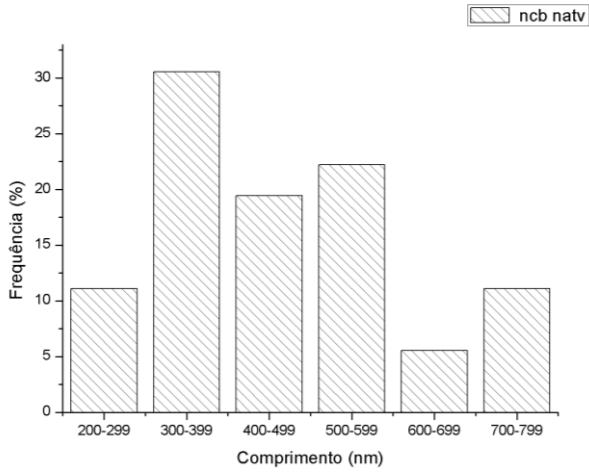


Figure 6: TGA curve of cellulose membrane and native, succinylated and immobilized lipase (a) nanocrystal cellulose; DTG curve of cellulose membrane and native, succinylated and immobilized lipase (b) nanocrystal cellulose.

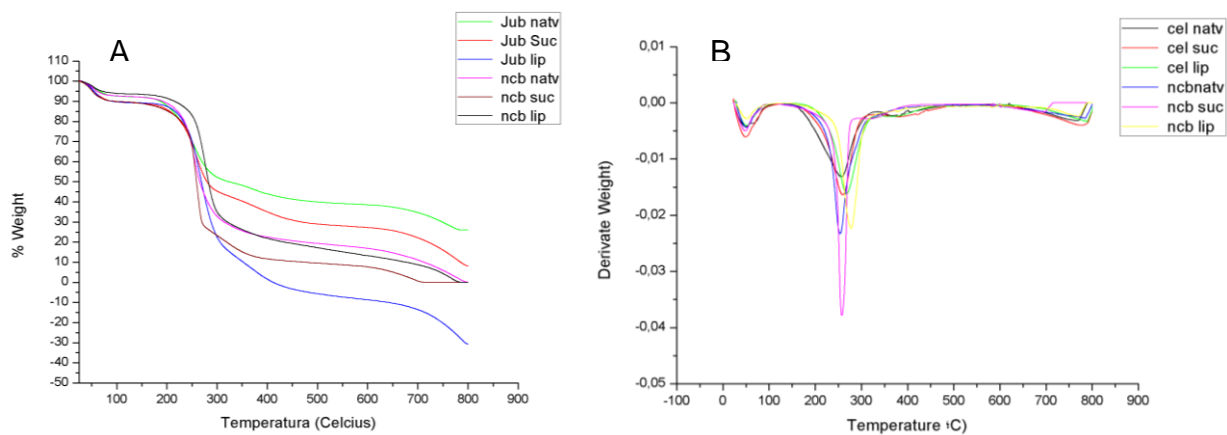


Figure 7: Cellulose DRX and native, succinylated and immobilized nanocrystal cellulose with lipase

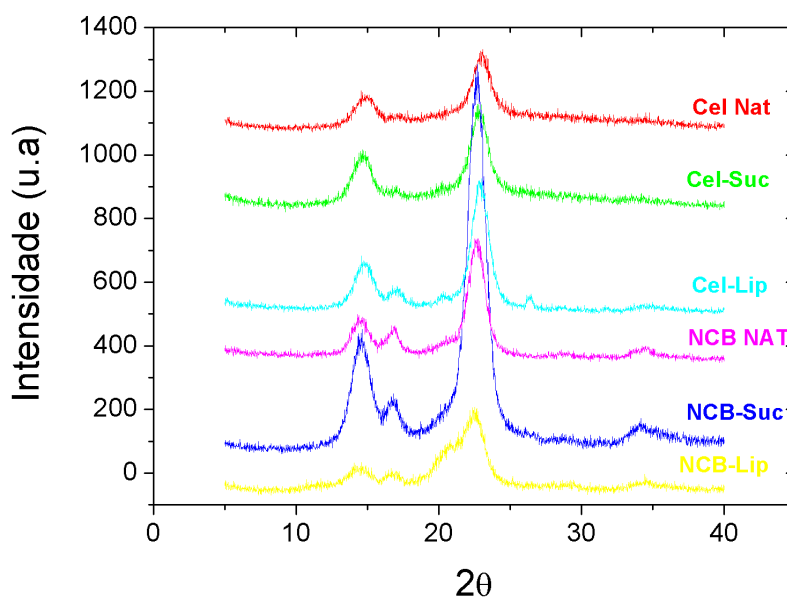


Figure 8: Photographs of the suspensions in relation to the time (1h, 3h, 6h, 24h, 144h). **A:** suspension of native nanocrystal cellulose. **B:** succinylated nanocrystal cellulose. **C:** Nanocrystal cellulose immobilized with lipase. **D:** Change of the optical density of the nanocrystal cellulose particles with respect to time, $\lambda = 270$ nm.

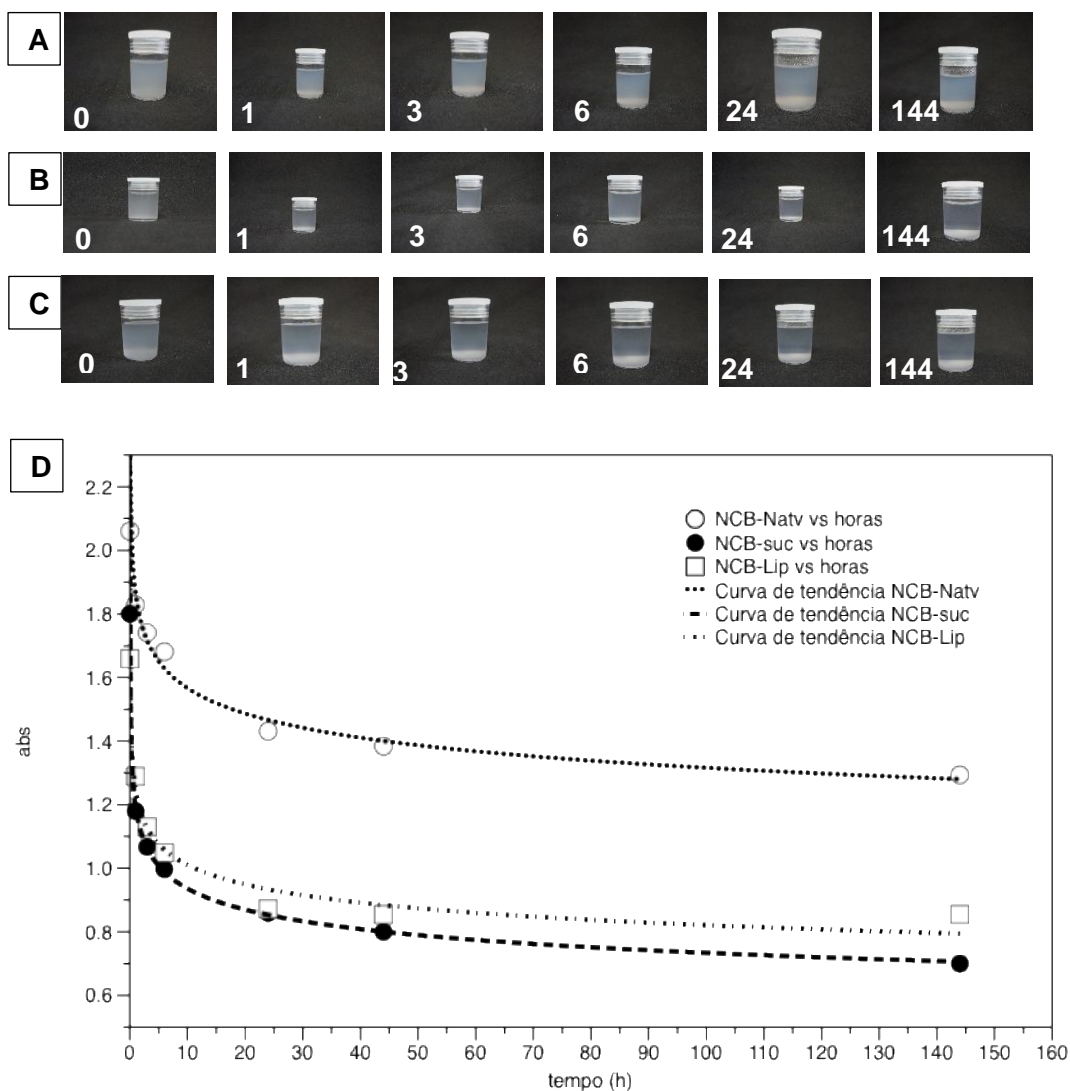


Table 1: Lipase concentration immobilized on bacterial membrane and nanocrystal cellulose.

Amostra	μg Lipase/mg cellulose; nanocrystal of cellulose	Suport mass (mg)
<i>cel-natv</i>	0	18
<i>cel-suc</i>	0	17
<i>cel-lip</i>	$9,7 \pm 2,90$	25
<i>ncb-natv</i>	0	20
<i>ncb-suc</i>	0	10
<i>ncb-lip</i>	$26,63 \pm 2,70$	11