



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JANAINA DE SOUZA LIMA

**IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE EM CAULIM E SUA APLICAÇÃO EM
PROCESSOS DE ACABAMENTO TÊXTIL**

Florianópolis
2020

Janaina de Souza Lima

Imobilização de celulase em caulim e sua aplicação em processos de acabamento têxtil

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título doutor em Engenharia Química

Orientador: Profa. Débora de Oliveira, Dra.

Coorientador: Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.

Profa. Ana Paula Serafini Immich Boemo, Dra.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do programa de geração automática da biblioteca universitária da UFSC.

Lima, Janaina de Souza
Imobilização de celulase em caulim e sua aplicação em processos de acabamento têxtil / Janaina de Souza Lima ; orientador, Débora de Oliveira, coorientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo, coorientadora, Ana Paula Serafini Immich Boemo, 2020.
105 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Celulases. 3. Imobilização de enzimas. 4. Biopolimento. 5. Bioestonagem. I. Oliveira, Débora de. II. Araújo, Pedro Henrique Hermes de. III. Boemo, Ana Paula Serafini Immich IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Janaina de Souza Lima

Imobilização de celulase em caulim e sua aplicação em processos de acabamento têxtil

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Antônio Augusto Ulson de Souza, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cristiano José de Andrade, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marco Di Luccio, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Helen Treichel, Dra.
Universidade Federal da Fronteira Sul

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia Química

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Débora de Oliveira, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2020

AGRADECIMENTOS

Dirijo meus agradecimentos:

A Deus, por abençoar os meus sonhos e me dar força para lutar por eles.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À UFSC, ao Posenq e ao Labmassa/Labsin pela oportunidade e infraestrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (Linden) pelas análises de difração de raios X (DRX). Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). À Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos pelas análises de tração. Ao Laboratório de Tecido e Malhas (LABTEC) (Campus Blumenau) pelas análises de resistência ao pilling. Ao Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos (VITROCER) pelas análises de distribuição de tamanho de partículas. Aos meus orientadores e co-orientadores pelo aprendizado, contribuições, dedicação e apoio.

Às empresas Coratex, Akmey e Imerys pela doação de material para realização da pesquisa.

À minha família pelo amor, carinho, apoio e incentivo. Com certeza essa conquista também é de vocês!

Ao Kaio pelo amor, carinho, dedicação e por dividir essa caminhada comigo.

Aos amigos de toda a vida e àqueles que conheci nesse período pelas colaborações nas mais diversas formas e por tornarem a caminhada mais prazerosa.

E a todos que contribuíram na minha trajetória acadêmica.

RESUMO

As enzimas são utilizadas na indústria têxtil como uma alternativa ambientalmente correta para melhorar a qualidade dos produtos. As celulasas são uma das enzimas mais empregadas no processamento têxtil, sendo utilizadas principalmente no acabamento de substratos de celulose. Elas são usadas para criar uma aparência desbotada no jeans (processo conhecido como bioestonagem) e remover microfibrilas salientes na superfície de tecidos de celulose para reduzir a tendência de formação do *pilling* (processo conhecido como biopolimento). Apesar de ser aplicada com o intuito de melhorar a qualidade dos produtos, a aplicação da celulase, geralmente, causa perdas significativas de massa e resistência à tração no substrato têxtil devido à hidrólise da molécula de celulose no interior da fibra. Uma das formas de controlar a atividade enzimática nos processos de acabamento têxtil, e por sua vez, reduzir os efeitos de desgaste do substrato, é a imobilização das enzimas utilizadas, o que acaba também facilitando a recuperação e reutilização da enzima. Embora tenha elevado potencial, a imobilização tem sido pouco explorada nos processos de bioacabamento. No presente estudo foram avaliados o uso do caulim como suporte para imobilização de celulase empregando os métodos de ligação covalente e adsorção. Posteriormente, a celulase imobilizada foi aplicada nos processos de biopolimento e bioestonagem. O caulim é um material inorgânico, natural, de baixo custo, fácil de ser recuperado e pouco explorado na imobilização de celulasas. Eficiências de imobilização de $65 \pm 3,5$ e $60 \pm 2,5\%$ foram obtidas utilizando os métodos de ligação covalente e adsorção, respectivamente. O caulim permitiu a recuperação da enzima de forma simples e rápida, com perda de atividade enzimática de apenas 14% após oito ciclos de hidrólise utilizando a carboximetilcelulose como substrato. De modo geral, os resultados indicaram que o caulim é um suporte promissor para a imobilização de celulasas. Quando aplicadas no biopolimento de malha de algodão, as celulasas imobilizadas por ligação covalente e por adsorção apresentaram resultados semelhantes ou superiores à celulase livre em relação à formação de *pilling*. Além disso, as amostras tratadas com celulase imobilizada apresentaram resistência à tração consideravelmente maior, indicando menor dano à malha de algodão devido à restrição da hidrólise à superfície das fibras de algodão. Na bioestonagem, as amostras tratadas com a celulase imobilizada por adsorção apresentaram efeitos de estonagem próximos ao da celulase livre com *backstaining* menor. Foi possível recuperar e reutilizar a celulase imobilizada em caulim eficientemente tanto no processo de biopolimento quanto no processo de bioestonagem. Os resultados obtidos são promissores e podem contribuir para os processos de bioacabamento e também para o desenvolvimento de novos protocolos de imobilização de celulase.

Palavras-chave: Celulasas. Imobilização de enzimas. Biopolimento. Bioestonagem.

ABSTRACT

Enzymes are used in the textile industry as an environmentally friendly alternative to improve product quality. Cellulases are one of the most used enzymes in textile processing, especially for the finishing of cellulose-containing materials. They are used to creating a faded appearance to jeans (a process called biostoning) and to remove protruding microfibrils on the cellulosic fabrics surface to reduce the tendency for pill formation (a process called biopolishing). Despite being applied to improve product quality, cellulase use often causes significant weight loss and decreased tensile strength. These problems are attributed to the hydrolysis of the cellulose molecule inside the cotton fiber. One of the ways to control enzymatic activity in textile finishing processes, and thus, reduce the effects of the textile substrate wear is the immobilization of the used enzymes. Immobilization also allows the recovery and reuse of the enzyme. Although it has a high potential, cellulase immobilization has been very poorly explored in biofinishing processes. In the current study, the potential of kaolin as support for cellulase immobilization using the covalent binding and adsorption methods was evaluated. Subsequently, the immobilized cellulase was applied in the processes of biopolishing and biostoning. Kaolin is an inorganic, natural material, of low cost, easy to be recovered and little explored for cellulases immobilization. Immobilization efficiency was 65 ± 3.5 and $60 \pm 2.5\%$ cellulase immobilized by covalent binding and adsorption methods, respectively. The kaolin allowed recovery the cellulase in a simple and fast way, with a loss of enzymatic activity of only 14% after eight cycles of hydrolyzes using carboxymethylcellulose as substrate. In general, the results indicated that kaolin is promising support for cellulase immobilization. When applied in the biopolishing process, cellulases immobilized using covalent binding and adsorption methods showed similar or superior results to free cellulase concerning to pilling formation. Besides, the samples treated with immobilized cellulases showed considerably greater tensile strength. This result indicates less damage to the cotton knit due to the restriction of hydrolysis to the surface of cotton fibers. In biostoning, samples treated with immobilized cellulase showed fading effects close to that treated with free cellulase, with much lower backstaining. It was possible to recover and reuse the cellulase immobilized in kaolin efficiently, in biopolishing, as well as biostoning. The results obtained are promising and may contribute to the biofinishing processes and also to the development of new cellulase immobilization protocols.

Keywords: Cellulase. Enzymes immobilization. Biopolishing. Biostoning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação da ligação peptídica.....	26
Figura 2 – Níveis estruturais de proteínas.	27
Figura 3 – Sinergismo do complexo celulolítico.....	31
Figura 4 – Principais métodos de imobilização de enzimas.....	32
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura da caulinita.	37
Figura 6 – Aplicação de enzimas no processamento têxtil.....	41
Figura 7 – Estrutura química da celulose. (a) Unidades de glicose formando uma cadeia linear. (b) Ligação de hidrogênio entre as cadeias de glicose. (c) Esquema de microfibrilas de celulose mostrando estrutura cristalina e amorfa.....	43
Figura 8 – Estrutura (a) tecido plano (b) malha.....	44
Figura 9 – Biopolimento com celulase livre. (a) Tecido de algodão e a fibra contendo as microfibrilas salientes. (b) Processo de biopolimento. (c) Tecido de algodão e a fibra após o biopolimento.....	47
Figura 10 – Bioestonagem com celulase livre. (a) Jeans e as fibras de celulose antes do processo. (b) Processo de bioestonagem. (c) Jeans e as fibras de celulose após estonagem.....	48
Figura 11 – Esquema de imobilização da celulase em caulim por (a) adsorção, (b) ligação covalente.....	56
Figura 12 – Etapas envolvidas no processo de imobilização da celulase por ligação covalente em caulim.	60
Figura 13 – Difratoogramas de raio-X das amostras (a) caulim, (b) caulim funcionalizado, (c) caulim contendo enzima imobilizada por adsorção e (d) caulim contendo enzima imobilizada por ligação covalente.....	62
Figura 14 – Distribuição de tamanho de partículas das amostras de (a) caulim, (b) caulim funcionalizado, (c) caulim contendo enzima imobilizada por adsorção e (d) caulim contendo enzima imobilizada por ligação covalente.....	63
Figura 15 – Imagens de MEV das amostras de (a) C, (b) C _{FA} , (c) C _E e (d) C _{FA-E}	64
Figura 16 – Influência do pH na atividade da enzima livre (quadrado preto), imobilizada por adsorção (triângulo azul) e imobilizada por ligação covalente (círculo vermelho) a 55 °C por 30 min.....	66
Figura 17 – Influência da temperatura na atividade da enzima livre (quadrado preto), imobilizada por adsorção (triângulo azul) e imobilizada por ligação covalente (círculo vermelho) em pH 5 por 30 min.	67

Figura 18 – Estabilidade térmica da enzima livre (quadrado preto), imobilizada por adsorção (triângulo azul) e imobilizada por ligação covalente (círculo vermelho) a 55 °C e pH 5,0.	68
Figura 19 – Atividade enzimática da enzima imobilizada por adsorção (cinza) e imobilizada por ligação covalente (preto) após ciclos sucessivos de 30 min, 55 °C, pH 5,0 e concentração de substrato de 4% (m/v).....	70
Figura 20 – Etapas do processo de tingimento.	75
Figura 21 – Etapas de lavagem da malha tingida.	75
Figura 22 – Espaço de cor CIELAB.....	76
Figura 23 – Imagens de MEV das amostras após o processo de biopolimento. (a) Biopolimento com solução tampão , (b) Biopolimento com solução tampão e argila; (c) Biopolimento com celulase livre; (d) Biopolimento com celulase imobilizada por adsorção ; (e) Biopolimento com celulase imobilizada por ligação covalente. Os subíndices 1 e 2 a ampliação de 30 e 1000 vezes, respectivamente.	81
Figura 24 – Fotografia das amostras após o processo de abrasão para avaliação do <i>pilling</i> . (a) Biopolimento com solução tampão , (b) Biopolimento com solução tampão e argila; (c) Biopolimento com celulase livre; (d) Biopolimento com celulase imobilizada por adsorção – 1º ciclo; (e) Biopolimento com celulase imobilizada por adsorção – 2º ciclo; (f) Biopolimento com celulase imobilizada por adsorção – 3º ciclo; (g) Biopolimento com celulase imobilizada por ligação covalente – 1º ciclo; (h) Biopolimento com celulase imobilizada por ligação covalente – 2º ciclo; (i) Biopolimento com celulase imobilizada por ligação covalente – 3º ciclo	84
Figura 25 – Mudança de cor do caulim durante o processo de bioestonagem.	91
Figura 26 – Imagens de MEV das amostras de jeans. (a) a) Bioestonagem com solução tampão; (b) Bioestonagem com solução tampão e argila; (c) Bioestonagem com celulase livre; (d) Bioestonagem com celulase imobilizada por adsorção. Os subíndices 1, 2 e 3 indicam a ampliação de 25, 100 e 1000 vezes, respectivamente.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produtos e suas quantidade utilizadas no processo de tingimento.	76
Tabela 2 – Efeitos da celulase livre, imobilizada por adsorção e imobilizada por ligação covalente no biopolimento de amostra de malha de algodão.	79
Tabela 3 – Parâmetros de cor do espaço CIELAB das amostras tingidas após o biopolimento.	83
Tabela 4 – Parâmetros de cor do espaço CIELAB das amostras de jeans após a bioestonagem.	89
Tabela 5 – Parâmetros de cor do espaço CIELAB amostras de tecido testemunha.	90
Tabela 6 – Efeitos da celulase livre e imobilizada por adsorção na variação de massa e resistência à tração de amostras submetidas ao processo de bioestonagem.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIT – Associação Brasileira da Indústria Têxtil

AE – Atividade enzimática

APTES – (3-aminopropil)triétoxissilano

BEa – amostra de jeans tratada com solução tampão contendo argila sem enzima (bioestonagem)

BEads – amostra de jeans tratada com celulase imobilizada por adsorção (bioestonagem)

BEc – amostra de jeans tratada com solução tampão (bioestonagem)

BEe – amostra de jeans tratada com celulase livre (bioestonagem)

BPa – amostra de malha tratada com solução tampão contendo argila sem enzima (biopolimento)

BPads – amostra de malha tratada com celulase imobilizada por adsorção (biopolimento)

BPc – amostra de malha tratada com solução tampão (biopolimento)

BPcov – amostra de malha tratada com celulase imobilizada por ligação covalente (biopolimento)

BPe – amostra de malha tratada com celulase livre (biopolimento)

C_E – Caulim contendo celulase imobilizada por adsorção

C_{FA} – Caulim funcionalizado com silano

C_{FA-E} – Caulim contendo celulase imobilizada por ligação covalente

CMC – Carboximetilcelulose

DNS – Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

DRX – Difração de raios-X

GA – Glutaraldeído

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Y – Eficiência de imobilização

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	23
1.2	OBJETIVOS	25
1.2.1	Objetivo Geral.....	25
1.2.2	Objetivos Específicos	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	ENZIMAS.....	26
2.2	CELULASES.....	30
2.3	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	31
2.3.1	Métodos de imobilização	32
2.3.2	Suportes para a imobilização de enzimas.....	35
2.4	CAULIM.....	36
2.4.1	Caulim como suporte para imobilização de enzimas	37
2.4.2	Funcionalização do caulim visando a imobilização de enzimas por ligação covalente	38
2.5	INDÚSTRIA TÊXTIL.....	40
2.5.1	Fibras têxteis: fibras celulósicas.....	41
2.5.2	Processo têxtil.....	43
2.5.3	Biopolimento e bioestonagem	45
2.6	APLICAÇÃO DE CELULASE IMOBILIZADA EM PROCESSOS DE BIOACABAMENTO	49
2.7	CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	52
3	IMOBILIZAÇÃO DA CELULASE EM CAULIM	53
3.1	MATERIAIS.....	53
3.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	53
3.3	PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO	55
3.3.1	Funcionalização do caulim com APTES.....	55

3.3.2	Ativação do caulim com glutaraldeído	55
3.3.3	Imobilização da celulase.....	55
3.4	CARACTERIZAÇÃO DO CAULIM CONTENDO CELULASE IMOBILIZADA	56
3.5	PERFIS DE ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA.....	57
3.5.1	Determinação da faixa de pH ótimo	57
3.5.2	Determinação da faixa de temperatura ótima	58
3.5.3	Estabilidade térmica e ao armazenamento.....	58
3.5.4	Capacidade de reuso.....	58
3.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.6.1	IMOBILIZAÇÃO DA CELULASE EM CAULIM	59
3.6.2	CARACTERIZAÇÃO DO CAULIM CONTENDO CELULASE	
	IMOBILIZADA	61
3.6.3	PERFIS DE ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA.....	65
3.6.3.1	<i>Influência do pH na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada.....</i>	<i>65</i>
3.6.3.2	<i>Influência da temperatura na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada</i>	<i>66</i>
3.6.3.3	<i>Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada.....</i>	<i>67</i>
3.6.3.4	<i>Capacidade de reuso</i>	<i>69</i>
3.7	CONCLUSÃO	70
4	APLICAÇÃO DE CELULASE IMOBILIZADA EM BIOPOLIMENTO	72
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
4.1.1	Variação de massa após o biopolimento	73
4.1.2	Teste de tração	73
4.1.3	Grau de brancura	73
4.1.4	Análise de <i>pilling</i>	74
4.1.5	Análises morfológicas	74
4.1.6	Avaliação da propriedade tintorial após o biopolimento.....	74

4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.3	CONCLUSÃO	85
5	APLICAÇÃO DE CELULASE IMOBILIZADA EM BIOESTONAGEM...	86
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	86
5.1.1	Variação de massa	87
5.1.2	Teste de tração	87
5.1.3	Avaliação da estonagem e do <i>backstaining</i>	87
5.1.4	Análises morfológicas	88
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
5.3	CONCLUSÃO	94
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
6.1	CONCLUSÕES	95
6.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97

DIAGRAMA CONCEITUAL

Por quê?
<ul style="list-style-type: none">• Investigar o potencial do caulim como suporte para imobilização de endoglucanases, uma vez que este é um material natural, inorgânico, de baixo custo, fácil de ser recuperado, entre outras características que o tornam uma excelente alternativa para imobilizar enzimas;• Embora seja aplicada com o intuito de melhorar a qualidade dos produtos, a celulase geralmente causa perdas significativas de massa e resistência à tração;• O backstaining (redeposição do corante), um dos principais problemas relacionados à estonagem do jeans, é intensificado quando a celulase é utilizada porque o corante tem elevada afinidade pela enzima, que por sua vez tende a ficar adsorvida no substrato têxtil. Assim, a maior redeposição do corante é associada à interação algodão-enzima-corante.
Quem já fez?
<ul style="list-style-type: none">• O caulim foi pouco explorado para imobilização de celulases e não foi encontrado na literatura relatos de seu uso para suporte de endoglucanases;• Poucos trabalhos científicos avaliaram a aplicação de celulase imobilizada nos processos de biopolimento e bioestonagem. A maioria desses trabalhos utilizou materiais sintéticos e/orgânicos como suporte.
Hipóteses
<ul style="list-style-type: none">• A endoglucanase pode ser eficientemente imobilizada na superfície do caulim e suas propriedades catalíticas não são prejudicadas?• A imobilização por adsorção pode proporcionar resultados semelhantes aos obtidos pela imobilização por ligação covalente?• A celulase imobilizada minimiza os danos causados pela celulase livre aos substratos têxteis?• É possível reutilizar a celulase imobilizada em caulim nos processos de biopolimento e bioestonagem?
Como fazer?
<ul style="list-style-type: none">• Imobilizar a celulase no caulim sem modificação por adsorção e imobilizar por ligação covalente utilizando caulim com superfície funcionalizada;• Realizar ensaios enzimáticos em diferentes valores de pH, temperatura e tempos de incubação para avaliar os efeitos da imobilização nas propriedades catalíticas da enzima;• Realizar ensaios de biopolimento com a enzima livre e imobilizada para avaliar os parâmetros de interesse usando métodos apropriados;• Recuperar a enzima imobilizada ao final de cada ciclo dos processos de bioacabamento e reutilizá-la em um novo processo.
Respostas
<ul style="list-style-type: none">• Determinação das condições ótimas de atuação da enzima imobilizada;• Determinação do método de imobilização da celulase em caulim mais adequado para aplicação em processos de bioacabamento;• Avaliação dos efeitos da celulase imobilizadas na perda de massa, resistência a tração e redeposição de corante no jeans;• Determinação da capacidade de reuso da celulase imobilizada nos processos de bioacabamento.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos utilizados em diversos processos industriais. Elas têm sido uma alternativa promissora para as empresas melhorarem os processos industriais existentes e até produzirem produtos de melhor qualidade, atendendo à demanda por processos mais limpos e ecológicos (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; KIRK *et al.*, 2002). Na indústria têxtil, as enzimas podem ser usadas na maioria dos processos úmidos, particularmente nas etapas de pré-tratamento e acabamento (ALY *et al.*, 2004; BESEGATTO *et al.*, 2018). O grande interesse em utilizar esses biocatalisadores no processamento têxtil está associado à sua capacidade de substituir os produtos químicos usados convencionalmente e proporcionar processos ambientalmente mais corretos em condições de temperatura e pH, na maioria das vezes, mais amenos e com menor consumo de água e energia. Assim, as enzimas melhoram a qualidade dos produtos a um custo final que pode ser significativamente menor.

Os processos de acabamento têxtil constituem uma importante etapa do beneficiamento, pois geralmente são utilizados para melhorar a aparência, conferir funcionalidade e/ou aumentar a durabilidade do produto (BATTISTI, 2017). As celulasas são as principais enzimas utilizadas nessa etapa e são usadas nos processos de biopolimento e bioestonagem. O biopolimento consiste na remoção de microfibrilas soltas ou protuberantes presentes na superfície da fibra celulósica. Durante o uso e as lavagens, essas microfibrilas tendem a se romper e acumular na superfície na forma de emaranhados de fibras denominadas de *pilling*. Já na bioestonagem, as celulasas são usadas para promover a remoção parcial do corante índigo para proporcionar a aparência envelhecida ou desbotada ao jeans. Apesar de melhorar a aparência, proporcionar maior maciez e ser ambientalmente correta, a aplicação de celulasas pode ocasionar alguns prejuízos ao material têxtil. No biopolimento, elas podem causar perda de massa indesejável e levam à diminuição significativa da resistência à tração dos tecidos tratados. Esses problemas estão relacionados à hidrólise da celulose no interior da fibra celulósica e uma das alternativas para minimizá-los é restringir a mobilidade da enzima através da imobilização em um suporte sólido. Ao ligar a enzima a um suporte muito maior que ela é possível que a penetração da enzima no interior do fio seja dificultada e sua atuação ocorra apenas na superfície.

Além dos problemas anteriores, a bioestonagem apresenta como desvantagem uma maior redeposição do corante no jeans, reduzindo o contraste desejado entre as fibras brancas e tingidas e causa manchas nos forros e bolsos. Esse problema é conhecido como *backstaining* e é intensificado pela presença da celulase devido à interação química entre o corante e a enzima e adsorção da enzima no jeans. Dessa forma, a interação celulose-celulase-corante faz com que mais corante seja redepositado no jeans. A imobilização também pode ser utilizada como estratégia para amenizar tal problema já que a enzima pode ser recuperada no final do processo, evitando que a mesma fique adsorvida no tecido. Ademais, a imobilização permite que a enzima seja reutilizada no processo, diminuindo os custos de aplicação, além da possibilidade de minimização da contaminação do efluente.

Apesar do apelo tecnológico, a aplicação de celulases imobilizadas nos processos de bioacabamento têxtil tem sido pouco explorada. Os poucos trabalhos encontrados na literatura têm relatado resultados promissores, porém a capacidade de reuso da enzima, parâmetro diretamente relacionado ao custo-benefício da tecnologia, foi pouco investigada. Em relação aos suportes, a grande maioria dos trabalhos empregaram materiais orgânicos e/ou sintéticos. No entanto, em geral, esses materiais apresentam elevado custo e não apresentam características adequadas para aplicação industrial, podendo tornar a imobilização uma alternativa inviável. Assim, o presente trabalho propôs o uso de caulim como suporte para imobilização de celulase. O caulim foi escolhido como suporte por ser um material inorgânico, natural, de baixo custo, fácil de ser recuperado. Além disso, a imobilização de enzimas ocorre apenas na superfície das partículas de caulim, o que é muito importante para que a celulase imobilizada possa ter contato com o substrato. Bons resultados têm sido obtidos utilizando o caulim na imobilização de outras enzimas, tais como lacase, glicose oxidase, lipase e peroxidase, mas seu uso ainda foi pouco explorado na imobilização da celulase. Foram encontrados na literatura apenas dois trabalhos de imobilização de celulase em caulim e apenas um desses trabalhos era voltado para aplicação industrial (KARAGULYAN *et al.*, 2007; SINEGANI *et al.*, 2005). Em tal trabalho, foi estudada a imobilização da β -glicosidase, enzima do complexo das celulases que age em substratos solúveis. Porém, nos processos de bioestonagem e biopolimento, geralmente são utilizados preparados enzimáticos ricos em endoglucanases. Ao contrário da β -glicosidase, as endoglucanases atuam na região amorfa da celulose insolúvel. Assim, os resultados de imobilização para essas enzimas podem ser diferentes.

O presente trabalho visa contribuir para a melhoria dos processos de bioacabamento têxtil utilizando celulase imobilizada e também com o desenvolvimento de novos protocolos de imobilização da celulase. Assim, no presente trabalho foram utilizadas as técnicas de adsorção

e ligação covalente para avaliar o potencial de aplicação do caulim como suporte para imobilizar endoglucanases. Posteriormente, foram avaliados os efeitos da celulase imobilizada nos processos de biopolimento e bioestonagem.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso do caulim como suporte para imobilização de celulase e aplicação da celulase imobilizada nos processos de biopolimento e bioestonagem.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os resultados de imobilização da celulase em caulim por adsorção e ligação covalente;
- Avaliar os efeitos da imobilização nas características da enzima em relação ao pH, temperatura e estabilidade térmica;
- Averiguar a capacidade de reuso da enzima imobilizada em carboximetilcelulose;
- Avaliar os efeitos de perda de massa da malha de algodão, bem como a resistência mecânica, com aplicação da enzima imobilizada no biopolimento;
- Avaliar os efeitos da aplicação da enzima imobilizada na bioestonagem e no backstaining;
- Averiguar a capacidade de reuso da enzima imobilizada quando aplicada nos processos de bioestonagem e biopolimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

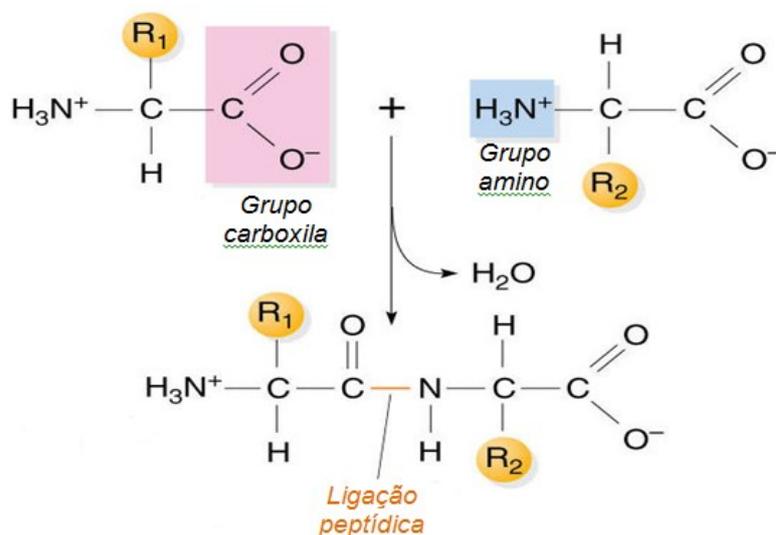
Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre assuntos relevantes para compreensão e contextualização do trabalho.

2.1 ENZIMAS

As enzimas são biomoléculas capazes de catalisar reações químicas sem alterar o equilíbrio da reação. Na maioria das vezes, a sua eficiência catalítica é maior que a de catalisadores químicos devido à maior especificidade. Em alguns casos, são a única rota para obtenção do produto, pois não existem alternativas químicas viáveis devido às reações paralelas ou pela geração de subprodutos difíceis de separar (ROMERA *et al.*, 2019). Além disso, elas atuam em condições brandas (temperatura, pH e pressão) e sua atividade pode ser regulada de acordo com as condições operacionais (COPELAND, 2004; MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON *et al.*, 2008).

Com exceção de um pequeno grupo de RNA catalítico, todas as enzimas são de natureza proteica, sendo formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Essas ligações são resultantes da reação de condensação entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina do aminoácido seguinte, como mostra a Figura 1 (NELSON *et al.*, 2008).

Figura 1 – Formação da ligação peptídica.



Fonte: Adaptado de RUSSELL (2009).

De acordo com o nível de organização, a estrutura das proteínas pode ser classificada como primária, secundária, terciária e quaternária, como mostra a Figura 2. A estrutura primária é a sequência de aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica. A estrutura secundária é o dobramento da cadeia peptídica causado pela interação entre aminoácidos próximos. Essa estrutura é mantida por meio de ligações de hidrogênio e os tipos mais comuns de estruturas secundárias são a α -hélice e a folha- β pregueada. A estrutura terciária é o arranjo resultante da interação entre regiões da estrutura secundária e a cadeia lateral de aminoácidos, formando uma estrutura mais compacta. Essa estrutura é mantida por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações iônicas e pontes dissulfeto (ligação covalente) entre segmentos da cadeia principal e cadeias laterais de aminoácidos e da interação da molécula com o ambiente. A estrutura quaternária, é a interação entre duas ou mais cadeias polipeptídicas diferentes, ou subunidades. Somente algumas proteínas apresentam esse tipo de estrutura (MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON *et al.*, 2008).

Figura 2 - Níveis estruturais de proteínas.



Fonte: Adaptado de OPENSTAX (2013).

Nas reações enzimáticas, as substâncias que são transformadas são chamadas de substrato. Embora toda a molécula da enzima seja necessária para desempenhar o papel catalítico, a reação ocorre apenas quando o substrato se liga a uma região específica conhecida como o sítio ativo. Para que uma molécula seja reconhecida como substrato, ela precisa ter a forma adequada para se acomodar no sítio ativo e ser capaz de estabelecer ligações químicas com os grupamentos químicos ali presentes. Dessa forma, cada enzima catalisa um tipo de reação para um dado substrato ou para um pequeno grupo de substratos intimamente relacionados, tornando-as altamente específicas e seletivas (MARZZOCO; TORRES, 2007). No caso do beneficiamento têxtil, é possível obter o efeito desejado escolhendo a enzima adequada, sem, por exemplo, destruir determinadas fibras do material, o que poderia ocorrer com reagentes químicos normais.

Cada enzima tem uma estrutura tridimensional específica que lhe permite exercer sua função, denominada de conformação nativa. A tendência em manter esta conformação é denominada estabilidade. Esta conformação reflete um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula e entre esta e o seu meio ambiente. Assim, a estrutura da enzima e a forma do sítio ativo podem ser afetados por quaisquer agentes capazes de alterar esse equilíbrio, tornando a atividade enzimática dependente das características do meio, como pH e temperatura. Qualquer mudança que cause a perda da função de uma proteína é chamada de desnaturação (BON *et al.*, 2008a; MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON *et al.*, 2008).

Variações de pH podem alterar a carga líquida da enzima, causando repulsão eletrostática e o rompimento de algumas ligações de hidrogênio (NELSON *et al.*, 2008). Conseqüentemente, pode haver perda de afinidade do sítio ativo pelo substrato e/ou mudanças na estrutura tridimensional. Em alguns casos, pode ocorrer também a ionização da molécula de substrato, diminuindo sua afinidade com o sítio ativo. Por essas razões, o poder catalítico é mantido apenas em uma faixa de pH, conhecida como faixa de estabilidade. Valores de pH fora dessa faixa causam a desnaturação da enzima com perda permanente da atividade. A estreita faixa onde a atividade catalítica é máxima é denominada como faixa de pH ótimo (LIU, 2012; NELSON *et al.*, 2008; RODWELL, 2015)

Assim como os catalisadores químicos, o aumento da temperatura favorece a atividade catalítica das enzimas devido ao aumento da energia cinética. No entanto, o aumento da temperatura também aumenta a energia vibracional das moléculas causando o rompimento de ligações fracas, especialmente as ligações de hidrogênio. A quebra dessas ligações provoca alterações conformacionais que levam à desnaturação da enzima, causando queda brusca da

atividade. Tal fato é observado, geralmente, em temperaturas acima da faixa de temperatura ótima, onde a atividade catalítica é máxima (LIU, 2012; MARZZOCO; TORRES, 2007).

A força iônica está relacionada com a concentração de íons em uma solução. Ela pode influenciar nos valores de pKa dos resíduos ionizáveis das enzimas e dos substratos, afetando a interação entre eles (EUN, 1996). A força iônica também pode alterar a estabilidade e solubilidade de proteínas e do substrato (EUN, 1996). Baixas concentrações de sal podem aumentar a solubilidade de proteínas. Por outro lado, altas concentrações levam a desidratação das mesmas e, conseqüentemente, reduz a solubilidade e a atividade catalítica. Em uma concentração de sal suficientemente alta, o resultado é a precipitação (*salting-out*). Em geral, a conformação é mantida e a enzima pode ser dissolvida novamente sem perda de atividade (LENTING, 2003). A concentração de íons salinos também é importante para estabilizar o pH, através da neutralização dos íons hidrogênio que podem ser consumidos ou liberados durante a reação enzimática.

Surfactantes são muito utilizados para melhorar a interação enzima-substrato quando se trata de substratos insolúveis em água e são um grupo muito importante de auxiliares têxteis, sendo utilizados como agentes umectantes, amaciadores, detergentes, emulsificantes, entre outros (BUSCHLE-DILLER, 2003). Existem quatro classes principais de agentes tensoativos: aniônicos, catiônicos, zwitteriônicos e não-iônicos, todos possuem uma parte com característica apolar ligada a uma outra parte com característica polar. Alguns estudos mostram que surfactantes iônicos (catiônicos e aniônicos) interferem negativamente a atividade da celulase (HEMMATINEJAD *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2013; OOSHIMA *et al.*, 1986; SIMON *et al.*, 2018; UEDA *et al.*, 1994). Esse efeito pode ser relacionado a mudanças conformacionais causadas pelas interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a enzima e esses surfactantes (HOLMBERG, 2018; UEDA *et al.*, 1994; XIANG *et al.*, 2006). Surfactantes aniônicos interagem com os grupos carregados positivamente de lisina, arginina ou histidina, enquanto surfactantes catiônicos interagem com grupos carboxílicos de glutamato ou aspartato. Por outro lado, a adição de surfactantes não-iônicos tem mostrado efeito positivo na hidrólise (HEMMATINEJAD *et al.*, 2002; MIZUTANI *et al.*, 2002; OOSHIMA *et al.*, 1986). O aumento na taxa de reação pode ser atribuído à redução da adsorção inespecífica da enzima no substrato, melhorando a taxa de hidrólise (ERIKSSON *et al.*, 2002; HOLMBERG, 2018; MIZUTANI *et al.*, 2002; OOSHIMA *et al.*, 1986).

A presença de outras substâncias, como agentes redutores, agentes redutores, metais, entre outros, no meio reacional também podem afetar a atividade enzimática. Assim, a

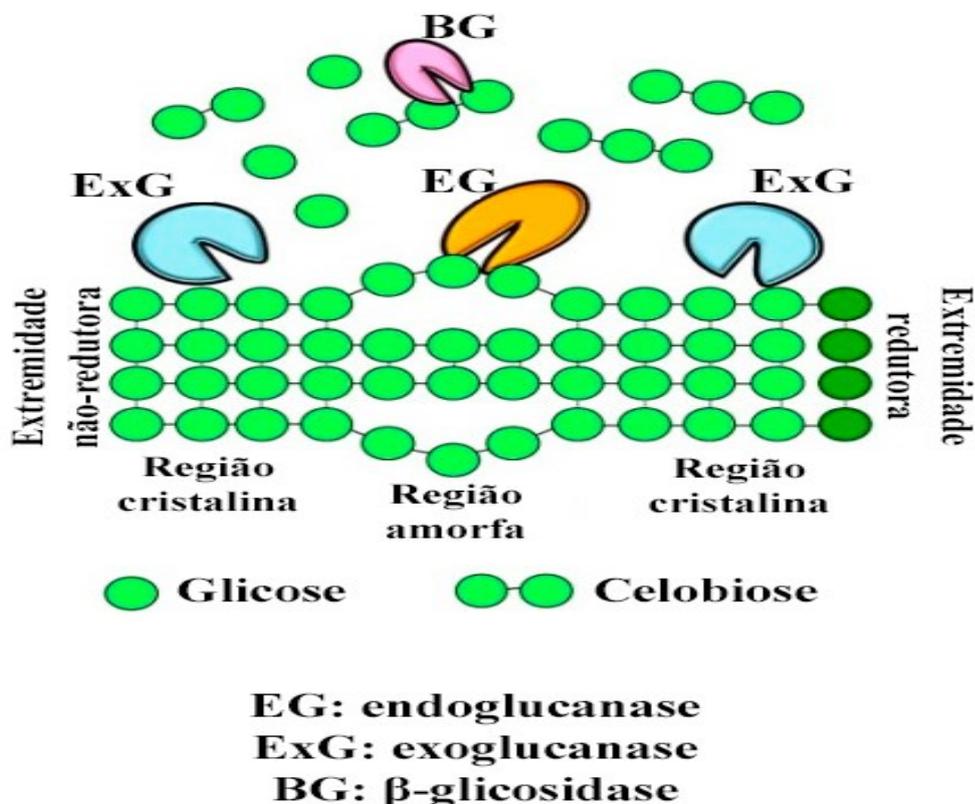
compatibilidade da enzima com as substâncias que podem estar presentes no meio reacional deve ser cuidadosamente analisada antes de desenvolver um processo enzimático.

2.2 CELULASES

As celulases constituem um complexo enzimático capaz de hidrolisar a celulose em oligossacarídeos e glicose. Elas são amplamente utilizadas em diversos segmentos industriais, tais como alimentos e bebidas, têxtil, ração animal, papel e celulose, biocombustíveis, bem como em pesquisa e desenvolvimento (BHAT, 2000; CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Na indústria têxtil elas são amplamente utilizadas para melhorar as propriedades dos produtos à base de celulose. As principais aplicações são para remoção do *pilling* (biopolimento) e para criar efeito desbotado no jeans (bioestonagem). Elas também são utilizadas em detergentes para limpar a superfície das fibras, melhorando a aparência e o brilho da cor (ANDREAUS *et al.*, 2014; CAVACO-PAULO, 1998).

De acordo com seu local de atuação no substrato, as enzimas desse complexo são divididas em três grandes grupos: endoglucanases, exoglucanases, e β -glicosidases. Todas as celulases clivam a mesma ligação (ligação glicosídica β -1,4), o que as difere é o local de atuação no substrato (BON *et al.*, 2008b; KNOWLES *et al.*, 1987; LYND *et al.*, 2002; POLAINA; MACCABE, 2007). A completa conversão da celulose em glicose depende da atuação sinérgica de todas essas enzimas (Figura 3) (MANSFIELD; MEDER, 2003). As endoglucanases são responsáveis por iniciar a hidrólise. Esse grupo de enzimas atua de forma aleatória nas regiões amorfas da molécula de celulose liberando oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização. As exoglucanases atuam nas extremidades da fibra de celulose e nos oligossacarídeos liberados pelas endoglucanases, gerando celobiose e glicose como produtos principais. As β -glicosidases hidrolisam os oligossacarídeos e celobiose liberados pelas outras enzimas, formando glicose. Além de finalizar a despolimerização, a ação das β -glicosidases também é importante para evitar a inibição das endoglucanases devido ao acúmulo de celobiose (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; LYND *et al.*, 2002; MANSFIELD; MEDER, 2003; POLAINA; MACCABE, 2007). Para os processos de bioestonagem e biopolimento é recomendado o emprego de preparados enzimáticos ricos em endoglucanases, pois proporcionam bons efeitos de superfície com o menor perda de tração em comparação aos preparados que contêm todas as enzimas do complexo celulolítico ou que sejam ricos em exoglucanases (LENTING, H.; WARMOESKERKEN, M., 2001; LIU *et al.*, 2000; MIETTINEN-OINONEN *et al.*, 2001; NIERSTRASZ; WARMOESKERKEN, 2003).

Figura 3 – Sinergismo das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: Adaptado de RATANAKHANOKCHAI *et al.* (2013).

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas consiste na restrição da mobilidade da enzima em um espaço fixo (suporte/matriz) (SIRISHA *et al.*, 2016; TISCHER; WEDEKIND, 1999). Em geral, os principais benefícios proporcionados pela imobilização são a fácil recuperação e reutilização da enzima, o que proporciona maior produtividade e diminuição do custo de aplicação do biocatalisador. Para os processos de acabamento têxteis, a imobilização proporciona outra importante vantagem, que é a restrição da mobilidade da enzima. Assim, sua atuação fica restrita à superfície da fibra celulósica, o que preserva o interior da fibra e minimiza a perda de massa e resistência dos tecidos. A imobilização também pode melhorar o desempenho da enzima, como atividade, seletividade e estabilidade operacional e ao armazenamento (KATCHALSKI-KATZIR, 1993; SHELDON; VAN PELT, 2013; TISCHER; WEDEKIND, 1999).

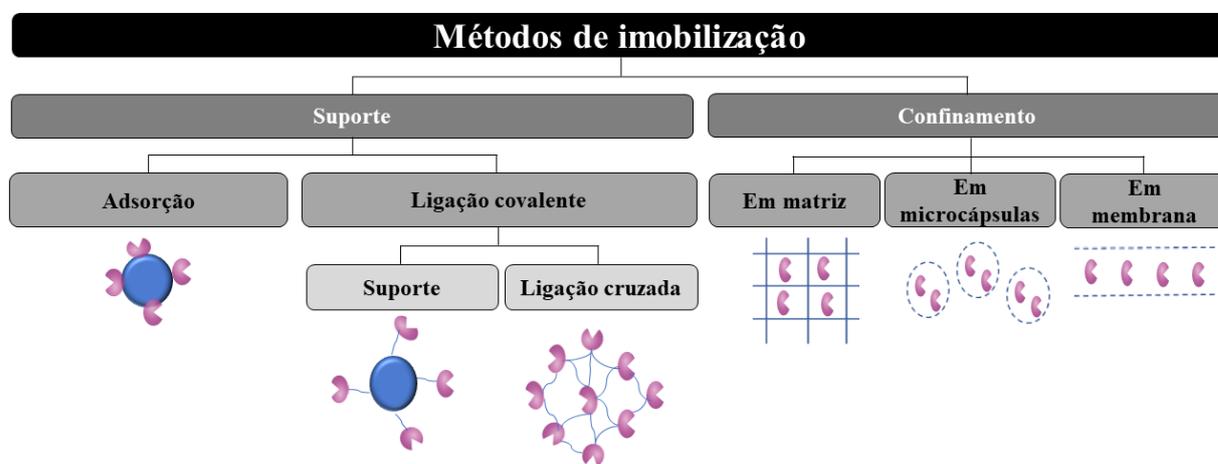
A principal tarefa ao desenvolver um protocolo de imobilização é selecionar o suporte e o método de imobilização a serem empregados, levando em consideração as características

da enzima e da aplicação (EL-RAZIK *et al.*, 2016; KRAJEWSKA, 2004). Essa seleção, geralmente, é feita experimentalmente, pois depende das peculiaridades de cada enzima e das características do processo em que o biocatalisador será empregado (BICKERSTAFF, 1997; CAO *et al.*, 2003; HANEFELD *et al.*, 2009; LIESE; HILTERHAUS, 2013). Os principais objetivos dos protocolos de imobilização são a preservação da atividade catalítica da enzima e obtenção das vantagens tecnológicas esperadas da imobilização (CANTONE *et al.*, 2013). No entanto, outros aspectos também devem ser almejados, tais como: simplicidade e robustez do protocolo, evitar o uso de reagentes tóxicos, resistência mecânica da enzima imobilizada, possibilidade de acoplar a imobilização com a purificação da enzima, reduzir os problemas de inibição, menor custo, entre outros (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2011). Dessa forma, para que todos os aspectos sejam considerados é necessário integrar o conhecimento em diversas áreas, incluindo enzimologia, reações químicas, ciência dos materiais e superfícies (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

2.3.1 Métodos de imobilização

Os principais métodos de imobilização podem ser classificados em dois grupos (Figura 4): ligação (com ou sem uso de suporte) e confinamento (em matriz polimérica, cápsulas ou membranas). Outros métodos, que são combinações dos métodos listados, têm sido desenvolvido para abordar as diferentes características de enzimas, substratos, produtos e aplicações (HOMAEI *et al.*, 2013).

Figura 4 – Principais métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Autora (2020).

Os métodos de confinamento consistem na restrição do movimento da enzima dentro de um espaço pequeno, que pode ser nos poros de uma matriz polimérica, no interior de cápsulas ou entre membranas (MOHAMAD *et al.*, 2015; SHELDON, ROGER A, 2007). Em geral, a síntese da matriz de confinamento ocorre na presença da enzima. Assim, a formação da matriz e a imobilização ocorrem concomitantemente (CAO, 2006). A principal vantagem desses métodos é não haver ligações químicas entre o suporte e a enzima, fazendo com que a estrutura desta seja mantida. Contudo, essa técnica é inadequada para aplicações em que o substrato é sólido, como a bioestonagem e o biopolimento, pois o mesmo não pode se difundir pelos poros da membrana e chegar até a enzima.

Os métodos de ligação que não usam suporte são conhecidos como imobilização por ligação cruzada. Nesses métodos, as enzimas são ligadas umas às outras por meio de reagentes bifuncionais ou multifuncionais (por exemplo, glutaraldeído, diisocianatos, hexametileno diisocianato, tolueno diisocianato, etc.), formando agregados de enzimas insolúveis (EL-RAZIK *et al.*, 2016; SHELDON; VAN PELT, 2013). Existem dois métodos de reticulação em uso: (i) cristais de enzima reticulados (*cross-linked enzyme crystals* – CLEC) e (ii) agregados de enzimas reticulados (*cross-linked enzyme aggregate* - CLEA). Em geral, imobilização por reticulação envolve duas etapas principais que envolvem cristalização em uma solução aquosa a temperatura adequada (CLECs) ou precipitação da enzima solúvel com precipitante adequado (CLEAs) seguido da formação de ligações cruzadas intermoleculares por meio de reagentes bi ou multifuncionais (COSTA *et al.*, 2005; MOHAMAD *et al.*, 2015; SHELDON, R., 2007). A preparação de CLEAs é mais simples, não requer uma enzima de alta pureza e permite combinar dois processos unitários, purificação e imobilização, em uma operação (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; SHELDON, 2011). A técnica é simples, permite uma elevada retenção catalítica e apresenta baixo custo de produção devido à ausência de um suporte (SHELDON, R., 2007). No entanto, pode ocorrer desnaturação e baixa estabilidade mecânica, o que gera dificuldades quando aplicadas em sistemas de reação heterogêneos e com elevada agitação como a indústria têxtil (CANTONE *et al.*, 2013; CAO, 2006; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Além disso, o tamanho de poro dessas estruturas é pequeno, o que impediria o contato entre o interior do agregado contendo celulase e o substrato têxtil.

Nos métodos que envolvem o uso de suporte, a ligação entre enzima e suporte pode ser realizada por adsorção (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ligação por afinidade ou interações iônicas) ou ligação covalente (BICKERSTAFF, 1997; CAO, 2006; NISHA *et al.*, 2012). Este método é o que aparenta ser o mais adequado para

aplicação têxtil, pois as enzimas estão localizadas na superfície do suporte e podem facilmente entrar em contato com o substrato.

A imobilização por adsorção é um método que apresenta maior potencial comercial por se tratar de uma técnica simples, rápida, de baixo custo e tem a possibilidade de regenerar o suporte quando a enzima inativa com a adição de um novo lote de enzima livre (BICKERSTAFF, 1997; MOHAMAD *et al.*, 2015). Contudo, devido à natureza fraca das ligações, as enzimas podem ser lixiviadas durante sua aplicação, contaminando o produto final e reduzindo a atividade (BICKERSTAFF, 1997; CAO, 2006; MOHAMAD *et al.*, 2015; SHELDON, ROGER A, 2007). Para algumas aplicações, a lixiviação da enzima do suporte pode ser uma questão relevante. Nos processos de bioacabamento têxtil, a imobilização é usada como uma ferramenta para minimizar os efeitos negativos proporcionados pela enzima livre. Se a enzima for lixiviada do suporte durante o processo a imobilização pode ser inútil. Porém, em alguns casos a adsorção da enzima pode ser suficientemente estável sob as condições de aplicação e a lixiviação pode não ocorrer (CAO, 2006).

A ligação covalente é um dos métodos mais amplamente utilizados para imobilização irreversível de enzimas (SHELDON, 2011). O método se baseia na formação de ligações fortes (ligações covalentes) entre grupos funcionais presentes na superfície da enzima e do suporte (BICKERSTAFF, 1997). Os grupos funcionais da enzima que, geralmente, participam dessa ligação são os grupamentos amino, carboxila, hidroxila e/ou sulfidril. Na maioria dos casos, o suporte requer alguma ativação preliminar por reagentes como o glutaraldeído, e é recomendável algum tipo de bloqueio dos grupos reativos livres da superfície do suporte após a imobilização (CAO, 2006; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A ligação covalente geralmente reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas, impedindo que a estrutura da enzima seja alterada na presença de agentes desnaturantes, como calor, solventes orgânicos, pH extremo e outros (CAO, 2006; HANEFELD *et al.*, 2009). Por outro lado, as restrições conformacionais podem acarretar em perdas de atividade catalítica (VIDINHA *et al.*, 2006). A ligação covalente também impede a lixiviação da enzima do suporte (BRENA *et al.*, 2013; CAO, 2006; SHELDON, ROGER A, 2007). Porém, se a enzima é irreversivelmente desativada, a ligação covalente é uma desvantagem porque a enzima e o suporte (geralmente caros) ficam inutilizáveis (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Uma desvantagem de utilizar enzimas ligadas a suportes, independentemente do método utilizado, é a introdução de uma grande proporção de massa não-catalítica, ou seja, grande parte da massa total, geralmente mais 95% da massa total, não é enzima (SHELDON;

VAN PELT, 2013). Como consequência, são obtidos produtividades e rendimentos volumétricos e de espaço-tempo menores (CAO *et al.*, 2003; SHELDON *et al.*, 2005).

2.3.2 Suportes para a imobilização de enzimas

O bom desempenho de um biocatalisador imobilizado está relacionado principalmente às características do suporte empregado (DE CASTRO *et al.*, 2008; SHELDON, ROGER A, 2007). Dessa forma, é necessário avaliar criteriosamente todos os aspectos envolvidos para selecionar o suporte mais apropriado para a aplicação desejada (DE CASTRO *et al.*, 2008). A escolha adequada pode aumentar o tempo de meia-vida do biocatalisador. Porém, a escolha incorreta pode afetar não só a estabilidade, mas o desempenho global do processo (DE CASTRO *et al.*, 2008).

A seleção do suporte deve analisar suas características físicas, químicas e morfológicas e deve estar de acordo com as características da enzima e de sua aplicação (BRENA *et al.*, 2013; CANTONE *et al.*, 2013; DE CASTRO *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2011). Em geral, as principais características a serem observadas durante a seleção de um suporte são: área superficial, porosidade, permeabilidade, solubilidade, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência mecânica e ao ataque microbiano, pH e temperatura, capacidade de reutilização, resistência mecânica, toxicidade, custo, dentre outras (BICKERSTAFF, 1997; TISCHER; WEDEKIND, 1999). Além disso, o suporte deve ser quimicamente inerte para evitar que ocorra reação com a água, substratos ou produtos resultantes das reações catalisadas pela enzima. Porém, ele deve ser reativo o suficiente para se ligar diretamente à enzima ou para ser quimicamente modificado para favorecer a imobilização (ZUCCA; SANJUST, 2014).

De acordo com sua composição química, os suportes podem ser classificados como orgânicos (naturais ou sintéticos) e inorgânicos ou híbridos (BRENA *et al.*, 2013; DE CASTRO *et al.*, 2008; MOHAMAD *et al.*, 2015). Considerando uma aplicação industrial, os suportes inorgânicos são os mais indicados, pois possuem elevada resistência mecânica e ao ataque microbiano, boa estabilidade térmica, são resistentes a solventes orgânicos e possuem distribuição uniforme de poros. Além disso, é possível modificar quimicamente sua superfície, possibilitando inúmeras técnicas de imobilização (BRENA *et al.*, 2013; DE CASTRO *et al.*, 2008; ZUCCA; SANJUST, 2014). Os materiais inorgânicos mais comumente utilizados na imobilização de enzimas são: argilas, cerâmica, sílica, vidro e metais (BRENA *et al.*, 2013; DE

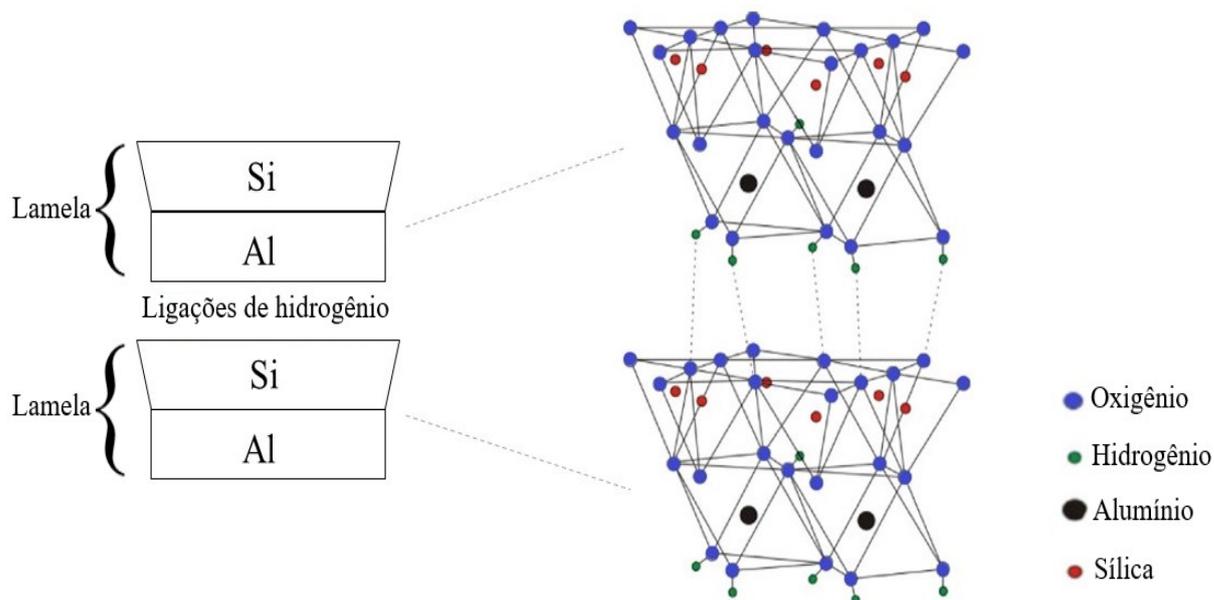
CASTRO *et al.*, 2008). Dentre esses materiais, as argilas, em especial o caulim, têm se mostrado uma excelente opção de suporte para imobilizar enzimas devido às suas características físicas e químicas, como será discutido a seguir (AN *et al.*, 2015).

2.4 CAULIM

O termo caulim é empregado para denominar a rocha que contém, essencialmente, material argiloso formado por silicato hidratado de alumínio. O seu principal componente é a caulinita, mas outros minerais, como haloisita, e outras substâncias, tais como quartzo, palhetas de mica, grãos de feldspato, óxidos de ferro e titânio, também podem estar presentes em sua composição em teores variáveis, conforme a origem e o seu processamento industrial (MURRAY, HAYDN H, 2006).

A caulinita é um aluminossilicato hidratado, sua fórmula estrutural é $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ e sua composição percentual teórica é 39,5% de Al_2O_3 , 46,5% de SiO_2 e 14,0% de H_2O . Conforme pode ser observado na Figura 5, a caulinita apresenta uma estrutura lamelar do tipo 1:1. Cada lamela é constituída por uma folha octaédrica de alumina e uma folha tetraédrica de sílica (GARDOLINSKI *et al.*, 2001; HERRINGTON *et al.*, 1992; PRASAD *et al.*, 1991; REZENDE *et al.*, 2012). Nas folhas octaédricas, os átomos de alumínio são coordenados a oxigênio e grupamentos hidroxila. Nas folhas tetraédricas, os átomos de silício são coordenados por átomos de oxigênio (CHENG *et al.*, 2012; MURRAY, HAYDN H., 2006b). Desta forma, um lado da lamela contendo alumínio é recoberto com grupamentos hidroxila e o outro é recoberto com átomos de oxigênio (GARDOLINSKI *et al.*, 2001). A reatividade da folha octaédrica externa é devida aos grupos hidroxila presentes, que podem produzir uma carga superficial dependente do pH por reações de protonação e desprotonação ou podem reagir especificamente com outras moléculas (ADAMIS; WILLIAMS, 2005). As lamelas adjacentes são ligadas umas às outras por ligações de hidrogênio envolvendo grupos aluminol (Al-OH) e grupos siloxano (Si-O) (REZENDE *et al.*, 2012).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura da caulinita.



Fonte: Adaptado de (CHENG *et al.*, 2012).

2.4.1 Caulim como suporte para imobilização de enzimas

O caulim é uma matéria-prima versátil, sendo aplicada em diversas indústrias, tais como papel, cerâmicas, plásticos, tintas, adesivos, farmacêuticas, inseticidas e pesticidas, entre outras (CARRETERO, 2002; MURRAY, HAYDN H., 2006a; PRASAD *et al.*, 1991). Além disso, ele apresenta elevado potencial para ser empregado como suporte na imobilização de enzimas, pois apresenta características essenciais para o bom desempenho do biocatalisador. Ele é inerte em uma faixa de pH relativamente ampla, não é abrasivo, não é tóxico, apresenta resistência mecânica, resistência microbiana e estabilidade térmica, além de apresentar baixo custo e ser facilmente disponível na natureza (MURRAY, 2000; PRASAD *et al.*, 1991; TANASKOVIĆ *et al.*, 2017). Além disso, sua estrutura não é expansível, devido a sua baixa capacidade de troca iônica e às ligações de hidrogênio entre suas lamelas. Assim, a ligação de moléculas, tal como proteínas, é restrita à sua superfície externa (AN *et al.*, 2015; BARRAL *et al.*, 2008; FIORITO *et al.*, 2008). Essa característica o torna ainda mais atraente para a imobilização da celulase visando a aplicação em processos de bioacabamento têxtil. Nesses casos, se a enzima estiver imobilizada entre as lamelas, ela não consegue interagir com o substrato e o efeito desejado não é obtido (CANTONE *et al.*, 2013; TANIGUCHI *et al.*, 1992).

Na literatura, diversos estudos têm mostrado resultados promissores utilizando caulim como suporte para imobilização de diversas enzimas. SARKAR *et al.* (1989) empregaram caulim modificado para imobilizar as enzimas lacase, glicose oxidase, tirosinase, β -glicosidase

e fosfatase ácida. Dentre elas, apenas a fosfatase ácida apresentou menos de 60% de atividade retida no suporte. GIANFREDA e BOLLAG (1994) também empregaram caulim modificado para imobilizar as enzimas lacase, peroxidase e fosfatase ácida, sendo obtidos 85,5; 80,7 e 35,3% de atividade retida, respectivamente. ISO *et al.* (2001) mostraram que a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em caulinita apresentou maior eficiência catalítica durante a produção de biodiesel que a enzima livre. No trabalho desenvolvido por DODOR *et al.* (2004), a enzima lacase foi imobilizada em caulim funcionalizado. Em comparação com a enzima livre, a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade ao pH, à temperatura e ao armazenamento. RAHMAN *et al.* (2005) relataram 77% de eficiência de imobilização da enzima lipase pelo método de adsorção física e maior estabilidade térmica da enzima imobilizada. ŠEKULJICA *et al.* (2016) mostraram uma melhora no desempenho da enzima *horseradish* peroxidase imobilizada por adsorção física.

Em relação à imobilização de celulasas, poucos trabalhos foram encontrados utilizando o caulim como suporte. KARAGULYAN *et al.* (2008) estudaram a imobilização da β -glicosidase, por adsorção, sendo que 95% da carga inicial da enzima foi imobilizada e não foi observada perda de atividade. No entanto, essa classe de celulasas atua na celulose solúvel e as outras enzimas do complexo celulolítico, endo e exoglucanases, atuam somente no substrato sólido. Dessa forma, as características das enzimas e do substrato se diferem e, conseqüentemente, pode-se esperar resultados diferentes no processo de imobilização. Já SINEGANI *et al.* (2005) avaliaram a imobilização da celulase no caulim recoberto com hidróxido de alumínio. Porém, o objetivo desses pesquisadores foi apenas compreender como a celulase interage com alguns componentes do solo e não está relacionado com uma aplicação industrial específica. Além disso, nesses trabalhos, a imobilização da celulase foi realizada apenas por meio de adsorção e a capacidade de reuso da enzima não foi avaliada.

2.4.2 Funcionalização do caulim visando a imobilização de enzimas por ligação covalente

A imobilização de enzimas utilizando o caulim como suporte pode ser feita através de adsorção ou ligação covalente. No entanto, a imobilização por adsorção envolve ligações fracas e a enzima pode ser lixiviada do suporte durante o processo. Assim, dependendo da aplicação e das características da enzima, a imobilização por ligação covalente pode ser a melhor opção.

Em geral, para estabelecer ligações covalentes com enzimas, a superfície do caulim precisa ser funcionalizada com grupamentos como amina, hidroxila, carboxila e tiol. O caulim funcionalizado precisa de uma etapa de ativação com um agente ativador, tais como haletos

orgânicos e inorgânicos, glutaraldeído e carbodiimidas, para modificar os grupos funcionais e torná-los reativos com os grupos funcionais presentes na enzima (ZUCCA; SANJUST, 2014). Conceitualmente, funcionalização é o procedimento pelo qual uma nova função química é introduzida em um suporte. Ativação significa que a função química recentemente introduzida é reativa para a enzima (ZUCCA; SANJUST, 2014). Neste contexto, o principal tratamento utilizado em silicatos empregados na imobilização de enzimas é a silanização com 3-(aminopropil)triétoxissilano (APTES) seguido pela ativação com glutaraldeído (GA) (CAO, 2006; MONSAN, 1978). Na literatura não foram encontrados trabalhos de imobilização de celulase em caulim utilizando esse tratamento. No entanto, resultados promissores têm sido relatados em outros suportes, como sílica gel, nanopartículas magnéticas, esferas de vidro porosas (ALAHAKOON *et al.*, 2012; GREWAL *et al.*, 2017; ROGALSKI *et al.*, 1985; ZHANG *et al.*, 2016).

O APTES é um organossilano conhecido como agente de acoplamento, pois é capaz de realizar ligação química entre um material orgânico e um material inorgânico (SAYILKAN *et al.*, 2004). Em geral, os organossilanos possuem estrutura do tipo $R-SiX_3$, sendo R o grupo funcional orgânico e X o grupo hidrolisável. No caso do APTES, os grupamentos R e X correspondem ao grupamento amino e etóxi, respectivamente (SAYILKAN *et al.*, 2004). A funcionalização do caulim com APTES consiste na interação entre o radical silanol e as hidroxilas presentes na superfície da argila, formando ligação siloxano (CAO, 2006; JUNG *et al.*, 2012; SAYILKAN *et al.*, 2004).

O GA é o agente ativador mais utilizado na ativação de suportes contendo grupos amina e na imobilização de enzimas devido à sua elevada reatividade, é facilmente utilizado, é estável em soluções aquosas, baixo custo e disponibilidade comercial (BETANCOR *et al.*, 2006; MIGNEAULT *et al.*, 2004; OKUDA *et al.*, 1991; WALT; AGAYN, 1994). O GA é um dialdeído linear de cinco carbonos que, em solução aquosa com pH ao redor do neutro, reage rapidamente com grupamentos amina formando ligações imina estáveis (MATEO *et al.*, 2007; MIGNEAULT *et al.*, 2004; OKUDA *et al.*, 1991; TOMIMATSU *et al.*, 1971). A reação entre GA e proteínas ocorre preferencialmente com aminas primárias, mas ele também pode eventualmente reagir com outros grupos, como tióis, fenóis e imidazóis (BARBOSA *et al.*, 2014; HABEEB; HIRAMOTO, 1968). No entanto, a estrutura exata do glutaraldeído em solução aquosa ainda não está totalmente esclarecida, podendo ser encontrado na forma monomérica ou polimérica e na forma linear ou cíclica (BARBOSA *et al.*, 2014; MIGNEAULT *et al.*, 2004).

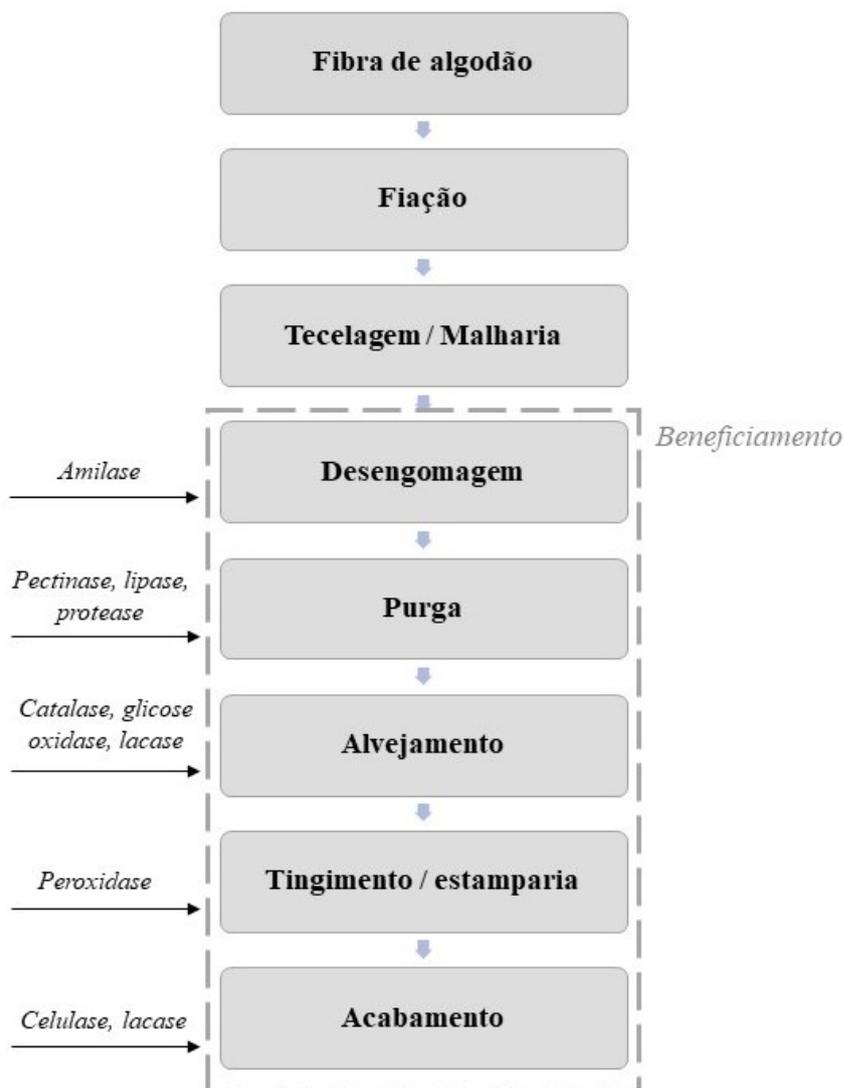
2.5 INDÚSTRIA TÊXTIL

A indústria têxtil tem grande destaque no cenário nacional e internacional. De acordo com os dados divulgados pela ABIT (Associação Brasileira da Indústria Têxtil) (2018), o Brasil é o quarto maior produtor e consumidor de jeans do mundo, quarto maior produtor de malhas do mundo e o segundo maior empregador da indústria de transformação, perdendo apenas para o setor alimentos e bebidas (ABIT, 2018). O Brasil apresenta a maior cadeia têxtil completa do Ocidente, ou seja, o país tem desde produtores de matérias-primas (algodão e demais fibras), insumos (corantes, produtos auxiliares, entre outros), máquinas e equipamentos têxteis até a venda do produto acabado ao consumidor final (ABIT, 2018).

Além da sua importância econômica, a indústria têxtil também se destaca pelo elevado consumo de água e energia, juntamente com a geração de grandes volumes de efluentes contendo corantes e produtos químicos (CHEN *et al.*, 2017). A preocupação em minimizar os impactos causados ao meio ambiente juntamente com o interesse em melhorar a qualidade dos produtos e diminuir o custo dos processos tem feito com que essas indústrias busquem por tecnologias viáveis, como a aplicação de enzimas. O uso de enzimas proporciona efeitos permanentes, melhora o aspecto visual (*pilling*, coloração e brilho) e o conforto (*maciez*) dos substratos com menor consumo de energia e produtos químicos, reduzem a produção de resíduos, além de serem biodegradáveis (ARAUJO *et al.*, 2008; BESEGATTO *et al.*, 2018; HEIKINHEIMO, 2002; MIETTINEN-OINONEN, 2007).

As enzimas são os agentes biológicos mais importantes empregados na indústria têxtil. Elas podem ser usadas em vários processos de beneficiamento úmidos, desde a preparação até os processos de acabamento (Figura 6) (ALY *et al.*, 2004; BESEGATTO *et al.*, 2018). As etapas de preparação do tecido incluem o processo de desengomagem (remoção do amido), limpeza (remoção de impurezas não celulósicas, como pectinas, gorduras, ceras, proteínas) e alvejamento (remoção de pigmentos naturais presentes nas fibras). Já as etapas de acabamento incluem o biopolimento (remoção de microfibrilas da superfície da fibra celulósica) e bioestonagem do jeans (para remoção parcial do corante índigo para proporcionar o aspecto envelhecido ou desbotado às peças) (CAVACO-PAULO, 1998; MADHU; CHAKRABORTY, 2017; YACHMENEV *et al.*, 2002). Embora as enzimas tenham sido aplicadas principalmente em fibras celulósicas, elas também podem ser aplicadas no acabamento em fibras de poliéster e poliamida (ARAUJO *et al.*, 2008; PAUL, 2014b).

Figura 6 – Aplicação de enzimas no processamento têxtil.



Fonte: Autora (2020).

2.5.1 Fibras têxteis: fibras celulósicas

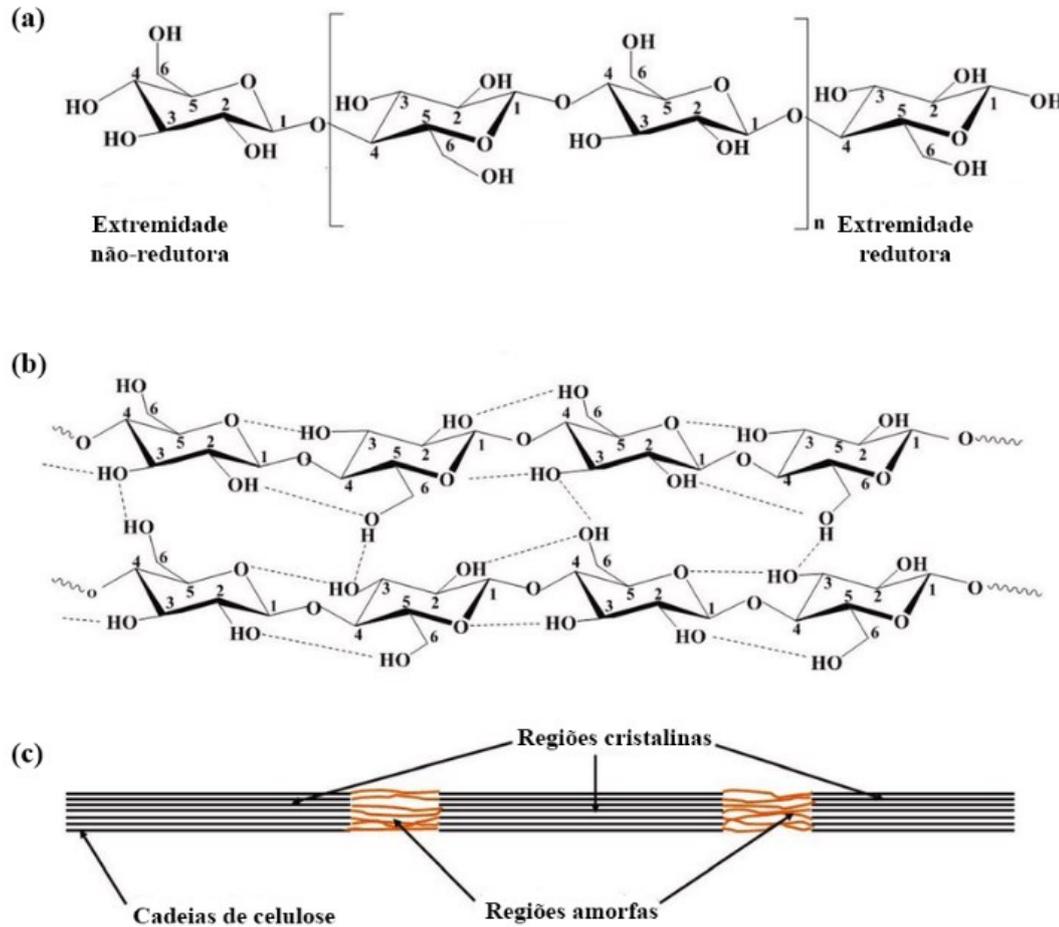
As fibras têxteis podem ser divididas em dois grandes grupos: fibras naturais e fibras não naturais ou manufaturadas (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996; GRISHANOV, 2011). As fibras naturais podem ser de origem animal como a lã e a seda; vegetal como algodão, linho e juta; ou mineral como amianto (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996; OLIVEIRA, 1997). As fibras manufaturadas são classificadas em: artificiais, produzidas a partir da celulose encontrada na polpa da madeira ou no línter do algodão, como viscose e acetato; e sintéticas, produzidas a partir de matérias primas da indústria petroquímica, como poliéster, poliamida (náilon), acrílico, elastano (lycra) e polipropileno (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996; OLIVEIRA, 1997).

De acordo com a análise do consumo industrial de fibras e filamentos feitos pela ABIT o algodão é a fibra de maior consumo industrial no Brasil, representando aproximadamente 47% do consumo total de fibras e filamentos em 2018 (ABIT, 2018). O seu destaque na indústria têxtil está relacionado as suas características como versatilidade, boa absorção de umidade, resistência mecânica, biodegradabilidade e propriedades químicas e tintoriais (DOCHIA *et al.*, 2012).

As fibras de algodão são constituídas em grande parte por celulose (mais de 90% da massa da fibra bruta) e, em menor quantidade, por impurezas, como pectina, ceras, gorduras, proteínas e minerais (DOCHIA *et al.*, 2012; GRISHANOV, 2011). Os materiais não celulósicos são eficientemente removidos nas etapas de limpeza e branqueamento e o conteúdo de celulose pode chegar a 99% (CAVACO-PAULO, 1998). O comprimento das fibras dos diferentes tipos de algodão geralmente utilizados na indústria têxtil varia de 22 a 50 mm e o diâmetro de 18 a 25 μm (DOCHIA *et al.*, 2012).

A celulose é um homopolímero formado por cadeias paralelas de glicose (PÉREZ; MAZEAU, 2004). As moléculas de glicose são ligadas entre si por ligações glicosídicas (Figura 7-a) (GRISHANOV, 2011). As cadeias lineares de glicose são interligadas por ligações de hidrogênio formadas pelos grupos hidroxila OH que se projetam da cadeia da molécula de glicose (Figura 7-b) (GRISHANOV, 2011). As duas extremidades das cadeias são quimicamente diferentes, uma extremidade tem propriedades redutoras e a outra não-redutora (PÉREZ; MAZEAU, 2004). As ligação de hidrogênio intra e inter-cadeia e as interações de empilhamento originadas principalmente pelas forças de Van der Waals proporcionam um arranjo altamente ordenado (regiões cristalinas) das fibrilas de celulose, embora também haja regiões amorfas presentes (onde o arranjo das cadeias de celulose é desordenado) (Figura 7-c) (DASSANAYAKE *et al.*, 2018). Assim, apesar da sua simplicidade química, a estrutura física e morfológica da celulose é complexa e heterogênea (MANSFIELD; MEDER, 2003).

Figura 7 – Estrutura química da celulose. (a) Unidades de glicose formando uma cadeia linear. (b) Ligação de hidrogênio entre as cadeias de glicose. (c) Esquema de microfibrilas de celulose mostrando estrutura cristalina e amorfa.



Fonte: Adaptado de DASSANAYAKE *et al.* (2018).

2.5.2 Processo têxtil

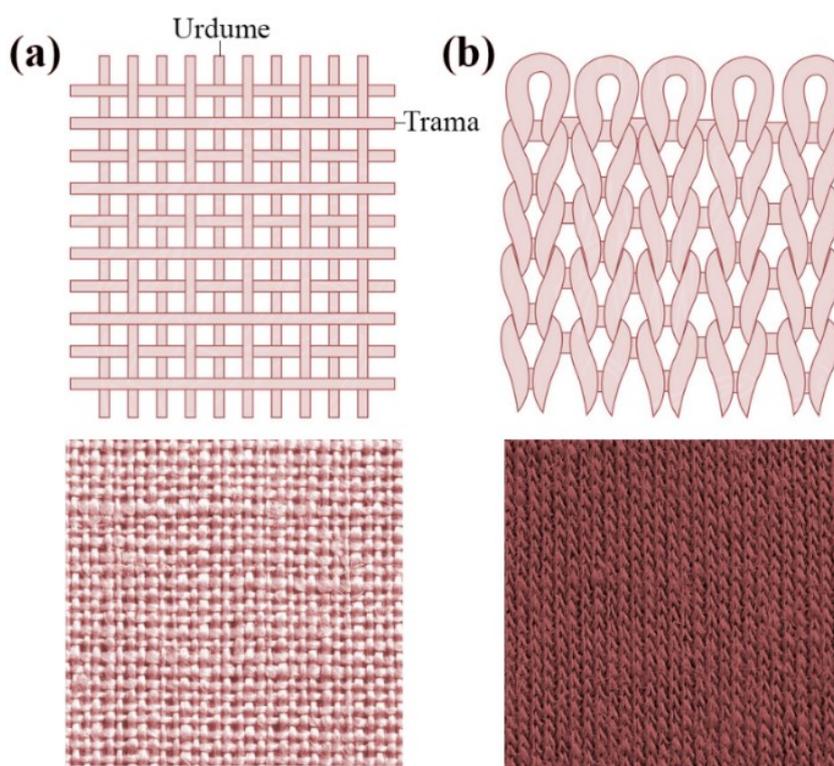
O processo têxtil é dividido em fiação, tecelagem (obtenção de tecidos planos) ou malharia (obtenção de tecidos de malha) e beneficiamento. O produto final de cada uma dessas etapas é a matéria-prima da fase seguinte (BROADBENT, 2001). A etapa de fiação consiste em uma série de operações para obtenção dos fios a partir das fibras têxteis. Nas etapas de tecelagem e malharia os fios são transformados em tecidos planos e malhas, respectivamente. A diferença entre tecido plano e malha está na forma de entrelaçamento dos fios.

Os tecidos planos são caracterizados pelo entrelaçamento de dois conjuntos de fios que se cruzam em ângulo reto (Figura 8-a). Os fios dispostos no sentido do comprimento (ou vertical) são chamados de urdume e os fios dispostos no sentido da largura (ou horizontal) são

chamados de trama. Exemplos de tecidos planos são cetim, sarja, tricoline, popeline, oxford, entre outros.

As malhas são formadas pela sucessão de laçadas consecutivas de um único fio ou de vários fios (Figura 8-b). Alguns exemplos de tecidos em malha são: visco lycra, jersey, moletom, tricô, piquet. Essa diferença na forma de entrelaçamento proporciona elasticidade e conforto às malhas.

Figura 8 – Estrutura (a) tecido plano (b) malha.



Fonte: Adaptado de THREADS MAGAZINE (2009) e THE LITTLEST STUDIO (2014).

A etapa de beneficiamento inclui os processos de preparação ao tingimento (alvejamento, purga e desengomagem), tingimento propriamente dito e/ou estampagem e acabamento. A etapa de preparação tem como objetivo a remoção do máximo possível de impurezas indesejadas para obter um tecido que absorva uniformemente soluções de corantes e produtos químicos. Uma boa preparação é vital para obtenção de um tingimento ou estamparia bem-sucedidos (BROADBENT, 2001). O tingimento envolve o contato entre uma solução aquosa ou dispersão de corantes e o material têxtil, que sob condições promovem uma coloração uniforme (BROADBENT, 2001). A estamparia, por outro lado, é a aplicação localizada de pigmentos em diferentes áreas específicas de um tecido (BROADBENT, 2001).

Os processos de acabamento são geralmente realizados na etapa final do beneficiamento, onde as propriedades finais do tecido são desenvolvidas (MONTAZER; HARIFI, 2018). Em geral, esses processos são usados para tornar o produto mais atrativo, seja melhorando a aparência, conferindo funcionalidade e/ou aumentando a durabilidade do produto (BATTISTI, 2017; CHOUDHURY, 2017). Existe uma grande variedade de processos de acabamento disponíveis no mercado que podem ser físicos, químicos ou biológicos (PAUL, 2014a). Os acabamentos biológicos ou também chamados de bioacabamentos incluem os tratamentos enzimáticos, tratamentos que utilizam biopolímeros, como quitosana e ciclodextrina, aromaterapia, e qualquer acabamento que utiliza algum meio biológico (BHALA *et al.*, 2012; MONTAZER; HARIFI, 2018). Os tratamentos enzimáticos são os principais métodos de bioacabamento, sendo utilizados nos processos de bioestonagem e biopolimento (CHOUDHURY, 2017; PAUL, 2014a). Eles proporcionam efeitos permanentes, melhoram o aspecto visual (*pilling*, coloração e brilho) e proporcionam maciez aos substratos têxteis, sem o uso de produtos químicos tóxicos e com baixo consumo de energia, garantindo um processo com baixo ou nenhum impacto ambiental.

Por fim, os produtos obtidos são direcionados ao consumidor em forma de vestuário ou de artigos para o lar (cama, mesa, banho, decoração, limpeza, entre outros) ou são destinados ao uso industrial (filtros de algodão, componentes para o interior de automóveis, embalagens, entre outros).

2.5.3 Biopolimento e bioestonagem

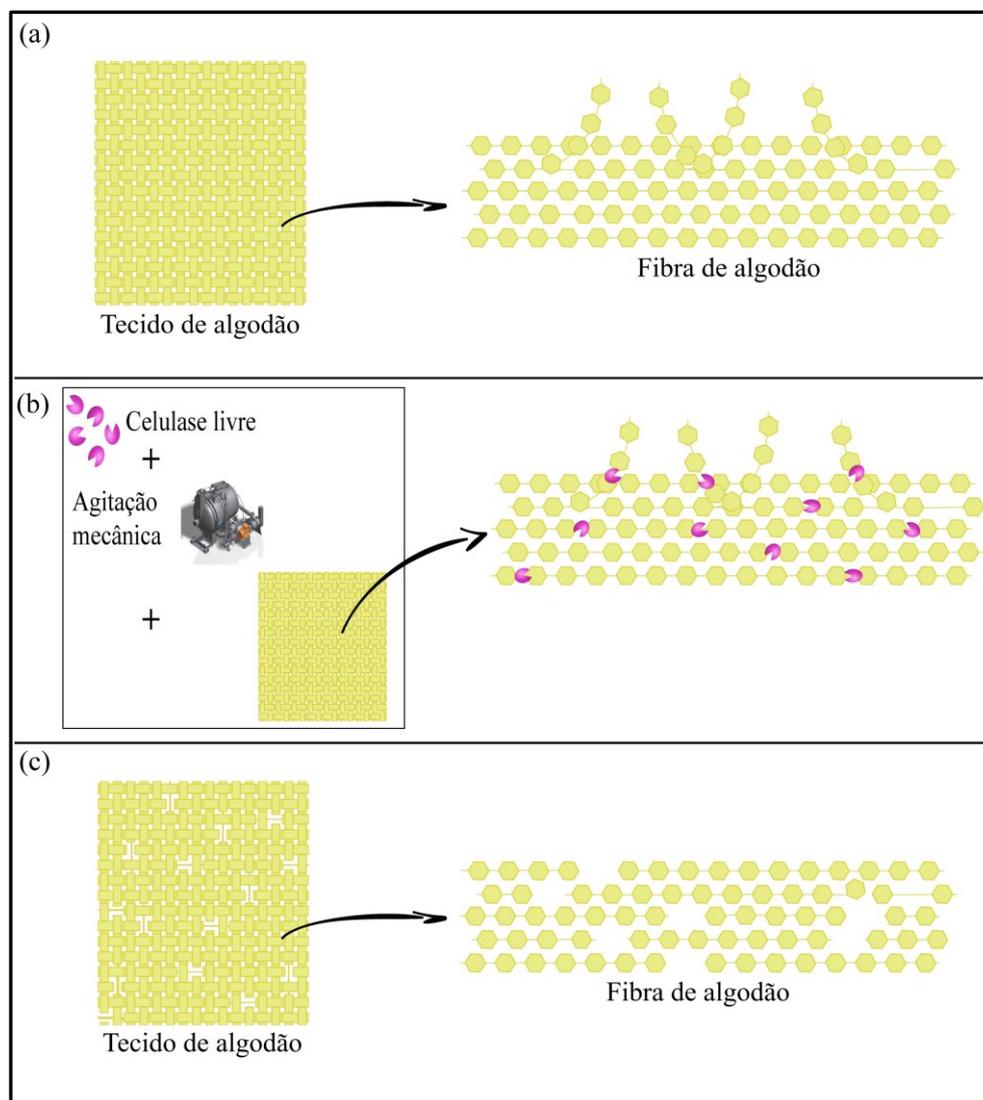
O biopolimento é um processo de acabamento para remover as microfibrilas imaturas ou salientes na superfície do fio de algodão por meio da combinação da ação da enzima celulase e agitação mecânica (Figura 9) (GALANTE; FORMANTICI, 2003). Durante o processo, as microfibrilas salientes na superfície do tecido são enfraquecidas pela ação da celulase e através da ação mecânica elas são removidas (CAVACO-PAULO *et al.*, 1996; GALANTE; FORMANTICI, 2003; LENTING, H. B. M.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G., 2001). A remoção dessas microfibrilas é importante porque elas tendem a se romper e acumular na superfície do tecido durante o uso e as lavagens, levando à formação de emaranhados de fibras denominadas de *pilling*. O *pilling* confere às roupas uma aparência usada e tornam as cores opacas devido ao aumento da reflexão difusa da luz branca na superfície do tecido (ANDREAUS *et al.*, 2014; HEIKINHEIMO, 2002). Além de melhorar a aparência do tecido,

o biopolimento ainda promove reavivamento de cores, amaciamento do tecido e aumenta a hidrofiliidade (GALANTE; FORMANTICI, 2003; PAULO, 1996; SCHINDLER, W. D.; HAUSER, P. J., 2004). O tratamento enzimático pode ser realizado após qualquer etapa de processo úmido, mas é preferencialmente realizado após o alveijamento do tecido (MIETTINEN-OINONEN, 2007; NIERSTRASZ; WARMOESKERKEN, 2003). Quando o tratamento enzimático é feito após o tingimento, pode ocorrer remoção parcial do corante, alterando a cor do tecido ou a enzima pode ser inibida pelo corante (LIU *et al.*, 2000; NIERSTRASZ; WARMOESKERKEN, 2003). Em geral, esse tratamento é aplicado em tecidos de algodão, mas também pode ser realizado em fios, roupas e artigos de celulose regenerada, como liocel e viscose (CHOUDHURY, 2017; PERE *et al.*, 2001).

A bioestonagem é um processo que combina a ação da celulase, a fricção entre tecido/tecido e a abrasão causada pela máquina para conferir ao jeans uma aparência envelhecida ou desbotada devido à remoção local do corante (ARAUJO *et al.*, 2008; CAVACO-PAULO *et al.*, 1998; HEIKINHEIMO, 2002) (Figura 10). O jeans, ou também denominado denim, é um tecido de sarja de algodão formado por um fio de urdidura tingido e um fio de trama branco (MIETTINEN-OINONEN, 2007). O fio de urdidura é tingido por adsorção de corante índigo blue¹ (AGRAWAL, 2017; MIETTINEN-OINONEN, 2004). Durante o processo, a celulase enfraquece as fibras da superfície e a ação mecânica as remove, liberando o corante adsorvido naquela área. Assim, o fio branco é revelado, criando áreas claras no jeans (HEIKINHEIMO, 2002; MIETTINEN-OINONEN *et al.*, 2004). As celulases foram introduzidas nesse processo para substituírem o uso da pedra-pomes (AGRAWAL, 2017; CHOUDHURY, 2017). O tratamento enzimático ocasiona menos danos à peça e às máquinas, proporciona uma aparência mais uniforme e maciez ao jeans, não gera resíduos, melhora a qualidade das águas residuais devido à ausência de poeira das pedras e aumenta a produtividade, pois o espaço ocupado pelas pedras pode ser ocupado por mais peças de jeans (AGRAWAL, 2017; ARAUJO *et al.*, 2008; MIETTINEN-OINONEN, 2007; NIERSTRASZ; WARMOESKERKEN, 2003).

¹ O corante índigo Blue pertence à classe de corantes à cuba, que são insolúveis em água. Durante o processo de tingimento, esses corantes são reduzidos à forma solúvel (forma leuco) que possui afinidade com a celulose. Posteriormente, é realizada oxidação com o oxigênio do ar ou por adição de agentes oxidantes para que sua forma insolúvel seja restabelecida, proporcionando boa permanência em condições úmidas.

Figura 9 – Biopolimento com celulase livre. (a) Tecido de algodão e a fibra contendo as microfibrilas salientes. (b) Processo de biopolimento. (c) Tecido de algodão e a fibra após o biopolimento.

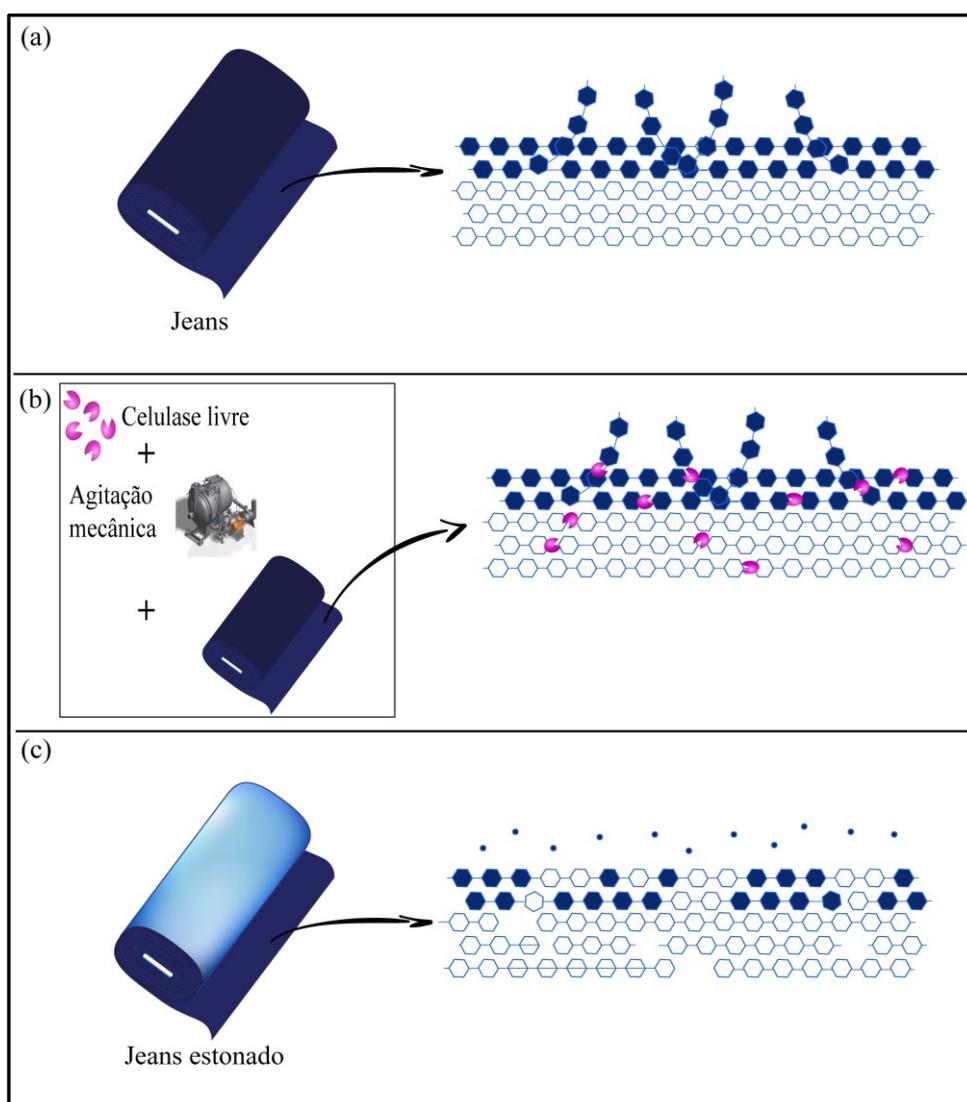


Fonte: Autora (2020).

Para ambos os processos, a agitação mecânica é um parâmetro importante para obter os efeitos desejados. Além de agir na remoção das fibras enfraquecidas pela enzima, a agitação também auxilia na adsorção e dessorção da enzima no substrato, aumentando a taxa de reação (CAVACO-PAULO; ALMEIDA, 1996). No entanto, é necessário evitar uma agitação intensa para que não ocorra danos ao substrato e para que não ocorra dissociação da enzima (CAVACO-PAULO; ALMEIDA, 1994; CHOUDHURY, 2017). O nível de agitação tolerável é dependente da característica de cada tecido. Outros parâmetros também devem ser considerados nesses processos, sendo eles: o pH, a dosagem de enzima, composição do preparado enzimático, temperatura, tempo, relação de banho, tipo de fibra tecido e fibra,

presença e concentração de produtos químicos auxiliares. Ao final de cada processo é necessário realizar a desativação da enzima, seja por elevação do pH ou temperatura, para evitar que esta continue atuando e cause efeitos indesejáveis ao substrato têxtil (CAVACO-PAULO; ALMEIDA, 1994; GALANTE; FORMANTICI, 2003; MIETTINEN-OINONEN, 2007; NIERSTRASZ; WARMOESKERKEN, 2003; SCHINDLER, WOLFGANG D; HAUSER, PETER J, 2004). Para o biopolimento, a dosagem de enzima recomendada é 0,05 - 6% de enzima por massa de artigo, dependendo do efeito desejado, do processo e da atividade da enzima (MIETTINEN-OINONEN *et al.*, 1999). Para a bioestonagem, a dosagem recomendada de enzima é de 1 a 4% por massa de substrato para que o efeito da estonagem seja alcançado sem afetar a resistência do jeans (ŠIMIĆ *et al.*, 2015).

Figura 10 – Bioestonagem com celulase livre. (a) Jeans e as fibras de celulose antes do processo. (b) Processo de bioestonagem. (c) Jeans e as fibras de celulose após estonagem.



Fonte: Autora (2020).

Apesar dos diversos benefícios oferecidos pela aplicação das celulases, a tecnologia apresenta algumas desvantagens. A principal desvantagem do biopolimento são a perda de resistência e massa excessivas que os tecidos tratados apresentam em comparação ao tecido não tratado. Esses problemas estão relacionados à atuação da enzima no interior da fibra de celulose e uma das alternativas para minimizá-los é restringir a mobilidade da enzima pela imobilização em um suporte sólido. Assim, a atuação ocorre principalmente na superfície das fibras de celulose, preservando a estrutura interna da fibra e, portanto, minimiza a perda de resistência (ŠIMÍČ *et al.*, 2015). A intensidade da redução na mobilidade vai depender da natureza do suporte, turbulência no reator, do tamanho das partículas e da distribuição e concentração da enzima ao redor da partícula. A imobilização também permite que a enzima seja facilmente recuperada e reutilizada, podendo inclusive melhorar seu desempenho em termos de atividade, estabilidade e/ou seletividade (DE CASTRO *et al.*, 2008; LENTING, H. B. M.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G., 2001; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Além da perda de massa e de resistência, a bioestonagem apresenta outro problema importante que é a maior redeposição do corante índigo liberado durante o processo no verso ou na frente do jeans, o que reduz o contraste desejado entre as fibras brancas e tingidas (AGRAWAL, 2017; BHAT, 2000; CAVACO-PAULO *et al.*, 1998; GUSAKOV *et al.*, 2001; PURANEN *et al.*, 2014). Esse fenômeno é conhecido como *backstaining* e é atribuído à interação química entre o corante e as moléculas de enzima e a adsorção da enzima na superfície das fibras celulósicas (CAMPOS *et al.*, 2000; CAVACO-PAULO *et al.*, 1998; GUSAKOV *et al.*, 2001). Assim, a interação celulose-celulase-corante resulta em uma maior redeposição de corante. Embora algumas estratégias como adicionar proteases junto ao processo, seleção de celulases e desenvolvimento de processos em temperaturas mais baixas tenham sido investigadas para tentar minimizar o *backstaining*, ele continua sendo um problema para a indústria (CHOUDHURY, 2017). A imobilização também é uma das alternativas para minimizar esse problema, pois evita que a enzima fique adsorvida ao jeans.

2.6 APLICAÇÃO DE CELULASE IMOBILIZADA EM PROCESSOS DE BIOACABAMENTO

Como discutido anteriormente, a imobilização da celulase é uma das alternativas estudadas para contornar os problemas causados pelo uso da celulase livre nos processos de

bioacabamento têxtil. A seguir serão apresentados os trabalhos encontrados na literatura até o momento e os seus principais resultados.

KUMAR *et al.* (2008) mostraram que a celulase imobilizada em resina epóxi por adsorção alcançou os mesmos resultados de remoção de *pilling* que a enzima livre nos três primeiros ciclos de biopolimento. Nos ciclos seguintes, o seu efeito diminuiu lentamente, o que pode estar associado à lixiviação da enzima do suporte. Esse foi o único trabalho encontrado na literatura em que o potencial de reuso em biopolimento foi avaliado, porém esse é um parâmetro muito importante porque pode compensar o aumento no custo enzima associado à imobilização.

Em dois trabalhos, YU, YUANYUAN *et al.* (2013) e YU *et al.* (2014b) utilizaram um copolímero comercial composto por ácido metacrílico e metacrilato de metila, denominado Eudragit S-100, e o agente de acoplamento carbodiimida para imobilizar a celulase por ligação covalente. Esse copolímero é solúvel acima de pH 4,8 e abaixo de pH 4,6 ele precipita. Assim, ao utilizar tais materiais é possível utilizar a enzima em sua forma solúvel durante as reações e depois é possível recuperá-las alterando o pH para um valor que torna o copolímero insolúvel. Após estudar os aspectos relacionados à imobilização, os pesquisadores avaliaram os efeitos da enzima livre e imobilizada no biopolimento de fios e tecidos de algodão. As amostras com a celulase imobilizada apresentaram menor perda de massa e maior resistência à tração, além da maior maciez em comparação a amostra tratada com celulase livre. Além disso, as amostras de tecido tratadas com a enzima imobilizada apresentaram maior maciez. O mesmo grupo de pesquisadores imobilizaram a celulase em EudragitS-100 e Eudragit L-100 por ligação iônica e também observaram menor perda de massa e maior resistência à tração dos fios e tecidos de algodão tratados com a celulase imobilizada (YU *et al.*, 2014a). Apesar dos bons resultados apresentados, não é possível concluir se houve remoção adequada das microfibrilas salientes na superfície dos substratos, uma vez que nenhum teste de *pilling* foi realizado.

Em um trabalho desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, a imobilização da celulase em nanopartículas magnéticas encapsuladas em poli(metacrilato) de metila foi estudada e posteriormente seu potencial de aplicação biopolimento de fio de algodão foi avaliado (LIMA, 2016). A amostra tratada com a enzima imobilizada apresentou menor perda de resistência à tração quando tratado com a celulase imobilizada, porém a amostra apresentou uma coloração alaranjada proveniente da retenção das nanopartículas no interior das fibras celulósicas.

SANKARRAJ e NALLATHAMBI (2018) também mostraram que as amostras de tecido de algodão tratadas com celulase imobilizada em esferas de alginato de cálcio revestido

com Concanavalina A (proteína lecitina) apresentaram menor perda de massa e menor redução de resistência à tração e ainda alcançaram melhor índice de brancura em relação às amostras tratadas com a enzima livre. Porém, nenhum teste de teste de *pilling* foi realizado.

Visando a aplicação em bioestonagem, uma celulase comercial foi imobilizada em pedra-pomes quimicamente modificada com APTES (PAZARLIOĞLU *et al.*, 2005). As amostras tratadas com celulase imobilizada se mostraram mais claras que as amostras tratadas com celulase livre e os efeitos de desbotamento foram mantidos durante reuso. Em contrapartida, as amostras tratadas com celulase imobilizada apresentaram maior *backstaining* que a livre no primeiro ciclo. Nos ciclos seguintes, os resultados de *backstaining* foram próximos ao da enzima livre. Os autores relacionaram esse resultado à lixiviação das enzimas que estavam fracamente adsorvidas ao suporte nos dois primeiros ciclos. A perda de massa e de resistência a tração não foram avaliados. Assim, não apresentou os resultados esperados da imobilização no processo.

A aplicação de celulase imobilizada em Eudragit S-100 também foi explorada em processos de bioestonagem (YU, Y. *et al.*, 2013). A celulase imobilizada obteve efeitos de desbotamento semelhantes aos obtidos pela celulase livre, porém seu uso resultou em uma leve diminuição do *backstaining*, menor perda de massa e maior resistência a tração.

Como pode ser visto, os trabalhos relacionados à aplicação de celulase imobilizada nos processos de bioacabamento da indústria têxtil são escassos. De acordo com SOARES *et al.* (2011), essa escassez provavelmente está relacionada às significativas limitações difusionais relacionadas ao substrato. A maioria dos trabalhos encontrados até o momento empregaram apenas suportes sintéticos e/ou de natureza orgânica. No entanto, esses suportes geralmente possuem alto custo, são passíveis de contaminação microbiana e não são resistentes mecanicamente para condições de elevada agitação, o que os tornam inadequados para aplicação industrial. Os efeitos esperados da imobilização não foram comprovados nos trabalhos de biopolimento, uma vez que a maioria dos trabalhos apresentam dados de resistência à tração e perda de massa, mas não apresentaram dados de grau de *pilling*. Nos trabalhos de bioestonagem, não houve redução significativa do *backstaining*, principal problema do processo.

2.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Diante do que foi exposto ao longo deste capítulo e a partir do levantamento dos trabalhos sobre o uso de celulase imobilizada nos processos de biopolimento e bioestonagem, nota-se o potencial dessa tecnologia para contornar os problemas relacionados a tais processos. No entanto, a quantidade de estudos relacionados a aplicação de celulase imobilizada nos processos de biopolimento e bioestonagem ainda é pequena e mais estudos são necessários para avaliar o potencial da tecnologia. A capacidade de reúso, principal benefício associado à imobilização de enzimas e que está diretamente relacionado ao custo-benefício da técnica, tem sido pouco explorada. Até o momento, a maioria dos suportes utilizados para imobilizar a celulase visando a aplicação em bioacabamento são sintéticos e/ou de natureza orgânica. Em geral, esses suportes apresentam elevado custo e apresentam características, como baixa resistência mecânica, facilidade de contaminação microbiana e elevado custo, que não são adequadas para aplicação industrial e podem tornar a imobilização uma alternativa inviável. Diante da necessidade de encontrar suportes com características mais atraentes, o presente trabalho propõe o uso do caulim como suporte para imobilização da celulase. Além de apresentar características ideais para imobilização da celulase, o caulim é um material natural, facilmente encontrado e de baixo custo. Embora ele tenha sido muito pouco explorado na imobilização de celulases, bons resultados têm sido relatados para imobilização de outras enzimas. Neste contexto, na primeira parte do presente trabalho será abordada a imobilização da celulase em caulim; na segunda parte será abordada a aplicação da celulase imobilizada no biopolimento de malha; e na terceira parte será abordada a aplicação em bioestonagem de jeans.

3 IMOBILIZAÇÃO DA CELULASE EM CAULIM

Neste capítulo serão descritos os materiais, procedimentos e resultados obtidos referentes ao estudo de imobilização da celulase em caulim. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os resultados obtidos com a imobilização da celulase em caulim por ligação covalente foram publicados na revista *Bioprocess and Biosystems Engineering*, volume 42, edição 7, páginas 1165-1173, 2019 (LIMA *et al.*, 2019).

3.1 MATERIAIS

O preparado enzimático utilizado neste trabalho, BiokeyAKM (rico em endoglucanases), foi gentilmente cedido pela empresa Akmey Biotecnologia Têxtil (Indaial, SC, Brasil). Com o intuito de remover estabilizantes e possíveis impurezas que pudessem afetar o processo de imobilização, o preparado foi dialisado e liofilizado. A diálise foi realizada em tampão fosfato 0,02 M (pH 6,0) por 7 dias à temperatura ambiente, sendo a solução tampão trocada a cada 24 horas. Após a liofilização, a enzima foi armazenada em frasco hermeticamente fechado a 4 °C.

O caulim (Saca B) foi cedido pela empresa Imerys (Pará, Brasil). O 3-aminopropiltrióxissilano (APTES) e carboximetilcelulose de sódio (90.000 Daltons) (CMC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O glutaraldeído (GA, solução a 25% (m/v) em água), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, PA), ácido cítrico monohidratado (PA), fosfato de potássio monobásico anidro (PA), fosfato de sódio monobásico anidro (PA), o fosfato de sódio dibásico anidro (PA) e a glicose D (+) anidra (PA) foram adquiridos da Vetec. O hidróxido de sódio (NaOH, P.A) foi obtido da Lafan Ltda. O tartarato de potássio e sódio (P.A) foi adquirido da Dinâmica.

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para avaliar o desempenho de um processo enzimático, o principal parâmetro utilizado é a atividade enzimática, pois não está relacionada com quantidade total de enzima e sim com a quantidade de enzima ativa. A quantificação da atividade da celulase livre e imobilizada foi

realizada utilizando a carboximetilcelulose (CMC) como substrato e foi relacionada com a quantidade de açúcares redutores liberados.

A quantificação dos açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS, descrito por MILLER (1959). O método se baseia na oxidação do grupo aldeído de açúcares redutores a um grupo carboxílico, em condição alcalina a quente. Simultaneamente, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que apresenta coloração amarela, é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, de coloração laranja avermelhado, o qual pode ser detectado a 540 nm (MILLER, 1959).

Nos ensaios enzimáticos, 900 μL de solução 4% (m/v) de CMC, preparada em tampão citrato-fosfato (0,15 M, pH 5,0), e 100 μL da amostra contendo enzima (livre ou imobilizada) foram incubados a 55 ± 1 °C. Ao completar 30 minutos, foi adicionado 1,5 mL de solução de DNS para parar a reação. A solução resultante foi aquecida em banho de água fervente por 5 minutos e resfriada em banho de gelo. As amostras foram diluídas com água destilada e centrifugadas (3 minutos e 3130 g). Por fim, a absorbância das amostras foi medida no comprimento de onda de 540 nm e a concentração de açúcares redutores foi determinada por meio de uma curva de calibração, em que a glicose foi utilizada como padrão. A atividade foi calculada utilizando a Equação 1.

A atividade enzimática foi expressa em Unidades Internacionais. Uma Unidade de Atividade (U) representa a quantidade de açúcares redutores (produto) produzidos em μmol por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$AE = \frac{M_{\text{glicose}}}{t \times V_A} \quad \text{Equação 1}$$

Em que,

AE é atividade enzimática (U/mL);

M_{glicose} é a quantidade de glicose liberada (μmols);

t é o tempo reacional (min);

V_A é o volume de amostra contendo enzima (mL).

Para evitar interferências, em todos os ensaios foram preparadas amostras controle (branco), que continham os mesmos componentes do ensaio de hidrólise. No entanto, o DNS foi adicionado antes da adição de enzima para não haver reação de hidrólise.

3.3 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

Foram estudados dois métodos de imobilização: adsorção e ligação covalente. No método de adsorção foi utilizado o caulim natural (C) e no método de ligação covalente foi utilizado o caulim funcionalizado com APTES e ativado com glutaraldeído (C_{FA}).

3.3.1 Funcionalização do caulim com APTES

A funcionalização do caulim foi baseada no método empregado por BATISTELLA *et al.* (2015), com algumas modificações. Inicialmente, 50 g de caulim foram dispersos em 500 mL de uma mistura etanol/água (96/4). Em seguida, foi adicionado o APTES com uma concentração em massa de 10% em relação ao caulim. A mistura foi mantida sob agitação por 12 horas a 82 °C. Ao final, o solvente foi evaporado, a amostra foi macerada com auxílio de pistilo, peneirada (peneira com abertura de 38 µm) e armazenada em um frasco fechado.

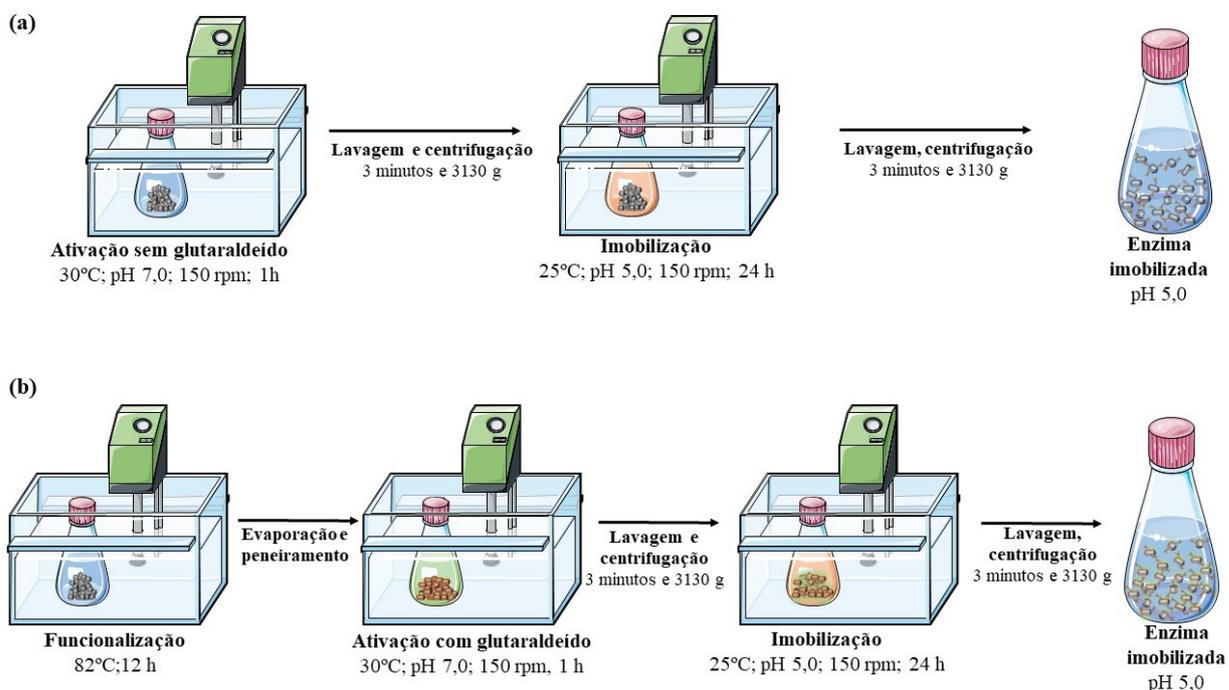
3.3.2 Ativação do caulim com glutaraldeído

Para ativar o caulim natural e o caulim funcionalizado com grupamentos aldeídos, 10% (m/v) da argila foi mantida em contato com uma solução de 2% (v/v) de glutaraldeído (GA), pH 7,0, por 1 hora e 30 °C. Em seguida, as partículas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de GA. As amostras de caulim natural (C) também foram mantidas nessas condições, mas sem a adição de GA.

3.3.3 Imobilização da celulase

Após a etapa de ativação, todas as amostras foram submetidas diretamente ao processo de imobilização. Para realizar a imobilização, a solução de enzima (100 mg/mL) em tampão fosfato (0,05 M) pH 7,0 foi adicionada às amostras de caulim. A suspensão resultante foi incubada a 25 °C e 150 rpm por 24 horas. Ao final, a argila foi recuperada por meio de centrifugação (3 minutos e 3130 g), lavada exaustivamente para remoção de enzima residual, ressuspensa em tampão e armazenada a 4 °C. O processo de imobilização utilizando os métodos de adsorção e ligação covalente está representado na Figura 11.

Figura 11 – Esquema de imobilização da celulase em caulim por (a) adsorção, (b) ligação covalente.



Fonte: Autora (2020).

A eficiência de imobilização foi determinada pela porcentagem de atividade retida no suporte em relação à atividade oferecida no início da imobilização (Equação 2). As atividades foram quantificadas conforme o procedimento descrito no item 3.2.

$$Y = \frac{AE_R}{AE_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que,

Y corresponde à eficiência de imobilização (%);

AE_R corresponde à atividade enzimática retida no suporte (U/mL);

AE_0 corresponde à atividade enzimática antes do processo de imobilização (U/mL).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO CAULIM CONTENDO CELULASE IMOBILIZADA

Os difratogramas das amostras foram obtidos pela técnica de difração de raios X (DRX) utilizando um difratômetro equipado com detector Scintillation counter ($K\beta$ filter), utilizando radiação $CuK\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), potência de 40 kV. As distâncias basais foram

calculadas utilizando-se a Lei de Bragg (Equação 3). A interpretação qualitativa dos difratogramas foi baseada nos padrões contidos na Base Internacional de Dados de Estruturas Cristalinas (ICSD) de acordo com o PDF 01-089-6538. As análises foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (Linden) da UFSC.

$$d_{001} = \lambda / (2 \sin \theta) \quad \text{Equação 3}$$

Em que,

d_{001} a distância entre as camadas ou planos de átomos;

n é um número inteiro e positivo (geralmente igual a 1);

λ é o comprimento de onda do raio X;

θ é o ângulo entre o raio incidente e os planos refletidos (ângulo de difração).

O tamanho médio das partículas de caulim foi determinado pela técnica de difração de laser utilizando o equipamento Mastersizer 3000E (Malvern) alocado no Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos (VITROCER) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina.

A morfologia das partículas e a composição química elementar foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada com Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X (EDX) utilizando o equipamento JEOL JSM-6390LV localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. A técnica de EDX fornece uma análise qualitativa de como os elementos químicos estão distribuídos na superfície do material analisado. Para realizar as análises, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro.

3.5 PERFIS DE ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

3.5.1 Determinação da faixa de pH ótimo

A faixa de pH ótimo da enzima livre e imobilizada foi determinada por meio de ensaios de atividade enzimática (item 3.2) em diferentes valores de pH (4,0, 5,0, 6,0 e 7,0), sob temperatura, concentração de substrato e molaridade do tampão constantes, 55 °C, 4% (m/v) e

0,15 M, respectivamente. Para os valores de pH de 6 a 7 foi utilizado o tampão fosfato e para os valores de 4 e 5 foi utilizado o tampão citrato-fosfato.

3.5.2 Determinação da faixa de temperatura ótima

A faixa de temperatura ótima da enzima livre e imobilizada foi determinada pela medida da atividade enzimática (item 3.2) em diferentes temperaturas (35, 45, 55, 65 e 75 °C), mantendo o pH em 5,0 e concentração do substrato de 4% (m/v).

3.5.3 Estabilidade térmica e ao armazenamento

Para comparar a estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foram realizados ensaios de atividade enzimática (item 3.2) em diferentes tempos de incubação (30 a 300 minutos). A temperatura e o pH foram definidos a partir dos itens 3.5.1 e 3.5.2 e a concentração de substrato foi de 4% (m/v).

A enzima livre e imobilizada foi armazenada em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 a 4 °C e sua atividade foi monitorada por 30 dias.

3.5.4 Capacidade de reuso

A capacidade de reuso da celulase imobilizada foi avaliada pela medida da atividade enzimática (item 3.2) em ciclos sucessivos. Ao final de cada ciclo, a enzima foi recuperada por centrifugação (5 minutos e 5290 g), lavada com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 e dispersa em uma solução de CMC fresca, até completar 8 ciclos.

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a imobilização da celulase em caulim. Inicialmente, serão apresentados os resultados de imobilização da celulase em caulim, em seguida, serão apresentadas a caracterização do caulim contendo a enzima imobilizada e os perfis de atividade da enzima imobilizada.

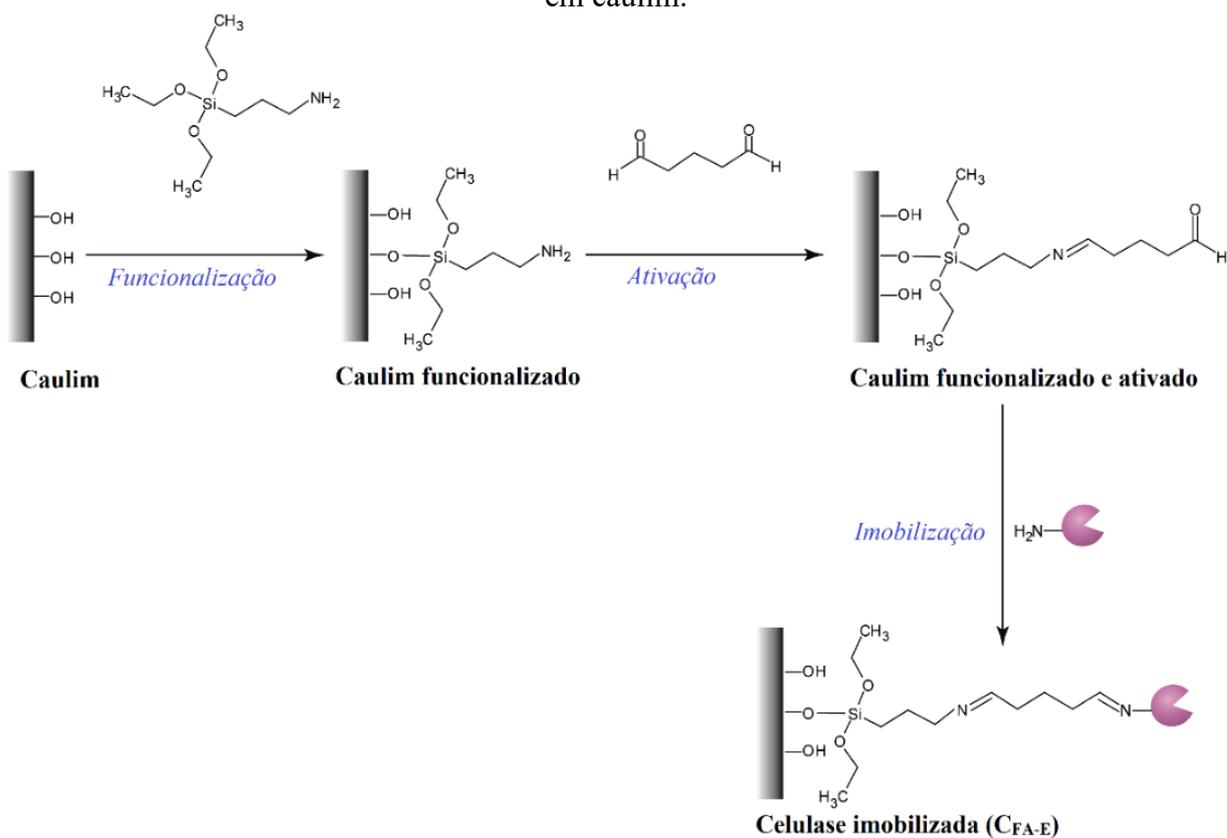
3.6.1 IMOBILIZAÇÃO DA CELULASE EM CAULIM

A imobilização da celulase foi realizada utilizando dois métodos: adsorção e ligação covalente. No método de adsorção foi utilizado o caulim sem nenhum tipo de tratamento (C), sendo a imobilização da enzima atribuída principalmente à interações hidrofóbicas com as ligações siloxano das folhas tetraédricas e ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas presentes nas bordas quebradas das folhas tetraédricas e octaédricas (AN *et al.*, 2015). No método de ligação covalente foi utilizado o caulim funcionalizado com APTES e ativado com GA (C_{FA}). As etapas de funcionalização, ativação e imobilização estão esquematicamente apresentadas na Figura 12. A reação de funcionalização consiste na hidrólise de grupos silanos do APTES seguida pela condensação desses grupos com os grupos hidroxila da superfície do caulim (KAHRAMAN *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2014). O resultado é o enxerto do silano na superfície e a presença de grupos amina funcionais na superfície do caulim. Posteriormente, os grupos amino foram ativados com GA para torná-los reativos para se ligarem à enzima. O GA é um dialdeído que reage rapidamente com grupos amina em torno do pH neutro (MIGNEAULT *et al.*, 2004). Na reação de ativação, uma das extremidades do GA reage com o grupo amina do silano e forma uma ligação imina, ou também conhecido como base de Schiff. Em seguida, foi realizada a imobilização da enzima através da reação entre seus grupos amina (grupo amino terminal e grupo amino da cadeia lateral da lisina) e a extremidade livre do GA (GUNDA *et al.*, 2014). Em pH 7, a imobilização tende a ocorrer através do grupo amino terminal ($pK_a \approx 7-8$) porque é mais reativo que os grupos amino da cadeia lateral da lisina ($pK_a \approx 10$) (BARBOSA *et al.*, 2013; HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

As eficiências de imobilização por ligação covalente e por adsorção foram de $65 \pm 3,5$ e $60 \pm 2,5\%$, respectivamente. Embora o método de imobilização por ligação covalente tenha apresentado resultado superior ($p \leq 0,05$), a diferença obtida pode ser pequena para justificar a sua escolha, uma vez que ele demanda tratamentos na superfície do caulim para que seja estabelecida a ligação covalente entre enzima e suporte, o que torna a técnica mais onerosa. Por outro lado, apesar de o método por adsorção ser mais simples, mais rápido e de menor custo, ele pode não ser recomendado para imobilização de endoglucanases devido a tendência destas enzimas se soltarem do suporte durante a hidrólise devido à sua elevada afinidade pelo substrato (LINDER *et al.*, 1995). Assim, outros parâmetros precisam ser avaliados para selecionar o melhor método.

LIMA *et al.* (2017) reportaram uma eficiência de imobilização de 49% para celulase imobilizada em nanopartículas magnéticas encapsuladas em poli(metacrilato de metila). Utilizando um copolímero comercial de metacrilato de metila e ácido metacrílico (Eudragit S-100) como suporte, YU, Y. *et al.* (2013) e YU *et al.* (2015) relataram eficiência de imobilização de aproximadamente 80% empregando o método de ligação covalente e adsorção, respectivamente. Assim, nota-se que os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados na literatura, porém o caulim, suporte utilizado no presente trabalho, possui características mais atrativas e com maior potencial para aplicações industriais. O caulim é um material encontrado na natureza, de baixo custo e que apresenta estabilidade térmica, resistência mecânica, não é tóxico, entre outras características, que tornam os resultados obtidos relevantes para a imobilização de celulases.

Figura 12 – Etapas envolvidas no processo de imobilização da celulase por ligação covalente em caulim.



Fonte: Autora (2020).

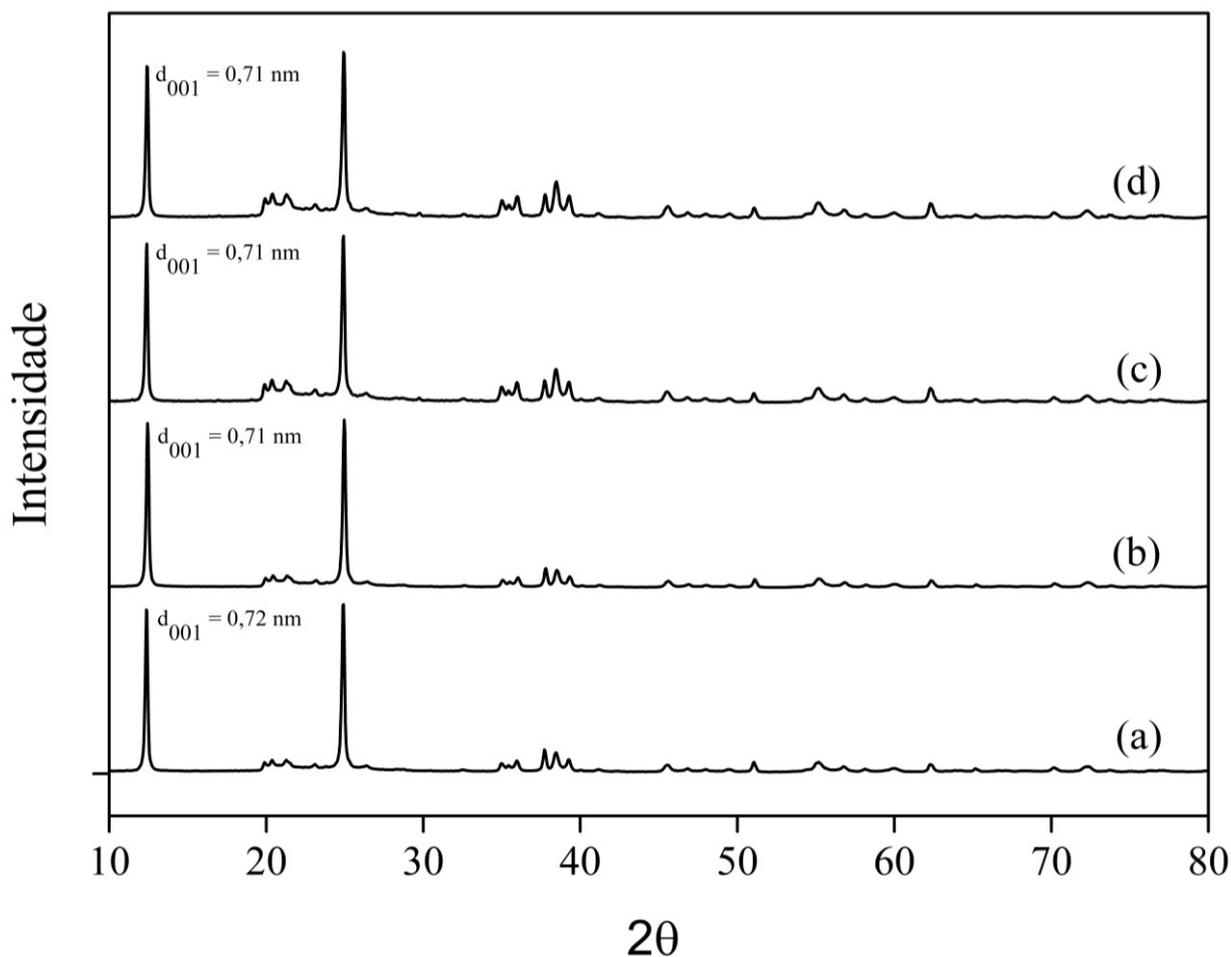
3.6.2 CARACTERIZAÇÃO DO CAULIM CONTENDO CELULASE IMOBILIZADA

Os difratogramas de raios X das amostras de caulim (C), caulim contendo enzima imobilizada por adsorção (C_E) e caulim contendo enzima imobilizada por ligação covalente (C_{FA-E}) estão apresentados na Figura 13. Os picos de maior intensidade em $2\theta = 12,40$ e $24,90^\circ$ podem ser atribuídos à caulinita indicando que este é o principal constituinte do caulim utilizado. A amostra funcionalizada (C_{FA}) e as amostras contendo enzima imobilizada (C_E e C_{FA-E}) não apresentaram alterações nas posições e intensidades das reflexões de Bragg, indicando que a cristalinidade do caulim foi mantida após a ligação da enzima e também após a funcionalização. Os valores de distanciamento basal das amostras C_{FA} , C_E e C_{FA-E} ($d_{001} = 0,71$ nm) foram iguais ao da amostra C ($d_{001} = 0,72$ nm), sugerindo que não houve expansão das lamelas. Assim, é possível dizer que as moléculas de APTES e celulase estão ligadas apenas nas superfícies externas e nas bordas do caulim (BARRAL *et al.*, 2008). Esse resultado era esperado uma vez que o caulim apresenta uma estrutura não expansível devido à sua baixa capacidade de troca iônica e às ligações de hidrogênio entre suas lamelas, fazendo com que apenas moléculas pequenas possam ser intercaladas (AN *et al.*, 2015; BARRAL *et al.*, 2008; FIORITO *et al.*, 2008). Esse resultado é muito importante para esse trabalho porque é fundamental que a celulase esteja localizada na superfície do suporte para conseguir ter contato com o substrato.

Os resultados de distribuição de tamanho de partículas obtida por difração de laser do C, C_{FA} , C_E e C_{FA-E} estão apresentados na Figura 14. Observa-se que todas as amostras mostraram uma ampla distribuição de tamanhos e apresentaram um D_{50}^2 próximo, o que sugere que a funcionalização e a imobilização não influenciaram no tamanho das partículas. Os maiores valores de D_{90} observado nas amostras contendo enzima imobilizada pode estar relacionado à agregação de partículas menores devido às diversas centrifugações realizadas durante a lavagem das partículas após a imobilização.

² Diâmetro de partícula mediano, ou seja, significa que há 50% de partículas maiores que o D_{50} e 50% de partículas menores que o D_{50} .

Figura 13 – Difratogramas de raio-X das amostras (a) caulim, (b) caulim funcionalizado, (c) caulim contendo enzima imobilizada por adsorção e (d) caulim contendo enzima imobilizada por ligação covalente.

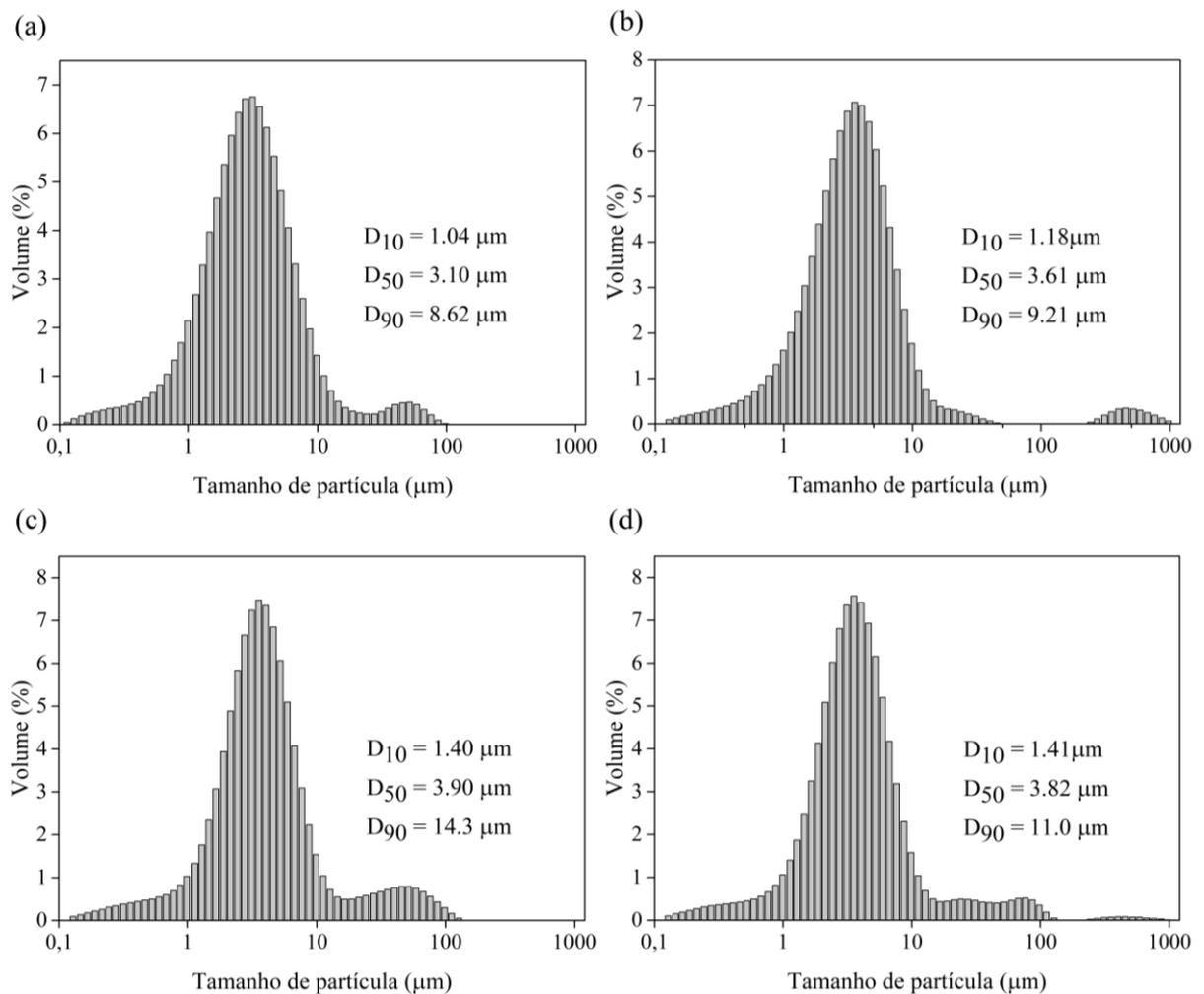


Fonte: Autora (2020).

A Figura 15 apresenta as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras C, C_{FA} , C_E e C_{FA-E} . Observa-se que a amostra C (Figura 15-a) apresenta partículas de diferentes tamanhos em forma de plaquetas com bordas bem definidas, característicos da estrutura da caulinita. De acordo com as análises de EDX, essa amostra apresentou os elementos que compõem o caulim, que são o silício, alumínio e oxigênio, e também apresentou carbono, que pode ser atribuído a impurezas na forma de carbono, como carbonatos. Na amostra funcionalizada (C_{FA}) (Figura 15-b), observa-se a presença de partículas em forma de plaquetas com bordas arredondadas, o que pode ser atribuído a modificação superficial das partículas resultante da funcionalização com APTES. Os resultados de EDX comprovam a presença do APTES, pois foi detectada a presença de nitrogênio e aumento da porcentagem mássica de carbono. Nas amostras contendo enzima (Figura 15-c e d), observa-se

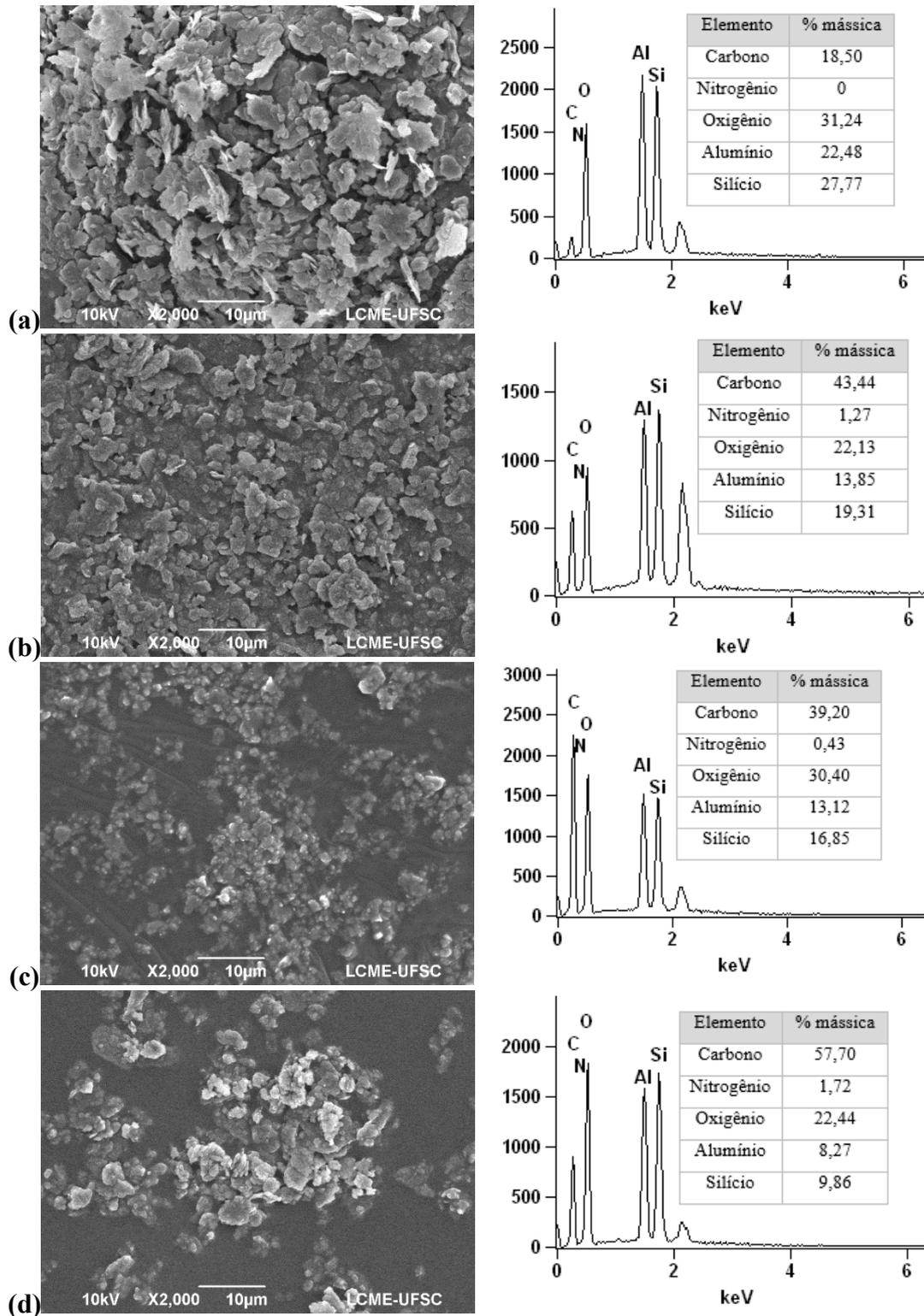
a presença de partículas, mas não é possível observar o formato de plaquetas. As análises de EDX de ambas as amostras também mostraram aumento da porcentagem mássica de carbono, além da presença de nitrogênio. No entanto, as porcentagens mássicas de carbono e nitrogênio são maiores na amostra C_{FA-E} . Esses resultados são coerentes, pois na amostra C_E o aumento da porcentagem de carbono e a presença de nitrogênio pode ser associado à presença da enzima. Já na amostra C_{FA-E} os resultados podem ser relacionados à presença do APTES e da enzima. Logo, com os resultados de MEV e EDX é possível mostrar a presença da enzima nas partículas de caulim.

Figura 14 – Distribuição de tamanho de partículas das amostras de (a) caulim, (b) caulim funcionalizado, (c) caulim contendo enzima imobilizada por adsorção e (d) caulim contendo enzima imobilizada por ligação covalente.



Fonte: Autora (2020).

Figura 15 – Imagens de MEV das amostras de (a) C, (b) C_{FA}, (c) C_E e (d) C_{FA-E}.



Fonte: Autora (2020).

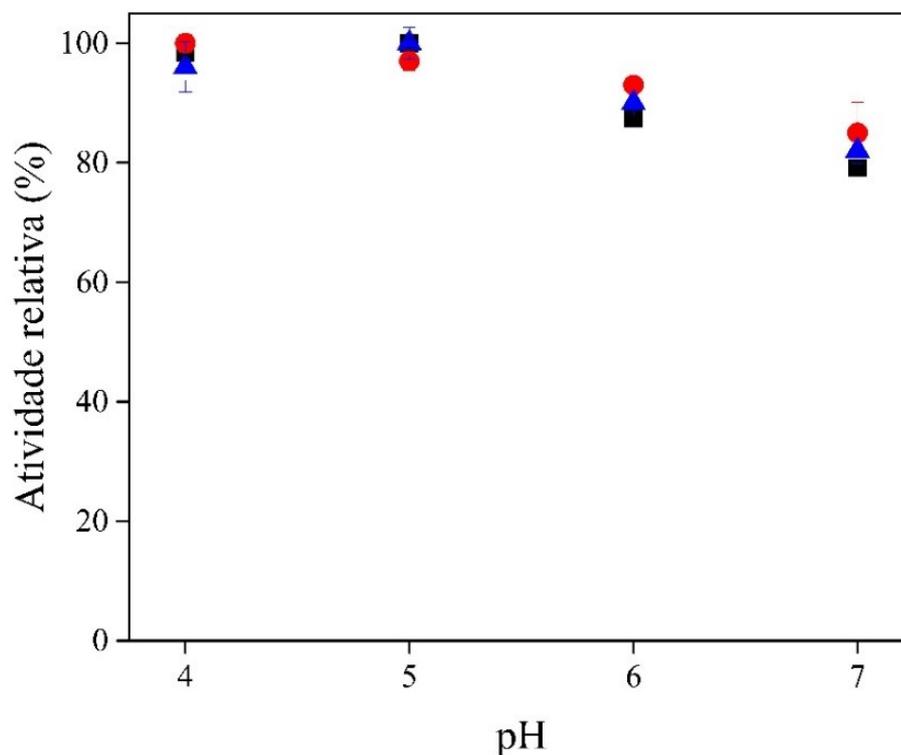
3.6.3 PERFIS DE ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

A imobilização pode causar algumas alterações nas propriedades da enzima afetando, por exemplo, a atividade catalítica e a estabilidade (BRENA *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 1989). Essas alterações podem ser resultado da modificação da estrutura terciária da enzima ou pelo fato da interação entre a enzima imobilizada e o substrato ocorrer em um microambiente diferente ao da enzima em solução (BRENA *et al.*, 2013; CLARK, 1994). Como resultado, a enzima imobilizada pode adquirir novas propriedades cinéticas e apresentar comportamento diferente sob determinadas condições de pH e temperatura. Assim, para cada novo protocolo de imobilização, a enzima imobilizada deve ser cuidadosamente caracterizada e testada

3.6.3.1 *Influência do pH na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada*

O efeito do pH na atividade das celulasas livre e imobilizadas por adsorção e ligação covalente é mostrado na Figura 16. Observa-se que as enzimas apresentaram comportamento semelhante e uma boa estabilidade na faixa de pH estudado. Os valores de atividade foram máximos e estatisticamente iguais ($p = 0,05$) nos valores de pH 4 e 5 para todas as enzimas. Esses resultados sugerem que as propriedades catalíticas da enzima não foram alteradas após a imobilização, o que é consistente com outros trabalhos (HUNG *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2014a; ZANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; ZHOU, 2010).

Figura 16 – Influência do pH na atividade da enzima livre (quadrado preto), imobilizada por adsorção (triângulo azul) e imobilizada por ligação covalente (círculo vermelho) a 55 °C por 30 min.

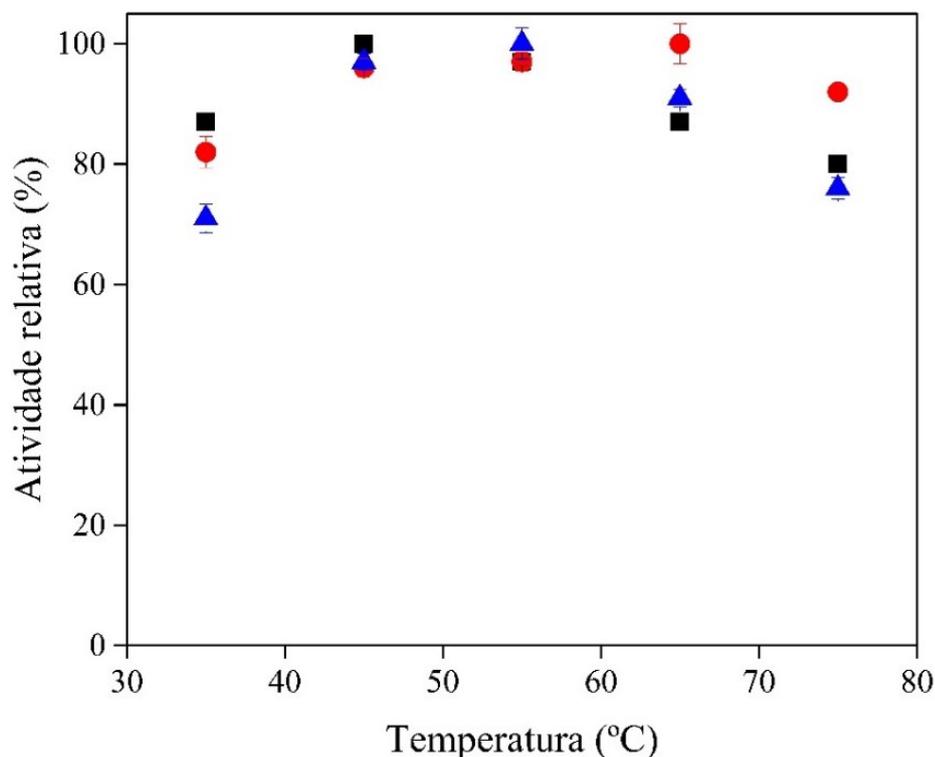


Fonte: Autora (2020).

3.6.3.2 Influência da temperatura na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada

Em geral, o efeito da temperatura na taxa de reações catalisadas por enzimas não fornece muita informação sobre o mecanismo de reação. No entanto, estes efeitos podem ser importantes indicadores de alterações estruturais na molécula da enzima após a imobilização. Assim, o efeito da temperatura nas atividades das celulases livre e imobilizadas (C_E e C_{FA-E}) foi avaliado e é mostrado na Figura 17A. A média das atividades da enzima livre e imobilizada por adsorção nos pontos de 45 e 55 °C foram iguais ($p \leq 0,05$) e nesses pontos a atividade foi máxima. Já para a enzima imobilizada por ligação covalente, não houve diferença significativa entre as médias das atividades obtidas entre 45 e 75 °C, sendo essa a faixa de temperatura ótima. A ampliação da faixa de temperatura ótima de enzimas imobilizadas por ligação covalente é frequentemente observada e pode ser atribuída à forte ligação entre enzima e suporte, que afetam as forças intramoleculares responsáveis pela manutenção da conformação da molécula proteica.

Figura 17 – Influência da temperatura na atividade da enzima livre (quadrado preto), imobilizada por adsorção (triângulo azul) e imobilizada por ligação covalente (círculo vermelho) em pH 5 por 30 min.



Fonte: Autora (2020).

3.6.3.3 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada

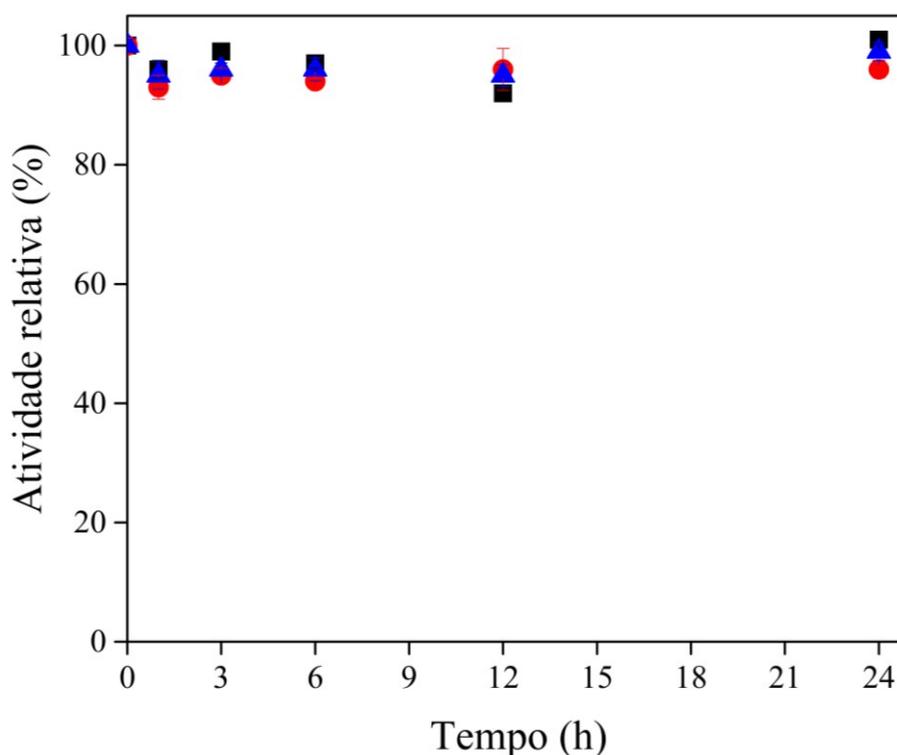
Uma das principais vantagens proporcionadas pela imobilização é a possibilidade de reutilizar a enzima. No entanto, a enzima precisa ser muito estável ou tornar-se altamente estabilizada durante o processo de imobilização para alcançar bons resultados de reuso e tornar a imobilização tecnicamente viável (MATEO *et al.*, 2007). A estabilidade térmica está relacionada com a capacidade da enzima manter sua conformação nativa em temperaturas relativamente altas. Para avaliar a estabilidade térmica, a celulase livre e imobilizada (C_E e C_{FA-E}) foram mantidas a 55 °C em tampão pH 5,0 e em intervalos de tempo pré-definidos uma alíquota era coletada para quantificar a atividade. De acordo com a Figura 18, tanto a celulase livre quanto as celulases imobilizadas apresentaram boa estabilidade térmica, mantendo a atividade por 24 horas. Resultado semelhante foi relatado por SIMON (2015) ao incubar a celulase na presença de água e bicarbonato de sódio por 3 h a 70 °C. A elevada estabilidade térmica é uma característica importante para que não ocorra redução de atividade catalítica

devido à desnaturação da enzima durante o reuso. Apesar da celulase imobilizada por adsorção não apresentar ampliação da faixa de temperatura ótima, ela se mostrou termicamente estável como a celulase imobilizada por ligação covalente na temperatura ótima.

Outro aspecto importante a ser avaliado ao imobilizar uma enzima é a sua estabilidade ao armazenamento. Esse parâmetro está relacionado à capacidade da enzima manter sua atividade durante o período entre produção e uso (Ó'FÁGÁIN, 2003). A desativação lenta da enzima durante esse período pode afetar a reprodutibilidade dos processos. Durante o período de 30 dias, a atividade das enzimas livre e imobilizada (C_E e C_{FA-E}) foi monitorada e a atividade catalítica de todas as enzimas foi mantida. ZHANG *et al.* (2016) obtiveram resultados semelhantes para a celulase imobilizada em sílica gel modificada por APTES e ativada com GA. A enzima imobilizada manteve 92,4% de sua atividade após 38 dias armazenada a 4 °C.

Os resultados obtidos de estabilidade térmica e ao armazenamento sugerem que o método e o suporte empregados para imobilizar a celulase não afetaram suas propriedades catalíticas e são promissores do ponto de vista industrial.

Figura 18 – Estabilidade térmica da enzima livre (quadrado preto), imobilizada por adsorção (triângulo azul) e imobilizada por ligação covalente (círculo vermelho) a 55 °C e pH 5,0.



Fonte: Autora (2020).

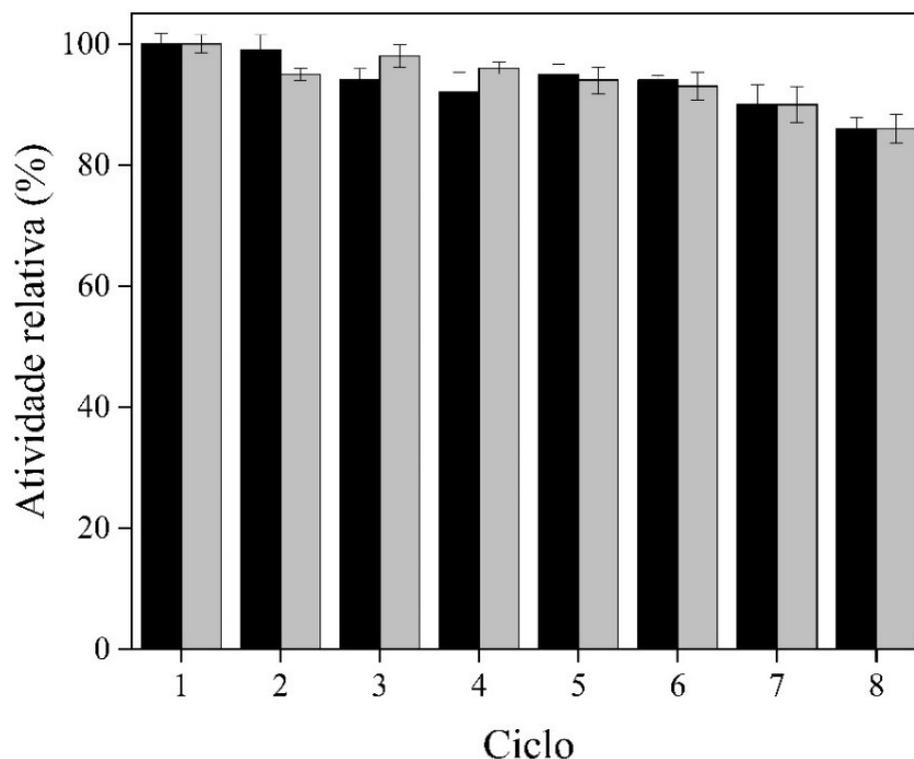
3.6.3.4 Capacidade de reuso

Enzimas imobilizadas apresentam um custo adicional em relação à sua forma livre devido aos custos do suporte e processo de imobilização. Assim, a enzima imobilizada deve apresentar elevada capacidade de reuso para que a redução no consumo de enzima compense os custos da imobilização e o custo final do processo seja equivalente ou inferior ao da enzima livre.

A capacidade de reuso da celulase imobilizada por adsorção e por ligação covalente foi avaliada realizando ciclos sucessivos de hidrólise. Como mostra a Figura 19, ambas as enzimas imobilizadas apresentaram cerca de 86% de sua atividade inicial após 8 ciclos de uso, o que representa um excelente desempenho. Um dos fatores que pode ter contribuído para esse resultado é a elevada estabilidade térmica apresentada pela enzima, como discutido no item 4.3.3. De acordo com a literatura, as técnicas de ligação covalente são mais adequadas para a imobilização de endoglucanases, pois estas podem facilmente se desprender do suporte devido à sua elevada afinidade pelo substrato (LINDER *et al.*, 1995). No entanto, no presente trabalho, as celulases imobilizadas apresentaram resultados de reuso semelhantes, o que permite dizer que para as condições estudadas a enzima imobilizada por adsorção foi tão estável quanto a enzima imobilizada por ligação covalente.

Visando aplicação em bioacabamento, YU, YUANYUAN *et al.* (2013) mostraram que a celulase imobilizada em Eudragit S-100 reteve apenas 52% de sua atividade inicial após cinco ciclos. Em um trabalho posterior, YU *et al.* (2014a) imobilizaram a celulase em Eudragit S-100 e Eudragit L-100. Apesar de ter obtido maior retenção de atividade após a imobilização, menos de 40% da atividade inicial foi mantida após cinco ciclos de uso. Os resultados obtidos no presente trabalho também são superiores aos obtidos em outros trabalhos que empregaram as mesmas condições de reuso (ABRAHAM *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2017; MISHRA; SARDAR, 2015; QI *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2016). Assim, observa-se que além de apresentar características importantes para imobilização de enzimas, o uso do caulim na imobilização de endoglucanases proporcionou resultados promissores de reuso.

Figura 19 – Atividade enzimática da enzima imobilizada por adsorção (cinza) e imobilizada por ligação covalente (preto) após ciclos sucessivos de 30 min, 55 °C, pH 5,0 e concentração de substrato de 4% (m/v).



Fonte: Autora (2020).

3.7 CONCLUSÃO

A imobilização tem sido a principal alternativa estudada para melhorar a estabilidade de enzimas e diminuir os seus custos. Para os processos de bioacabamento, o principal objetivo da imobilização é obter produtos de melhor qualidade. A maioria dos suportes utilizados na imobilização de celulasas geralmente são sintéticos e/ou de natureza sintética. Por ser um material natural, facilmente disponível na natureza e de baixo custo, neste trabalho foi proposto o uso do caulim como suporte para imobilização da endoglucanase. Foram obtidos eficiência de imobilização de $65 \pm 3,5$ e $60 \pm 2,5\%$ empregando o método de ligação covalente e por adsorção, respectivamente. Através da análise de difração de raios X foi comprovada a imobilização da celulase na superfície das partículas caulim. As propriedades catalíticas das enzimas imobilizadas em relação à variação do pH não foram alteradas após a imobilização. Apesar de a celulase imobilizada por ligação covalente apresentar ampliação da faixa de temperatura ótima, a celulase imobilizada por adsorção mostrou ser tão estável quanto ela na temperatura de 55 °C (temperatura ótima para as duas enzimas). Durante os ensaios de reúso,

as celulases imobilizadas mantiveram cerca de 86% de sua atividade inicial após oito ciclos de uso. Como não foram observadas diferenças consideráveis nos resultados obtidos pela endoglucanase imobilizada pelos dois métodos, optou-se por estudar os efeitos de ambas na etapa seguinte.

4 APLICAÇÃO DE CELULASE IMOBILIZADA EM BIOPOLIMENTO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos após a aplicação da celulase livre e imobilizada no biopolimento de malhas de algodão. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra utilizada neste trabalho foi uma malha crua (150 g/cm^2) fabricada com fio *open-end* 100% algodão. Antes de realizar os experimentos, a malha foi pré-alvejada, de acordo com a norma ABNT NBR 13218-1994, utilizando uma solução contendo 5 g/L de silicato de sódio, 5 g/L de sulfato de magnésio, 2% (m/v) de peróxido de hidrogênio e 1% (v/v) de emulgador Prote-Pon WRR 14-BR (cedido pela empresa Prox do Brasil). O pH dessa solução foi ajustado com uma solução de 50% (m/v) de hidróxido de sódio até atingir pH 11. O processo foi conduzido a $90 \text{ }^\circ\text{C}$, por 60 minutos, relação de banho 1:10 (1 grama de tecido para 10 mL de solução) em uma máquina de lavagem em tambor, modelo Mathis MTP-HT. Após esse processo, o banho foi descartado e a amostra foi neutralizada com uma solução de 2% (v/v) de ácido acético, na mesma relação de banho utilizada anteriormente, a temperatura ambiente por 10 minutos. Ao final, o banho foi descartado e a malha foi lavada duas vezes com água, seca ao ar livre e armazenada em temperatura ambiente.

Os ensaios de biopolimento com celulase livre (BPe), imobilizada por ligação covalente (BPcov) e imobilizada por adsorção (BPads) foram realizados em equipamento de tingimento HT (Modelo ALT-B, Mathis) por 90 minutos, $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 rpm e com relação de banho 1:30 (1 grama de malha para 30 mL de tampão acetato 50 mM pH 5,0). A concentração de enzima livre utilizada foi de 0,67 mg/mL (2% de massa de enzima por massa de tecido) e a concentração de enzima imobilizada utilizada foi de 50 mg/mL. A fim de proporcionar uma maior abrasão, 10 esferas de aço inoxidável de 6 mm foram adicionadas em cada banho (conforme a norma ABNT NBR ISO 105-C06). Após o biopolimento, as amostras foram separadas do banho e lavadas três vezes com tampão acetato 50 mM pH 5,0. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma etapa para desativar a enzima residual utilizando solução de hidróxido de sódio 1 mM, por 15 minutos e $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao final, as amostras foram lavadas com água e foram deixadas em estufa de ventilação de ar a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas. Dois ensaios controles

foram realizados nessas mesmas condições: em um foi utilizada apenas solução tampão (BPc) e no outro foi utilizada a solução tampão contendo argila sem enzima (BPa).

Para avaliar a capacidade de reuso das enzimas imobilizadas, as soluções utilizadas no processo de biopolimento e a solução resultante da lavagem das amostras foram centrifugadas (3 minutos e 3130 g). As partículas sedimentadas foram ressuspensas mantendo a relação de banho 1:30 e a suspensão foi utilizada no biopolimento de novas amostras de malha.

4.1.1 Variação de massa após o biopolimento

A variação de massa (Equação 4) após o biopolimento foi determinada pela diferença da massa das amostras antes e depois do biopolimento (ALY *et al.*, 2004; SANKARRAJ; NALLATHAMBI, 2018). A análise foi feita após secagem das amostras em estufa de ventilação de ar a 60 °C, por 2 horas e resfriamento em dessecador.

$$\text{Variação da massa (\%)} = \left(\frac{m_0 - m_1}{m_0} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que,

m_0 = massa da amostra antes do biopolimento;

m_1 = massa da amostra após o biopolimento.

4.1.2 Teste de tração

Os ensaios de resistência à tração foram realizados de acordo com norma ABNT NBR ISO 13934 adaptada. Os ensaios foram realizados em 10 corpos de prova de 25 mm de largura e 100 mm de comprimento. O equipamento utilizado foi o Texturômetro TA HD plus (Stable Micro Systems) e célula de carga de 50 N, localizado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.1.3 Grau de brancura

O grau de brancura das amostras após o processo de biopolimento foi realizado de acordo com a norma ASTM E313-15 utilizando espectrofotômetro CM-3600a da marca Minolta. Foram realizadas leituras em três regiões diferentes de seis amostras.

4.1.4 Análise de *pilling*

As análises de *pilling* foram realizadas de acordo com a norma ASTM D4970 utilizando o abrasímetro Martindale TC 145 (Texcontrol) localizado no Laboratório de Tecido e Malhas (LABTEC) da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau. Foram utilizadas 3000 rotações por ensaio e pressão de 120 kPa. O equipamento Martindale simula os mecanismos de atrito que levam ao desgaste da superfície do tecido e à formação de *pilling*. O grau de classificação de *pilling* foi avaliado visualmente comparando a amostra tratada com padrões fotográficos e uma nota entre 1 a 5 foi dada. A nota 5 significa que a amostra não tem *pilling* e a nota 1 significa que a amostra apresenta uma quantidade muito severa de *pilling*.

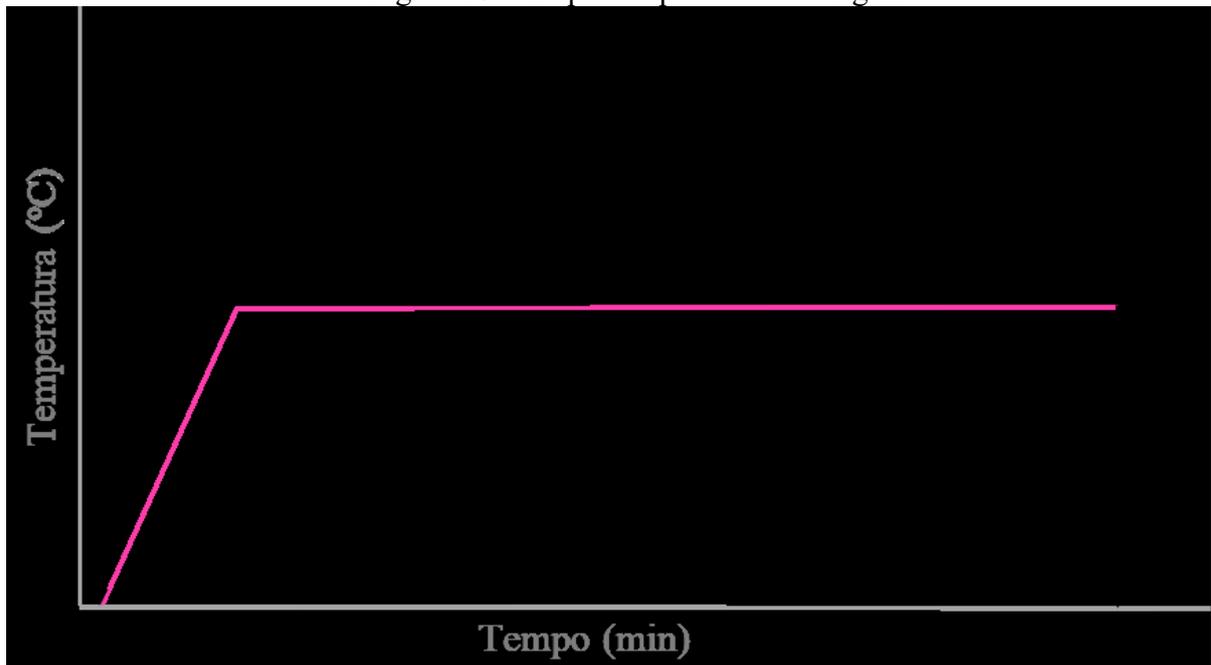
4.1.5 Análises morfológicas

A superfície das amostras de malha tratada e não tratada foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando o equipamento JEOL JSM-6390LV localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. Antes de realizar as análises, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro (material condutor).

4.1.6 Avaliação da propriedade tintorial após o biopolimento

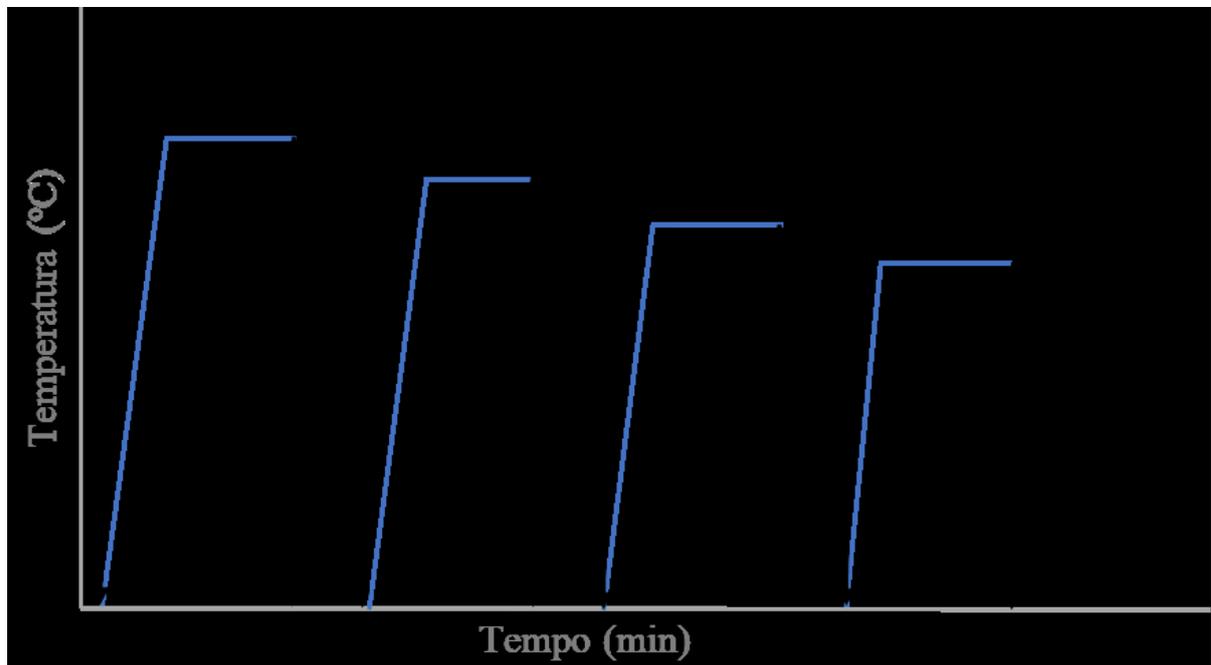
As amostras submetidas ao processo de biopolimento foram submetidas a um tingimento padrão com corante vermelho reativo (Vermelho Tiafix AF/B – Aupicor Química). O processo de tingimento (Figura 20) foi baseado no procedimento empregado por SILVA (2013) e foi realizado no equipamento de tingimento em canecos (Modelo ALT-B, Mathis) utilizando uma relação de banho de 1:50 (1 grama de tecido para 50 mL de solução). No início do processo de tingimento foram adicionados o dispersante/sequestrante, o corante e o cloreto de sódio. Após 30 min, o álcali foi adicionado em duas etapas e o processo foi conduzido por mais 60 minutos. Ao final, o banho foi descartado e foi iniciada a lavagem das amostras tingidas, conforme a Figura 21. Os produtos utilizados em todo o processo e suas quantidades estão especificados na Tabela 1.

Figura 20 – Etapas do processo de tingimento.



Fonte: Autora (2020).

Figura 21 – Etapas de lavagem da malha tingida.



Fonte: Autora (2020).

Tabela 1 – Produtos e suas quantidade utilizadas no processo de tingimento.

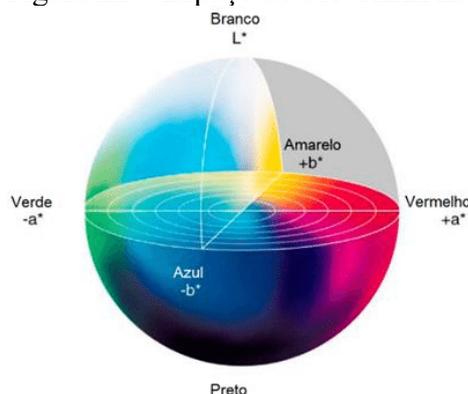
Produto	Quantidade
Dispersante/Sequestrante Ladiquest 2005	1,5 g/L
Cloreto de sódio	80 g/L
Corante Vermelho Tiafix AF/B	0,6% em relação a massa da malha
Álcali Líquido Laugal MV	6,7 g/L
Dispersante Verolan NVR	0,75 g/L

Fonte: Autora (2020).

A avaliação da cor da malha tingida foi realizada utilizando o espectrofotômetro CM3600a da marca Minolta, que segue o sistema CIE (CIELAB). Tal sistema correlaciona os valores de cor com a percepção visual e é expresso por um espaço tridimensional com as coordenadas L*, a* e b* (Figura 22). A coordenada L* se refere à luminância e pode assumir valores de 0 (preto) a 100 (branco). Já as coordenadas a* e b* estão relacionadas às cores, onde a* negativo aponta uma tendência para o verde e a* positivo para o vermelho; b* negativo apresenta uma tendência para o azul e o b* positivo para o amarelo (BROADBENT, 2001). A diferença total de cor entre as três coordenadas (ΔE), determinada pela Equação 5, indica a magnitude da diferença total de cor entre uma amostra e a referência (padrão) (BROADBENT, 2001). Os ensaios foram realizados em duplicata e cada replicata foi analisada em quatro pontos diferentes. O padrão utilizado foi a amostra submetida ao processo apenas com tampão (BPC) tingida.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad \text{Equação 3}$$

Figura 22 – Espaço de cor CIELAB.



Fonte: MINOLTA (2007).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios com enzima livre foi utilizado 0,67 mg/mL (2% de massa de enzima por massa de tecido), o que corresponde a uma atividade de 2,5 U/mL. Para que os efeitos da enzima livre e imobilizada pudessem ser comparados, foi utilizada uma quantidade de enzima imobilizada que correspondesse à atividade da enzima livre, que foi de 50 mg/mL. A maior quantidade de enzima imobilizada necessária para atingir a mesma atividade da enzima livre pode ser atribuída ao uso do suporte, que, em geral, corresponde a mais de 95% da massa total do biocatalisador imobilizado (SHELDON; VAN PELT, 2013). Ademais, uma maior quantidade de enzima pode ser necessária para compensar a perda de atividade causada pela imobilização.

Os efeitos do tratamento com celulase livre, imobilizada por adsorção e imobilizada por ligação covalente em termos de variação de massa, resistência à tração, grau de brancura e grau de *pilling* estão apresentados na Tabela 2. Após o biopolimento, é esperado que as amostras tratadas com celulase apresentem perda de massa devido a remoção da microfibrilas. (CHOUDHURY, 2017; MONTAZER; HARIFI, 2018; ŠIMIĆ *et al.*, 2015). De acordo com SARAVANAN *et al.* (2009), perdas de massa em torno de 1-2% já são suficientes para obter uma redução notável na tendência de formação do *pilling* em malhas. Comercialmente, perdas de massa de 3 a 6% são consideradas aceitáveis (CHOUDHURY, 2017; MONTAZER; HARIFI, 2018; ŠIMIĆ *et al.*, 2015).

A perda de massa apresentada pela amostra BPc (biopolimento em solução tampão) pode ser atribuída à remoção das fibrilas por ação mecânica. A amostra BPe (biopolimento com celulase livre) apresentou uma perda de massa de aproximadamente 2,5%, o que está dentro da faixa aceitável comercialmente. Por outro lado, as amostras BPa (biopolimento com solução tampão e argila), BPads (biopolimento com celulase imobilizada por adsorção) e BPcov (biopolimento com celulase imobilizada por ligação covalente) apresentaram ganho de massa. Esse resultado pode ser atribuído ao aprisionamento das partículas de caulim nos micro poros ou espaços vazios presentes entre os microfibrilas dos filamentos de algodão (BROADBENT, 2001). A presença de partículas de caulim pode ser comprovada pelas imagens de MEV da Figura 23.

Ainda em relação à variação de massa, observa-se que a amostra BPcov apresentou um ganho de massa muito maior que a amostra BPads, o que mostra uma maior incorporação de caulim na malha. Como as amostras de celulase imobilizada pelos métodos de adsorção e

ligação covalente apresentaram uma distribuição de tamanho semelhante, a diferença na retenção das partículas não pode ser justificada pela diferença do tamanho das partículas. Assim, é possível que na amostra BPcov também ocorra alguma ligação química entre as partículas de caulim e a celulose. Assim como ocorre na reação de funcionalização (Figura 15), os grupos silanos hidrolisados do APTES (que não reagiram com o caulim) podem se condensar com os grupos hidroxila da celulose, o que pode resultar na fixação do caulim no tecido (KHANJANZADEH *et al.*, 2018; MONDAL *et al.*, 2018; PUJIASIH *et al.*, 2018; RAFIEIAN *et al.*, 2019). Além disso, se houver alguma extremidade livre de glutaraldeído pode haver reação de acetilação com os grupos hidroxila da celulose em condições ácidas (JEON *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2015).

Como foi detectada a presença de partículas no tecido foi realizado o teste de grau de brancura, uma vez que a presença de partículas pode afetar esse parâmetro. De acordo com a norma ASTM, brancura é um atributo da percepção de cores pelo qual se julga que a cor de um objeto se aproxima do branco preferido (ASTM, 2015). O grau de brancura é um número, calculado a partir de dados colorimétricos, que indica o grau de partida de uma cor de objeto em relação ao branco preferido (ASTM, 2015). Quanto mais alto for o valor, maior será a brancura do substrato analisado.

Observa-se que as amostras BPe, BPa e BPads apresentaram um grau de brancura próximo. O grau de brancura obtido por essas amostras é típico para substratos de algodão, uma vez que as fibras de algodão contêm impurezas que absorvem mais luz na região azul do espectro visível do que nas outras proporcionando um tom amarelado ou acastanhado. A remoção dessas impurezas na etapa de pré-alveamento aumenta a refletância azul do substrato têxtil e proporciona um aumento de luminosidade. Porém, mesmo após um pré-alveamento prolongado, uma certa quantidade de amarelamento permanece (CHOUDHURY, 2014). Para obter um substrato de algodão branco é necessário tratá-lo com um corante azul, conhecido como branqueador ótico, para adicionar cores complementares ao substrato. Esses corantes absorvem a luz na parte verde-amarela do espectro e, assim, aumentam a percepção visual do branco (CHOUDHURY, 2014).

Apenas a amostra BPcov apresentou uma diminuição do grau de brancura. Essa alteração indica o amarelamento do tecido, o qual é resultado da incorporação das partículas de caulim que adquiriram uma coloração amarelada após a etapa de ativação com o glutaraldeído e que se intensificou após a ligação com a enzima. Essa coloração amarelada do caulim pode ser atribuída à formação de bases de Schiff entre o silano, glutaraldeído e enzima (HOPWOOD *et al.*, 1970). O amarelamento de tecidos pode ser um problema porque, geralmente, é associado

à falta de qualidade devido ao envelhecimento ou sujeira (CHOUDHURY, 2014). Se enviada para tingimento, a amostra amarelada pode causar alterações de cor no substrato tingido, como problemas na igualização do tingimento e aparecimento de manchas.

Um dos principais problemas associados ao biopolimento de tecidos é a perda de resistência à tração do tecido. De acordo com os dados da Tabela 2, observa-se que todas as amostras tratadas com celulase apresentaram perda de resistência à tração, porém a amostra BPe foi a que apresentou a maior perda de resistência. A amostra BPe apresentou cerca de 36% de perda de resistência em relação à amostra BPc, enquanto as amostras tratadas com celulase imobilizada, BPads e BPcov, apresentaram entre 20 e 12%, respectivamente. Durante os ensaios também foi observada a presença de furos em algumas amostras tratadas com a celulase livre. Como pode ser observado pela imagem de MEV (Figura 23-c.1) da região de uma amostra que continha um furo, há uma intensa degradação das fibras do algodão. Esses resultados sugerem que a enzima imobilizada causou menos dano à estrutura interna dos fios da malha, o que pode ser atribuído à restrição da atuação da enzima a superfície dos fios devido a imobilização.

Tabela 2 – Efeitos da celulase livre, imobilizada por adsorção e imobilizada por ligação covalente no biopolimento de amostra de malha de algodão.

Amostra	Variação de massa (%)^f	Força máxima de tração (N)	Grau de <i>Pilling</i>	Grau de brancura
BPc^a	- 0,6 ± 0,1	15,3 ± 1,0	1,0	61 ± 1
BPa^b	+ 2,4 ± 0,04	14,9 ± 0,7	1,0	58 ± 1
BPe^c	- 2,5 ± 0,3	9,7 ± 1,1	3,0	61 ± 1
BPads^d– 1º ciclo	+ 0,9 ± 0,5	12,3 ± 0,8	3,0	59 ± 1
BPads – 2º ciclo	+ 1,2 ± 0,4	14,3 ± 0,9	3,0	60 ± 1
BPads – 3º ciclo	+ 1,7 ± 0,4	14,5 ± 0,4	2,5	60 ± 1
BPcov^e – 1º ciclo	+ 4,5 ± 0,3	13,5 ± 0,9	4,0	39 ± 2
BPcov – 2º ciclo	+ 4,9 ± 0,4	13,6 ± 0,6	3,0	41 ± 2
BPcov – 3º ciclo	+ 4,3 ± 0,4	13,9 ± 1,1	3,5	41 ± 2

Fonte: Autora (2020).

^a Biopolimento com solução tampão; ^b Biopolimento com solução tampão e argila; ^c Biopolimento com celulase livre; ^d Biopolimento com celulase imobilizada por adsorção; ^e Biopolimento com celulase imobilizada por ligação covalente; ^f massa de amostra em torno de 4,8 gramas.

O objetivo principal do biopolimento é a remoção das microfibrilas salientes na superfície do tecido e para avaliar essa remoção as amostras tratadas foram submetidas a um

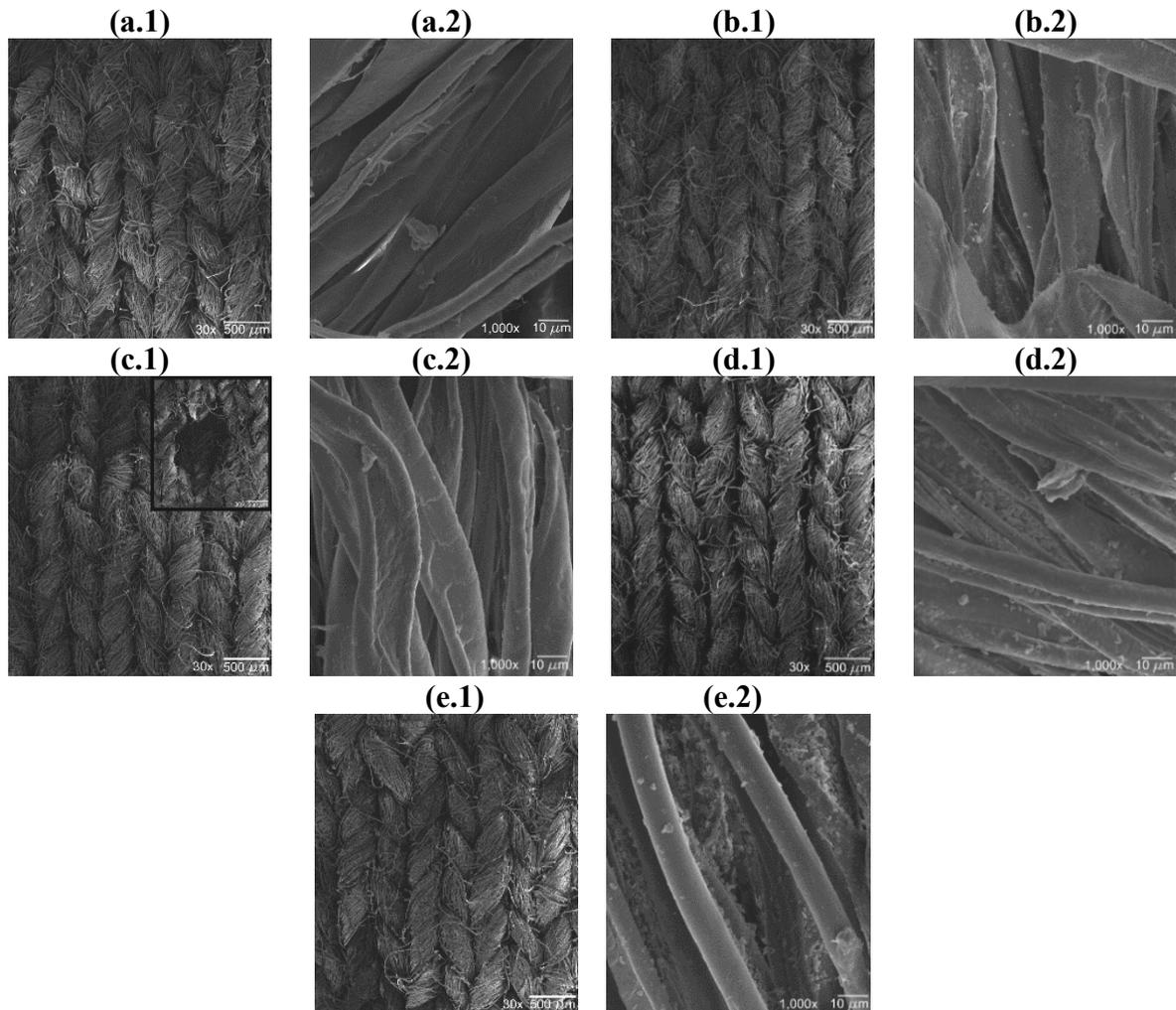
processo de abrasão para formação do *pilling*. Em seguida, estas foram comparadas com padrões fotográficos para avaliar a intensidade de formação de *pilling*. A Figura 24 apresenta as amostras tratadas após o processo de abrasão para avaliação do *pilling* e as notas atribuídas para cada amostra estão apresentadas na Tabela 2. Todas as amostras tratadas com celulase apresentaram melhores resultados de *pilling* quando comparadas com as amostras controle, comprovando que há remoção das microfibrilas protuberantes da superfície do tecido. Nas imagens de MEV (Figura 23) é possível observar a superfície das amostras de malha e aparentemente as amostras controle possuem uma maior quantidade de fibrilas na superfície que as amostras tratadas com celulase, o que corrobora com os resultados de *pilling*. Em relação às amostras tratadas com enzima livre, as amostras tratadas com enzima imobilizada apresentaram uma nota igual ou superior.

Esses resultados, juntamente com os resultados de resistência à tração, sugerem que a imobilização proporciona remoção adequada das microfibrilas da superfície da malha, causando menor dano aos fios de algodão, o que está associado à restrição de mobilidade da celulase imobilizada. Assim, é possível mostrar que a imobilização foi efetiva para minimizar a perda de resistência causada pela aplicação da enzima livre.

Ao comparar os resultados obtidos com as enzimas imobilizadas, observa-se que as amostras tratadas com celulase imobilizada por adsorção apresentaram um menor grau de *pilling* e uma maior perda de resistência à tração no primeiro ciclo ($p \leq 0,05$). Esses resultados sugerem que houve uma maior atuação da celulase imobilizada por adsorção no interior dos fios de algodão. Uma suposição para tal resultado é a lixiviação de moléculas de celulase que estivessem fracamente adsorvidas, já que nos ciclos seguintes a resistência a tração foi maior e constante.

Em relação ao reuso, observa-se que ao reutilizar a celulase imobilizada por adsorção e por ligação covalente foi possível obter bons resultados de grau de *pilling* sem alterar a resistência à tração. Durante o reuso, observa-se que houve redução do grau de *pilling* das amostras tratadas com ambas as celulases imobilizadas. Esses resultados podem ser relacionados à diminuição da atividade catalítica, uma vez a celulase imobilizada por ligação covalente e por adsorção apresentaram cerca de 84 e 80% de sua atividade inicial após o terceiro ciclo de biopolimento. devido à retenção das partículas de caulim na malha. A principal razão para a diminuição da atividade catalítica é a retenção das partículas de caulim na malha.

Figura 23 – Imagens de MEV das amostras após o processo de biopolimento. (a) Biopolimento com solução tampão; (b) Biopolimento com solução tampão e argila; (c) Biopolimento com celulase livre; (d) Biopolimento com celulase imobilizada por adsorção; (e) Biopolimento com celulase imobilizada por ligação covalente. Os subíndices 1 e 2 indicam a ampliação de 30 e 1000 vezes, respectivamente.



Fonte: Autora (2020).

KUMAR *et al.* (2008) também observaram redução do grau de *pilling* ao reutilizar a celulase imobilizada em resina epóxi por adsorção. Porém, ao contrário do presente trabalho, a única vantagem que a imobilização da enzima proporcionou foi a possibilidade de reuso, uma vez que as amostras tratadas com a celulase imobilizada apresentaram resistência à tração semelhante às amostras tratadas com a celulase livre. Assim, observa-se que a imobilização da celulase em caulim é uma estratégia promissora, pois além de minimizar a perda de resistência à tração permite que a enzima seja reutilizada de forma eficiente. O reuso eficiente é um requisito importante para que a redução no consumo de enzima possa compensar os custos da

imobilização, podendo, assim, tornar o processo com enzima imobilizada economicamente viável.

Ao comparar as atividades retidas após o biopolimento e os ensaios com CMC (Capítulo 3, item 3.6.3.4) é possível observar como as características do substrato influenciam na capacidade de reuso da enzima imobilizada. Nos ensaios com CMC, 86% da atividade foi mantida após oito ciclos. Já no processo de biopolimento foi obtido uma atividade retida semelhante com apenas três ciclos de uso da enzima imobilizada. A principal razão para tal diferença está relacionada ao fato de a CMC ser solúvel, o que proporciona recuperação mais eficiente da enzima imobilizada e, conseqüentemente, a atividade retida é maior.

Diante dos resultados de grau de brancura e a comprovação, pelo ganho de massa e imagens de MEV, da presença de partículas de caulim no tecido, foi realizado o tingimento das amostras para avaliar a interferência das mesmas nas propriedades de cor da malha tingida. A presença de contaminantes no tecido podem interferir no umedecimento e no tingimento (BROADBENT, 2001). Qualquer distribuição desigual de partículas resulta em absorção desigual do corante e que é facilmente percebida, afetando a qualidade visual do tecido. Na Tabela 3 são apresentadas as coordenadas colorimétricas das amostras tingidas após o biopolimento. O padrão utilizado para comparação foi a amostra controle, que foi tratada apenas com solução tampão (BPc) antes do tingimento.

As amostras tratadas com enzima livre (BPe) e imobilizada (BPcov e BPads) apresentaram valores de L^* próximos ao da amostra padrão (BPc), sugerindo que a presença do caulim na malha não afetou a luminosidade das amostras tingidas. Os parâmetros a^* e b^* também foram próximos ao do padrão e mostram que a tonalidade das amostras não foi alterada pelo caulim.

Em relação ao parâmetro ΔE , todas as amostras apresentaram diferença de cor em relação à amostra padrão. No entanto, valores de ΔE menores que 1,0, como apresentado pelas amostras BPe e BPads, não são perceptíveis ao olho humano e a diferença de cor é considerada aceitável nas indústrias. Porém, o valor de ΔE apresentado pela amostra BPcov, a diferença de cor é perceptível para observadores treinados e pode não ser aceitável para produtos com padrão de qualidade mais elevado. Para observadores não treinados, a diferença de cor é perceptível para valores de ΔE maiores que 3,5 (MOKRZYCKI; TATOL, 2011). A diferença de cor da amostra BPcov pode estar associada ao grau de brancura que a amostra apresentou após o biopolimento, uma vez que as amostras que apresentaram grau de brancura próximo ao da amostra controle, apresentaram uma menor variação de cor. Assim, os resultados sugerem que apenas as partículas de caulim quimicamente modificadas para promover a ligação covalente

com a enzima afetaram as propriedades tintoriais da malha. As propriedades tintoriais e o grau de brancura são características importantes para a indústria têxtil porque estão relacionadas à qualidade visual do tecido e podem afetar aceitabilidade dos produtos.

Apesar de ter proporcionado resultados inferiores em relação ao grau de *pilling* e resistência à tração, a imobilização da celulase em caulim por adsorção se mostrou mais promissora para aplicação em biopolimento. Além de ser uma técnica menos onerosa, uma vez que não é necessário realizar as etapas de funcionalização e ativação do suporte, a aplicação da enzima imobilizada por adsorção não causou alterações no grau de brancura e nas propriedades tintoriais da malha.

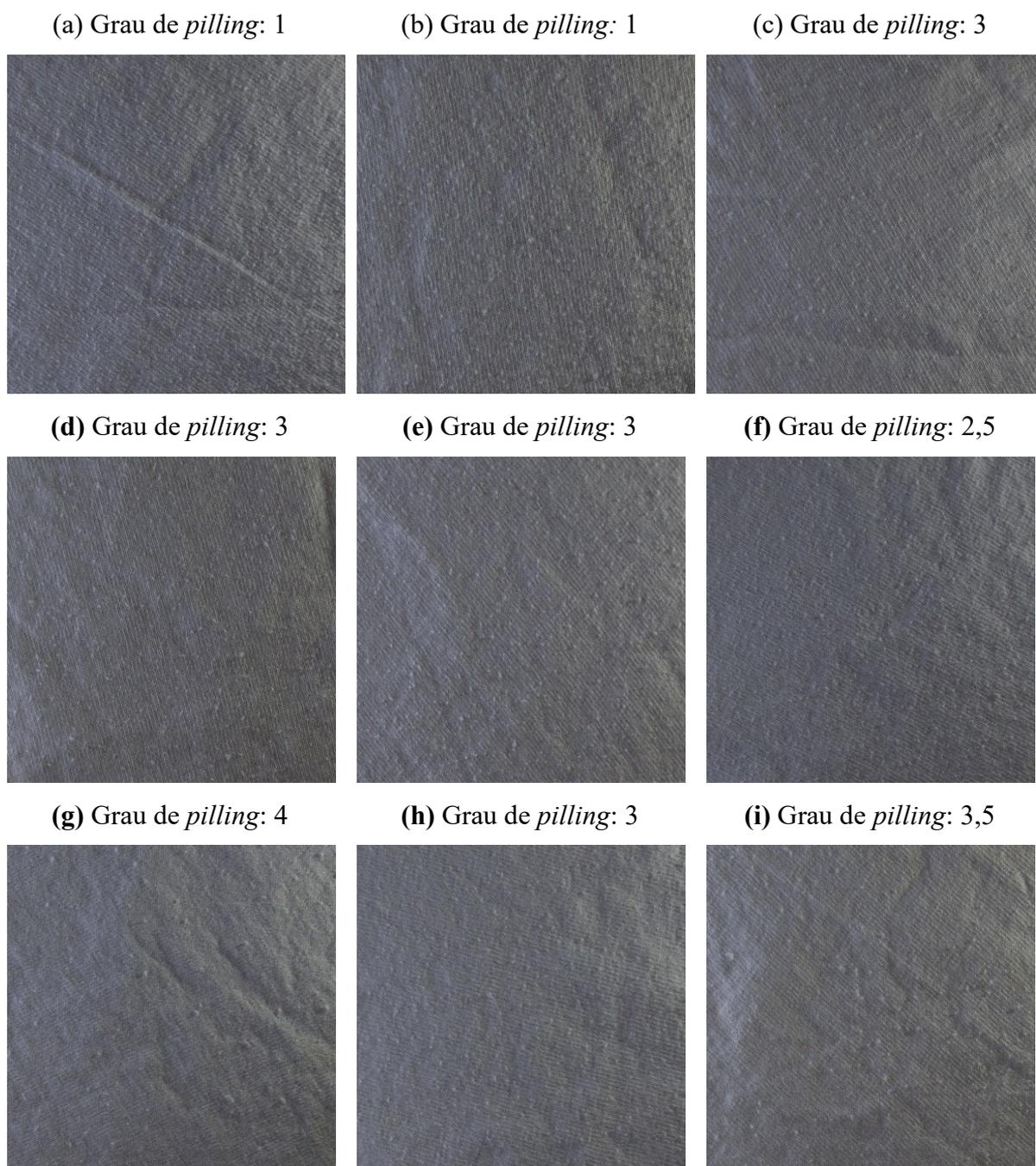
Tabela 3 – Parâmetros de cor do espaço CIELAB das amostras tingidas após o biopolimento.

Amostra	L*	a*	b*	ΔE	Cor
BPc (padrão)¹	57,1	+43,3	-7,9	-	
BPe²	56,5 ± 0,01	+43,7 ± 0,5	-7,9 ± 0,1	0,8 ± 0,3	
BPads³	57,3 ± 0,1	+44,0 ± 0,01	-8,3 ± 0,3	0,8 ± 0,01	
BPcov⁴	58,8 ± 1,0	+42,6 ± 0,2	-8,1 ± 0,1	1,9 ± 1,0	

Fonte: Autora (2020).

¹Biopolimento em solução tampão; ² Biopolimento com celulase livre; ³ Biopolimento com celulase imobilizada por adsorção ; ⁴ Biopolimento com celulase imobilizada por ligação covalente.

Figura 24 – Fotografia das amostras após o processo de abrasão para avaliação do *pillling*. (a) Biopolimento com solução tampão; (b) Biopolimento com solução tampão e argila; (c) Biopolimento com celulase livre; (d) Biopolimento com celulase immobilizada por adsorção – 1º ciclo; (e) Biopolimento com celulase immobilizada por adsorção – 2º ciclo; (f) Biopolimento com celulase immobilizada por adsorção – 3º ciclo; (g) Biopolimento com celulase immobilizada por ligação covalente – 1º ciclo; (h) Biopolimento com celulase immobilizada por ligação covalente – 2º ciclo; (i) Biopolimento com celulase immobilizada por ligação covalente – 3º ciclo



Fonte: Autora (2020).

4.3 CONCLUSÃO

O biopolimento é uma técnica importante para a indústria têxtil, uma vez que melhora a qualidade dos produtos sem causar danos ao meio ambiente. No entanto, devido à atuação da celulase no interior da fibra celulósica pode haver perdas excessivas de massa e de resistência à tração. Uma das alternativas para amenizar tais problemas é imobilizar a celulase em um suporte sólido para restringir sua mobilidade e limitar sua atuação à superfície da fibra celulósica. Na literatura há poucos estudos relacionados à aplicação de celulases imobilizadas em biopolimento e, embora esses estudos tenham demonstrado redução da perda de resistência à tração, não é possível comprovar que enzima imobilizada foi efetiva na remoção das microfibrilas protuberantes, uma vez que não foram realizados testes de *pilling*. Além disso, todos esses trabalhos utilizaram suportes orgânicos para imobilizar a celulase, os quais não apresentam características ideais para aplicação industrial. Diante disso, o objetivo deste capítulo foi avaliar os efeitos do uso da celulase imobilizada em caulim no biopolimento de malha de algodão. As amostras tratadas com celulase imobilizada apresentaram maior resistência à tração e grau de *pilling* semelhante ou superior às amostras tratadas com celulase livre. Esses resultados mostram que a celulase imobilizada proporcionou remoção adequada das microfibrilas causando menos danos à malha sugerindo que a imobilização restringiu a hidrólise da celulase à superfície das fibras de algodão. Além de minimizar os danos ao substrato, a imobilização também permitiu que grande parte da enzima fosse recuperada e reutilizada de forma eficiente. Embora a celulase imobilizada por ligação covalente tenha levado a resultados superiores de resistência a tração e grau de *pilling*, as amostras tratadas apresentaram menor grau de brancura e alteração das propriedades tintoriais, o que pode influenciar a aceitabilidade dos produtos. Esses resultados associados ao fato de a imobilização por ligação covalente ser mais onerosa, fazem com que o método por adsorção tenha maior potencial para aplicação em biopolimento. Esse trabalho obteve resultados importantes que comprovam que a imobilização pode ser um caminho para minimizar os danos causados à malha no processo de biopolimento. Ademais, esse trabalho mostra uma outra perspectiva para imobilização de enzimas, uma vez que o principal objetivo de utilizar a técnica no biopolimento é proporcionar um produto de melhor qualidade e o reúso é um objetivo secundário.

5 APLICAÇÃO DE CELULASE IMOBILIZADA EM BIOESTONAGEM

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos após a aplicação da celulase livre e imobilizada no processo de bioestonagem. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra de jeans utilizada neste trabalho foi cedida pela empresa Coratex e sua composição era 98% algodão e 2% elastano, construção sarja 3x1 e gramatura de 305 g/m² (9 oz/jd²). Para realizar os ensaios, as amostras foram cortadas e no dorso de cada uma delas foi costurada uma amostra de malha 100% algodão pré-alvejada para avaliar a redeposição do corante. Antes do processo de bioestonagem, as amostras foram lavadas com uma solução de 1% (v/v) de emulgador Prote-Pon WRR 14-BR, a 80 °C, por 20 min e relação de banho de 1:30. Ao final, as amostras foram lavadas abundantemente com água fria e, em seguida, foram submetidas ao processo de bioestonagem.

Os ensaios de bioestonagem com celulase livre (BEe) e imobilizada por adsorção (BEads) foram realizados em equipamento de tingimento em canecos (Modelo ALT-B, Mathis) por 90 minutos, 50 °C, 60 rpm e relação de banho 1:30 (1 grama de jeans para 30 mL de tampão acetato 50 mM pH 5,0). A fim de proporcionar uma maior abrasão, 10 esferas de aço inoxidável de 6 mm foram adicionadas em cada banho (conforme a norma ABNT NBR ISO 105-C06). Ao final do processo, as amostras foram separadas do banho e lavadas três vezes com tampão acetato 50 mM pH 5,0. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma etapa de desativação da enzima residual utilizando solução de hidróxido de sódio 1 mM, por 15 min a 100 °C. Ao final, as amostras foram lavadas com água, secas em estufa de ventilação de ar a 60 °C por 2 horas e depois foram analisadas. Dois ensaios controles foram realizados nessas mesmas condições: em um foi utilizado apenas solução tampão (BEc) e no outro foi utilizado a solução tampão contendo argila sem enzima (BEa). Para cada experimento foram realizados seis replicatas. Nos ensaios com celulase foi utilizada uma concentração de 0,67 e 50 mg/mL de celulase livre e imobilizada, respectivamente.

Para avaliar a capacidade de reúso das enzimas imobilizadas, as soluções utilizadas no processo de bioestonagem e a solução resultante da lavagem das amostras foram centrifugadas

(3 minutos e 3130 g). As partículas sedimentadas foram ressuspensas mantendo a relação de banho 1:30 e a suspensão foi utilizada na bioestonagem de novas amostras de jeans.

5.1.1 Variação de massa

A variação de massa (Equação 6) foi determinada pela diferença da massa das amostras antes e depois da bioestonagem (ALY *et al.*, 2004; SANKARRAJ; NALLATHAMBI, 2018). A análise foi feita após secagem das amostras em estufa de ventilação de ar a 60 °C, por 2 horas e resfriamento em dessecador.

$$\text{Variação da massa (\%)} = \left(\frac{m_0 - m_1}{m_0} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que,

m_0 = massa da amostra antes da bioestonagem;

m_1 = massa amostra após a bioestonagem.

5.1.2 Teste de tração

Os ensaios de resistência a tração foram realizados de acordo com norma ABNT NBR ISO 13934 adaptada. Nos ensaios foram utilizados 10 corpos de prova de 25 mm de largura e 100 mm de comprimento. O equipamento utilizado foi o Texturômetro TA.HD plus (Stable Micro Systems) e célula de carga de 750 N, localizado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. As análises foram feitas no sentido do urdume, sentido contrário ao estiramento do elastano, para avaliar o efeito do algodão somente.

5.1.3 Avaliação da estonagem e do *backstaining*

A avaliação da estonagem e de redeposição de corante (*backstaining*) foi realizada utilizando os parâmetros do sistema CIE (CIELAB) que foram determinados pelo espectrofotômetro CM3600a da marca Minolta. Tal sistema correlaciona os valores de cor com a percepção visual e é expresso por um espaço tridimensional com as coordenadas L^* , a^* e b^* . A coordenada L^* se refere à luminância e pode assumir valores de 0 (preto) a 100 (branco). Já as coordenadas a^* e b^* estão relacionadas às cores, onde a^* negativo aponta uma tendência para

o verde e a^* positivo para o vermelho; b^* negativo apresenta uma tendência para o azul e o b^* positivo para o amarelo (BROADBENT, 2001). A diferença total de cor entre as três coordenadas (ΔE) indica a magnitude da diferença total de cor entre uma amostra e a referência (padrão) (BROADBENT, 2001).

Foram realizadas leituras em quatro regiões diferentes de seis amostras. O efeito de desbotamento foi avaliado pela alteração da cor do corpo de prova em teste e a transferência de cor para o tecido testemunha. Como padrão foram utilizadas a amostra de jeans sem passar pelas condições de processo da bioestonagem e a malha pré-alvejada para avaliar os parâmetros de cor da bioestonagem e do *backstaining*, respectivamente.

5.1.4 Análises morfológicas

A superfície das amostras de jeans foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando o equipamento JEOL JSM-6390LV localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. Antes de realizar as análises, as amostras foram recobertas com ouro (material condutor).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a bioestonagem, as microfibrilas da superfície da fibra do algodão são removidas pela ação conjunta da celulase e a ação mecânica. Na região onde as microfibrilas são removidas ocorre liberação do corante adsorvido, criando áreas mais claras que proporcionam o efeito desbotado ao jeans. Assim, para avaliar os efeitos de desbotamento do processo sobre o substrato têxtil tratado são utilizadas as coordenadas colorimétricas. As coordenadas colorimétricas das amostras de jeans estão apresentadas na Tabela 4. Todas as amostras submetidas às condições do processo de bioestonagem apresentaram valores de luminosidade (L^*) e a^* estatisticamente iguais entre si ($p > 0,05$). Com relação aos parâmetros b^* , observa-se que todas as amostras, controle e tratadas com enzima livre e imobilizada, apresentaram valores menores ($p \geq 0,05$) em relação à amostra padrão, o que significa que essas amostras se tornaram mais azuladas. Os valores de ΔE mostram que todas as amostras apresentaram variação de cor em relação ao padrão perceptível a olhos não treinados (MOKRZYCKI; TATOL, 2011). No entanto, ao comparar as amostras submetidas à bioestonagem, observa-se que tanto os valores de b^* e ΔE das amostras tratadas com celulase livre e celulase imobilizada (1º ciclo) foram iguais entre si ($p > 0,05$) e diferentes aos das

amostras controle ($p \leq 0,05$). Esses resultados eram esperados e indicam a remoção de corante da superfície das fibras celulósicas devido à ação conjunta da celulase e ação mecânica. Além disso, os resultados mostram que a eficiência da celulase imobilizada no primeiro ciclo é semelhante ao da celulase livre. No entanto, a partir do segundo ciclo de uso observa-se uma diminuição ($p \leq 0,05$) dos valores de b^* e ΔE , indicando um menor efeito de desbotamento.

Tabela 4 – Parâmetros de cor do espaço CIELAB das amostras de jeans após a bioestonagem.

Amostra	L*	a*	b*	ΔE	Cor
Padrão	31,9	+ 0,3	-5,4	-	
BEc¹	28,2 ± 0,7	+0,9 ± 0,2	-8,2 ± 0,2	4,8 ± 0,5	
BEa²	29,1 ± 1,8	+0,5 ± 0,3	-8,5 ± 0,3	4,3 ± 1,6	
BEe³	27,7 ± 0,6	+0,7 ± 0,1	-11,7 ± 0,6	7,8 ± 0,6	
BEads⁴ – 1º ciclo	28,9 ± 0,8	+0,5 ± 0,2	-12,2 ± 0,7	7,4 ± 0,5	
BEads – 2º ciclo	29,6 ± 0,9	+0,4 ± 0,2	-9,7 ± 0,9	5,3 ± 0,6	
BEads – 3º ciclo	28,2 ± 0,4	+0,4 ± 0,1	-9,9 ± 0,5	5,9 ± 0,6	

Fonte: Autora (2020).

¹ Bioestonagem com solução tampão; ² Bioestonagem com solução tampão e argila; ³ Bioestonagem com celulase livre; ⁴ Bioestonagem com celulase imobilizada por adsorção.

O *backstaining* é a redeposição do corante liberado no processo de bioestonagem no substrato tratado, podendo recolorir os fios azuis do jeans (urdume) e proporcionar coloração azul aos fios brancos do jeans (trama), bolsos e forros. Para avaliar a redeposição do corante, atrás de cada amostra foi costurada uma amostra de malha de algodão pré-alvejada e ao final do processo as coordenadas colorimétricas dessas amostras foram avaliadas.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, as amostras tratadas com celulase livre apresentaram o menor valor de L^* , indicando que essas amostras apresentaram uma coloração mais escura que as outras amostras. Todas as amostras apresentaram uma tendência para a tonalidade azul (b^* negativo) e variação de cor (ΔE) perceptível ao olho humano em

comparação ao padrão, sendo estes valores muito maiores para as amostras tratadas com a celulase livre.

Tabela 5 – Parâmetros de cor do espaço CIELAB amostras de tecido testemunha.

Amostra	L*	a*	b*	ΔE	Cor
BEc¹	80,0 ± 0,9	-2,5 ± 0,1	-4,1 ± 0,7	8,5 ± 1,1	
BEa²	85,0 ± 0,6	-1,8 ± 0,1	-0,9 ± 0,2	3,0 ± 0,4	
BEe³	71,3 ± 1,1	-3,6 ± 0,1	-10,0 ± 0,6	19,0 ± 1,2	
BEads⁴ – 1º ciclo	80,9 ± 1,2	-2,9 ± 0,3	-4,1 ± 0,9	8,0 ± 1,5	
BEads – 2º ciclo	82,9 ± 0,7	-2,6 ± 0,2	-2,8 ± 0,7	5,8 ± 0,8	
BEads – 3º ciclo	83,7 ± 0,6	-2,3 ± 0,4	-3,1 ± 0,5	4,5 ± 1,3	

Fonte: Autora (2020).

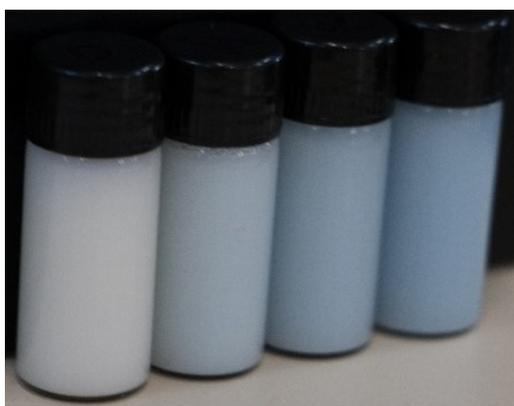
¹ Bioestonagem com solução tampão; ² Bioestonagem com solução tampão e argila; ³ Bioestonagem com celulase livre; ⁴ Bioestonagem com celulase imobilizada por adsorção.

Diante dos resultados, observa-se que para um mesmo efeito de desbotamento, amostras tratadas com celulase imobilizada (1º ciclo) apresentaram redeposição de corantes muito inferior às amostras tratadas com celulase livre. Um dos fatores associados à redeposição é a interação química entre o corante e as moléculas de enzima que estão adsorvidas na superfície das fibras celulósicas. Assim, ao imobilizar a enzima, é esperado menor *backstaining* porque a enzima não fica adsorvida ao tecido. Além disso, no presente trabalho, esse resultado também pode ser atribuído à incorporação, provavelmente por adsorção, do corante liberado às partículas de caulim. Essa incorporação pode ser comprovada comparando os resultados de *backstaining* e estonagem das amostras que continham argila no processo e a amostra controle BEc. Para diferença de cor semelhante na estonagem, a amostra BEa apresentou menor *backstaining* que a amostra BEc. Já para as amostras tratadas com celulase imobilizada observa-se maiores efeitos de estonagem e *backstaining* semelhante ao da amostra BEc. Além disso, durante os ensaios foi observado que a argila adquiriu uma coloração azul, que se intensificou à medida que a enzima foi reutilizada (Figura 25). COSTA (2019) também relatou diminuição do *backstaining* ao adicionar bentonita sódica ao processo de bioestonagem com o intuito de

remover o corante liberado para que efluente do processo não tivesse sem cor. Assim, diante dos resultados obtidos, observa-se a possibilidade de desenvolver um processo de bioestonagem que proporcione menor *backstaining* e ao mesmo tempo gere um efluente sem cor ao utilizar o caulim como suporte para imobilização da celulase.

Com relação ao reuso da enzima imobilizada, observa-se que as amostras do segundo e terceiro ciclo de uso da enzima apresentaram menores valores de L^* , b^* e ΔE , indicando menor redeposição de corante. Esses resultados podem ser relacionados ao menor efeito de estonagem observado ao reutilizar a enzima. Se o efeito de estonagem é menor, significa que menos corante é liberado para o banho e, conseqüentemente, menos corante será redepositado.

Figura 25 – Mudança de cor do caulim durante o processo de bioestonagem.



Fonte: Autora (2020).

A variação de massa e resistência à tração estão apresentados na Tabela 6. As amostras tratadas com celulase livre e imobilizada (1º ciclo) apresentaram perda de massa maior ($p \leq 0,05$) em relação ao controle (BEc), o que é atribuído a remoção parcial das microfibrilas e de corante. Apesar da amostra tratada com celulase imobilizada apresentar perda de massa menor, não se pode afirmar que a remoção de fibrilas foi menor. Como constatado no biopolimento, ao utilizar celulase imobilizada em caulim ocorre retenção de partículas no tecido, tornando difícil dizer qual é a variação de massa associada apenas ao processo de bioestonagem.

Estatisticamente (teste de Tukey, nível de confiança de 95%), a resistência à tração das amostras tratadas com a celulase livre e com a celulase imobilizada (1º ciclo) são iguais e menores que as das amostras controle. Assim, os resultados sugerem que a imobilização da celulase não minimizou a perda de resistência à tração do jeans, ao contrário do que foi observado no biopolimento da malha. A diferença nos efeitos da imobilização em relação à resistência à tração observados entre a malha e o jeans pode estar associada a acessibilidade de

cada tecido, a qual pode ser influenciada pelas características dos fios e da estrutura de fiação, bem como dos tratamentos pelos quais os tecidos foram previamente submetidos (JATURAPIREE *et al.*, 2008; SCHIMPER *et al.*, 2004; SCHIMPER *et al.*, 2011).

À medida que a celulase foi reutilizada, as amostras apresentaram menor perda de massa e maior resistência à tração ($p \leq 0,05$). Esses resultados corroboram com os resultados de estonagem e mostram perda de atividade catalítica, o que era esperado devido à incorporação das partículas de caulim ao jeans. Ao fim do terceiro ciclo de bioestonagem, a atividade da celulase foi quantificada utilizando CMC como substrato e a enzima apresentou cerca de 85% de atividade em relação à sua atividade inicial, comprovando a diminuição da atividade com o reuso da enzima. Apesar da diminuição de atividade catalítica, os resultados mostraram que é possível reutilizar a celulase imobilizada em caulim e para manter os efeitos desejados basta suplementar o processo com mais enzima imobilizada.

Tabela 6 – Efeitos da celulase livre e imobilizada por adsorção na variação de massa e resistência à tração de amostras submetidas ao processo de bioestonagem.

Amostra	Varição de massa (%)	Resistência à tração (N)
BEc¹	- 1,3 ± 0,7	56,6 ± 7,2
BEa²	-1,3 ± 1,6	53,5 ± 6,8
BEe³	- 4,6 ± 0,4	32,0 ± 4,4
BEads⁴ – 1º ciclo	- 3,5 ± 1,1	35,2 ± 9,1
BEads – 2º ciclo	- 1,9 ± 0,4	44,8 ± 6,2
BEads – 3º ciclo	- 2,0 ± 0,5	50,1 ± 5,6

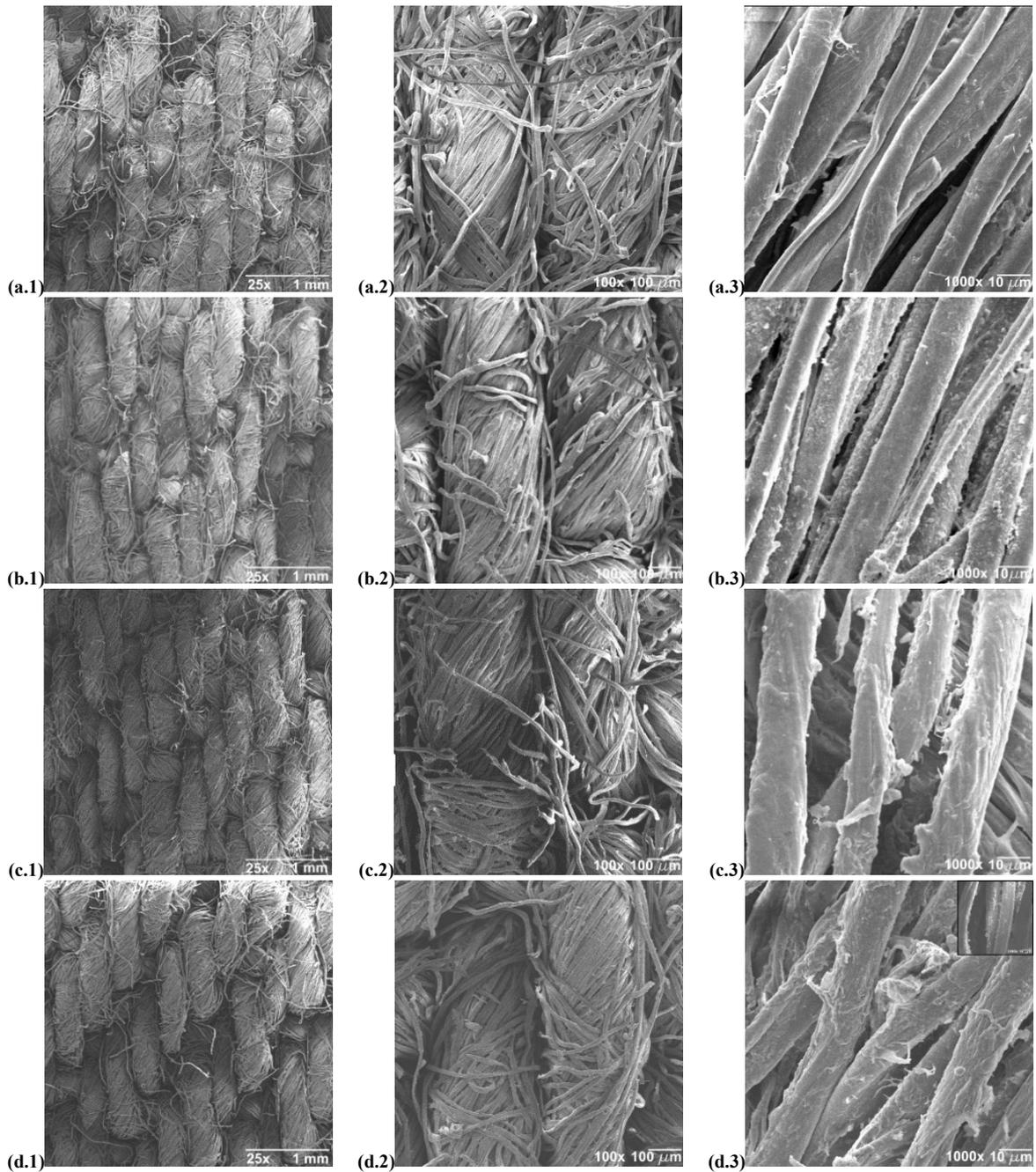
Fonte: Autora (2020).

¹ Bioestonagem com solução tampão; ² Bioestonagem com solução tampão e argila; ³ Bioestonagem com celulase livre; ⁴ Bioestonagem com celulase imobilizada por adsorção.

As superfícies das amostras de jeans tratadas com celulase e as amostras controle podem ser observadas pelas imagens de MEV apresentadas na Figura 26. Na ampliação de 25 vezes é possível observar que as amostras tratadas com celulase apresentaram menor quantidade de microfibrilas ancoradas na superfície. Na ampliação de 100 vezes, é possível notar algumas microfibrilas rompidas e danificadas nas amostras tratadas com celulase. Na ampliação de 1000 vezes, as microfibrilas das amostras tratadas com celulase apresentaram uma superfície mais rugosa que as amostras controle. Tais observações são resultado da modificação causada pela clivagem das microfibrilas protuberantes da superfície do tecido sob influência da celulase. Nas

imagens com ampliação de 1000 vezes ainda é possível observar a presença de partículas de caulim na superfície das amostras BEa e BEads.

Figura 26 – Imagens de MEV das amostras de jeans. (a) a) Bioestonagem com solução tampão; (b) Bioestonagem com solução tampão e argila; (c) Bioestonagem com celulase livre; (d) Bioestonagem com celulase imobilizada por adsorção. Os subíndices 1, 2 e 3 indicam a ampliação de 25, 100 e 1000 vezes, respectivamente.



Fonte: Autora (2020).

5.3 CONCLUSÃO

A bioestonagem é um processo consolidado na indústria têxtil para criar o efeito desbotado ao jeans. Embora proporcione inúmeros benefícios, a tecnologia tem algumas limitações. A principal limitação é a redeposição de corante, o que diminui o efeito de estonagem, proporciona coloração azul aos fios brancos do jeans (trama), bolsos e forros. Assim como no biopolimento, a perda de massa excessiva e diminuição da resistência mecânica são outras limitações do processo. Para contornar tais problemas, a imobilização tem sido proposta como uma alternativa promissora. Assim, neste trabalho foram avaliados os efeitos da celulase imobilizada em caulim na bioestonagem. A enzima imobilizada se mostrou tão efetiva quanto a enzima livre na estonagem do jeans. Embora a imobilização não tenha se mostrado efetiva para preservar resistência do jeans, ela proporcionou redução significativa na redeposição de corante. Os resultados mostraram que foi possível reutilizar a enzima imobilizada, apesar de haver diminuição dos efeitos de estonagem durante o reuso. O presente estudo é uma importante contribuição para as pesquisas relacionadas ao uso de celulase imobilizada na bioestonagem, uma vez que os trabalhos relacionados a esse tema são escassos na literatura, além de ser uma contribuição para o desenvolvimento de trabalhos de imobilização de enzimas visando a aplicação têxtil.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo estudar a imobilização da celulase em caulim e avaliar o potencial de aplicação de celulase imobilizada nos processos de bioestonagem e biopolimento, para minimizar a perda de massa e resistência à tração excessivas resultantes da aplicação da enzima livre. A imobilização da celulase em caulim proporcionou resultados promissores. As celulases imobilizadas pelo método de adsorção e ligação covalente apresentaram comportamentos próximos e capacidade de reuso semelhantes utilizando substrato solúvel (carboximetilcelulose). Por esse motivo, as duas celulases imobilizadas foram aplicadas no biopolimento. Os resultados mostraram que a celulase imobilizada alcançou efeitos de *pillling* semelhantes ou superiores aos obtidos pela enzima livre causando menor perda de resistência à tração, o sugere que a imobilização restringiu a hidrólise da celulase à superfície das fibras de algodão. Embora a celulase imobilizada por ligação covalente tenha levado a resultados superiores, as amostras tratadas com essas enzimas apresentaram menor grau de brancura e alteração das propriedades tintoriais, o que pode ser indesejável por influenciar a aceitabilidade dos produtos. Por esse motivo, associado ao fato de que a imobilização por ligação covalente ser mais onerosa, apenas a celulase imobilizada por adsorção foi utilizada no processo de bioestonagem. No processo de bioestonagem, a celulase imobilizada se mostrou tão efetiva quanto a enzima livre na estonagem do jeans, com um *backstaining* significativamente menor. Além de minimizar a perda de resistência à tração no biopolimento e diminuir o *backstaining* na bioestonagem, a imobilização também permitiu que grande parte da enzima fosse recuperada e reutilizada de forma eficiente. presente estudo é uma importante contribuição para melhoria dos processos de bioacabamento têxtil e para o desenvolvimento de trabalhos de imobilização de enzimas visando a aplicação têxtil. Ademais, esse trabalho também mostra uma outra perspectiva para imobilização de enzimas, uma vez que o principal objetivo de utilizar a técnica nos processos de bioacabamento é proporcionar produtos de melhor qualidade e o reuso é um objetivo secundário.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Explorar a incorporação do caulim ao tecido para proporcionar propriedades funcionais ao tecido, como por exemplo, acabamento antimicrobiano;
- Avaliar a capacidade do caulim em recuperar o corante liberado na solução para tentar desenvolver um processo que proporcione menor *backstaining* e ao mesmo tempo gere um efluente sem cor;
- Investigar os fatores que possam diminuir a atividade catalítica da celulase imobilizada durante os processos de bioacabamento;
- Avaliar as diferenças estruturais entre a malha e o jeans que possam justificar o motivo de a celulase imobilizada não reduzir a perda de resistência à tração na bioestonagem;
- Avaliar o potencial de aplicação da celulase imobilizada em caulim em outros processos, como por exemplo, na hidrólise de materiais celulósicos;
- Desenvolver estratégias para aumentar a atividade catalítica por massa de suporte.

REFERÊNCIAS

- ABIT. **Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção**. 2018. Disponível em: <https://www.abit.org.br>. Acesso em: 19/11/2019.
- ABRAHAM, R. E.; VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; PURI, M. Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass. **Biotechnology for Biofuels**, 7, n. 1, p. 1-12, 2014. journal article.
- ADAMIS, Z.; WILLIAMS, R. B. Bentonite, kaolin and selected clay minerals. 2005.
- AGRAWAL, B. J. Bio-Stoning of Denim-An Environmental-Friendly Approach. **Current Trends Biomedical Engineering & Biosciences**, 3, n. 3, 2017.
- ALAHAKOON, T.; KOH, J. W.; CHONG, X. W. C.; LIM, W. T. L. Immobilization of cellulases on amine and aldehyde functionalized Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 42, n. 3, p. 234-248, 2012.
- ALCÂNTARA, M.; DALTIM, D. A química do processamento têxtil. **Química nova**, 19, n. 3, p. 320-330, 1996.
- ALY, A.; MOUSTAFA, A.; HEBEISH, A. Bio-technological treatment of cellulosic textiles. **Journal of Cleaner Production**, 12, n. 7, p. 697-705, 2004.
- AN, N.; ZHOU, C. H.; ZHUANG, X. Y.; TONG, D. S. *et al.* Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Applied Clay Science**, 114, p. 283-296, 2015.
- ANDREAUS, J.; OLEKSZYSZEN, D. N.; SILVERIA, M. Processing of cellulosic textile materials with cellulases. **Cellulose and other naturally occurring polymers**, p. 11-19, 2014.
- ARAUJO, R.; CASAL, M.; CAVACO-PAULO, A. Application of enzymes for textile fibres processing. **Biocatalysis and Biotransformation**, 26, n. 5, p. 332-349, 2008.
- ASTM. E313-15 Standard practice for calculating yellowness and whiteness indices from instrumentally measured color coordinates. **Paint-Tests for Chemical, Physical, and Optical Properties; Appearance**, 2015.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R. *et al.* Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **Royal Society of Chemistry Advances**, 4, n. 4, p. 1583-1600, 2014.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A. n. *et al.* Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, 14, n. 8, p. 2433-2462, 2013.

BARRAL, S.; VILLA-GARCIA, M.; RENDUELES, M.; DIAZ, M. Interactions between whey proteins and kaolinite surfaces. **Acta Materialia**, 56, n. 12, p. 2784-2790, 2008.

BATISTELLA, M.; CARO-BRETELLE, A.; OTAZAGHINE, B.; IENNY, P. *et al.* The influence of dispersion and distribution of ultrafine kaolinite in polyamide-6 on the mechanical properties and fire retardancy. **Applied Clay Science**, 116, p. 8-15, 2015.

BATTISTI, R. N., A. M. ; Lima, J. S. ; Aguiar, C. R. L. ; Immich, A. P. S. . Uma visão geral dos processos especiais de acabamentos têxteis. **Química têxtil**, 126, p. 6-24, 2017.

BESEGATTO, S. V.; COSTA, F. N.; DAMAS, M. S. P.; COLOMBI, B. L. *et al.* Enzyme Treatment at Different Stages of Textile Processing: A Review. **Industrial Biotechnology**, 14, n. 6, p. 298-307, 2018.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N. *et al.* Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, n. 4, p. 877-882, 2006.

BHALA, R.; DHANDHANIA, V.; PERIYASAMY, A. P. Bio-finishing of fabrics. **Asian Dyer**, 9, n. 4, p. 45-49, 2012.

BHAT, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**, 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of enzymes and cells. *In: Immobilization of enzymes and cells*: Springer, 1997. p. 1-11.

BON, E. P. S.; JUNIOR, N. P.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P. *et al.* Bioprocessos para a produção de enzima. *In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A., et al (Ed.). Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008a. cap. 5, p. 95-122.

BON, E. P. S.; JUNIOR, N. P.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P. *et al.* Bioprocessos para a produção de enzima *In: Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008b. cap. 5, p. 95-122.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. *In: Immobilization of enzymes and cells*: Springer, 2013. p. 15-31.

BROADBENT, A. D. **Basic principles of textile coloration**. Society of Dyers and Colourists, 2001. 0901956767.

BUSCHLE-DILLER, G. Substrates and their structure. *In: CAVACO-PAULO, A. e GUBITZ, G. (Ed.). Textile Processing with Enzymes*. England: Woodhead Publishing Limited, 2003. cap. 2.

CAMPOS, R.; CAVACO-PAULO, A.; ANDREAUS, J.; GÜBITZ, G. Indigo-cellulase interactions. **Textile research journal**, 70, n. 6, p. 532-536, 2000.

CANTONE, S.; FERRARIO, V.; CORICI, L.; EBERT, C. *et al.* Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, 42, n. 15, p. 6262-6276, 2013.

CAO, L. **Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design**. John Wiley & Sons, 2006. 3527607080.

CAO, L.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current opinion in Biotechnology**, 14, n. 4, p. 387-394, 2003.

CARRETERO, M. I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. **Applied Clay Science**, 21, n. 3-4, p. 155-163, 2002.

CASTRO, A. M. d.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33, p. 181-188, 2010.

CAVACO-PAULO, A. Processing textile fibers with enzymes: an overview. *In*: ACS Publications, 1998.

CAVACO-PAULO, A.; ALMEIDA, L. Kinetic parameters measured during cellulase processing of cotton. **Journal of the Textile Institute**, 87, n. 1, p. 227-233, 1996.

CAVACO-PAULO, A.; ALMEIDA, L.; BISHOP, D. Effects of agitation and endoglucanase pretreatment on the hydrolysis of cotton fabrics by a total cellulase. **Textile Research Journal**, 66, n. 5, p. 287-294, 1996.

CAVACO-PAULO, A.; ALMEIDA, L. d. Cellulase hydrolysis of cotton cellulose: the effects of mechanical action, enzyme concentration and dyed substrates. **Biocatalysis**, 10, n. 1-4, p. 353-360, 1994.

CAVACO-PAULO, A.; MORGADO, J.; ALMEIDA, L.; KILBURN, D. Indigo backstaining during cellulase washing. **Textile Research Journal**, 68, n. 6, p. 398-401, 1998.

CHEN, L.; WANG, L.; WU, X.; DING, X. A process-level water conservation and pollution control performance evaluation tool of cleaner production technology in textile industry. **Journal of cleaner production**, 143, p. 1137-1143, 2017.

CHENG, H.; LIU, Q.; YANG, J.; MA, S. *et al.* The thermal behavior of kaolinite intercalation complexes-A review. **Thermochimica Acta**, 545, p. 1-13, 2012.

CHOUDHURY, A. K. Various ecofriendly finishes. *In*: CHOUDHURY, A. K. R. (Ed.). **Principles of Textile Finishing**: Elsevier, 2017. cap. 14, p. 467-525.

CHOUDHURY, A. K. R. **Principles of colour and appearance measurement: Object appearance, colour perception and instrumental measurement**. Elsevier, 2014. 0857099248.

CLARK, D. S. Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? **Trends in Biotechnology**, 12, n. 11, p. 439-443, 1994.

COPELAND, R. A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. John Wiley & Sons, 2004. 0471461857.

COSTA, F. N. **REMOÇÃO DE CORANTE ÍNDIGO REMANESCENTE NO EFLUENTE TÊXTIL DA BIOESTONAGEM POR ADSORÇÃO COM BENTONITA SÓDICA COMERCIAL E AVALIAÇÃO DO REÚSO DA ÁGUA**. 2019. 96 f. (Doutor) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COSTA, S.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications. 2005.

DASSANAYAKE, R. S.; ACHARYA, S.; ABIDI, N. Biopolymer-Based Materials from Polysaccharides: Properties, Processing, Characterization and Sorption Applications. *In*: EDEBALI, S. (Ed.). **Advanced Sorption Process Applications**: IntechOpen, 2018.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; DE MOARES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização *In*: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6, p. 123-150.

DOCHIA, M.; SIRGHIE, C.; KOZŁOWSKI, R. M.; ROSKWITALSKI, Z. Handbook of Natural Fibres: Volume 1: Types, Properties and Factors Affecting Breeding and Cultivation Cotton fibres *In*: KOZŁOWSKI, R. M. (Ed.). **Handbook of Natural Fibres: Types, Properties and Factors Affecting Breeding and Cultivation** United States: Woodhead Publishing Limited, 2012. cap. 2, p. 11-22.

DODOR, D. E.; HWANG, H.-M.; EKUNWE, S. I. Oxidation of anthracene and benzo [a] pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, 35, n. 2-3, p. 210-217, 2004.

EL-RAZIK, T. A.; OMER, A. M.; HASSAN, M. Methods of Enzyme Immobilization. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, 7, n. 6, p. 385-392, 2016.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, n. 3, p. 353-364, 2002.

EUN, H.-M. Enzymes and Nucleic Acids: General Principles. *In*: EUN, H.-M. (Ed.). **Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology**. United States: Academic Press Limited, 1996. cap. 1, p. 1-108.

FIORITO, T. M.; ICOZ, I.; STOTZKY, G. Adsorption and binding of the transgenic plant proteins, human serum albumin, β -glucuronidase, and Cry3Bb1, on montmorillonite and kaolinite: Microbial utilization and enzymatic activity of free and clay-bound proteins. **Applied Clay Science**, 39, n. 3-4, p. 142-150, 2008.

GALANTE, Y. M.; FORMANTICI, C. Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. **Current organic chemistry**, 7, n. 13, p. 1399-1422, 2003.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GARCIA, A.; OH, S.; ENGLER, C. R. Cellulase immobilization on Fe₃O₄ and characterization. **Biotechnology and Bioengineering**, 33, n. 3, p. 321-326, 1989.

GARDOLINSKI, J. E.; WYPYCH, F.; CANTÃO, M. P. Esfoliação e hidratação da caulinita após intercalação com uréia. **Química Nova**, 24, p. 761-767, 2001.

GIANFREDA, L.; BOLLAG, J.-M. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. **Soil Science Society of America Journal**, 58, n. 6, p. 1672-1681, 1994.

GREWAL, J.; AHMAD, R.; KHARE, S. Development of cellulase-nanoconjugates with enhanced ionic liquid and thermal stability for in situ lignocellulose saccharification. **Bioresource technology**, 242, p. 236-243, 2017.

GRISHANOV, S. Structure and properties of textile materials. *In*: CLARK, M. (Ed.). **Handbook of Textile and Industrial Dyeing**: Elsevier, 2011. v. 1, cap. 2, p. 28-63.

GUNDA, N. S. K.; SINGH, M.; NORMAN, L.; KAUR, K. *et al.* Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. **Applied Surface Science**, 305, p. 522-530, 2014.

GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P.; MARKOV, A. V.; SINITSYNA, O. A. *et al.* Study of protein adsorption on indigo particles confirms the existence of enzyme-indigo interaction sites in cellulase molecules. **Journal of Biotechnology**, 87, n. 1, p. 83-90, 2001.

HABEEB, A. F. S. A.; HIRAMOTO, R. Reaction of proteins with glutaraldehyde. **Archives of biochemistry and biophysics**, 126, n. 1, p. 16-26, 1968.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HEIKINHEIMO, L. Trichoderma reesei cellulases in processing of cotton. 2002.

HEMMATINEJAD, N.; VAHABZADEH, F.; KORDESTANI, S. S. Effect of surfactants on enzymatic hydrolysis of cellulosic fabric. 2002.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and microbial technology**, 48, n. 2, p. 107-122, 2011.

HERRINGTON, T. M.; CLARKE, A. Q.; WATTS, J. C. The surface charge of kaolin. **Colloids and Surfaces**, 68, n. 3, p. 161-169, 1992.

HOLMBERG, K. Interactions between surfactants and hydrolytic enzymes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 168, p. 169-177, 2018.

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of chemical biology**, 6, n. 4, p. 185-205, 2013.

HOPWOOD, D.; ALLEN, C.; MCCABE, M. The reactions between glutaraldehyde and various proteins. An investigation of their kinetics. **The Histochemical Journal**, 2, n. 2, p. 137-150, 1970.

HUANG, G.; JIANG, R. H.; JIA, Y. T., 2013, **Effects of surfactants on the activity of acid cellulase enzyme**. Trans Tech Publ. 527-530.

HUNG, T.-C.; FU, C.-C.; SU, C.-H.; CHEN, J.-Y. *et al.* Immobilization of cellulase onto electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofibrous membranes and its application to the reducing sugar production from microalgae. **Enzyme and microbial technology**, 49, n. 1, p. 30-37, 2011.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T. *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

JATURAPIREE, A.; EHRHARDT, A.; GRONER, S.; ÖZTÜRK, H. B. *et al.*, 2008, **Treatment in Swelling Solutions Modifying Cellulose Fiber Reactivity–Part 1: Accessibility and Sorption**. Wiley Online Library. 39-49.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. **Journal of cleaner production**, 42, p. 228-240, 2013.

JEON, J. G.; KIM, H. C.; PALEM, R. R.; KIM, J. *et al.* Cross-linking of cellulose nanofiber films with glutaraldehyde for improved mechanical properties. **Materials Letters**, 250, p. 99-102, 2019.

JUNG, H.-S.; MOON, D.-S.; LEE, J.-K. Quantitative analysis and efficient surface modification of silica nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, 2012, p. 48, 2012.

KAHRAMAN, M. V.; BAYRAMOĞLU, G.; KAYAMAN-APOHAN, N.; GÜNGÖR, A. α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. **Food Chemistry**, 104, n. 4, p. 1385-1392, 2007.

KARAGULYAN, H. K.; GASPARYAN, V. K.; DECKER, S. R. Immobilization of fungal β -glucosidase on silica gel and kaolin carriers. *In: Biotechnology for Fuels and Chemicals*: Springer, 2007. p. 159-167.

KARAGULYAN, H. K.; GASPARYAN, V. K.; DECKER, S. R. Immobilization of Fungal β -Glucosidase on Silica Gel and Kaolin Carriers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 146, n. 1, p. 39-47, 2008.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes—learning from past successes and failures. **Trends in biotechnology**, 11, n. 11, p. 471-478, 1993.

KHANJANZADEH, H.; BEHROOZ, R.; BAHRAMIFAR, N.; GINDL-ALTMUTTER, W. *et al.* Surface chemical functionalization of cellulose nanocrystals by 3-aminopropyltriethoxysilane. **International journal of biological macromolecules**, 106, p. 1288-1296, 2018.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. **Trends in Biotechnology**, 5, n. 9, p. 255-261, 1987.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and microbial technology**, 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

KUMAR, V.; MEENAKSHISUNDARAM, S.; SELVAKUMAR, N. Conservation of cellulase enzyme in biopolishing application of cotton fabrics. **Journal of the Textile Institute**, 99, n. 4, p. 339-346, 2008.

LENTING, H.; WARMOESKERKEN, M. Guidelines to come to minimized tensile strength loss upon cellulase application. **Journal of biotechnology**, 89, n. 2-3, p. 227-232, 2001.

LENTING, H. B. M. Practical aspects of handling enzymes. *In*: CAVACO-PAULO, A. e GUBITZ, G. (Ed.). **Textile processing with enzymes**: Elsevier, 2003. cap. 5, p. 158-198.

LENTING, H. B. M.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. Mechanism of interaction between cellulase action and applied shear force, an hypothesis. **Journal of biotechnology**, 89, n. 2-3, p. 217-226, 2001.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, 42, n. 15, p. 6236-6249, 2013.

LIMA, J. S. **Imobilização de celulase em nanopartículas magnéticas encapsuladas em poli (metacrilato de metila)**. 2016. 85 f. (Mestrado) - Engenharia Química, Univeridade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LIMA, J. S.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; SOUZA, A. A. U. *et al.* Cellulase immobilization on magnetic nanoparticles encapsulated in polymer nanospheres. **Bioprocess and biosystems engineering**, 40, n. 4, p. 511-518, 2017.

LIMA, J. S.; COSTA, F. N.; BASTISTELLA, M. A.; DE ARAÚJO, P. H. H. *et al.* Functionalized kaolin as support for endoglucanase immobilization. **Bioprocess and biosystems engineering**, 42, n. 7, p. 1165-1173, 2019.

LIN, Y.; LIU, X.; XING, Z.; GENG, Y. *et al.* Preparation and characterization of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for cellulase immobilization. **Cellulose**, 24, n. 12, p. 5541-5550, 2017.

LINDER, M.; MATTINEN, M. L.; KONTTELI, M.; LINDEBERG, G. *et al.* Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. **Protein Science**, 4, n. 6, p. 1056-1064, 1995.

LIU, J.; OTTO, E.; LANGE, N.; HUSAIN, P. *et al.* Selecting cellulases for bio-polishing based on enzyme selectivity and process conditions. **Textile Chemist and Colorist and American Dyestuff Reporter**, 32, n. 5, p. 30-36, 2000.

LIU, S. **Bioprocess engineering: kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design**. Oxford, UK: : Elsevier, 2012.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MADHU, A.; CHAKRABORTY, J. Developments in application of enzymes for textile processing. **Journal of cleaner production**, 145, p. 114-133, 2017.

MAGAZINE, T. **Knits and Wovens: What's the Difference?** , 2009. Disponível em: <https://www.threadsmagazine.com/2009/01/05/knits-wovens-whats-the-difference>. Acesso em: 12/01/2020.

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. **Cellulose**, 10, n. 2, p. 159-169, 2003. journal article.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Enzimas. *In*: MARZZOCO, A. e TORRES, B. B. (Ed.). **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and microbial technology**, 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MIETTINEN-OINONEN, A. *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. **VTT PUBLICATIONS** 2004.

MIETTINEN-OINONEN, A. Cellulases in the textile industry. *In*: POLAINA, J. e MACCABE, A. P. (Ed.). **Industrial enzymes: structure, function and applications**. Netherlands: Springer, 2007. cap. 4, p. 51-64.

MIETTINEN-OINONEN, A.; HEIKINHEIMO, L.; BUCHERT, J.; MORGADO, J. *et al.* The role of *Trichoderma reesei* cellulases in cotton finishing. **AATCC Review**, 1, n. 1, p. 33-35, 2001.

MIETTINEN-OINONEN, A.; LONDESBOROUGH, J.; JOUTSJOKI, V.; LANTTO, R. *et al.* Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. **Enzyme and Microbial Technology**, 34, n. 3-4, p. 332-341, 2004.

MIETTINEN-OINONEN, A. S. K.; ELOVAINIO, M. J.; SUOMINEN, P. L. Cellulase composition for biofinishing cellulose-containing textile materials. United States. US5858767A 1999.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, 37, n. 5, p. 790-802, 2004.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINOLTA, K. Comunicação precisa da cor: controle de cor da percepção à instrumentação. **Asaka: Konica Minolta Sensing**, 2007.

MISHRA, A.; SARDAR, M. Cellulase assisted synthesis of nano-silver and gold: application as immobilization matrix for biocatalysis. **International journal of biological macromolecules**, 77, p. 105-113, 2015.

MIZUTANI, C.; SETHUMADHAVAN, K.; HOWLEY, P.; BERTONIERE, N. Effect of a nonionic surfactant on *Trichoderma* cellulase treatments of regenerated cellulose and cotton yarns. **Cellulose**, 9, n. 1, p. 83-89, 2002.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F. *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 29, n. 2, p. 205-220, 2015.

MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. Colour difference ΔE -A survey. **Machine Graphics and Vision**, 20, n. 4, p. 383-411, 2011.

MONDAL, M.; ISLAM, M.; AHMED, F. Modification of cotton fibre with functionalized silane coupling agents Vinyltriethoxysilane and Aminopropyltriethoxy-silane. **Journal of Textile Science and Engineering**, 8, n. 3, p. 1-8, 2018.

MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, 3, n. 5, p. 371-384, 1978.

MONTAZER, M.; HARIFI, T. Introduction: Textile finishing. *In*: MONTAZER, M. e HARIFI, T. (Ed.). **Nanofinishing of Textile Materials**. United States: Elsevier, 2018. cap. 1, p. 1-17.

MURRAY, H. H. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. **Applied clay science**, 17, n. 5-6, p. 207-221, 2000.

MURRAY, H. H. Kaolin Applications. *In*: MURRAY, H. H. (Ed.). **Developments in Clay Science**: Elsevier, 2006a. v. 2, cap. 5, p. 85-109.

MURRAY, H. H. Structure and composition of the clay minerals and their physical and chemical properties. **Developments in clay science**, 2, p. 7-31, 2006.

MURRAY, H. H. Structure and Composition of the Clay Minerals and their Physical and Chemical Properties. *In*: MURRAY, H. H. (Ed.). **Developments in Clay Science**: Elsevier, 2006b. v. 2, cap. 2, p. 7-31.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008. 071677108X.

NIERSTRASZ, V.; WARMOESKERKEN, M. Process engineering and industrial enzyme applications. *In*: CAVACO-PAULO, A. e GUBITZ, G. M. (Ed.). **Textile processing with enzymes England**: Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 2003. cap. 4, p. 120–157.

NISHA, S.; KARTHICK, S. A.; GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, 1, n. 3, p. 148-155, 2012.

Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization—recent experimental progress. **Enzyme and Microbial Technology**, 33, n. 2-3, p. 137-149, 2003.

OKUDA, K.; URABE, I.; YAMADA, Y.; OKADA, H. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. **Journal of fermentation and bioengineering**, 71, n. 2, p. 100-105, 1991.

OLIVEIRA, M. H. d. Principais matérias-primas utilizadas na indústria têxtil. 1997.

OOSHIMA, H.; SAKATA, M.; HARANO, Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose by surfactant. **Biotechnology and bioengineering**, 28, n. 11, p. 1727-1734, 1986.

OPENSTAX. **Biology**. Houston, Texas, 2013. Disponível em:
<https://openstax.org/details/books/biology#resources>.

PAUL, R. Functional finishes for textiles: an overview. *In*: PAUL, R. (Ed.). **Functional Finishes for Textiles, Improving Comfort, Performance and Protection**. Amsterdam: Elsevier, 2014a. cap. 1, p. 1-14.

PAUL, R. Functional finishes for textiles: an overview. *In*: PAUL, R. (Ed.). **Functional Finishes for Textiles, Improving Comfort, Performance and Protection**: Woodhead Publishing, 2014b. cap. 1, p. 1-14.

PAULO, A. C. A., Luís de; Bishop, David. Cellulase activities and finishing effects. **Textile chemist and colorist**, 28, n. 6, p. 28-32, 1996.

PAZARLIOĞLU, N. K.; SARIİŞİK, M.; TELEFONCU, A. Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases. **Process Biochemistry**, 40, n. 2, p. 767-771, 2005.

- PERE, J.; PUOLAKKA, A.; NOUSIAINEN, P.; BUCHERT, J. Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn. **Journal of Biotechnology**, 89, n. 2-3, p. 247-255, 2001.
- PÉREZ, S.; MAZEAU, K. Conformations, structures, and morphologies of celluloses. *In: DUMITRIU, S. (Ed.). Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility.* United States of America: CRC Press, 2004. p. 53-80.
- POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.** Springer Netherlands, 2007.
- PRASAD, M.; REID, K.; MURRAY, H. Kaolin: processing, properties and applications. **Applied Clay Science**, 6, n. 2, p. 87-119, 1991.
- PUJIASIH, S.; MASYKUR, A.; KUSUMANINGSIH, T.; SAPUTRA, O. A. Silylation and characterization of microcrystalline cellulose isolated from Indonesian native oil palm empty fruit bunch. **Carbohydrate polymers**, 184, p. 74-81, 2018.
- PURANEN, T.; ALAPURANEN, M.; VEHEMAANPERÄ, J. *Trichoderma* enzymes for textile industries. *In: Biotechnology and biology of Trichoderma:* Elsevier, 2014. cap. 26, p. 351-362.
- QI, H.; DUAN, H.; WANG, X.; MENG, X. *et al.* Preparation of magnetic porous terpolymer and its application in cellulase immobilization. **Polymer Engineering & Science**, 55, n. 5, p. 1039-1045, 2015.
- RAFIEIAN, F.; MOUSAVI, M.; YU, Q.; JONOBI, M. Amine functionalization of microcrystalline cellulose assisted by (3-chloropropyl) triethoxysilane. **International journal of biological macromolecules**, 130, p. 280-287, 2019.
- RAHMAN, M. B. A.; TAJUDIN, S. M.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, R. N. Z. R. A. *et al.* Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. **Applied Clay Science**, 29, n. 2, p. 111 – 116, 2005.
- RATANAKHANOKCHAI, K.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAUKOON, C. *et al.* *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization. *In: MATOVIC, M. D. (Ed.). Biomass Now-Cultivation and Utilization:* IntechOpen, 2013.
- REZENDE, E. I. P. D.; MANGRICH, A. S.; MANGONI, A. P.; SCARPELLINI, M. *et al.* Estudo espectroscópico de composto obtido da reação no estado sólido entre um complexo mononuclear de vanádio(IV) e caulinita. **Química Nova**, 35, p. 257-261, 2012.
- RODWELL, V. W. **Harper: bioquímica ilustrada.** McGraw-Hill, 2015. 6071513685.
- ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; DAWIDOWICZ, A.; ILCZUK, Z. *et al.* Immobilization of cellulase and D-xylanase complexes from *Aspergillus terreus* F-413 on controlled porosity glasses. **Enzyme and microbial technology**, 7, n. 8, p. 395-400, 1985.

ROMERA, C. d. O.; DE OLIVEIRA, D.; DE ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Biobased Ester 2-(10-Undecenoyloxy) ethyl Methacrylate as an Asymmetrical Diene Monomer in Thiol–Ene Polymerization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 58, n. 46, p. 21044-21055, 2019.

RUSSELL, P. J. **iGenetics: A Molecular Approach**. 3 ed. Pearson, 2009. 864 p.

SANKARRAJ, N.; NALLATHAMBI, G. Enzymatic biopolishing of cotton fabric with free/immobilized cellulase. **Carbohydrate polymers**, 191, p. 95-102, 2018.

SARAVANAN, D.; VASANTHI, N.; RAMACHANDRAN, T. A review on influential behaviour of biopolishing on dyeability and certain physico-mechanical properties of cotton fabrics. **Carbohydrate polymers**, 76, n. 1, p. 1-7, 2009.

SARKAR, J. M.; LEONOWICZ, A.; BOLLAG, J.-M. Immobilization of enzymes on clays and soils. **Soil Biology and Biochemistry**, 21, n. 2, p. 223-230, 1989.

SAYILKAN, H.; ERDEMOĞLU, S.; ŞENER, Ş.; SAYILKAN, F. *et al.* Surface modification of pyrophyllite with amino silane coupling agent for the removal of 4-nitrophenol from aqueous solutions. **Journal of colloid and interface science**, 275, n. 2, p. 530-538, 2004.

SCHIMPER, C.; KECKEIS, R.; IBANESCU, C.; BURTSCHER, E. *et al.* Influence of steam and dry heat pretreatment on fibre properties and cellulase degradation of cellulosic fibres. **Biocatalysis and Biotransformation**, 22, n. 5-6, p. 383-389, 2004.

SCHIMPER, C. B.; IBANESCU, C.; BECHTOLD, T. Surface activation of dyed fabric for cellulase treatment. **Biotechnology journal**, 6, n. 10, p. 1280-1285, 2011.

SCHINDLER, W. D.; HAUSER, P. J. Anti-pilling finishes. *In: Chemical Finishing of Textiles*: Woodhead Publishing, 2004. cap. 11, p. 129-137.

SCHINDLER, W. D.; HAUSER, P. J. Finishing with enzymes: bio-finishes for cellulose. *In: SCHINDLER, W. D. e HAUSER, P. J. (Ed.). Chemical finishing of textiles*. England: Woodhead Publishing Ltd, 2004. cap. 17.

ŠEKULJICA, N. Ž.; PRLAINOVIĆ, N. Ž.; JOVANOVIĆ, J. R.; STEFANOVIĆ, A. B. *et al.* Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 39, n. 3, p. 461-472, 2016.

SHELDON, R. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA® s): stable and recyclable biocatalysts. : Portland Press Ltd. 2007.

SHELDON, R.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**, 23, n. 3-4, p. 141-147, 2005.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied microbiology and biotechnology**, 92, n. 3, p. 467-477, 2011.

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

SILVA, L. G. d. M. d. **Biopurga de malha de algodão utilizando processo enzimático com associação de enzimas**. 2013. (Mestre em Engenharia Química) -, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ŠIMIĆ, K.; SOLJAČIĆ, I.; PUŠIĆ, T. Application of cellulases in the process of finishing **Tekstilec** 58, n. 1, p. 47-56, 2015.

SIMON, P. **Imobilização de celulase em nanopartículas polimérica de poli(metacrilato de metila) via polimerização em miniemulsão**. 2015. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) -, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

SIMON, P.; LIMA, J. S.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, D. d. *et al.* Cellulase immobilization on poly (methyl methacrylate) nanoparticles by miniemulsion polymerization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 35, n. 2, p. 649-658, 2018.

SINEGANI, A. A. S.; EMTIAZI, G.; SHARIATMADARI, H. Sorption and immobilization of cellulase on silicate clay minerals. **Journal of colloid and interface science**, 290, n. 1, p. 39-44, 2005.

SIRISHA, V.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *In: Advances in food and nutrition research*: Elsevier, 2016. v. 79, p. 179-211.

SOARES, J. C.; MOREIRA, P. R.; QUEIROGA, A. C.; MORGADO, J. *et al.* Application of immobilized enzyme technologies for the textile industry: a review. **Biocatalysis and Biotransformation**, 29, n. 6, p. 223-237, 2011.

TANASKOVIĆ, S. J.; JOKIĆ, B.; GRBAVČIĆ, S.; DRVENICA, I. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. **Applied Clay Science**, 135, p. 103-111, 2017.

TANIGUCHI, M.; HOSHINO, K.; WATANABE, K.; SUGAI, K. *et al.* Production of soluble sugar from cellulosic materials by repeated use of a reversibly soluble-autoprecipitating cellulase. **Biotechnology and bioengineering**, 39, n. 3, p. 287-292, 1992.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized enzymes: methods and applications. *In: Biocatalysis-from discovery to application*: Springer, 1999. p. 95-126.

TOMIMATSU, Y.; JANSEN, E.; GAFFIELD, W.; OLSON, A. Physical chemical observations on the α -chymotrypsin glutaraldehyde system during formation of an insoluble derivative. **Journal of Colloid and Interface Science**, 36, n. 1, p. 51-64, 1971.

UEDA, M.; KOO, H.; WAKIDA, T.; YOSHIMURA, Y. Cellulase Treatment of Cotton Fabrics: Part II: Inhibitory Effect of Surfactants on Cellulase Catalytic Reaction. **Textile research journal**, 64, n. 10, p. 615-618, 1994.

VIDINHA, P.; AUGUSTO, V.; ALMEIDA, M.; FONSECA, I. *et al.* Sol-gel encapsulation: an efficient and versatile immobilization technique for cutinase in non-aqueous media. **Journal of biotechnology**, 121, n. 1, p. 23-33, 2006.

WALT, D. R.; AGAYN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. : Elsevier 1994.

WU, L.; YUAN, X.; SHENG, J. Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. **Journal of Membrane Science**, 250, n. 1-2, p. 167-173, 2005.

WU, T.; DU, Y.; YAN, N.; FARNOOD, R. Cellulose fiber networks reinforced with glutaraldehyde-chitosan complexes. **Journal of Applied Polymer Science**, 132, n. 33, 2015.

XIANG, J.; FAN, J.; CHEN, N.; CHEN, J. *et al.* Interaction of cellulase with sodium dodecyl sulfate at critical micelle concentration level. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 49, n. 2, p. 175-180, 2006.

XU, J.; SUN, J.; WANG, Y.; SHENG, J. *et al.* Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. **Molecules**, 19, n. 8, p. 11465-11486, 2014.

YACHMENEV, V. G.; BERTONIERE, N. R.; BLANCHARD, E. J. Intensification of the bio-processing of cotton textiles by combined enzyme/ultrasound treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 77, n. 5, p. 559-567, 2002.

YANG, C.; MO, H.; ZANG, L.; CHEN, J. *et al.* Surface functionalized natural inorganic nanorod for highly efficient cellulase immobilization. **Royal Society of Chemistry Advances**, 6, n. 80, p. 76855-76860, 2016.

YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X. *et al.* Cellulase immobilization onto the reversibly soluble methacrylate copolymer for denim washing. **Carbohydrate polymers**, 95, n. 2, p. 675-680, 2013.

YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X. *et al.* Noncovalent immobilization of cellulases using the reversibly soluble polymers for biopolishing of cotton fabric. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 62, n. 4, p. 494-501, 2014a.

YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X. *et al.* A promising approach for bio-finishing of cotton using immobilized acid-cellulase. **Fibers and Polymers**, 15, n. 5, p. 932-937, 2014b.

YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X. *et al.* Noncovalent immobilization of cellulases using the reversibly soluble polymers for biopolishing of cotton fabric. **Biotechnology and applied biochemistry**, 62, n. 4, p. 494-501, 2015.

YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X. *et al.* Immobilization of cellulases on the reversibly soluble polymer Eudragit S-100 for cotton treatment. **Engineering in Life Sciences**, 13, n. 2, p. 194-200, 2013.

ZANG, L.; QIU, J.; WU, X.; ZHANG, W. *et al.* Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization. **Industrial & engineering chemistry research**, 53, n. 9, p. 3448-3454, 2014.

ZHANG, D.; HEGAB, H. E.; LVOV, Y.; DALE SNOW, L. *et al.* Immobilization of cellulase on a silica gel substrate modified using a 3-APTES self-assembled monolayer. **SpringerPlus**, 5, n. 1, p. 1-20, 2016.

ZHANG, W.; QIU, J.; FENG, H.; ZANG, L. *et al.* Increase in stability of cellulase immobilized on functionalized magnetic nanospheres. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 375, p. 117-123, 2015.

ZHOU, J. Immobilization of cellulase on a reversibly soluble– insoluble support: properties and application. **Journal of agricultural and food chemistry**, 58, n. 11, p. 6741-6746, 2010.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. **Molecules**, 19, n. 9, p. 14139-14194, 2014.