



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE ALFA-AMILASE (TERMAMYL[®]
2X) NA RESINA DUOLITE[®] A-568**

FERNANDA SANTOS SILVA

Uberlândia – MG

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE ALFA-AMILASE (TERMAMYL[®] 2X) NA RESINA DUOLITE[®] A-568

Fernanda Santos Silva

Orientadores: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

Profa. Dra. Miriam Maria de Resende

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia – MG

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2020	Silva, Fernanda Santos, 1990- Estudo da imobilização de alfa - amilase (Termamyl® 2X) na resina Duolite® A-568 [recurso eletrônico] / Fernanda Santos Silva. - 2020. Orientador: Eloizio Júlio Ribeiro. Coorientadora: Miriam Maria de Resende. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.759 Inclui bibliografia. 1. Engenharia química. I. Ribeiro, Eloizio Júlio, 1952- , (Orient.). II. Resende, Miriam Maria de, 1971- (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. IV. Título. CDU: 66.0
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado, 23/2020, PPGEQ				
Data:	26 de novembro 2020	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	11822EQU007				
Nome do Discente:	Fernanda Santos Silva				
Título do Trabalho:	Estudo da imobilização de alfa-amilase (Termamyl 2X) na resina Duolite A-568				
Área de concentração:	Desenvolvimento de processos químicos				
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas e bioprodutos em processos industriais				

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Eliana Setsuko Kamimura - FZEA/USP; Fabiana Regina Xavier Batista - PPGEQ/UFU; Juliana de Souza Ferreira - PPGEQ/UFU; Miriam Maria de Resende - PPGEQ/UFU, coorientadora e Eloízio Júlio Ribeiro - PPGEQ/UFU, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Maria de Resende, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/11/2020, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Regina Xavier Batista, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/11/2020, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Souza Ferreira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/11/2020, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eloizio Julio Ribeiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/11/2020, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliana Setsuko Kamimura, Usuário Externo**, em 27/11/2020, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2411232** e o código CRC **420DE88A**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Nossa Senhora, a Deus e aos meus protetores espirituais por iluminar meus caminhos sempre, me ajudar a ter resiliência e inspiração, juntamente com o Universo que deixou tudo fluir para concluir mais essa etapa. Aos meus pais preciosos e muito amados, Maria Madalena Santos Silva (Madazinha) e Paulo Teixeira Silva (Bin), pelo amor mais puro e leve, pelo apoio incondicional, pelos diálogos, risadas, acolhimento contínuo, fonte de motivação, coragem e inspiração, além da confiança depositada em mim. À minha querida irmã Paula Santos Silva (Tica), por todo apoio emocional, amor, abertura, disposição para escuta e sabedoria para me acalantar. Aos meus avós e Mara (*in memoriam*), aos meus tios (as) e primos (as) que de maneira direta e indireta sempre me apoiaram, mesmo à distância.

Aos meus amigos tão especiais que a dança de salão me trouxe: Érica Santos (unidas pelo “gancho do samba”), o quarteto (Rafael Faria, Will Arruda e Luiza Muniz,) e Mariana Vinhal, pelos momentos incríveis de dança, risadas, descontração, muitas conversas, encontros infinitos, suporte emocional e muita alegria sempre. Às minhas amadas amigas e irmãs do coração, Marina Oliveira Rodrigues, Rhaila Carvalho Said, Mayara Moreira, Ananda Gabriela e Cecília Godilho por toda a paciência, cumplicidade, companheirismo, amizade, carinho, amor e escuta, mesmo à distância. Agradeço também a Raphael Boaventura por todo apoio, risadas, recepção calorosa e incrível nas minhas visitas e por tornar cada viagem ao seu lado um evento único e autêntico.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro, que me instruiu com todo carinho, leveza e dedicação em meio às dificuldades, sempre de bom humor, muito paciente, carismático, receptivo para as minhas “dúvidas infinitas” e disposto a ajudar. Obrigada por todo o apoio.

Agradeço imensamente à minha orientadora Profa. Dra. Miriam Maria de Resende, pelo acompanhamento firme em toda a pesquisa, assistência contínua, disposição para tentar “mais uma repetiçãozinha”, pela paciência para as reuniões longas e frequentes, pelas instruções, direcionamentos e também pelos momentos de descontração e risadas, além da persistência, resiliência, empatia, humanidade, carisma e bom humor sempre. Obrigada por ser a grande “Mãezona” para mim e para o NUCBIO e por sempre enxergar alternativas para algumas análises que pareciam mais complexas.

Agradeço à Profa. Juliana de Souza Ferreira, pelas críticas construtivas nessa dissertação e por ter feito a recepção mais doce, gentil e risonha quando cheguei à UFU,

sempre espalhando alegria para todos com a sua presença radiante e deixando o meu primeiro contato com o mestrado muito agradável e feliz.

Aos companheiros do laboratório NUCBIO pelo auxílio e sugestões que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação, além de permitirem momentos de descontração no laboratório e na UFU. Em especial, a Flávia Pio e Ana Carolina Tolentino, grandes companheiras de laboratório, por toda a cumplicidade, apoio emocional, amizade, leveza, risadas, carinho, escuta e suporte na pesquisa. A Arthur Godoy, que com seu carisma, altruísmo e empatia esteve sempre disposto a ajudar, além de deixar o ambiente mais descontraído. A Carla Sousa, pela paciência, empatia, suporte e boa vontade sempre para colaborar com essa pesquisa.

Aos amigos que a Pós-graduação me presenteou, Ana Carolina Mocci, Daiane Ribeiro e Marcus Paulo Barbosa Martins, que compartilharam os desafios da trajetória e forneceram auxílios técnicos, mas também a tornaram mais leve e muito especial, com encontros risonhos, caronas, sugestões de filmes para relaxar e de podcasts interessantes, além das conversas sobre diversos assuntos sempre.

A Matheus Maia Beraldo, que com seu coração grande e generoso, sempre me apoiou. Obrigada pelo carinho, doçura, acolhimento, paciência, suporte técnico e emocional. Obrigada também pelo apoio contínuo e amoroso da “família verde”.

Aos membros da banca pelas contribuições importantes ao trabalho. Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química que contribuíram de forma direta e indireta para a pesquisa. Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pela oportunidade, estrutura e recursos; e ao CNPq pelo financiamento de minha bolsa de mestrado.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.” (Eduardo Galeano)

“A vida é fluida, é movimento e transformação. Apegar-se às coisas é ilusão. Você é um ser humano livre. Sem apego e aversão, o caminho é livre.” (Monja Coen)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE SÍMBOLOS	5
RESUMO	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	3
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Amido	4
2.2 Composição química do amido.....	6
2.2.1 Amilose.....	7
2.2.2 Amilopectina	8
2.2.3 Outros componentes do amido	9
2.3 Natureza semicristalina do amido.....	10
2.4 Amido de milho	11
2.5 Hidrólise do amido.....	12
2.5.1 Hidrólise enzimática do amido	13
2.5.2 Hidrólise convencional do amido	14
2.6 Enzimas.....	16
2.6.1 Enzimas amilolíticas.....	17
2.7 Imobilização.....	19
2.7.1 Métodos de imobilização.....	22
2.7.2 Suportes para imobilização.....	26
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material.....	29
3.1.1 Enzima	29
3.1.2 Suporte para imobilização	29
3.1.3 Substrato e outros reagentes	30
3.2 Unidade experimental	30
3.3 Metodologia experimental	32
3.3.1 Gelatinização do amido	32
3.3.2 Determinação da atividade da enzima livre.....	32

3.3.3	Determinação da atividade da enzima imobilizada	33
3.3.4	Influência do pH na atividade da enzima livre	33
3.3.5	Determinação da estabilidade da Termamyl® 2X livre em relação ao pH	34
3.3.6	Imobilização da enzima Termamyl® 2X por adsorção ao suporte	34
3.3.7	Imobilização da enzima Termamyl® 2X por ligação cruzada com glutaraldeído. 40	
3.3.8	Determinação da atividade da enzima Termamyl® 2X no ponto ótimo da imobilização por ligação cruzada com variação de pH do meio reacional	42
3.3.9	Determinação da estabilidade da enzima Termamyl® 2X no ponto ótimo da imobilização por ligação cruzada em relação ao pH	43
3.3.10	Estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada por adsorção e da enzima imobilizada por ligação cruzada	43
3.3.11	Reusos da enzima Termamyl® 2X na condição ótima de imobilização por ligação cruzada	44
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO		45
4.1	Influência do pH na atividade da enzima livre	45
4.2	Estabilidade da Termamyl® 2X livre em relação ao pH	46
4.3	Análise dos testes preliminares à imobilização	49
4.4	Análise e otimização da imobilização da enzima Termamyl® 2X em resina Duolite A-56850	
4.4.1	Atividade da enzima imobilizada (AI)	51
4.4.2	Atividade Recuperada (AR)	57
4.4.3	Eficiência (Ef).....	63
4.4.4	Otimização das três respostas AI, AR e Ef simultaneamente utilizando o software Maple 17	69
4.4.5	Validações complementares para as respostas AI, AR e Ef	70
4.5	Análise dos testes preliminares à imobilização da enzima Termamyl® 2X por ligação cruzada com glutaraldeído	73
4.6	Análise e otimização da imobilização de Termamyl® 2X por ligação cruzada com glutaraldeído	73
4.6.1	Atividade da enzima imobilizada (AI) por ligação cruzada com glutaraldeído .	74
4.6.2	Atividade recuperada (AR) da imobilização por ligação cruzada com glutaraldeído	77
4.6.3	Eficiência (Ef) da imobilização por ligação cruzada com glutaraldeído	80

4.6.4	Otimização simultânea das três respostas – AI, AR e Ef - na imobilização por ligação cruzada e validação	82
4.6.5	Comparação entre os processos de imobilização	85
4.6.6	Atividade da enzima Termamyl® 2X na condição selecionada pelo delineamento composto central do estudo da imobilização por ligação cruzada com variação de pH do meio reacional.	87
4.6.7	Estabilidade da enzima Termamyl® 2X na condição selecionada pelo delineamento composto central do estudo da imobilização por ligação cruzada em relação ao pH.....	88
4.6.8	Estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada por adsorção e da enzima imobilizada por ligação cruzada	90
4.6.9	Reusos da enzima Termamyl® 2X na condição selecionada pelo delineamento composto central do estudo da imobilização por ligação cruzada.....	91
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES		92
5.1	Sugestões para trabalhos futuros.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		94
APÊNDICE		113

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Grânulos de amido de acordo com a fonte vegetal. Imagens de amido nativo de várias fontes a partir de microscopia eletrônica de varredura e com luz polarizada (quadros menores): a) inhame; (b) castanha; (c) gengibre; (d) mandioca; (e) milho; (f) banana verde; (g) trigo e (h) batata. Escala: 20µm em todas as imagens.	5
Figura 2.2 Componentes principais do amido: amilose e amilopectina A: estrutura da amilose com ligações do tipo α -(1,4). B: estrutura da amilopectina, evidenciando ponto de ramificação com ligação do tipo α -(1,6). C: Estrutura dos polímeros componentes do amido no grânulo de amido. Presença de dupla-hélice nas moléculas de amilopectina e amilose.	6
Figura 2.3 - Estrutura da Amilose.	7
Figura 2.4 - Estrutura da Amilopectina	9
Figura 2.5 – Representação esquemática da estrutura dos grânulos de amido. a) Seção ultrafina de grânulo de amido de milho ceroso após 7 dias de hidrólise com ácido sulfúrico e coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo; b) Alternância entre regiões semicristalinas e amorfas; c) Modelo <i>cluster</i> para amilopectina.....	11
Figura 2.6 - Métodos de imobilização de enzimas.	22
Figura 2.7 - Ligação covalente unipontual e multipontual.	24
Figura 3.1 - Resina de troca iônica Duolite® A-568.....	30
Figura 3.2 - Unidade experimental. 1: Banho em ebulição; 2: Tubos Folin Wu com DNS; 3: Banho de gelo; 4: Reatores; 5: Banho termostatizado.....	31
Figura 3.3- Reator com cesta de aço inox para imobilização. 1: cesta de aço inox; 2: reator.	32
Figura 3.4 – Enzima imobilizada.....	33
Figura 3.5 – Enzima imobilizada (a) e controle (b).....	36
Figura 3.6 – Ligação cruzada com glutaraldeído.	40
Figura 4.1 - Atividade relativa em função do pH para a enzima livre.	45
Figura 4.2 – Estabilidade da enzima Termamyl® 2X livre em relação ao pH.....	47
Figura 4.3 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da enzima imobilizada por adsorção (U) em função do pH e do tempo.....	53
Figura 4.4 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da enzima imobilizada por adsorção (U) em função da concentração de enzima e do pH.....	54
Figura 4.5 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da enzima imobilizada por adsorção (U) em função da concentração de enzima e do tempo.	55

Figura 4.6 – Perfis da função desejabilidade para maximização da atividade da enzima imobilizada (U) por adsorção.	56
Figura 4.7 Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade recuperada (%) na imobilização por adsorção em função do pH e do tempo.	60
Figura 4.8 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade recuperada (%) na imobilização por adsorção em função da concentração de enzima e do pH.	60
Figura 4.9 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade recuperada (%) na imobilização por adsorção em função da concentração de enzima e do tempo.	61
Figura 4.10 – Perfis da função desejabilidade para maximização da atividade recuperada (%) na imobilização por adsorção.	62
Figura 4.11 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência (%) em função do pH e do tempo na imobilização por adsorção.	66
Figura 4.12 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência (%) em função da concentração de enzima e do pH na imobilização por adsorção.	67
Figura 4.13 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência (%) em função da concentração de enzima e do tempo na imobilização por adsorção.	67
Figura 4.14 - Perfis da função desejabilidade para maximização simultânea de Ef (%) e AI (U) na imobilização por adsorção.	68
Figura 4.15 - Curvas para maximização de AI (U), AR (%) e Ef (%) em relação às variáveis independentes pelo Maple 17.	70
Figura 4.16 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade da enzima imobilizada (AI) por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído e do tempo.	77
Figura 4.17 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade recuperada (%) para a imobilização por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído e do tempo.	79
Figura 4.18 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência da imobilização (%) por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído e do tempo.	82
Figura 4.19 - Curvas para maximização de AI (U), AR (%) e Ef (%) da imobilização por ligação cruzada em relação às variáveis independentes pelo Maple 17.	83
Figura 4.20 - Perfis da função desejabilidade para maximização simultânea de AI (U), AR (%) e Ef (%) na imobilização por ligação cruzada.	83

Figura 4.21 - Atividade relativa em função do pH para a enzima imobilizada por ligação cruzada.....	87
Figura 4.22 – Estabilidade da Termamyl® 2X livre e imobilizada por ligação cruzada em relação ao pH.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Temperatura de gelatinização de amidos de diferentes fontes botânicas.	15
Tabela 3.1- Matriz do DCC com valores reais e codificados.	39
Tabela 3.2- Matriz do DCC com valores reais e codificados para o segundo DCC.	42
Tabela 4.1 - Matriz com valores obtidos a partir do DCC com Termamyl 2x imobilizada.	50
Tabela 4.2 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta AI (U) da imobilização por adsorção.	51
Tabela 4.3 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AI (U) da imobilização por adsorção.	52
Tabela 4.4 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta AR (%) da imobilização por adsorção.	57
Tabela 4.5 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AR (%) da imobilização por adsorção.	58
Tabela 4.6 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta Ef (%) na imobilização por adsorção.	64
Tabela 4.7. - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta Ef (%) na imobilização por adsorção.	65
Tabela 4.8 - Validações complementares para as respostas AI, AR e Ef.	71
Tabela 4.9 - Matriz com valores obtidos a partir do DCC com Termamyl 2x imobilizada por ligação cruzada.	74
Tabela 4.10 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta AI (U) por ligação cruzada.	75
Tabela 4.11 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AI (U) por ligação cruzada com glutaraldeído.	76
Tabela 4.12 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta AR (%) por ligação cruzada.	77
Tabela 4.13 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AR (%) por ligação cruzada com glutaraldeído.	78
Tabela 4.14 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta Ef (%) por ligação cruzada.	80
Tabela 4.15 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AR (%) por ligação cruzada com glutaraldeído.	81

Tabela 4.16 – Resultados experimentais para AI, AR e Ef na imobilização por adsorção e por ligação cruzada.	85
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS

AC	Atividade do controle (U)
A_i	Atividade em cada pH (U)
AI	Atividade da enzima imobilizada (U)
$A_{m\acute{a}x}$	Atividade máxima (U)
A_{pHi}	Atividade em cada pH (U)
AR	Atividade Recuperada (%)
A_{rel}	Atividade relativa (%)
A_{res}	Atividade residual (%)
ART	Açúcar redutor total (g/L)
<i>D</i>	Desejabilidade Global
<i>DCC</i>	Delineamento Composto Central
D-glicose	Glicose dextrógira - isômero óptico da glicose
D_i	Desejabilidade individual
DP	Grau de polimerização
Ef	Eficiência (%)
<i>SMG</i>	Fermentação submersa
<i>SSF</i>	Fermentação em estado sólido
U	Unidade de atividade (mg de ART/min)
<i>X1</i>	pH
<i>X2</i>	tempo de imobilização (min)
<i>X3</i>	Concentração de enzima (% v/v)
<i>X4</i>	Concentração de glutaraldeído (% m/v)
<i>X5</i>	tempo de reticulação (min)

Símbolos grego

α -amilase	Alfa - Forma anomérica da enzima
B-amilase	Beta - Forma anomérica da enzima
α -(1,4)	Tipo de ligação na forma anomérica alfa entre carbono 1 e carbono 4 de resíduos de D-Glicose
α -(1,6)	Tipo de ligação na forma anomérica alfa entre carbono 1 e carbono 6 de resíduos de D-Glicose

RESUMO

O amido é o segundo polissacarídeo mais abundante no mundo e é o carboidrato mais importante da dieta humana. Ele se encontra distribuído em grânulos, de natureza semicristalina, e é composto por duas macromoléculas: a amilose, essencialmente linear, e a amilopectina, extremamente ramificada. Muitas das aplicações industriais do amido dependem da hidrólise desse composto e esta tem sido preferencialmente realizada com a utilização de enzimas amilases. Estas podem ser utilizadas nas formas livre e imobilizada, porém a forma imobilizada apresenta várias vantagens, como possibilidade de aumento da atividade e da estabilidade. Nesse trabalho, foi feito o estudo do processo de imobilização da enzima α -amilase, Termamyl[®] 2X, em resina de troca iônica, Duolite[®] A-568. Primeiramente, foram avaliados: a atividade da Termamyl[®] 2X livre a 0,2% v/v; sua estabilidade em relação ao pH, por 2h, a 0,05% v/v e os testes preliminares para definir a melhor temperatura de imobilização por adsorção. Na sequência, foi feito um delineamento composto central (DCC), no qual foram avaliados a influência do pH, do tempo e da concentração de enzima nas seguintes respostas do processo de imobilização por adsorção: atividade da enzima imobilizada (AI), atividade recuperada (AR) e eficiência (Ef). A partir desse DCC, foram definidas as condições ótimas e foram feitos testes preliminares nessa condição para definir o procedimento de ligação cruzada com glutaraldeído a ser testado: antes ou após a adição de enzima. A partir disso, foi realizado um segundo DCC, no qual foram avaliados a influência da concentração de glutaraldeído e do tempo de reticulação nas respostas AI, AR e Ef, no processo de imobilização por ligação cruzada. Também foi feita a otimização desse planejamento e foi selecionada a condição mais adequada (0,2% m/v de glutaraldeído e tempo de reticulação de 25 minutos), na qual foram avaliados a atividade da enzima imobilizada, a estabilidade em relação ao pH, a estabilidade de armazenamento (a 4°C e pH 6,5, por 25 dias), feita também para a condição ótima do DCC de imobilização por adsorção, e o número de reusos. A enzima livre e a imobilizada por ligação cruzada apresentaram atividade ótima em pH 7,00. A enzima livre se apresentou mais estável em pHs 7,00 e 7,50, mantendo, respectivamente, 62,10% e 60,57% de atividade residual, enquanto a enzima imobilizada se apresentou mais estável em pH 7, mantendo 43,20% de atividade residual. No primeiro DCC, foi definida a temperatura de 25°C e a condição ótima obtida para a imobilização foi a seguinte: pH 4,82, tempo de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878 % v/v. No segundo DCC, foi estabelecido que a ligação cruzada devia ser feita anteriormente à adição de Termamyl[®] 2X e a condição ótima obtida foi: 0,00% m/v de glutaraldeído e tempo de reticulação de 25 minutos. Em ambos os procedimentos de imobilização foi bem sucedida a validação dos pontos ótimos. Ao comparar os dois DCCs, observou-se que o primeiro DCC apresentou respostas melhores: 77,70 U para AI, 30,43% para AR e 54,84% para Ef. No processo de imobilização por ligação cruzada, as respostas obtidas foram: 35,66 U for AI, 31,38 % for AR e 46,51 % for Ef. Após armazenamento de 25 dias, em pH 6,5 a 4°C, a enzima imobilizada por adsorção apresentou atividade residual de 9,57% e a enzima imobilizada por ligação cruzada apresentou 18,23% de atividade residual. Em relação ao número de reusos, após três ciclos a enzima imobilizada por ligação cruzada apresentou atividade residual e estabilidade significativas.

Palavras-chave: amido, imobilização, α -amilase, resina de troca iônica, adsorção, ligação cruzada.

ABSTRACT

Starch is the second most abundant polysaccharide in the world and it is the main carbohydrate in the human diet. It is distributed in granules, with a semicrystalline nature and it is composed of two macromolecules: amylose, an essentially linear polysaccharide, and amylopectin, an extremely branched one. Many of the industrial applications of starch depend on the hydrolysis of this compound and it has been preferentially carried out with the use of amylase enzymes. They can be used free and immobilized, but the immobilized form has several advantages, like the possibility of increasing enzyme activity and stability. In this research, the immobilization process of the enzyme α -amylase, Termamyl® 2X, in ion exchange resin, Duolite® A-568, was studied. First, the following points were evaluated: the activity of free Termamyl® 2X, 0.2 % v/v; its stability in relation to pH, for 2 hours, at 0.05 % v/v and preliminary tests to define the best temperature of immobilization by adsorption. Then, a central composite design (CCD) was defined, in which the influence of pH, time and enzyme concentration on the following responses of the immobilization by adsorption were evaluated: immobilized enzyme activity (IA), recovered activity (RA) and efficiency (Ef). From this CCD, the optimal conditions were defined and preliminary tests were carried out in this condition to define the crosslinking procedure with glutaraldehyde to be tested: before or after the addition of the enzyme. After this, a second CCD was carried out, in which the influence of glutaraldehyde's concentration and the crosslinking time on the responses IA, RA and Ef, in the process of immobilization by crosslinking, were evaluated. The optimization of this planning was also carried out and, in a defined condition (0.2% w/v of glutaraldehyde and crosslinking time of 25 minutes), the activity of the immobilized enzyme, the stability in relation to pH, the storage stability (at 4 °C and pH 6.50, for 25 days), also performed for the optimal condition of the immobilization by adsorption, and the number of reuses were studied. The free enzyme and the immobilized one by crosslinking showed optimum activity at pH 7.00. The free enzyme was more stable at pH 7.00 and 7.50, keeping 62.10% and 60.57% of residual activity, respectively, while the immobilized enzyme showed optimum better stability at pH 7.00, keeping 43.20% of residual activity. In the first CCD, the temperature of 25°C was defined and the optimal condition obtained for the immobilization was as follows: pH 4.82, time of 15 minutes and enzyme concentration of 0.878 % v/v. In the second CCD, it was established that crosslinking should be done prior to the addition of Termamyl® 2X and the optimum condition obtained was: 0.00 % w/v of glutaraldehyde and crosslinking time of 25 minutes. In both immobilization procedures, the validation of the optimal points was successful. When comparing the two CCDs, it was observed that the first one revealed better results: 77.70 U for IA, 30.43 % for RA and 54.84 % for Ef. Immobilization by crosslinking showed the following results: 35.66 U for IA, 31.38 % for RA and 46.51 % for Ef. After 25 days of storage at pH 6.5 and at 4 °C, the enzyme immobilized by adsorption showed a residual activity of 9.57 % and the enzyme immobilized by crosslinking showed 18.23 % of residual activity. Regarding the number of reuses, after three cycles, the enzyme immobilized by crosslinking presented significant residual activity and stability.

Keywords: starch, immobilization, α -amylase, ion exchange resin, adsorption, crosslinking.

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

O amido é o principal carboidrato de reserva em sementes, raízes de plantas superiores e/ou tubérculos. Depois da celulose, é o recurso natural e renovável mais abundante, sendo um dos principais constituintes da dieta humana, além de ser a fonte primária de carbono e fonte de energia para manutenção da vida (MIAO ET AL., 2018; ALMEIDA ET AL., 2019).

Ele é composto por duas macromoléculas de glicose: amilose, polissacarídeo essencialmente linear composto por resíduos de D-glicose, unidos por ligações do tipo α -(1,4), e amilopectina, polissacarídeo extremamente ramificado, composto por monômeros de D-glicose unidos tanto por ligações tipo α -(1,4) e tipo α -(1,6) (ALMEIDA ET AL., 2019).

Esse carboidrato encontra uma série de aplicações industriais, como ligação, gelificação, estabilização, espessamento e texturização, sendo amplamente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica, de papel, na produção de bioetanol e xaropes. As principais fontes comerciais do amido são milho (82%), trigo (8%), batata (5%) e mandioca (5%) (RESEARCH AND MARKETS, 2017; YAZID ET AL., 2018).

Segundo Research and Markets (2020), em meio à crise do COVID-19, o mercado global de produtos derivados do amido, estimado em 51,2 milhões de toneladas em 2020, está estimado a atingir 69,8 milhões de toneladas em 2027, com uma taxa de crescimento anual composta de 4,5% nesse período analisado de 7 anos. O segmento de maltodextrina, produto derivado da hidrólise do amido, tem previsão de atingir 7 milhões de toneladas nesse período, o que representa um crescimento anual composto de 4,4%.

Em indústrias de processamento de amido e na produção de xaropes são empregadas, principalmente, as amilases, que são enzimas específicas para a hidrólise do amido e de compostos relacionados, que atuam por meio da ruptura das ligações do tipo α -(1,4) e/ou α -(1,6) (AEHLE, 2007, AL-DHABI ET AL., 2020). Dentre as amilases, as de fonte microbiana são preferidas a outras fontes, devido a sua grande disponibilidade e diversidade (LI, ZHANG E ZHU, 2011).

A hidrólise enzimática se apresenta atualmente como uma abordagem mais promissora, por ser ambientalmente favorável, devido às condições das reações de quebra, que não envolvem utilização de reagentes químicos e solventes, resultando em redução do volume de resíduos (XU, YAN, FENG, 2016).

Convencionalmente, a hidrólise enzimática ocorre através de três etapas: gelatinização, liquefação e da sacarificação do amido (RUIZ ET AL., 2011). A gelatinização é uma etapa relevante na qual os grânulos que compõem o amido são aquecidos com excesso de água, para facilitar a acessibilidade das enzimas e aumentar a região amorfa dos grânulos. A liquefação é o processo que ocorre na presença da α -amilase, com a conversão de uma suspensão concentrada de grânulos de amido em uma dispersão de amido solúvel pouco viscosa e leva à formação de produtos como dextrinas, maltose, maltotriose e maltopentose, a partir da ruptura das ligações do tipo α -(1,4). A etapa de sacarificação leva à produção de glicose a partir da conversão de amido e seus hidrolisados com a utilização de enzimas como a glicoamilase, que promovem a ruptura das ligações do tipo α -(1,4) e α -(1,6) (LIU, 2005, RUIZ ET AL., 2011).

Os biocatalisadores (enzimas ou células) têm sido intensamente usados em vários processos, em escala industrial ou laboratorial. Pesquisas têm sido feitas para melhorar as propriedades deles, assim como têm sido elucidadas técnicas para permitir a sua reutilização ou em processos contínuos, como, por exemplo, por meio de técnicas de imobilização, seja de enzimas ou células (CARVALHO, CANILHA E SILVA, 2006).

A imobilização, técnica desenvolvida em 1916, ampliou a aplicação das enzimas, pois a partir dessa técnica espera-se que elas reajam em ambientes com condições mais extremas de pH e temperatura, na presença de solventes orgânicos e com atividade catalítica mais alta e possibilidade de reuso. Enzimas são comumente imobilizadas por adsorção, retenção física, ligação covalente e ligação cruzada (LIU E DONG, 2020). Nesse trabalho foram avaliados os processos de imobilização da α -amilase Termamyl® 2X por adsorção e ligação cruzada na resina de troca iônica Duolite® A-568.

Essa resina é uma resina aniônica fracamente básica, altamente porosa, comercializada pela corporação química Dow (GUIDINI ET AL., 2010). Ela é muito utilizada para imobilização de enzimas utilizadas em indústrias como as de amido e gordura e apresenta-se apropriada para imobilização por adsorção devido à sua grande área superficial, adequada para suportar uma grande quantidade de enzima, além de ter baixo custo e rendimento de imobilização significativo. No entanto, esse processo pode ser afetado especialmente por fatores como temperatura, pH, concentração de enzima e tempo. Nesse contexto, o glutaraldeído, muito utilizado como agente reticulante em ligações cruzadas, pode ser utilizado para favorecer as propriedades do biocatalisador imobilizado (WANG ET AL., 2016).

A relevância dessa pesquisa consiste em estudar processos de imobilização com uma enzima amplamente utilizada no processamento do amido, a Termamyl® 2X, e de forma

inovadora, na resina Duolite® 2X, uma resina de baixo custo e que ainda não foi estudada para esse fim, nas condições avaliadas nessa pesquisa.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consistiu em estudar o processo de imobilização da enzima α -amilase, Termamyl® 2X, em resina de troca iônica, Duolite® A-568.

Nesse sentido, os objetivos específicos do trabalho foram:

Estudar a influência conjunta do pH, do tempo de imobilização e da concentração de enzima nas respostas atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência, no processo de imobilização por adsorção física na resina Duolite® A-568;

Estudar a influência conjunta do pH, do tempo de imobilização e da concentração de enzima nas respostas atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência no processo de imobilização por ligação cruzada com glutaraldeído na resina Duolite® A-568;

Definir modelos matemáticos compatíveis com os processos de imobilização e fazer a validação deles;

Caracterizar o biocatalisador livre e imobilizado em termos de estabilidade em relação ao pH e ao tempo de armazenamento;

Caracterizar o biocatalisador imobilizado em termos de números de usos.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo será abordado o aporte teórico que fundamentou a pesquisa.

2.1 Amido

O amido, polissacarídeo natural, abundante, de baixo custo e biodegradável, é produzido por plantas verdes para armazenamento de energia por períodos prolongados (TABASUM ET AL., 2019). Ele é um carboidrato produzido por fotossíntese, principalmente em raízes, tubérculos e sementes. De acordo com a sua origem vegetal, o amido pode ser dividido em quatro categorias: amido de cereal, de fruta, de rizoma e outros. Dentre essas fontes, os cereais ocupam uma posição de destaque na produção total de amido (GUO ET AL., 2019).

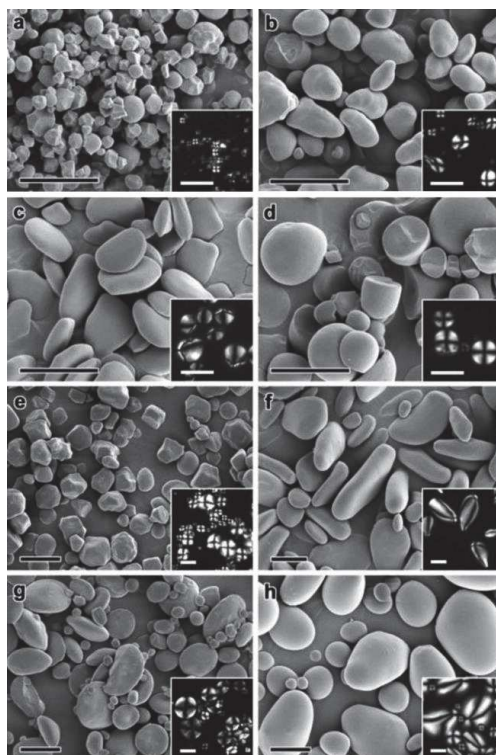
Por ser completamente biodegradável, ter baixo custo e ser um recurso renovável (ZHANG E SUN, 2004; ARAÚJO, CUNHA E MOTA, 2004; TAO ET AL., 2020), o amido vem chamando a atenção desde os anos 70 (GRIFFIN, 1994; TABASUM ET AL., 2019). Trata-se de um dos biopolímeros mais amplamente utilizados em várias indústrias, por exemplo, como estabilizante e espessante na indústria alimentícia, têxtil, de papel e farmacêutica (THIRUMDAS, KADAM, ANNAPURE, 2017; NIU ET AL., 2018; LI ET AL., 2019; WU ET AL., 2019;), aplicado também em biomedicina (GUO ET AL., 2019), utilizado como adesivo para madeira, como agente retentor de água e também para a produção de géis (NIU ET AL., 2018;). Além disso, sabe-se que ele consiste em uma matéria-prima de baixo custo para a produção de xaropes contendo glicose, frutose ou maltose (SUN ET AL., 2009; BERSKI e ZIOBRO, 2018) e alguns açúcares, obtidos a partir de sua hidrólise, podem ser fermentados para a produção de bioetanol (SUN ET AL., 2009).

O amido constitui o principal carboidrato de reserva das plantas e encontra-se distribuído em grânulos, cujos tamanhos e formas variam - elipsoides, polígonos, esferas, túbulos irregulares (TABASUM ET AL., 2019), a depender da fonte vegetal (PEREZ e BERTOFT, 2010). As fontes de amido de interesse comercial têm seus grânulos com tamanho variando, por exemplo, na faixa de 2 a 30 μm (amido de milho) e de 5 a 100 μm (amido de batata) (VAN DER MAAREL ET AL., 2002; KUMARI, YADAV, YADAV, 2020). As principais fontes comerciais do amido são: milho, trigo, arroz, mandioca, batata e batata doce (GUO ET AL., 2019).

O desenvolvimento dos grânulos ocorre a partir do centro, conhecido por hilo. Sob luz polarizada, os grânulos apresentam a aparência de uma estrutura cruzada, semelhante a uma cruz de malta e exibem birrefringência (BERTOFT, 2017).

A Figura 2.1 apresenta as imagens de grânulos de amido nativo de diferentes fontes vegetais, através de microscopia de varredura eletrônica, e a presença da cruz de malta, através de imagens obtidas a partir da aplicação de luz polarizada (quadros menores no canto inferior de cada imagem).

Figura 2.1 - Grânulos de amido de acordo com a fonte vegetal. Imagens de amido nativo de várias fontes a partir de microscopia eletrônica de varredura e com luz polarizada (quadros menores): a) inhame; (b) castanha; (c) gengibre; (d) mandioca; (e) milho; (f) banana verde; (g) trigo e (h) batata. Escala: 20µm em todas as imagens.



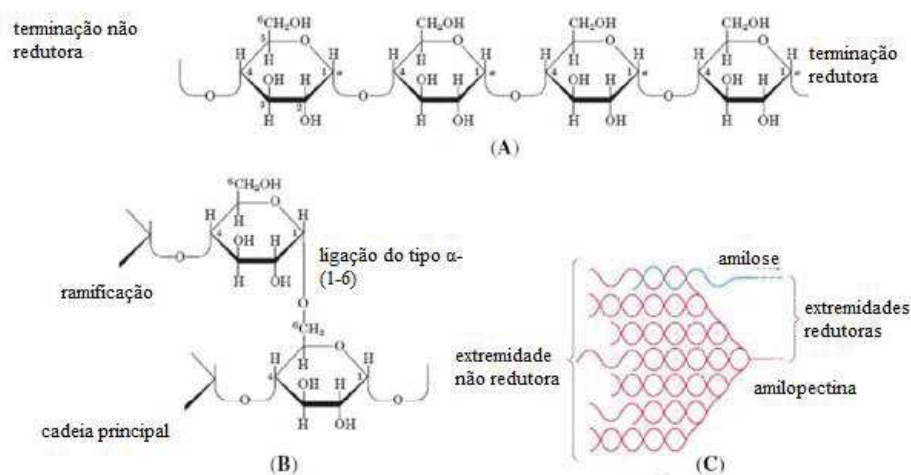
Fonte: Pérez e Bertoft, 2010.

Órgãos e tecidos que contêm grânulos de amido são: pólen, folhas, caule, tecidos lenhosos, raízes, tubérculos, bulbos, rizoma, frutos, flores e em partes de sementes. Além dos vegetais, algumas algas, bactérias, protozoários e musgos também podem conter grânulos desse carboidrato. Desse modo, o amido pode ser obtido de diversas fontes, no entanto, raízes, tubérculos, frutas, grãos e cereais normalmente apresentam um maior teor desse polissacarídeo, entre 40 a 80% m/m em base seca (TABASUM ET AL., 2019).

2.2 Composição química do amido

O amido é um polímero de glicose, cujos monômeros se ligam a partir do oxigênio do carbono número 1 de uma molécula de glicose, compondo as ligações glicosídicas. Essas ligações são estáveis a altos pH, mas em baixos pH são instáveis e podem ser hidrolisadas. Ao final da cadeia polimérica há a presença de um grupo aldeído, conhecido por grupo redutor (VAN DER MAAREL ET AL., 2002). Os dois principais componentes do amido, dois polímeros de glicose, são: a amilose, essencialmente linear, na qual as moléculas que a compõem possuem um grupo redutor e um não redutor; e a amilopectina, glicano altamente ramificado, que contém um grupo redutor e vários não redutores (ELLIS ET AL., 1998; MIAO ET AL., 2018). A Figura 2.2 apresenta a estrutura das moléculas componentes do amido.

Figura 2.2 Componentes principais do amido: amilose e amilopectina A: estrutura da amilose com ligações do tipo α -(1,4). B: estrutura da amilopectina, evidenciando ponto de ramificação com ligação do tipo α -(1,6). C: Estrutura dos polímeros componentes do amido no grânulo de amido. Presença de dupla-hélice nas moléculas de amilopectina e amilose.



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2006 apud Freitas, 2012.

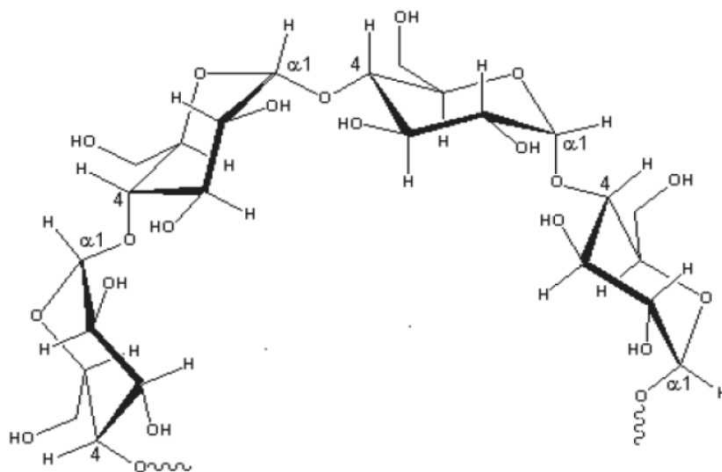
A amilose e a amilopectina possuem outras diferenças significativas em relação à estrutura e à função: o peso molecular da amilose está na faixa de 10^5 Da a 10^6 Da, já a amilopectina tem seu peso entre 10^7 Da e 10^9 Da (KUMARI, YADAV, YADAV, 2020). Enquanto a amilopectina é solúvel em água, a amilose e o próprio grânulo são insolúveis em água fria (VAN DER MAAREL ET AL., 2002). A amilose é o componente chave na

absorção de água, no inchamento de grânulos (HUI, 2006) e nas propriedades de géis obtidos a partir de amido. Por sua vez, os géis que contêm amilose são mais rígidos e firmes do que aqueles sem a presença dessa molécula, visto que se formam ligações intramoleculares e intermoleculares nas dupla-hélices existentes entre moléculas de amilose e de amilopectina longas (ZHANG ET AL., 2020). Além disso, a amilose tem facilidade de formar complexos, enquanto a amilopectina não (ZOBEL, 1988).

2.2.1 Amilose

A amilose é um polímero formado por cadeias lineares de resíduos de D-glicose, unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1,4), com um pequeno número de cadeias ramificadas (BULÉON ET AL., 1998; CURÁ, JANSSEN E KRISMAN, 1995; VAMADEVAN E BERTOFT, 2020). Ela é composta por resíduos de glicose, que indicam o seu grau de polimerização (DP) e cuja quantidade depende da origem do amido (SWINKELS, 1985; BULÉON ET AL., 1998). Amilose de amido de milho possui DP que pode variar de 830 a 960, enquanto o DP de amilose de batata varia na faixa de 4920 a 6340 (BERTOFT, 2017). Na Figura 2.3 está representada a estrutura desse polímero.

Figura 2.3 - Estrutura da Amilose.



Fonte: Adaptado de Denardin e da Silva, 2009.

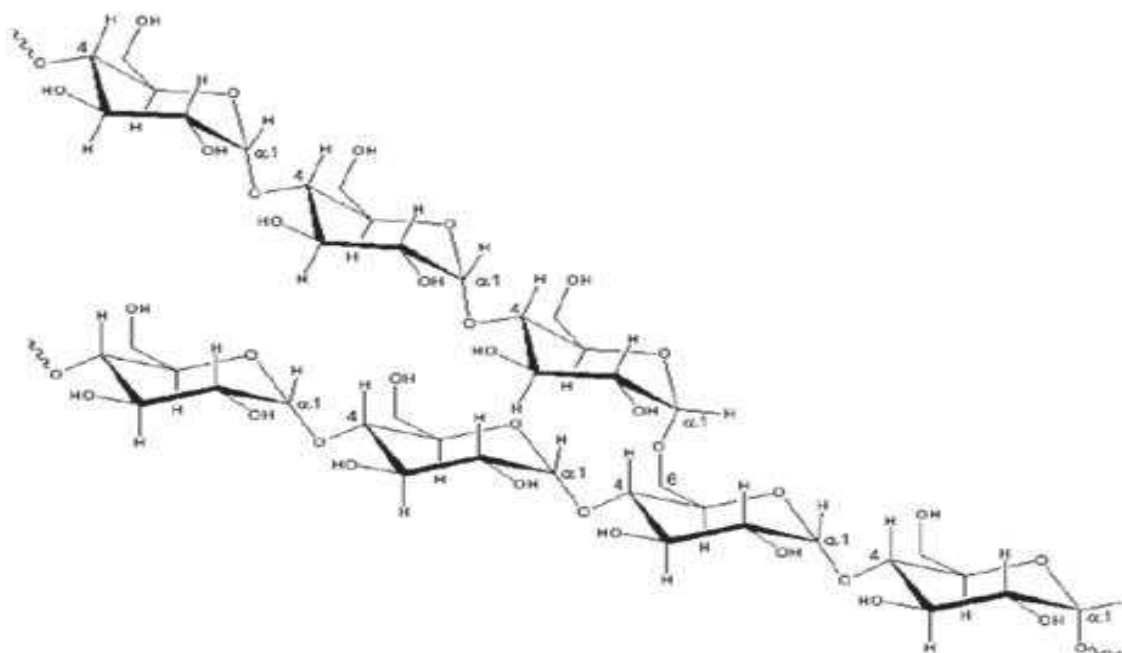
A amilose representa normalmente de 20% a 30% da composição em amidos de cereais normais, mas essa faixa varia de acordo com a fonte vegetal. No entanto, há exceções a essa regra, como os amidos com alto teor de amilose, acima de 50%, que são denominados *high-amilose* (WEBER, COLLARES-QUEIROZ E CHANG, 2009), que podem chegar a até

100% de teor desse componente, conforme mostrado em um amido de cevada produzido nessas condições (CARCIOF ET AL., 2012). Assim que uma solução aquosa é preparada, a cadeia de amilose assume uma estrutura espiral aleatória, que não é estável. Normalmente, ela tende a formar, por meio de reações instantâneas, uma estrutura helicoidal que se complexa com outros agentes complexantes, como lipídios, álcoois, compostos aromatizantes e iodo (BERTOFT, 2017). O iodo se complexa com a amilose produzindo um complexo de intensa cor azul escuro, que é a base de vários métodos para determinação do teor dessa molécula (ELLIS ET AL., 1998; HUI, 2006).

2.2.2 Amilopectina

A amilopectina, por sua vez, consiste em um polímero formado também por resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1,4), mas apresenta alto grau de ramificação pela presença de ligações glicosídicas do tipo α -(1,6) (CHIARAMONTE ET AL., 2012; GUO, 2018). As cadeias com ligações do tipo α -(1,4) são mais curtas e as cadeias com ligações do tipo α -(1,6) são laterais, com 15 a 45 unidades de glicose (VAN DER MAAREL ET AL., 2002). A molécula de amilopectina contém uma média de 2.000.000 unidades de glicose, sendo assim uma das maiores moléculas na natureza. As suas ramificações correspondem a cerca de 5% da composição desse polímero, mas isso depende da fonte botânica (BULÉON ET AL., 1998; MYERS ET AL., 2000, MIAO ET AL., 2018). A Figura 2.4 apresenta a estrutura desse polímero.

Figura 2.4 - Estrutura da Amilopectina



Fonte: Adaptado de Denardin e da Silva, 2009.

Normalmente, amidos como o de milho, de arroz e de trigo contêm entre 70 a 80% de amilopectina (PEREZ E BERTOFT, 2010). No entanto, dentre os amidos comerciais há também os amidos cerosos, como o de milho e o de arroz (um pouco mais caro), que contêm baixo ou nenhum conteúdo de amilose em sua composição. Estes são comumente usados como base para a produção de amidos modificados, a fim de promover estabilidade, melhorar o espessamento e a consistência de alimentos, por exemplo (HSIEH ET AL., 2019).

O modelo mais comumente aceito para representar a estrutura da amilopectina é o “cluster”, no qual as cadeias laterais ficam agrupadas e se organizam em torno das cadeias principais (OATES, 1997; BERTOFT, 2013; ZHU E CUI, 2019). As estruturas ramificadas que compõem os “clusters” e ficam interconectadas com as cadeias principais (BERTOFT, 2013) são chamadas de “blocos construtores” (BERTOFT, 2017). A região de ramificação compõe a área amorfa dos grânulos, que corresponde à parte interna da amilopectina, enquanto as pequenas cadeias da amilopectina, que ficam mais externas, formam duplas hélices que contribuem para a formação da natureza semicristalina dos grânulos (ZHU E CUI, 2019).

2.2.3 Outros componentes do amido

Além dos dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, que são os maiores componentes do amido, este também contém pequenas quantidades de proteínas, lipídios e

cinzas. As proteínas podem ser encontradas na superfície do grânulo como resíduos de conteúdo proteico do endosperma, mas também podem ser encontradas no seu interior. A quantidade de proteína depende do tipo de amido: amido de milho contém normalmente 0,35%; amido de trigo 0,40%; amido de batata 0,1%, por exemplo. Amidos de cereais contêm quantidades mais significantes de lipídios internamente, que são encontrados principalmente tanto na forma de ácidos graxos livres, quanto como lisofosfolipídios. Amidos de cereais normais contem entre 0,60% e 1,20% de teor total de lipídio, sendo que essa quantidade varia de acordo com a fonte e no caso dos cereais, varia com a quantidade de amilose, com a qual parte está associada. As cinzas estão presentes em alguns tipos de amido, como no de batata, devido à presença de grupos fosfato em monoésteres – nos quais o teor de fósforo está na faixa de 0,06% e 0,1% - em sua maioria, associados com a amilose e com outros íons como: cálcio, sódio e magnésio (BEMILLER, 2019).

Fosfolipídios e monoésteres de fosfato afetam as propriedades das pastas derivadas do amido: fosfolipídios, presentes, por exemplo, em cereais comuns, aumentam a opacidade do gel derivado de amido, enquanto os monoésteres, encontrados principalmente em amido de batata e outros, aumentam a transparência e a viscosidade do gel (PÉREZ E BERTOFT, 2010).

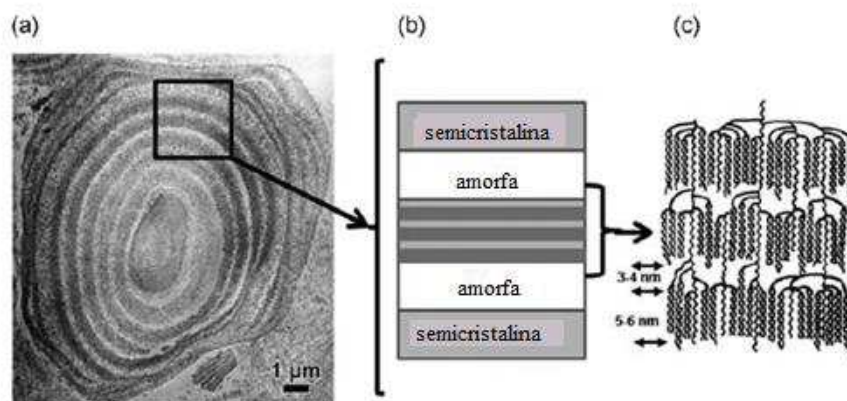
2.3 Natureza semicristalina do amido

Os grânulos de amido nativo são estruturas semicristalinas com cerca de 15 a 45% de material cristalino, que pode ser evidenciado a partir de difração de raios-x (OATES, 1997). A estrutura semicristalina inclui o grânulo de amido, os anéis de crescimentos, as camadas semicristalinas e os cristais (ZHANG ET AL., 2017, PIKUS, 2005). A maioria dos grânulos de amido é composta por camadas amorfas que se alternam com camadas semicristalinas com espessura entre 100 e 400 nm (PEREZ E BERTOFT, 2010).

A amilopectina, localizada na região cristalina dos grânulos, interage com moléculas de amilose em estruturas helicoidais que definem a estrutura fundamental dos grânulos (MORAN, 2019). A amilose, por sua vez, exerce menos influência na formação dos cristais, mas pode afetar a estruturação das duplas hélices na amilopectina, provocando interferência na densidade de empacotamento das cadeias dessa molécula (OATES, 1997), além de que parte da amilose pode estar cristalizada juntamente com a amilopectina (DENARDIN E SILVA, 2009). Normalmente, considera-se que a amilose se localiza na parte amorfa do grânulo (GUO ET AL., 2019), mas, essa é uma questão controversa, pois a localização da amilose no interior do grânulo não foi bem definida (MORAN, 2019).

Internamente, as regiões amorfas e cristalinas compõem os denominados anéis de crescimento. Esses anéis sugerem a possibilidade de deposição de amido diariamente e que o material mais recentemente sintetizado seja depositado na superfície, fazendo com que os grânulos expandam seu tamanho. Para explicar esse desenvolvimento, um modelo indica que o crescimento se inicia do hilo, centro do grão, que contém grande quantidade de grupos redutores, distribuídos de maneira não tão organizada como em outras partes do amido. Os grupos não redutores da amilose e da amilopectina, por sua vez, são irradiados para a superfície e isso permite a adição de mais unidades de glicose que aumentam as moléculas de amilopectina (OATES, 1997; DENARDIN E SILVA, 2009). A representação esquemática da estrutura dos grânulos de amido, com os anéis de crescimento até a molécula de amilopectina, representada pelo modelo *cluster*, é mostrada na Figura 2.5.

Figura 2.5 – Representação esquemática da estrutura dos grânulos de amido. a) Seção ultrafina de grânulo de amido de milho ceroso após 7 dias de hidrólise com ácido sulfúrico e coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo; b) Alternância entre regiões semicristalinas e amorfas; c) Modelo *cluster* para amilopectina.



Fonte: Adaptado de Perez and Bertoft, 2010.

2.4 Amido de milho

Dos amidos mais comuns, amido de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose estão dentre as fontes mais importantes de obtenção de amido. O teor de amido no milho está em torno de 68 a 74%. O amido de milho normal pode ter várias aplicações, como utilização como agente espessante e para a produção de géis para pudins, recheios, bolos e outros confeitos (GUZMÁN – MALDONADO, PAREDES – LÓPEZ E BILIADERIS, 1995). Também é utilizado para produzir xaropes, que são ingredientes para produção de doces,

cookies, refrigerantes, bebidas alcoólicas, umectantes e através de modificação química, algumas de suas propriedades são alteradas para satisfazer ainda mais outras necessidades industriais (BELITZ, GROSCH E SCHIEBERLE, 2010). Além disso, é tradicionalmente utilizado para a produção de bioetanol na América do Norte, por meio da hidrólise do amido em açúcares de baixo peso molecular, como glicose e maltose, para posterior fermentação por leveduras (NAGULESWARAN ET AL., 2014).

O amido de milho ceroso é relativamente mais fácil de ser gelatinizado, origina uma pasta clara e viscosa, com viscosidade mais estável de ser mantida (YANG ET AL., 2016). Apresenta digestibilidade mais lenta e assim, previne picos de glicose e insulina, além de consistir em uma fonte de energia mais contínua, devido às ramificações da amilopectina (DHITAL; SERESHA E GIDLEY, 2010). Por sua vez, pesquisas têm mostrado que amidos com alto teor de amilose originam uma série de diferentes características em alimentos processados e em produtos farmacêuticos (LI, GIDLEY E DHITAL, 2019; ZHANG ET AL., 2020). Eles apresentam algumas vantagens na produção de materiais derivados de amido, como os amidos termoplásticos, com mais resistência (VAN SOEST E BORGER, 1997; LIU ET AL., 2020).

De acordo com Wang et al. (1993), Lansky et al. (1949) propuseram a existência de um terceiro componente no amido de milho com propriedades diferentes da amilose e da amilopectina, denominado material intermediário. Posteriormente, foi constatado que sua presença ocorre especialmente em amidos mutantes, como por exemplo, com alto teor de amilose, no entanto, sua estrutura ainda não foi completamente entendida nos diferentes tipos de amido (HAN ET AL., 2017). Esse material consiste de polímeros que apresentam estrutura intermediária entre a da amilose e a da amilopectina, mas um aprofundamento no seu estudo pode ser útil para entender melhor o processo de síntese do amido (BERTOFT, 2017) e a sua influência nas propriedades do amido também.

E pelas razões destacadas então, como diversidade de fontes e aplicações, neste estudo, o amido de milho normal, na forma de Maizena, será utilizado como matéria-prima.

2.5 Hidrólise do amido

A hidrólise do amido corresponde à ruptura desse polímero em frações menores, como dextrina, maltose e glicose. Ocorre fundamentalmente pela adição de catalisadores químicos, enzimas (catalisadores biológicos) ou de ambos (HUI, 2006). Do ponto de vista da utilização do amido, ela é fundamental em vários aspectos e vem sendo continuamente estudada pelos cientistas, pois são muitos os produtos que podem ser obtidos após sua hidrólise, como

glicose, xaropes com alto teor de frutose, maltose e bioetanol, a partir da fermentação de açúcares obtidos (KOCHANÉ ET AL., 2020; GALKIN ET AL., 2014; DAI, 2011).

Para que a hidrólise ocorra, é necessária também a presença de água, que normalmente é aquecida e agitada, o que provoca o inchamento dos grânulos do amido e posterior ruptura. Dessa forma, a hidrólise ocorre a partir da solvatação e do intumescimento dos grânulos de amido (SCIPIONI, 2011).

A hidrólise ácida tem sido amplamente substituída pela hidrólise enzimática, pois aquela requer a utilização de materiais resistentes à corrosão, leva à formação de produtos com cor, consome maior quantidade de energia para aquecimento e é relativamente difícil de controlar (ADEJUMO, AGBOOLA E LAYOKUN, 2009). Indústrias como a de produção de etanol a partir de amido têm utilizado bastante a hidrólise enzimática. Ela é altamente específica em relação ao substrato e à reação, especificidade essa que é bem superior à da catálise química (TORRES, LEONEL, MISCHAN, 2012).

A forma e o tamanho do grânulo de amido, além dos fatores que controlam a acessibilidade da enzima até o interior do grânulo, regulam a hidrólise. Quanto maiores forem os grânulos, menor é a relação entre área superficial e volume, e assim, há menos superfície potencial disponível para ser hidrolisada pela enzima (TESTER, QI E KARKALAS, 2006).

2.5.1 Hidrólise enzimática do amido

O amido obtido de diversas fontes pode ser hidrolisado e utilizado como uma matéria-prima barata para a produção de açúcares fermentescíveis, contendo maltose e glicose, que são amplamente requeridos pela indústria de alimentos e também podem ser fermentados para produção de bioetanol (UTHUMPORN, ZAIDUL E KARIM, 2010). Esses produtos podem ser obtidos a partir da hidrólise enzimática, que se configura em um processo importante, inclusive também para melhor entendimento da estrutura do amido.

A hidrólise, com utilização de catalisadores biológicos, ocorre através da ação das enzimas. Para a utilização industrial, elas podem ser concentradas e purificadas. A partir da ação conjunta de enzimas, como amilase e amiloglicosidase, podem ser formadas moléculas de maltose, dextrinas e glicose (SCIPIONI, 2011).

A susceptibilidade dos diferentes tipos de amido à sua quebra é, provavelmente, afetada pela origem botânica, pela natureza da superfície do grânulo e de seus componentes, além do teor de amilose. Um estudo mostrou a seguinte ordem decrescente de susceptibilidade relativa à hidrólise enzimática: amido de milho > feijão mungo > amido de

mandioca> amido de sagu. (UTHUMPORN, ZAIDUL E KARIM, 2010; TAVALLAIE ET AL., 2019).

Os poros na superfície do amido podem ser os centros de ataque enzimático. Além das condições de hidrólise, modificações no amido e o tipo de enzima utilizada afetam a velocidade de hidrólise (TESTER, QI E KARKALAS, 2006). Recentemente, a utilização de amilases e hidrólise enzimática do amido foram revisadas por Miao, Jiang, Jin e BeMiller (2018).

A hidrólise enzimática pode ocorrer de maneira convencional e na forma a frio. No primeiro caso, para que o amido seja convertido em produtos de interesse industrial são necessárias as etapas de pré-hidrólise, gelatinização, liquefação e sacarificação (SCIPIONI, 2011). No segundo caso, várias enzimas agem no amido em sua forma granular, sem a necessidade das etapas de gelatinização e liquefação, o que permite uma redução no consumo energético. Dentre as enzimas utilizadas na hidrólise a frio estão as amilolíticas e as enzimas auxiliares, como proteases, xilanases, celulasas, pululanases, dentre outras (CINELLI ET AL, 2015).

2.5.2 Hidrólise convencional do amido

Como foi citado anteriormente, as etapas do processo de hidrólise convencional são: pré-hidrólise, gelatinização, liquefação e sacarificação.

A pré-hidrólise pode ocorrer através da adição de ácidos ou através da utilização de α -amilase, enzima dextrinizante, que em temperatura próxima à de gelatinização, já auxilia na ruptura dos grânulos de amido (SCIPIONI, 2011). De acordo com Reguly (1996), citado por Scipioni (2011), a etapa de pré-hidrólise é indispensável para que haja um rendimento de hidrólise próximo a 96%.

A gelatinização ocorre quando o amido é aquecido em água, o que promove a absorção de umidade pelos grânulos e seu intumescimento, ruptura da estrutura ordenada e colapso dos grânulos. Normalmente, ela ocorre em temperaturas entre 60 e 80 °C e promove a ruptura da estrutura cristalina e dos complexos amilose-lipídios (LIU ET AL., 2019).

Esse processo aumenta significativamente a reatividade dos grânulos inertes de amido em relação à ação das enzimas, facilitando a ação destas e assim, há redução no tempo de processamento e produtos formados com maior qualidade. A hidrólise enzimática contribuiu muito nos processos industriais, como na produção de xaropes de açúcares derivados de fontes amiláceas, como xaropes de maltose, frutose e glicose (TAFARELLO, 2004).

De acordo com Atwell et al. (1988), citado por Ellis et al. (1998) e também conforme Liu et al. (2009), a gelatinização é, portanto, definida como o colapso da ordem molecular dentro do grânulo de amido, que se manifesta por mudanças irreversíveis em algumas propriedades como: inchamento dos grânulos, destruição da estrutura cristalina, perda de birrefringência e a solubilização do amido, sendo que o excesso de água é fundamental nesse processo. A energia requerida para completa ruptura do amido é diferente entre os grânulos e, dessa forma, a gelatinização ocorre ao longo de uma faixa de temperatura (ELLIS ET AL., 1998).

A energia necessária para que a gelatinização ocorra depende do tamanho dos grânulos e também varia entre grânulos de diferentes fontes, devido ao tamanho e ao tipo do grânulo, além da proporção entre as quantidades de amilose e amilopectina, que também influenciam (SCIPIONI, 2011). A Tabela 2.1 mostra as faixas de temperatura entre amidos provenientes de diferentes fontes.

Tabela 2.1 Temperatura de gelatinização de amidos de diferentes fontes botânicas.

Vegetal	Temperatura (° C)		
	Início	Meio	Fim
Milho	62	66	70
Trigo	59,5	62,5	64
Batata	58	62	66
Mandioca	52	59	64

Fonte: Scipioni, 2011.

O processo de hidrólise convencional em si consiste nas etapas de liquefação e sacarificação. Na liquefação, o amido tem seus grânulos aquecidos, os quais sofrem uma dispersão em solução aquosa e por fim, ocorre a hidrólise parcial e irreversível, na presença de uma enzima α -amilase (VAN DER MAAREL ET AL., 2002). Nessa etapa, também conhecida por dextrinização devido à atuação da α -amilase, o objetivo é de romper o amido (ligações do tipo α - (1-4)), produzindo dextrinas, e isso promove também uma redução da viscosidade. (SOUSA, 2019).

Por fim, após a liquefação, há a etapa de sacarificação, que pode ocorrer na presença de uma enzima desramificante, como uma glicoamilase, que atua sobre as ligações do tipo α -(1,6) da amilopectina e também sobre as α -(1,4) (VAN DER MAAREL ET AL., 2002), formando sacarídeos menores como glicose e maltose (TORRES, LEONEL, MISCHAN, 2012).

2.6 Enzimas

As enzimas são proteínas compostas por resíduos de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas, excetuando-se um grupo pequeno de moléculas de RNA que são catalíticas (GALVÃO, 2004). Elas são utilizadas com o objetivo de acelerar reações bioquímicas vitais, constituindo-se assim como catalisadores que diminuem a energia de ativação (ISIK ET AL., 2003). Por apresentarem alta especificidade e eficiência em condições fisiológicas, elas possuem características específicas e o seu potencial para catalisar reações é utilizado industrialmente, tanto em fermentações quanto em reações químicas mais complexas (JÚNIOR, BON E FERRARA, 2008; CABRAL, FALLEIROS E RIBEIRO, 2012).

O conhecimento da atividade das enzimas é antigo, sendo a fermentação de açúcar por leveduras, para produzir álcool, um dos primeiros exemplos de processos biotecnológicos e a partir do qual começou a ser evidenciada a ação enzimática (AEHLE, 2007; QUEISSADA E DA SILVA, 2020).

A fonte mais usual de obtenção de enzimas corresponde aos micro-organismos. Um grande número de biocatalisadores é derivado de bactérias, sendo obtidos a partir de processos fermentativos de baixo custo. Apenas uma pequena parcela das enzimas utilizadas em bioprocessos é obtida através de plantas e vegetais, visto que elas são mais sensíveis (FABER, 2004).

As enzimas conseguem se diferenciar de outros catalisadores, como os sintéticos, por conseguirem atuar em condições mais brandas, pela capacidade de regulação, por possuírem maior especificidade e apresentarem velocidade de reação muito rápida, entre 10^6 a 10^{12} vezes maior do que as respectivas reações não catalisadas (QUEISSADA E DA SILVA, 2020; CABRAL, FALLEIROS E RIBEIRO, 2012).

As enzimas apresentam uma série de características que tornam a sua utilização muito vantajosa: alta eficiência de catálise, redução de custos energéticos por atuação em condições brandas, biodegradabilidade, são altamente específicas, tanto que conseguem distinguir entre diferentes substratos (especificidade quanto ao tipo de substrato), entre partes similares de moléculas (regioespecificidade) e dentre isômeros óticos (estereoespecificidade). A alta especificidade evita que ocorram reações laterais, impede a formação de subprodutos indesejados, promove alto rendimento (KRAJEWSKA, 2004).

Além dessas características também é importante citar a atividade e a estabilidade desses biocatalisadores. Aquela se relaciona com o aumento da velocidade de reação pela diminuição da energia de ativação da mesma, por meio da atuação da enzima que promove a

transformação do substrato em seu sítio ativo. Esta, por sua vez, se relaciona com a manutenção da estrutura nativa da enzima para que ela desempenhe suas funções, de modo que variações no pH, na temperatura e a existência de solventes polares podem afetar essa propriedade (CABRAL, FALLEIROS E RIBEIRO, 2012).

De acordo com a natureza da reação química na qual atuam, as enzimas podem ser classificadas em seis tipos: oxidoredutores (catalisam óxido-reduções); transferases (promovem a transferência de grupos funcionais); hidrolases (catalisam hidrólises); liases (participam da formação de ligações duplas pela eliminação de grupos funcionais); isomerases (participam de reações de isomerização) e ligases (promovem a formação de ligações duplas enquanto ocorre a hidrólise) (QUEISSADA e DA SILVA, 2020).

Conforme foi descrito, as enzimas apresentam uma série de vantagens que são muito benéficas principalmente para vários segmentos industriais. Dessa forma, vários tipos de enzimas, como celulasas, amilases, lipases, proteases, dentre outras são comercializadas e estima-se que esse mercado seja responsável por uma receita de até U\$6,30 bilhões em 2022 (KIRAN ET AL., 2018).

2.6.1 Enzimas amilolíticas

Amilases são enzimas usadas principalmente em indústrias de processamento de amido, mas também utilizadas em vários outros setores como no processamento de frutas como banana, mamão e manga, na fermentação de alimentos, nas indústrias de papel, têxtil, farmacêutica e de detergentes.

As amilases representam cerca de 25% do mercado de enzimas. Com a demanda crescente em vários segmentos industriais, tem aumentado o interesse em desenvolver amilases com melhores propriedades e com técnicas de produção com melhor relação custo benefício (SINDHU, BINOD e PANDEY, 2017; DE SOUSA e MAGALHÃES, 2010).

Segundo Gupta et al. (2003), as amilases podem ser divididas em duas categorias: endoamilases e exoamilases. As endoamilases participam da hidrólise de ligações α -1,4 de forma aleatória no interior do amido, levando à formação de oligossacarídeos ramificados e lineares, de diversos tamanhos. Essas enzimas atuam na redução de viscosidade do meio e a mais conhecida é a α -amilase. As exoamilases, por sua vez, realizam a hidrólise de ligações do tipo α -(1,4) e em menor extensão as do tipo α -(1,6), a partir dos extremos não redutores, levando à produção de produtos de baixo peso molecular, como maltose (β -amilases) e glicose (α -glicosídates). Conforme Castro (2011), existem também as chamadas enzimas desramificadoras, que hidrolisam principalmente ligações do tipo α -(1,6), como a pululanase

(GUPTA ET AL., 2003; DE CASTRO ET AL., 2011; DE CASTRO, CASTILHO E FREIRE, 2011).

Ainda pode ser citada a classificação de amilases conforme Kulp (1975) apud Batista (2019), na qual elas podem ser incluídas em três categorias de acordo com o mecanismo de ação: α -amilases, endoamilases, que hidrolisam ligações no interior da molécula de amido e reduzem a viscosidade do meio; β -amilases, exoamilases que promovem a hidrólise a partir de extremidades do substrato não redutoras; e as glicoamilases, também conhecidas por amiloglicosidases, cujo produto produzido a partir dos terminais não redutores é a glicose.

Sabe-se que para que ocorra a hidrólise completa do amido essas enzimas são combinadas de diferentes formas, para que ajam sinergicamente (GUPTA ET AL., 2003).

As amilases podem ser obtidas de várias fontes como plantas, animais e micro-organismos, porém as fontes microbianas têm sido as preferidas devido à grande disponibilidade e adaptabilidade. (AL-DHABI ET AL., 2020; CARVALHO ET AL., 2008).

Um grande número de amilases microbianas se encontra disponível no mercado, satisfazendo muito bem às necessidades industriais, tanto que elas praticamente substituíram a catálise química nas indústrias de processamento de amidos (GUPTA ET AL., 2003). Dentre essas fontes de amilase que incluem bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos, as bactérias e os fungos têm dominado a aplicação em setores industriais. Isso ocorre visto que eles apresentam curto período de crescimento, versatilidade bioquímica, possibilidade de aumento da concentração de enzimas produzidas por meio de manipulações genéticas e ambientalmente favoráveis, além de que normalmente essas fontes fornecem enzimas que de modo geral atendem às necessidades industriais (SINDHU, BINOD e PANDEY, 2017).

Além disso, vale ainda ressaltar a atenção para micro-organismos termofílicos, que produzem amilases termorresistentes, com estabilidade em relação ao pH e temperatura. Nesse contexto, podem ser citadas com destaque as amilases produzidas pelo gênero *Bacillus*, que produzem as α -amilases com essas características, com ênfase para quatro espécies que se destacam no meio comercial: *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* (SIVARAMAKRISHNAN ET AL., 2006; PRAKASH E JAISWAL, 2010). Para o gênero *Bacillus* sp., o valor ótimo de pH está entre 6 e 7 e a temperatura ótima de ação da enzima pode chegar a 135 °C. Dentre as fontes fúngicas, merece destaque o gênero *Aspergillus*, que está entre os grupos que produzem as amilases mais utilizadas industrialmente, sendo que para esse gênero, o valor ótimo de pH está entre 3 e 9 e a temperatura ótima de ação da enzima pode chegar a 70 °C (DE SOUSA E MAGALHÃES, 2010). *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus oryzae* são exemplos desse

grupo que são muito aplicados em processos biotecnológicos (SIVARAMAKRISHNAN ET AL., 2006).

Neste trabalho foi feito um estudo com a utilização de uma α -amilase termoestável, derivada de *Bacillus licheniformis*. As alfa-amilases, ou 1,4- α -D-glicano glicanohidrolases (EC 3.2.1.1) são endoenzimas que participam da reação de hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α -(1,4) em alguns polissacarídeos, como amido e glicogênio, e também em alguns oligossacarídeos. A ruptura do amido leva à formação de moléculas de glicose, maltose e dextrinas e é importante ressaltar que todos os produtos retêm a conformação anomérica original, com o grupo hidroxila na configuração α . (COELHO, SOUSA E GRANDE, 2018; PINTO, DORN E FELTES, 2020). A família de α -amilases consiste na maior família de hidrolases, transferases e isomerases, composta por 30 diferentes tipos de enzimas.

A produção de enzimas ocorre de forma limitada em alguns micro-organismos, o que dificulta a sua aplicação em escala industrial, porém estratégias como a utilização de meios de cultura específicos e otimizados podem minimizar essa questão (KUMAR E TAKAGI, 1999).

A fim de atender a demanda industrial, é necessário reduzir os custos para a produção das α -amilases, que podem ser produzidas por fermentação submersa (SMG) ou por fermentação em estado sólido (SSF). Cerca de 30 a 40% do custo da produção de enzimas é representado pelo meio de cultura, responsável para o desenvolvimento do micro-organismo. As condições de produção também dependem de fatores como pH, temperatura, aeração, concentração de inóculo, composição do meio de crescimento, presença de surfactantes, fontes de nitrogênio e carbono (CARVALHO ET AL., 2008).

Em geral, o processo de produção através de SSF apresenta-se como uma opção mais vantajosa do que o SMG por ter baixo investimento, usar técnica simples, baixo nível de inibição pelo produto, baixo consumo de água, melhor recuperação do produto e produção de alta qualidade. SMF geralmente ocorre usando um meio sintético com nutrientes e amido solúvel, assim como outros componentes de custo elevado. A substituição desses constituintes por opções de custo reduzido, como resíduos agroindustriais, diminui o custo do processo. Por sua vez, SSF é um processo no qual há crescimento dos micro-organismos em substratos sólidos, sem a presença de água ou com pouca quantidade. Substratos agroindustriais são os mais utilizados nesse processo (SINDHU, BINOD E PANDEY, 2017).

2.7 Imobilização

Biocatálise, seja através do uso de células ou enzimas, consiste em uma técnica consolidada atualmente em aplicações biotecnológicas e é uma estratégia que está alinhada

com a química verde, sendo sustentável devido ao menor consumo de energia, não toxicidade e seletividade química. Devido aos avanços nas pesquisas em relação às enzimas e a engenharia aplicada às proteínas, além da caracterização de processos biocatalíticos pela química verde, um crescente número de moléculas vem sendo sintetizado pelas enzimas, além do uso desses catalisadores na forma livre em indústrias como a farmacêutica, de cosméticos, papel e celulose, têxtil, por exemplo.

No entanto, é preciso ressaltar que a aplicação de enzimas livres é limitada pela instabilidade da estrutura proteica quando isoladas do seu ambiente natural, alto custo de isolamento e purificação, alta sensibilidade mesmo para pequenas variações nas condições do processo e na presença de substâncias que podem agir como inibidores, resultando assim, em um curto ciclo operacional (GIRELLI, ASTOLFI E SCUTO, 2019; BASSO E SERBAN, 2019).

A fim de solucionar algumas dessas limitações nos processos industriais, nos quais são utilizadas enzimas, além de melhorar a eficiência destes, foi desenvolvida a técnica de imobilização de enzimas (EŞ, VIEIRA E AMARAL, 2015). A escolha da utilização de enzimas livres ou insolúveis (imobilizadas) pelas indústrias está intimamente relacionada ao seu custo e a sua aplicação. As enzimas insolúveis correspondem a uma forma específica de catálise heterogênea, a partir da qual podem ser reutilizadas e recuperadas, com ampla aplicação em uma gama variada de processos e, normalmente, com manutenção de atividade por longo período (TUFVESSON ET AL., 2010).

A imobilização de uma enzima representa a junção da seletividade, da estabilidade e da cinética desse biocatalisador com as propriedades do suporte de modo a proporcionar como prioridade, a maior estabilidade física e catalítica desse conjunto (KRAJEWSKA, 2004; TUFVESSON ET AL., 2010; BASSO E SERBAN, 2019).

Por definição, imobilização expressa o ato de tornar algo imóvel ou fixo. Na primeira conferência de engenharia de enzimas, em Henniker (EUA, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, foram definidos como sendo fisicamente fixos em uma região definida com o intuito de catalisar uma reação específica, sem perda de atividade catalítica e capacidade de utilização repetida ou contínua (KATCHALSKI-KATZIR E KRAEMER, 2000). Além desse conceito, a imobilização pode ser definida como a chave para otimizar a performance operacional dos catalisadores em bioprocessos industriais (SHELDON, 2007).

Nelson e Griffin, em 1916, realizaram o primeiro trabalho de imobilização de enzimas, ao adsorverem invertase em carvão ativado e alumina, para reter atividade na reação de

inversão de sacarose. Na década de 60 houve um impulso nas pesquisas relacionadas com a tecnologia enzimática em relação à aplicação industrial de enzimas imobilizadas, com os primeiros avanços no Japão e daí em diante, continuamente, mais pesquisas têm sido desenvolvidas até o momento atual, com diferentes focos (SOUZA ET AL., 2017).

Enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens: facilidade de separação do biocatalisador; redução de custos de processos “*downstream*”; capacidade de reutilização eficiente; melhor estabilidade em relação ao armazenamento e a solventes orgânicos, altas temperaturas e variação de pH (condições operacionais); possibilidade de co-imobilização com outra enzima em alguns casos; aplicação em processos contínuos e facilidade de separação do meio reacional, evitando ou diminuindo a contaminação do produto com proteína (BASSO E SERBAN, 2019; SHELDON E VAN PELT, 2013).

Algumas desvantagens da imobilização também podem ser citadas: há custos adicionais em relação aos suportes utilizados, os quais normalmente apresentam preços elevados e não apresentam grande disponibilidade, como acetato de celulose, nanotubos de carbono e quitosana, dentre outros. No entanto, já está sendo explorada a utilização de resíduos agroindustriais, que são sustentáveis e apresentam características interessantes para a imobilização (KLEIN ET AL., 2016; SHELDON, 2007).

Alguns outros efeitos negativos que podem ocorrer com a imobilização são: inacessibilidade do sítio ativo da enzima devido à imobilização (efeito estereoquímico); alteração na conformação da enzima devido à mudança na estrutura do sítio ativo (efeito conformacional); interação do suporte com moléculas de baixa massa molecular do meio reacional, alterando o microambiente (efeito de partição) e resistência à transferência de massa de substrato até o sítio ativo ou da saída do produto (efeitos difusionais ou de transferência de massa) (KLEIN ET AL., 2016; SHELDON, 2007).

A fim de solucionar os problemas na imobilização é preciso analisar em cada processo qual o método mais adequado a ser aplicado. Alguns fatores fundamentais nessa escolha são: solubilidade de produtos e substratos, tipo de solvente, suporte mais adequado, avaliar a diferença de gradiente no meio reacional, verificar existência de efeitos difusionais e avaliar a porosidade e tamanho do suporte (VIEIRA, 2009; GEOR MALAR ET AL., 2020).

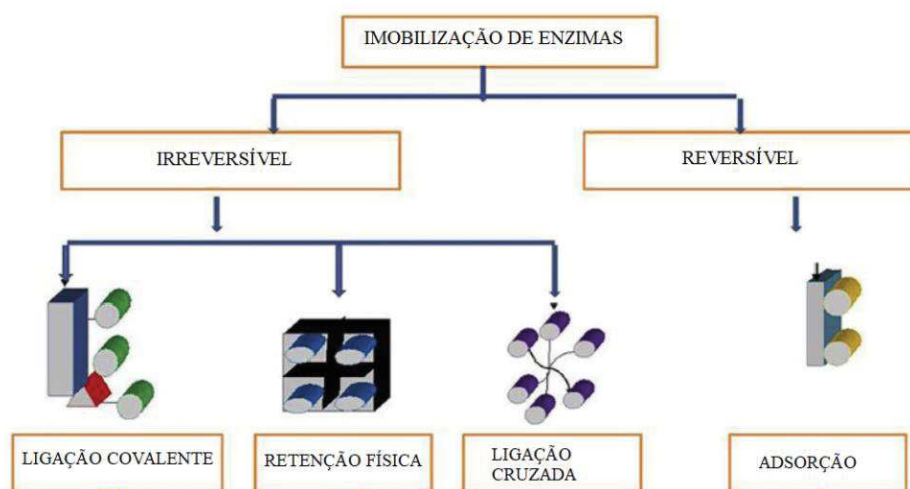
Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para promover a imobilização de enzimas, mas a escolha pela indústria leva principalmente em consideração a relação custo benefício de cada um. Os métodos mais comumente utilizados são baseados em interações físicas (como adsorção e confinamento/encapsulamento) e em interações químicas (que

envolvem ligações covalentes e reticulação com ligações múltiplas) (GEOR MALAR ET AL., 2020; BASSO e SERBAN, 2019).

2.7.1 Métodos de imobilização

A imobilização de enzimas pode ocorrer por meio de várias técnicas, comumente classificadas em dois métodos: físico ou reversível, o qual envolve interações mais fracas entre o suporte e o material, e químico ou irreversível, que envolve ligações covalentes, mais fortes. O primeiro método tem como exemplo a adsorção e o segundo método inclui a ligação covalente, a retenção física e a ligação cruzada. A escolha do método de imobilização é importante, pois a duração e a reutilização das enzimas imobilizadas dependem da opção feita e também a relação custo benefício para a aplicação industrial (SNEHA, BEULAH e MURTHY, 2019; SINGH ET AL., 2018). A Figura 2.6 apresenta um esquema dos principais métodos de imobilização.

Figura 2.6 - Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Sneha, Beulah e Murthy, 2019.

2.7.1.1 Adsorção Física

Esse método corresponde a uma técnica simples e de baixo custo, no qual a enzima é misturada com o adsorvente em condições adequadas por determinado tempo e, posteriormente, o adsorvente é lavado para remover as proteínas que não foram adsorvidas. As ligações envolvidas entre a superfície adsorvente e a enzima são interações mais fracas, como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e também podem existir ligações covalentes e iônicas. Por envolver interações mais fracas, normalmente a conformação da

enzima não é afetada e assim a atividade da enzima pode ser mantida. (NISHA, ARUN KARTHICK E GOBI, 2012; SNEHA, BEULAH E MURTHY, 2019).

Para selecionar o adsorvente, que pode ser orgânico ou inorgânico, deve haver grande afinidade entre este e a enzima, o que depende da presença de grupos ativos na superfície carreadora, tamanho de partícula e dos poros (SNEHA, BEULAH E MURTHY, 2019).

Algumas desvantagens dessa técnica são que pequenas mudanças no meio reacional podem promover a dessorção da enzima, como por meio de alterações de temperatura, concentração de substrato e pH, que pode modificar a força iônica. Além disso, em algumas situações o sítio ativo da enzima pode ser bloqueado pelo material de suporte e assim resultar em redução da atividade enzimática (SINGH ET AL., 2018).

Alguns reagentes bi ou multifuncionais como glutaraldeído e diisocianato de tolueno podem ser utilizados para melhorar a estabilidade no processo de adsorção física (DE SOUSA, 2018; CAO, 2005).

2.7.1.2 Ligação Covalente

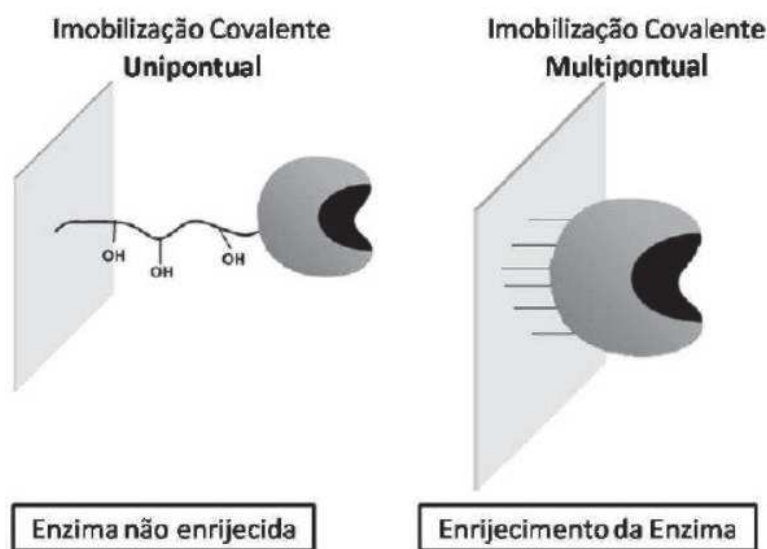
Essa técnica garante o desenvolvimento de interações mais estáveis a partir da formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, normalmente estabelecidas a partir de reações químicas entre grupos funcionais presentes nas enzimas, como amino, hidroxila fenólica, imidazol e tiol. A imobilização por ligação covalente pode ocorrer por meio da conexão direta entre enzima e suporte ou por intermédio de algum componente utilizado para fazer essa conexão, como o glutaraldeído e brometo de cianogênio, que promove a ativação do suporte, produzindo grupos eletrofilicos nessa superfície e permitindo que ela se ligue à enzima. Às vezes essa modificação na superfície do material promove estabilidade térmica. O glutaraldeído também pode ser utilizado como braço espaçador, que conecta o suporte já ativado à enzima (NISHA, ARUN KARTHICK e GOBI, 2012; SINGH ET AL., 2018). Ao utilizar essa técnica, uma estratégia é usar um inibidor competitivo ou a presença do substrato, com o objetivo de proteger o sítio ativo (SIRISHA, JAIN e JAIN, 2016).

Esse é um dos métodos de imobilização mais difundidos e eficientes, em termos de estabilidade operacional e térmica. A enzima fica firmemente ligada ao suporte e forma-se uma estrutura que é difícil de ser afetada por condições mais extremas de pH e temperatura. Como desvantagens podem ser citados os altos custos, a possibilidade de alteração da conformação da enzima, com efeito de redução de atividade ou inativação da mesma

(SOUZA ET AL., 2017). Além disso, por ser um método irreversível, não é possível separar enzima e suporte, e, portanto, este não pode ser reaproveitado em uma nova imobilização.

Para aumentar características como atividade, estabilidade e capacidade de reutilização, podem ser feitas ligações covalentes multipontuais. De acordo com o estudo de Mateo (2007), essas ligações, feitas em suportes previamente ativados, utilizam substâncias que atuam como pequenos braços espaçadores e envolve a conexão com vários resíduos presentes na superfície da enzima, promovendo um aumento da rigidez da enzima imobilizada. Isso ajuda a impedir alterações na conformação do catalisador quando este é submetido à ação de agentes desnaturantes e assim, aumenta a estabilidade e evita a inativação da enzima. No entanto, manter essa estrutura rígida requer a escolha de sistemas de imobilização adequados, analisando bem as características dos suportes e grupos funcionais envolvidos. A Figura 2.7 apresenta a configuração de ligações covalentes e ligações covalentes multipontuais.

Figura 2.7 - Ligação covalente unipontual e multipontual.



Fonte: Mateo et al., 2007.

2.7.1.3 Retenção Física

Esse método se baseia na retenção da enzima no interior de uma rede polimérica, porém permite a passagem de substrato e produto. Nesse caso, não ocorre a sua ligação com a matriz suporte e esse confinamento pode ocorrer a partir de três estratégias: inclusão da enzima em uma matriz polimérica; dissolução do catalisador em fase não aquosa (gel, por

exemplo) e pela utilização de microcápsulas semipermeáveis (SIRISHA, JAIN E JAIN, 2016).

As vantagens da retenção física são: é uma técnica barata, rápida, requer condições de reação brandas, protege o catalisador de contaminação microbiana, além de apresentar uma grande área superficial entre o material polimérico e a enzima. No entanto, como desvantagens podem ser consideradas algumas limitações de transferência de massa, a dificuldade no controle do tamanho dos poros e para evitar a saída da enzima do confinamento, além da possibilidade de inativação das enzimas pelos precursores de polimerização das matrizes (SOUZA ET AL., 2017; NISHA, ARUN KARTHICK E GOBI, 2012).

2.7.1.4 Ligação Cruzada

Essa técnica de imobilização, também conhecida por copolimerização, corresponde à ligação de enzimas umas às outras através de vários pontos de conexão entre si, sem a utilização de qualquer suporte (DATTA, CHRISTENA E RAJARAM, 2012). Esse tipo de agregado de enzimas é conhecido por cristais de enzima reticulados (CLECs), que são formados a partir de enzimas que se precipitam em microcristais e em seguida, são sujeitas às ligações cruzadas (SOUZA ET AL., 2017). Geralmente, o agente de reticulação utilizado é o glutaraldeído, por ser bifuncional, com grupos aldeídos em ambas as extremidades que reagem com grupos amino livres das enzimas, estabelecendo assim, as ligações cruzadas (SINGH ET AL., 2018).

Como vantagens, ressalta-se que esses agregados de enzimas são altamente reativos devido à alta concentração de enzimas e, também, que essa técnica pode ser utilizada juntamente com outras para minimizar a perda de enzima. No entanto, as desvantagens são as seguintes: como são envolvidas ligações covalentes, pode haver perda da atividade das enzimas com variações de vários fatores (pH, temperatura, agente ligante); há dificuldade de manter grandes agregados com retenção de atividade; alguns agentes reticulantes podem desnaturar ou modificar a estrutura das enzimas, baixa estabilidade mecânica devido à ausência de suporte e dificuldade de reprodução devido à aleatoriedade das ligações (CAO, 2005, MATEO ET AL., 2007).

Recentemente tem havido interesse por uma forma de reticulação conhecida por CLEAs – agregados enzimáticos reticulados, como substituição em relação aos métodos em que há utilização de suportes (PODREPŠEK, KNEZ E LEITGEB, 2019; XU E YANG, 2013). Os CLEAs apresentam alta atividade por volume, alta estabilidade devido à ligação

cruzada, facilidade de reuso e utilização de enzimas não purificadas em sua produção, sendo, esta última característica, uma das que os diferencia dos CLECs, dentre outras como também a não formação de cristais, visto que os CLEAs são formados a partir da precipitação de enzimas e depois da sua reticulação (SOUZA ET AL., 2017). No entanto, os CLEAs não apresentam resistência mecânica, mas isso pode ser aprimorado com intensificação das ligações cruzadas e com desidratação (GARCIA-GALAN ET AL., 2011). Outra questão é que há limitações de transferência de massa no interior dos agregados e também redução de mobilidade das enzimas, o que traz dificuldades de acesso para substratos que são macromoléculas (CUI E JIA, 2013).

2.7.2 Suportes para imobilização

As características do material utilizado no suporte para a imobilização de enzimas influenciam a eficiência desse processo, já que as propriedades cinéticas das enzimas são alteradas em função da interação delas com o suporte. Esses materiais se diferenciam pela morfologia e composição química e assim, podem ser classificados em: naturais (orgânicos), como alginato, colágeno, quitosana, quitina, amido e pectina, sintéticos (inorgânicos), como alumina, zeólitas, sílica, cerâmica, vidro e os orgânicos sintéticos, como resinas sintéticas (HETTIARACHCHY ET AL., 2018; DATTA, CHRISTENA E RAJARAM, 2012).

Algumas propriedades fundamentais que os suportes devem possuir são: alta permeabilidade, grande área superficial, estabilidade química e térmica, resistência à infecção microbiana, não toxicidade, regenerabilidade, baixo custo, resistência mecânica, presença de grupos funcionais adequados e em abundância, insolubilidade e características como hidrofobicidade ou hidrofiliicidade, que afetam a força e afinidade das interações entre enzima e carreador (BRENA, GONZÁLEZ-POMBO E BATISTA-VIERA, 2013).

Suportes inorgânicos normalmente são menos reativos que os orgânicos, mas apresentam estabilidade térmica, resistência mecânica adequada e resistência também à contaminação microbiana. Por não serem porosos, metais e seus óxidos apresentam pouca superfície disponível para imobilização. Por sua vez, suportes orgânicos apresentam limitações de difusão, são influenciados geralmente por fatores como contaminação microbiana e variação de pH, porém são de baixo custo e obtidos em grandes quantidades. Os suportes orgânicos sintéticos podem ser amplamente utilizados na imobilização, visto que podem ser fabricados com as propriedades físico-químicas desejadas. Não são suscetíveis à contaminação microbiana e incluem resinas simples, de troca iônica, polímeros com grupos ácidos ou básicos (HETTIARACHCHY, 2018).

2.7.2.1 Resinas como suporte para imobilização

A imobilização em resinas de troca iônica corresponde a um método simples, quando comparado a outros; ocorre por meio de interações eletrostáticas e iônicas entre os íons das proteínas e os íons de carga oposta da resina. A natureza das resinas é complexa, sendo em sua maioria polímeros (MARQUEZ ET AL., 2008; DAOUD, KADDOURI E SADOON, 2009) e elas correspondem a suportes insolúveis e com poros através dos quais é possível confinar as enzimas (DATTA, CHRISTENA E RAJARAM, 2012).

Diversas substâncias, sejam elas naturais, como ágar, celulose, carvão zeólitas, ou artificiais, como as resinas sintéticas, possuem propriedades que as caracterizam como trocadoras de íons. A definição de um trocador iônico corresponde ao “esqueleto” ou matriz de um material, no qual há íons fortemente fixados que podem ser de carga positiva ou negativa, sendo que também estão presentes íons móveis de carga oposta aos da matriz, que garantem a neutralidade elétrica. Em um trocador catiônico, os íons fixos têm carga negativa e os deslocáveis têm carga positiva. Quando ocorre o contrário, tem-se um trocador aniônico (ABRÃO, 2014).

A produção dos diferentes tipos de resinas depende da constituição da matriz, de grupos de troca e das características físico-químicas (RIANI, 2008). As primeiras resinas de troca iônica estáveis, produzidas comercialmente foram de fenol-formaldeído (ABRÃO, 2014).

A desvantagem da utilização dessa forma de imobilização consiste na possibilidade de a enzima se desprender da resina, em função de modificações da força iônica do meio reacional e também por alterações no pH. No entanto, podem ser citadas várias vantagens como recuperação do suporte, custo baixo e boa disponibilidade (CABRAL, FALLEIROS E RIBEIRO, 2012).

As resinas aniônicas podem ser formadas pela inserção de alguns grupamentos básicos como aminas terciárias e quaternários de amônio que produzem, respectivamente, resinas fracamente básicas e resinas fortemente básicas. Por sua vez, dentre os grupamentos ácidos podem ser citados o ácido sulfônico (que se sobressai) e o ácido carboxílico (mais raro), que produz, respectivamente, resina catiônica fortemente ácida e resina catiônica fracamente básica (GONZALES, 2010 apud FALLEIROS, 2012).

Nesta pesquisa foi usada a resina Duolite® A-568, que conforme o fabricante (Rohm Hass), é uma resina de troca aniônica, com matriz de fenol-formaldeído policondensado, caracterizada por ser fracamente básica, com estrutura granular e extremamente porosa. Ela se

adequa à aplicação em vários bioprocessos, como em indústria de amido, gordura, leite, dentre outras, por ser hidrofílica, ter distribuição controlada de poros e força iônica projetados para otimizar a imobilização de enzimas nesses processos.

Vários trabalhos utilizaram a resina Duolite® A-568 para imobilização de diferentes enzimas como: Fuentes et al., (2001) que estudaram a imobilização de lipase por adsorção nessa resina; Marquez et al, (2008), com o estudo da imobilização da invertase por adsorção nessa resina, para otimização da hidrólise da sacarose; Wang et al., (2016), com a imobilização de cellobiose 2-epimerase de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* na produção de lactulose, com a utilização de glutaraldeído no processo de adsorção nessa resina; Sousa et al. (2018), que estudaram o processo de imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces Marxianus* nessa resina.

Por fim, neste trabalho foi utilizada a função desejabilidade, que é a aplicação do método proposto por Derringer e Suich (1980), com o objetivo de estabelecer as melhores condições para os processos de imobilização com resina Duolite® A-568 que foram avaliados. Essa ferramenta se baseia na determinação dos valores das variáveis independentes que otimizam uma ou mais respostas ou, pelo menos, as deixem em faixas aceitáveis. É, portanto, uma técnica de otimização simultânea de mais de uma resposta, com base em métodos de programação não linear. Cada resposta y_i é associada a uma função individual de desejabilidade (d_i) que varia de $0 \leq d_i \leq 1$. Quando o valor da resposta for o mais desejável ou ideal, $d_i=1$; se a resposta estiver fora da região de aceitação, $d_i=0$. A desejabilidade global (D), dada pela média geométrica das desejabilidades individuais, deve ser maximizada (estar mais próxima de 1) e com base nesse objetivo são selecionadas as variáveis independentes, e consequentemente, definidas as melhores condições de processo (CRUZ-MONTEAGUDO, BORGES E CORDEIRO, 2008).

A partir do que foi exposto nessa revisão, foi definido então o escopo do trabalho: estudar os processos de imobilização da enzima α -amilase comercial Termamyl® 2X, em resina de troca iônica, Duolite® A-568, por adsorção e ligação cruzada, a partir da hidrólise de amido de milho (Maizena). Esta pesquisa apresenta relevância, pois foi feita de forma inovadora, com utilização de uma resina de baixo custo e que ainda não havia sido estudada nessas condições para essa finalidade.

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados e a metodologia experimental empregada para a realização dos experimentos relacionados com a pesquisa.

3.1 Material

3.1.1 Enzima

Neste trabalho foi utilizada a enzima α -amilase, de nome comercial Termamyl® 2X. Ela é produzida por uma cepa geneticamente modificada do gênero *Bacillus licheniformis* e é comercializada no estado líquido. Trata-se de uma enzima termostável, capaz de hidrolisar ligações glicosídicas do tipo α -(1,4) em amilose e amilopectina, componentes do amido.

A enzima foi gentilmente doada pela LNF Latino Americana, representante da Novozymes no Brasil. A atividade da Termamyl® 2X descrita pelo fabricante é dada por 1kU (quilounidade de alfa amilase), que representa a quantidade de enzima que possibilita hidrolisar 5,26 g de amido por hora, nas seguintes condições: pH 5,60; temperatura 37 °C e tempo de reação entre 7 e 20 minutos. Segundo informações do fabricante, esta enzima atua na faixa de pH de 5,50 a 7,50, sendo a faixa ótima de 6,00 a 7,00; a faixa de atuação em relação à temperatura é de 50 a 115 °C, com faixa ótima acima de 80 °C.

Nos experimentos de hidrólise de amido, um dado volume de enzima na sua forma original era adicionado ao meio reacional, fornecendo assim a relação volume de enzima por volume de meio em termos percentuais (%v/v). No decorrer do trabalho foram empregados diferentes valores de (%v/v), conforme a conveniência.

3.1.2 Suporte para imobilização

O suporte selecionado para a imobilização da enzima Termamyl® 2X foi a resina de troca iônica Duolite® A-568 (Rohm Haas). Essa resina é aniônica, altamente porosa e com caráter fracamente básico, que tem como base a ligação cruzada de fenol-formaldeído e é um suporte sintético (orgânico). A força iônica, volume de poros, tamanho de poros e de partículas da resina conferem um *design* favorável para a imobilização de enzimas aplicadas na indústria de amido e de gordura. Essa resina foi adquirida da companhia *Dow Chemical Company* e pode ser visualizada na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Resina de troca iônica Duolite® A-568.



Fonte: O autor.

As principais características da resina Duolite® A-568 são:

- Matriz: Fenol-formaldeído
- Grupo funcional: Amina Terciária
- Forma física: grânulos de cor verde a cinza
- Capacidade total de troca iônica: $\geq 1,20$ equivalente/L
- Alta porosidade
- Tamanho do poro: 15 a 25 nm
- Volume do poro: 0,78 a 1 mL/g
- Densidade: 1,10 a 1,14 g/mL
- pH bom para imobilização: 5 a 7

3.1.3 Substrato e outros reagentes

Nas reações de hidrólise de amido ao longo da execução dos ensaios foram preparadas soluções de amido (substrato) a partir de Maizena (marca Unilever) em tampão fosfato 0,2 M. Também foram utilizados os seguintes reagentes (PA): glicose, ácido 3,5-dinitrosalicílico, hidróxido de sódio, sal de Rochelle (tartarato de sódio e potássio), fosfato de sódio monobásico e dibásico. Além desses, foram usados glutaraldeído 25% v/v e HCl 37% de pureza.

3.2 Unidade experimental

Os experimentos para determinação da atividade da enzima Termamyl® 2X, tanto na forma livre como na forma imobilizada, foram realizados na unidade experimental, mostrada

na Figura 3.2, montada no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química.

Figura 3.2 - Unidade experimental. 1: Banho em ebulição; 2: Tubos Folin Wu com DNS; 3: Banho de gelo; 4: Reatores; 5: Banho termostatizado.



Fonte: o Autor.

Três reatores de mistura em batelada compunham a unidade experimental. Cada reator tem volume útil de 200 mL, com dimensões de 8,2 cm de altura, 5,5 cm de diâmetro interno e com agitação magnética. Cada reator era dotado de uma camisa externa conectada a um banho termostizado Quimis, modelo Q214M2, a partir do qual circulava água para controle de temperatura. Os experimentos para determinação da atividade da enzima Termamyl 2X, tanto na forma livre como na forma imobilizada, foram realizados na unidade experimental, mostrada na Figura 3.2, montada no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química.

Na Figura 3.2 também são apresentados um banho em ebulição, um banho de gelo e tubos Folin Wu com o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), os quais fazem parte dos ensaios para determinação de açúcar redutor total (ART) pelo método do DNS (MILLER, 1959). Na determinação da concentração de ART eram determinadas as absorbâncias a 540 nm, empregando um espectrofotômetro UV-VIS UV-280 (Shimadzu).

Nos experimentos de determinação de atividade da enzima imobilizada foi utilizada a mesma estrutura apresentada na Figura 3.2, porém foram acrescentadas cestas de aço inox de 100 mesh, com 6,2 cm de altura e 2,4 cm de diâmetro, inseridas no reator, a fim de reter a enzima imobilizada e evitar o atrito com os agitadores magnéticos, conforme pode ser visto na Figura 3.3.

Figura 3.3- Reator com cesta de aço inox para imobilização. 1: cesta de aço inox; 2: reator.



Fonte: o Autor.

3.3 Metodologia experimental

3.3.1 Gelatinização do amido

As soluções de amido a 1% (m/v) eram preparadas em solução tampão fosfato 0,2 M, a valores de pH conforme o valor desejado no experimento. Essas soluções eram colocadas em um béquer lacrado e mantidas em Banho-Maria em ebulição (em torno de 94°C), por 15 minutos, conforme descrito por Norman (1981) e Liu et al. (2019).

Estas soluções de amido gelatinizado eram usadas para compor o meio reacional nas reações de hidrólise empregando a enzima α -amilase.

3.3.2 Determinação da atividade da enzima livre

As atividades da enzima na forma livre, em todos os experimentos, foram determinadas pela metodologia das taxas iniciais de reação, empregando a unidade experimental da Figura 3.2. Inicialmente preparavam-se as soluções de amido gelatinizado a 1% (m/v), conforme descrito no Item 3.3.1. Na determinação da atividade da enzima, um dado volume da solução de amido gelatinizado, no pH desejado, era adicionado ao reator, mantido sob agitação magnética e quando a temperatura se estabilizava em 70°C, era acrescentada ao reator uma alíquota da enzima, tal que a relação desejada volume de enzima por volume de meio (%v/v) fosse alcançada. Essa reação volume de enzima por volume de meio assumiu diferentes valores conforme a conveniência do experimento e será informada em todas as oportunidades.

Amostras do meio em reação eram retiradas em intervalos adequados de tempo e determinada a concentração de açúcar redutor pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma curva de calibração de concentração de glicose (PA) em função da absorbância, a 540 nm, foi

elaborada como referência para a determinação da concentração de ART em função do tempo nos experimentos.

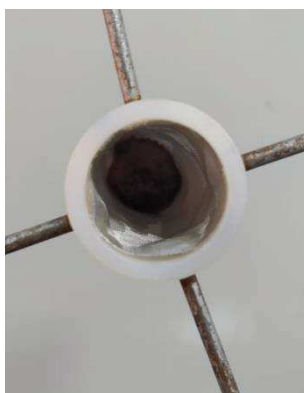
Com os valores de ART produzidos em função do tempo de reação, eram determinadas as taxas iniciais de reação de hidrólise a partir da inclinação da reta obtida. A unidade (U) de atividade da enzima livre (A_i) foi expressa em mg de ART produzidas por minuto (U), nas condições definidas no experimento.

3.3.3 Determinação da atividade da enzima imobilizada

Na determinação da atividade da enzima imobilizada utilizou-se uma metodologia idêntica àquela empregada para a enzima livre, porém com o biocatalisador imobilizado em 1 g de resina Duolite® A-568 e retido num cesto de aço inox, como já definido.

A unidade (U) de atividade da enzima imobilizada (A_i) foi expressa em mg de ART produzidas por minuto (U), nas condições definidas no experimento. A enzima imobilizada é mostrada na Figura 3.4.

Figura 3.4 – Enzima imobilizada



3.3.4 Influência do pH na atividade da enzima livre

Com o objetivo de avaliar a influência do pH do meio reacional na atividade da enzima Termamyl® 2X livre, as atividades da enzima foram determinadas na faixa de pH entre 5,0 e 8,0 com intervalo de 0,5 pelo procedimento indicado no Item 3.3.2, empregando uma concentração de enzima igual a 0,2% v/v (NATIONAL CENTRE, 2019).

A unidade (U) de atividade da enzima (A_i) foi expressa em mg/min (U) e foram calculadas atividades relativas (A_{rel}) em relação à máxima atividade obtida ($A_{máx}$), conforme a Equação (3.1). Foi feita também uma regressão polinomial de segundo grau para avaliar a atividade máxima da faixa de pH considerada.

$$A_{\text{rel}}(\%) = \frac{A_i}{A_{\text{máx}}} \times 100 \quad 3.1$$

3.3.5 Determinação da estabilidade da Termamyl® 2X livre em relação ao pH

Amostras de Termamyl® 2X, preparadas a 0,5% v/v em tampão fosfato nos valores de pH 5,0; 6,0; 6,5 7,0; 7,5 e 8,0 foram colocadas em frascos com tampa e incubadas durante 2 horas a 70°C, em banho termostatizado.

Após este intervalo de tempo de incubação, foram determinadas as atividades de todas as amostras pelo método das taxas iniciais, conforme Item 3.3.2, empregando um meio reacional composto de uma solução de amido gelatinizado a 1% (m/v), com a enzima a 0,05% (v/v), a 70°C e pH 6, sob agitação constante.

Antes da incubação, amostras da enzima (controle), nos mesmos valores de pH, a 25 °C, foram coletadas para determinação das atividades pelo mesmo procedimento, para efeito de comparação com as amostras que foram incubadas a 70°C.

A unidade (U) da atividade da enzima foi expressa em mg/min (U) e foram calculadas atividades residuais (A_{res}) por meio da relação das atividades obtidas após 2h (A_{phi}) e a atividade do controle para os mesmos valores de pH (AC), conforme Equação (3.2).

$$A_{\text{res}}(\%) = \frac{A_{\text{phi}}}{AC} \times 100 \quad 3.2$$

3.3.6 Imobilização da enzima Termamyl® 2X por adsorção ao suporte

A seguir é descrito como foi feito o processo de imobilização da enzima Termamyl® 2X na resina Duolite® A-568 e são mostrados os cálculos envolvidos.

3.3.6.1 Ativação do suporte de imobilização

Para ativação da resina Duolite® A-568 foi seguido o método proposto pelo fabricante:

- 1- Adição de ácido clorídrico 1M à resina, na proporção de 1 volume de resina e 10 volumes de solução de ácido, mantidos por 30 minutos e 50 rpm em incubadora rotativa. Após esse processo, foi efetuada uma lavagem do suporte com 2L água destilada.

- 2- Em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio 1M à resina, na proporção de 1 volume de resina e 10 volumes de solução de base, mantidos por 30 minutos e 50 rpm em incubadora rotativa. Após esse processo, foi realizada uma lavagem do suporte com água destilada com 2L de água destilada.
- 3- Filtração à vácuo da resina por 15 minutos com 5 L de água destilada e secagem à temperatura ambiente.

3.3.6.2 Testes preliminares de imobilização

Foram realizados alguns testes iniciais para avaliar a capacidade de adsorção da enzima na resina Duolite[®] A-568 e para definir qual a melhor temperatura para os experimentos de imobilização seguintes, que foram conduzidos por meio de um DCC (Delineamento Composto Central).

Em dois testes preliminares, a enzima Termamyl[®] 2X foi preparada para imobilização em um *erlenmeyer* contendo 1g de resina, ativada conforme Item 3.3.6.1 e volume total de 15 mL em pH 5 (enzima, resina e tampão fosfato no pH 5), tendo a enzima concentração de 0,2% v/v nesse meio. De acordo com o fabricante, a resina tem uma boa faixa de imobilização entre pH 5 e 7, por isso foi selecionado o valor de pH 5 para o teste. Os *erlenmeyers* foram colocados em uma incubadora rotatória a 120 rpm, com tempo imobilização de 15 minutos e temperatura variável: no teste 1, a temperatura de imobilização foi de 25°C e no teste 2, 40°C.

Em cada teste, após o tempo de imobilização, a enzima foi transferida para a cesta de aço inox, separada do sobrenadante e lavada com tampão fosfato pH 7. Em seguida, foi determinada a atividade da enzima imobilizada, conforme Item 3.3.2.

3.3.6.3 Procedimento experimental para imobilização da enzima

O estudo da imobilização da enzima Termamyl[®] 2X na resina Duolite[®] A-568 por adsorção foi conduzido através de um DCC (delineamento composto central), ferramenta estatística com a qual foi avaliada a influência conjunta das variáveis pH, tempo de imobilização e concentração da enzima no meio de imobilização, conforme será apresentado no Item 3.3.6.6. Além disso, também foram utilizados os softwares Maple 17 e o Statistica[®] 7.0, para avaliar regiões ótimas das respostas que foram determinadas, assim como também foi utilizada a função desejabilidade. Os procedimentos de imobilização e a metodologia analítica serão descritos na sequência.

Para cada experimento de imobilização da enzima Termamyl® 2X, conduzidos segundo o DCC, foram preparados 25 mL de uma solução inicial de enzima na concentração desejada (%v/v) para cada experimento, em um balão volumétrico, em tampão fosfato no pH da imobilização. Eram separados 10 mL dessa solução em um *erlenmeyer*, compondo o controle (que representava a enzima livre para o experimento) e os outros 15 mL eram adicionados em outro *erlenmeyer* contendo 1g de resina, ativada conforme 3.3.6.1. Os *erlenmeyers* contendo a resina e solução de enzima eram tampados e então colocados em uma incubadora rotatória a 120 rpm e 25°C, com tempo de imobilização variável. Em cada teste, após o tempo de imobilização, o biocatalisador imobilizado era transferido para a cesta de aço inox, separando o biocatalisador imobilizado do sobrenadante. A seguir a enzima imobilizada era lavada com 50 mL de solução tampão no mesmo pH da imobilização, gerando a suspensão ou água de lavagem.

A atividade do biocatalisador imobilizado era determinada conforme Item 3.3.3 e as do controle, sobrenadante e da solução de lavagem eram determinadas conforme Item 3.3.2, sempre empregando um meio reacional a 1% (m/v) de amido gelatinizado em tampão fosfato a pH igual a 7,0 à temperatura de 70°C. Esses experimentos foram realizados em duplicata. A imobilização da enzima, juntamente com a preparação do controle, são mostrados na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Enzima imobilizada (a) e controle (b).



Fonte: autor.

3.3.6.4 Cálculo da atividade recuperada (AR)

A atividade recuperada (AR) corresponde à relação entre a atividade da enzima imobilizada (AI) e a atividade do controle (AC). AC é a atividade total da enzima livre nas mesmas condições experimentais da enzima imobilizada (SHELDON E VAN PELT, 2013), conforme Equação (3.3).

$$AR(\%) = \frac{AI}{AC} \times 100 \quad 3.3$$

3.3.6.5 Cálculo da eficiência de imobilização (Ef)

A eficiência da imobilização (Ef) corresponde à relação entre a atividade da enzima imobilizada (AI) e o resultado da subtração das atividades do sobrenadante (AS) e da solução de lavagem (AL) da atividade do controle (AC) (SHELDON E VAN PELT, 2013), conforme Equação (3.4).

$$Ef(\%) = \frac{AI}{AC - AS - AL} \times 100 \quad 3.4$$

3.3.6.6 Influência do pH, tempo e concentração de enzima no meio de imobilização.

Neste trabalho foi utilizado um DCC, por meio do *software* Statistica® 7.0, considerando a análise de três variáveis independentes, tendo assim então um fatorial completo 2³, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, em um total de 17 experimentos. Nesse planejamento foi utilizado o alfa de rotacional, cujo valor foi de 1,6818. Esse planejamento teve como objetivo a análise conjunta da influência de três variáveis independentes - pH, tempo e concentração de enzima - em três respostas – atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência de imobilização.

A faixa de análise para as variáveis independentes foi a seguinte: o pH variou de 4,82 a 8,18; o tempo, de 15 minutos a 166 minutos e a concentração de enzima Termamyl® 2X, de 0,204% a 2,9% (v/v). Em relação ao pH, foi levada em consideração a faixa de atuação da enzima, a melhor faixa de imobilização da resina, fornecidos nas fichas técnicas e pelos fabricantes e também o trabalho de Guidini (2009), no qual foi utilizada a resina Duolite A-568. Os valores de concentração e tempo foram baseados em testes preliminares.

Cada experimento desse DCC foi realizado conforme descrito no Item 3.3.6.3. As equações de codificação do pH (X₁), tempo (X₂) e concentração de enzima (X₃) foram obtidas utilizando a Equação (3.5).

$$X_n = \frac{X - X_0}{\left[\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad 3.5$$

Sendo que,

X_n = valor codificado da variável ($n = 1, 2, \dots$);

X = valor da variável a ser calculada;

X_0 = valor da variável no ponto central;

X_{+1} = valor da variável no nível superior;

X_{-1} = valor da variável no nível inferior.

As Equações codificadas são apresentadas pelas Equações (3.6), (3.7) e (3.8), respectivamente.

$$X_1 = \frac{pH - 6,5}{1} \quad 3.6$$

$$X_2 = \frac{t - 90}{45} \quad 3.7$$

$$X_3 = \frac{C - 1,55}{0,8} \quad 3.8$$

A

Tabela 3.1 apresenta as condições de todos os experimentos realizados no DCC. São apresentados os valores das variáveis na forma codificada e em seu valor real, sendo que X_1 refere-se ao pH, X_2 ao tempo (min) e X_3 a concentração de enzima na imobilização (% v/v).

Tabela 3.1- Matriz do DCC com valores reais e codificados.

Experimentos	Valor Real (Valor codificado)		
	X ₁	X ₂	X ₃
	pH (-)	Tempo (min)	Concentração de enzima (% v/v)
1	5,50 (-1)	45 (-1)	0,75 (-1)
2	5,50 (-1)	45 (-1)	2,35 (+1)
3	5,50 (-1)	135 (+1)	0,75 (-1)
4	5,50 (-1)	135 (+1)	2,35 (+1)
5	7,50 (+1)	45 (-1)	0,75 (-1)
6	7,50 (+1)	45 (-1)	2,35 (+1)
7	7,50 (+1)	135 (+1)	0,75 (-1)
8	7,50 (+1)	135 (+1)	2,35 (+1)
9	4,82 (- α)	90 (0)	1,55 (0)
10	8,18 (+ α)	90 (0)	1,55 (0)
11	6,50 (0)	15 (- α)	1,55 (0)
12	6,50 (0)	166 (+ α)	1,55 (0)
13	6,50 (0)	90 (0)	0,20 (- α)
14	6,50 (0)	90 (0)	2,90 (+ α)
15	6,50 (0)	90 (0)	1,55 (0)
16	6,50 (0)	90 (0)	1,55 (0)
17	6,50 (0)	90 (0)	1,55 (0)

O procedimento experimental foi realizado em duplicata, conforme os itens 3.3.2 (para o controle, o sobrenadante e a solução de lavagem) e Item 3.3.3.

A partir do DCC foi possível gerar um modelo para cada resposta (atividade imobilizada, atividade recuperada e eficiência de imobilização) em função das variáveis independentes (pH, tempo e concentração de enzima), utilizando o Statistica® 7.0. Além disso, foram geradas superfícies de resposta por esse *software* e pelo Maple 17, cuja análise, juntamente com a utilização da função desejabilidade do Statistica® 7.0, permitiu determinar as melhores condições para maximização de cada resposta individualmente e simultaneamente.

Os experimentos de validação foram então conduzidos nas condições de otimização, que estavam dentro da faixa de estudo do DCC. Esses experimentos foram conduzidos conforme a metodologia usada nos experimentos do DCC.

3.3.7 Imobilização da enzima Termamyl® 2X por ligação cruzada com glutaraldeído.

Para avaliar a possibilidade de melhorar as repostas obtidas com a imobilização da enzima na resina, foi feito o estudo da imobilização de Termamyl® 2X por ligação cruzada com a resina Duolite® A-568, através da utilização de glutaraldeído como agente de reticulação, como mostrado na Figura 3.6. A resina utilizada foi previamente ativada, conforme Item 3.3.6.1.

Figura 3.6 – Ligação cruzada com glutaraldeído.



Fonte: autor.

3.3.7.1 Testes preliminares da ligação cruzada com glutaraldeído

Foi avaliada a influência do glutaraldeído como agente reticulante na atividade enzimática, após o processo de imobilização por adsorção ter sido otimizado. Para isso, foi realizado um teste preliminar para verificar se o processo de ligação cruzada deveria ser realizado antes ou após a o processo de imobilização, considerando o ponto ótimo obtido a partir do DCC realizado anteriormente.

No primeiro teste, foi preparada 25 mL de uma solução enzimática a 0,878 % v/v em um balão volumétrico, com tampão fosfato no pH 4,82. Eram separados 10 mL do controle em um *erlenmeyer* (que representavam a enzima livre para o experimento) e os outros 15 mL eram adicionados em outro *erlenmyer* com 1 g de resina, ativada conforme Item 3.3.6.1. Os *erlenmeyers* contendo a enzima e resina foram colocados em uma incubadora rotativa a 120 rpm e 25°C por 15 minutos, para imobilização.

Posteriormente a resina foi separada do sobrenadante e lavada com 50 mL de tampão fosfato e foram acrescentados 10 mL de solução de glutaraldeído 3 g/L, preparado em tampão fosfato, pH 4,82 para o processo de ligação cruzada. A resina com a solução de glutaraldeído foi colocada na incubadora rotativa nas mesmas condições do teste anterior. Ao final do processo, a resina foi separada da solução de glutaraldeído e lavada com 50 mL de tampão fosfato em pH 4,82. A atividade da enzima imobilizada foi determinada conforme Item 3.3.3.

No segundo teste, foi realizado primeiramente o processo de ligação cruzada com glutaraldeído, posteriormente a imobilização e a determinação da atividade, conforme Item 3.3.3. As condições desses testes tiveram como base o trabalho de Guidini (2009).

3.3.7.2 Influência conjunta da concentração de glutaraldeído e do tempo de ligação cruzada

Um novo DCC foi elaborado com o auxílio do *software* Statistica® 7.0., considerando a análise de três variáveis independentes, tendo assim então um fatorial completo 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, em um total de 11 experimentos. Nesse planejamento foi utilizado o alfa de rotacional, cujo valor foi de 1,4142. Esse planejamento teve como objetivo a análise conjunta da influência de duas variáveis independentes - concentração de glutaraldeído e tempo de ligação cruzada - em três respostas – atividade imobilizada, atividade recuperada (cálculo no Item 3.3.6.4) e eficiência de imobilização (cálculo no Item 3.3.6.5).

A faixa de análise para as variáveis independentes foi a seguinte: a concentração de glutaraldeído variou de 0 a 0,70; o tempo, de 4 minutos a 46 minutos. A metodologia adotada para os experimentos do DCC teve como base os melhores resultados verificados nos testes preliminares do Item 3.3.7.1 e com base no trabalho de Guidini (2009).

As Equações codificadas são apresentadas pelas Equações (3.9) e (3.10), respectivamente.

$$X_4 = \frac{C - 0,35}{0,25} \quad 3.9$$

$$X_5 = \frac{t - 25}{15} \quad 3.10$$

A Tabela 3.2 apresenta as condições de todos os experimentos realizados no DCC. São apresentados os valores das variáveis na forma codificada e em seu valor real, sendo que X_3 se refere à concentração de glutaraldeído (% m/v) e X_4 ao tempo para a ligação cruzada (min).

Tabela 3.2- Matriz do DCC com valores reais e codificados para o segundo DCC.

Experimentos	Valor Real (Valor codificado)	
	Concentração de glutaraldeído (X_4)	Tempo (X_5)
	(% m/v)	(min)
1	0,10 (-1)	10 (-1)
2	0,10 (-1)	40 (+1)
3	0,60 (+1)	10 (-1)
4	0,60 (+1)	40 (+1)
5	0,00 ($-\alpha$)	25 (0)
6	0,70 ($+\alpha$)	25 (0)
7	0,35 (0)	4 ($-\alpha$)
8	0,35 (0)	46 ($+\alpha$)
9	0,35 (0)	25 (0)
10	0,35 (0)	25 (0)
11	0,35 (0)	25 (0)

A partir do DCC foi possível gerar um modelo para cada resposta (atividade imobilizada, atividade recuperada e eficiência de imobilização) em função das variáveis independentes (concentração de glutaraldeído e tempo), utilizando o Statistica® 7.0. Também foram geradas superfícies de resposta por esse *software* e pelo Maple 17, cuja análise, juntamente com utilização da função desejabilidade do Statistica® 7.0, permitiu determinar as melhores condições para maximização simultânea das respostas.

Os experimentos de validação foram então conduzidos na condição de otimização, que estavam dentro da faixa de estudo do DCC.

3.3.8 Determinação da atividade da enzima Termamyl® 2X em condição selecionada da imobilização por ligação cruzada com variação de pH do meio reacional

Após a determinação e validação de condição selecionada após otimização para a imobilização da enzima por ligação cruzada, foram feitos experimentos para avaliar a atividade da enzima imobilizada nessa condição (0,2% g/L de glutaraldeído e 25 minutos –

condição da ligação cruzada e pH 4,82, tempo de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878% v/v – condição de imobilização)), nos pHs 5, 6 e 7 do meio reacional, a 70°C.

Os experimentos foram feitos na unidade experimental da Figura 3.2, conforme procedimento descrito no Item 3.3.3.

A unidade (U) de atividade da enzima, nesse caso, imobilizada, ($A_i=AI$) foi expressa em mg/min (U) e foram calculadas atividades relativas (A_{rel}) em relação à máxima atividade obtida ($A_{m\acute{a}x}$), conforme a Equação 3.1.

3.3.9 Determinação da estabilidade da enzima Termamyl® 2X em condição selecionada da imobilização por ligação cruzada em relação ao pH

Para o estudo da estabilidade da Termamyl® 2X, primeiramente foi realizado o processo de imobilização por ligação cruzada na condição selecionada após otimização (0,2% m/v de glutaraldeído e 25 minutos) e na condição ótima obtida pela imobilização por adsorção (pH 4,82, tempo de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878% v/v). Em seguida, foram realizados dois experimentos, nos quais a resina (1g) foi mantida por duas horas em contato com soluções tampão fosfato nos pHs 5,00 e 7,00 em enrlenmeyers lacrados, imersos em banho termostatizado com água a 70°C. Após esse tempo, as resinas com enzima imobilizada foram separadas do respectivo sobrenadante, lavadas com 50 mL de solução tampão no mesmo pH em que foi avaliada a estabilidade e então a resina e as soluções foram utilizadas para determinação da atividade.

Para obtenção da atividade, os procedimentos foram feitos de acordo com a descrição do Item 3.3.3., nos quais as condições do meio reacional eram 70°C e pH 7,00. A unidade (U) de atividade da enzima imobilizada foi expressa em mg/min (U) e foram calculadas, conforme a Equação 3.2), as atividades residuais (A_{res}) por meio da relação das atividades obtidas após 2h (A_{phi}) e a atividade do controle (AC), definido nesse caso, como a atividade da enzima imobilizada por ligação cruzada em seu ponto ótimo. Esses resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos para a enzima livre, na mesma faixa de pH estudada.

3.3.10 Estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada por adsorção e da enzima imobilizada por ligação cruzada

A enzima Termamyl® 2X, imobilizada por adsorção nas condições de pH 4,82, tempo de imobilização de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878% v/v, foi armazenada sob refrigeração na geladeira a 4°C em pH 6,50 (tampão fosfato) por 25 dias e também por 35

dias. A atividade enzimática após esses tempos de armazenamento foi determinada pelo método das taxas iniciais, conforme procedimento descrito no Item 3.3.3. Essas atividades residuais foram relacionadas com a atividade da enzima antes do armazenamento, considerada como o valor de 100%, para avaliar a estabilidade de armazenamento da Termamyl® 2X nessas condições.

De maneira análoga, foi determinada a atividade residual da enzima imobilizada por ligação cruzada, nas condições do ponto central do segundo DCC (0,35% g/L de glutaraldeído e 25 minutos de tempo para realização da ligação cruzada), armazenada por 25 dias, em pH 6,50 (tampão fosfato) a 4 °C. Essa atividade foi comparada em relação à atividade da enzima antes do armazenamento, considerada como valor de 100%.

3.3.11 Reusos da enzima Termamyl® 2X em condição selecionada da imobilização por ligação cruzada

Para avaliar a capacidade de reuso da enzima imobilizada por ligação cruzada, a resina foi preparada na condição selecionada após otimização desse processo. A partir de então, no reator da unidade experimental mostrada na Figura 3.2, foi feito, primeiramente, uma reação de hidrólise com a enzima imobilizada. Em seguida, foram realizadas outras cinco reações, entre as quais havia lavagem da enzima na resina com 50 mL de tampão (pH 4,82). As reações ocorreram com amido 1%, previamente gelatinizado, em pH 7, a 70°C, conforme procedimento do Item 3.3.3. Ao final de cada uma das cinco reações, foi determinado o valor de atividade residual remanescente na enzima imobilizada em relação à atividade presente em primeiro uso (primeira reação), considerado como o valor de 100%.

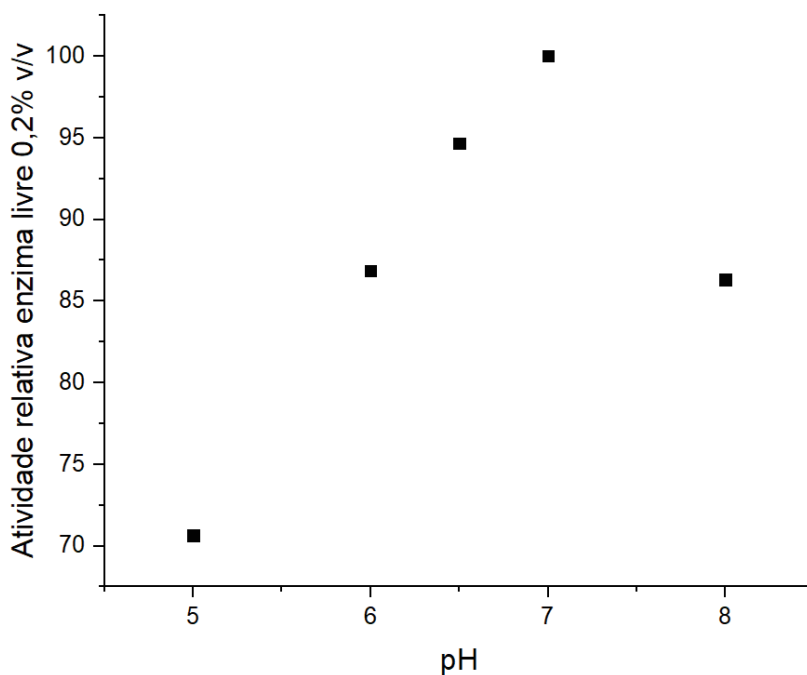
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, os principais resultados obtidos a partir do desenvolvimento desse trabalho serão expostos e discutidos.

4.1 Influência do pH na atividade da enzima livre

A determinação da atividade da enzima livre Termamyl® 2X foi avaliada na temperatura de 70°C e a partir da variação do pH do meio reacional, de 5 a 8. Em cada experimento, o meio continha 20 mL de solução de amido 1% m/v, previamente gelatinizada e a enzima se manteve na concentração de 0,2% v/v. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo regulares por um minuto e foi utilizado o método DNS para determinação do teor de ART. A atividade da enzima livre em cada pH foi obtida por meio do método das taxas iniciais de reação. A Figura 4.1 mostra a variação da atividade relativa da enzima livre em função do pH. O maior valor de atividade obtido foi assumido como 100% e os outros valores foram calculados em relação a ele.

Figura 4.1 - Atividade relativa em função do pH para a enzima livre.



Ao analisar a Figura 4.1 percebe-se que a enzima apresentou atividades relativas mais altas na faixa de pH 6,50 a 7,50. No pH 6,00 a enzima apresentou atividade relativa de 86,86%; no pH 6,50, 94,65 %; no pH 7,00 teve o valor mais alto, considerado 100% e no pH 8,00, 86,30%.

O valor de pH ótimo obtido para a reação de hidrólise do amido, pH 7, está de acordo com a faixa ótima de atuação descrita na ficha técnica da enzima, que está entre 6,00 e 7,00. Dessa forma, o pH 7,00 foi o valor adotado para o meio reacional dos experimentos seguintes realizados ao longo desse trabalho.

O pH ótimo das α -amilases pode variar de 2 a 12 (VIHINEN E MANTSILA, 1989), porém, a maioria das enzimas dessa categoria, que são derivadas de bactérias ou fungos, apresenta pH ótimo geralmente entre a faixa ácida à neutra (PANDEY ET AL., 2000).

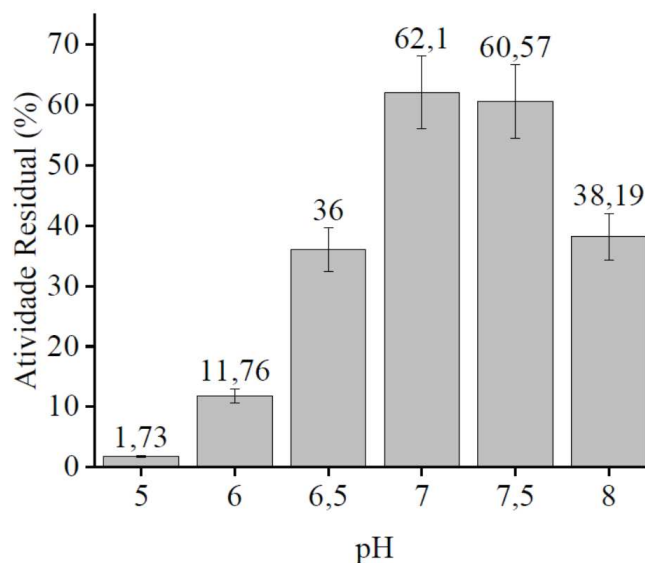
No trabalho de Aksoy, Tumturk e Hasirci (1997), foi estudada a variação da atividade da enzima α -amilase de pâncreas de porco em sua forma livre, em função do pH, na faixa de 5,00 a 8,00, em meio reacional a 25°C, com amido solúvel a 2% m/v e o pH ótimo obtido para a enzima foi de 7,50.

Outro trabalho que pode ser citado é o de Ferrari et al. (2017), no qual estudaram o processo de imobilização de α -amilase derivada de *Bacillus* sp. em goma gelana e que considera o pH ótimo de atividade da enzima livre como sendo 6,90, estando também de acordo com o valor obtido neste trabalho.

4.2 Estabilidade da Termamyl® 2X livre em relação ao pH

A estabilidade da Termamyl® 2X livre em relação ao pH foi avaliada por meio da manutenção da enzima em soluções com pHs variando na faixa de 5,00 a 8 por 2 horas, a 70 °C. Após esse tempo, para cada valor de pH, foi medida a atividade residual da enzima e expressa em porcentagem, conforme Figura 4.2.

Figura 4.2 – Estabilidade da enzima Termamyl® 2X livre em relação ao pH.



Percebe-se pela Figura 4.2 que a enzima livre apresentou baixa estabilidade em pH 5,00, 6,00 e 8,00 enquanto exibiu estabilidade mais alta nos pHs 7,00 e 7,50, apresentando, respectivamente, 62,10% e 60,57% de atividade residual.

Mesmo mantendo uma atividade residual mais alta tanto no pH 7,00 quanto no 7,50, percebe-se que houve perda de atividade da enzima no tempo de exposição à solução tampão desses pHs. Até mesmo desnaturações irreversíveis podem ocorrer dependendo desse tempo de exposição (BISWANGER, 2002).

Na prática industrial, α -amilases como a enzima Termamyl® 2X são utilizadas na produção de xaropes e o tempo de atuação no processo de liquefação é curto. Esse processo, que é uma das etapas da hidrólise convencional, ocorre utilizando o equipamento industrial “*Jet Cooker*”, no qual há temperatura alta, pressão e cisalhamento por 5-10 minutos, para permitir a ruptura do amido e favorecer a hidrólise enzimática no processo de produção de xaropes (NORMAN, 1981). Além disso, no trabalho de Lin et al. (2013), o tempo ótimo para liquefação na produção de xarope de maltose a partir de amido de milho foi de 27 minutos. Dessa forma, considerando-se que a atuação da enzima ocorre nessas condições (intervalo de tempo curto e altas temperaturas), os valores obtidos para a atividade residual são válidos.

O conhecimento da estabilidade da enzima ao pH é importante tendo em vista que o pH é um fator que exerce significativa influência na estabilidade catalítica das enzimas, sendo assim fundamental para estabelecer aplicações industriais e condições de armazenamento do catalisador.

As amilases derivadas de micro-organismos, como as amilases bacterianas são amplamente utilizadas em diferentes aplicações industriais devido à sua maior estabilidade em relação às enzimas derivadas de animais e plantas (de SOUZA e MAGALHÃES, 2010). Essa estabilidade diz respeito tanto à temperatura quanto ao pH, porém dependendo do tempo em que são expostas à certa condição, podem ter perda de atividade. Além disso, nem sempre o pH de máxima atividade coincide com o de máxima estabilidade. Na literatura foram encontrados alguns trabalhos com condições semelhantes ao teste de estabilidade feito nessa pesquisa.

No estudo de Yazgan et al. (2018), em que foram avaliadas as condições de produção de maltose a partir de amido, comparando-se a utilização de Termamyl 120L (outro tipo de α -amilase produzida pela empresa Novozymes, com faixa ótima de atuação de pH 6 a 8 e temperatura de 90 °C a 105 °C) livre e imobilizada em suportes de quitosana, foi feita a análise da estabilidade da enzima livre mantida em pH 7 a 50 °C (tampão fosfato) por 6 horas, obtendo-se uma atividade residual de 42%. Esse valor apresenta-se mais baixo comparado com o valor de atividade residual obtido para o pH 7 a 70 °C neste trabalho. A diferença nos valores obtidos ocorre devido às diferenças nas temperaturas dos experimentos e no tempo em que a estabilidade foi avaliada, tendo em vista que o resultado obtido nessa pesquisa teve uma estabilidade mais alta em uma temperatura mais alta, porém em menor intervalo de tempo.

Além disso, há o fato de haver variações nas características das enzimas, mesmo pertencendo a uma mesma classe, pois há modificações genéticas que podem ocorrer na sua produção, além das variadas fontes de obtenção da enzima. Sendo assim, as enzimas podem possuir diferentes valores de pH e temperaturas ótimas e também diferentes valores que maximizam atividade e estabilidade. Estas faixas para valores máximos não necessariamente coincidem, tendo em vista que a atividade se relaciona com a diminuição da energia de ativação necessária na conversão de um substrato e com a capacidade catalítica do sítio ativo da proteína, enquanto a estabilidade está intimamente ligada com a estrutura nativa da enzima, que se mantém através de forças de interação (CABRAL, FALLEIROS E RIBEIRO, 2012).

Na pesquisa de Bayramoğlu, Yilmaz, e Arica (2004) em que foi abordada a imobilização de enzima α -amilase termoestável, derivada de *Bacillus licheniformis*, em membranas reativas, estudou-se a estabilidade dessa enzima na forma livre nas temperaturas de 60 °C, 70 °C e 80 °C no pH 6,50 (tampão fosfato) por 2 h. Em 70 °C, no pH 6,50 a enzima apresentou atividade residual de 41%, que se aproxima do valor de 36% obtido nesse trabalho, no mesmo valor de pH.

Por sua vez, no trabalho de Freitas, Martins e Pereira (2014) em que foi avaliada a produção e caracterização de α -amilase derivada do fungo *Syncephalastrum racemosum*, a enzima apresentou mais de 90% de atividade residual na faixa de pH 3,00 a 9,00 após 24h, na temperatura de 25°C, apresentando estabilidade muito alta, mas em temperatura mais baixa. No trabalho de Nwagu e Okolo (2011), em que foi estudada a produção da enzima α -amilase *Fusarium sp*, foram obtidas atividades residuais acima de 60% após 24 horas para a faixa de pH de 4,50 a 7,00 a 25°C e atividade residual de 78% a 70°C em pH 6,50 após 30 minutos.

Percebe-se então que essas enzimas do tipo α -amilases tendem a ser mais termoestáveis em temperaturas mais baixas, podendo suportar tempos maiores, ou em temperaturas mais altas, mas por um menor intervalo de tempo. De modo geral, conclui-se que a estabilidade da enzima é uma característica bem particular, mesmo quando as enzimas são derivadas de fontes microbianas e são termoestáveis, pois essa característica depende fortemente de fatores como tempo, pH e temperatura.

4.3 Análise dos testes preliminares à imobilização

Foram realizados dois testes preliminares ao DCC nos quais a enzima Termamyl® 2X, a 0,2% v/v foi imobilizada em 1 g de resina Duolite A-568 imersa em solução tampão fosfato pH 5 por 15 minutos. Esse procedimento foi realizado em duas temperaturas distintas: 25°C e 40°C. Em seguida, foi determinada a atividade da enzima imobilizada a pH 7 e 70 °C.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

- Atividade a 25°C: 16,14 U
- Atividade a 40°C: 19,54 U

Pelos resultados verificou-se que a enzima foi adsorvida em ambas as temperaturas.

Em relação às temperaturas de imobilização, percebe-se que a atividade da enzima imobilizada a 40°C foi mais alta, porém, com foco na viabilização de aplicações de enzimas imobilizadas em processos industriais que consideram os custos dos processos e considerando que temperaturas mais baixas implicam em menos custos energéticos, optou-se por fazer a imobilização nos experimentos do DCC em temperatura ambiente, visto que a diferença das atividades não foi muito discrepante (17,4%) com a mudança de temperatura. Além disso, na literatura podem ser observados vários trabalhos de imobilização de α -amilases em temperatura ambiente, como por exemplo, nos trabalhos de El-Ghaffar e Hashem (2009), Bryjak (2003) e Milani, Jalal e Goharshadi (2017).

4.4 Análise e otimização da imobilização da enzima Termamyl® 2X em resina Duolite A-568

Para verificar a influência conjunta das variáveis independentes pH, tempo e concentração de enzima, em três respostas, atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência de imobilização, foi realizado um DCC contendo um fatorial completo 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, em um total de 17 experimentos, com alfa de rotacional, cujo valor foi de 1,6818. O pH (X_1) variou de 4,82 a 8,18; o tempo (X_2), de 15 minutos a 166 minutos e a concentração de enzima Termamyl® 2X (X_3), de 0,204% a 2,9% (v/v).

A análise estatística de cada resposta foi feita através da determinação dos coeficientes de regressão múltipla, calculados no *software* Statistica® 7.0. Foi considerado um nível de significância de 95%, ou seja, os parâmetros foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$. Os valores nominais e codificados das variáveis estudadas e as respostas obtidas para a atividade da enzima imobilizada (AI), atividade recuperada (AR) e eficiência (Ef) são mostradas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Matriz com valores obtidos a partir do DCC com Termamyl 2x imobilizada.

Experimento	pH	tempo (min)	Concentração de enzima (%v/v)	Atividade da enzima imobilizada (U)	Atividade Recuperada (%)	Eficiência (%)
1	5,50 (-1)	45,00 (-1)	0,75 (-1)	71,33	42,06	63,93
2	5,50 (-1)	45,00 (-1)	2,35 (+1)	93,13	25,35	52,17
3	5,50 (-1)	135,00 (+1)	0,75 (-1)	61,61	41,00	71,33
4	5,50 (-1)	135,00 (+1)	2,35 (+1)	72,95	17,00	50,61
5	7,50 (+1)	45,00 (-1)	0,75 (-1)	30,99	26,20	56,84
6	7,50 (+1)	45,00 (-1)	2,35 (+1)	82,92	24,91	51,84
7	7,50 (+1)	135,00 (+1)	0,75 (-1)	30,68	23,01	45,44
8	7,50 (+1)	135,00 (+1)	2,35 (+1)	75,63	18,43	59,00
9	4,82 (- α)	90,00 (0)	1,55 (0)	58,07	34,35	58,84
10	8,18 (+ α)	90,00 (0)	1,55 (0)	54,03	29,28	60,00
11	6,50 (0)	15,00 (- α)	1,55 (0)	87,73	29,41	74,00
12	6,50 (0)	166,00 (+ α)	1,55 (0)	65,99	25,38	53,64
13	6,50 (0)	90,00 (0)	0,20 (- α)	24,75	42,60	68,55
14	6,50 (0)	90,00 (0)	2,90 (+ α)	85,00	26,00	43,10
15	6,50 (0)	90,00 (0)	1,55 (0)	77,90	32,42	72,87
16	6,50 (0)	90,00 (0)	1,55 (0)	75,79	31,54	71,30
17	6,50 (0)	90,00 (0)	1,55 (0)	76,23	31,72	72,39

Com a Tabela 4.1 observa-se que a atividade da enzima imobilizada (AI) obtida com os experimentos variou de 24,75 U (experimento 13) a 93,13 U (experimento 2); a atividade recuperada (AR) variou de 17,00 % (experimento 4) a 42,60 % (experimento 13) e a eficiência variou de 43,10 (experimento 14) a 74,00 % (experimento 11).

4.4.1 Atividade da enzima imobilizada (AI)

A partir dos valores obtidos para a atividade da enzima imobilizada e com a utilização do *Software* Statistica® 7.0, foram calculados os coeficientes de regressão para as variáveis e suas interações, assim como os valores dos níveis de significância para identificar quais delas eram estatisticamente significativos (com $p < 0,05$). Esses valores são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta AI (U) da imobilização por adsorção.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	P
Termo independente	76,444	0,000
X_1 (L)	-6,272	0,002
X_1 (Q)	-6,598	0,003
X_2 (L)	-5,438	0,003
X_2 (Q)	0,791	0,141
X_3 (L)	16,941	0,000
X_3 (Q)	-6,988	0,002
X_1X_2	2,788	0,019
X_1X_3	7,967	0,002
X_2X_3	-2,180	0,031
$R^2=0,96$		

Após a regressão múltipla foi obtida a Equação (4.1) completa com todos os parâmetros:

$$AI(U) = 76,44 - 6,27X_1 - 6,60X_1^2 - 5,44X_2 + 0,79X_2^2 + 16,94X_3 - 6,99X_3^2 + 2,79X_1X_2 + 7,97X_1X_3 - 2,18X_2X_3 \quad 4.1$$

A partir da Tabela 4.2 percebe-se que as variáveis e interações são significativas, com exceção de $X_2(Q)$ (valor de “p” é maior do que 0,05), que representa a influência da variável quadrática tempo. Isso indica que a atividade da enzima não é influenciada significativamente

pela variável $X_2(Q)$, mas é influenciada por todas as outras variáveis e suas interações, ou seja, depende de $X_1(L)$, $X_1(Q)$, $X_2(L)$, $X_3(L)$, $X_3(Q)$, X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 .

De acordo com a Equação 4.1, verifica-se que o sinal negativo do coeficiente $X_1(L)$ e do coeficiente $X_2(L)$ indicam que maiores valores para o pH e para o tempo, respectivamente, provocam diminuição na atividade da enzima imobilizada (AI). Por sua vez, o sinal positivo do coeficiente $X_3(L)$ indica que o aumento na concentração da enzima leva ao aumento da atividade da enzima imobilizada (AI). Essas tendências podem ser confirmadas também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.1.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 96 % da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta. Foi feita a análise de variância (ANOVA) e observou-se que o valor de F calculado (10,99) foi superior ao valor de F tabelado (3,41) para um nível de significância de 5%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pela Equação (4.1).

Em seguida foi feita a análise estatística considerando-se apenas os parâmetros significativos (com $p < 0,05$), que são mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AI (U) da imobilização por adsorção.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	P
Termo independente	77,452	0,000
$X_1(L)$	-6,272	0,002
$X_1(Q)$	-6,830	0,002
$X_2(L)$	-5,429	0,003
$X_3(L)$	16,942	0,000
$X_3(Q)$	-7,220	0,002
X_1X_2	2,788	0,020
X_1X_3	7,967	0,002
X_2X_3	-2,181	0,031
$R^2=0,95$		

A partir dos resultados da regressão múltipla da Tabela 4.3 obteve-se a Equação (4.2) com os parâmetros significativos.

$$AI(U) = 77,45 - 6,27X_1 - 6,83X_1^2 - 5,42X_2 + 16,94X_3 - 7,22X_3^2 + 2,78X_1X_2 + 7,97X_1X_3 - 2,18X_2X_3 \quad 4.2$$

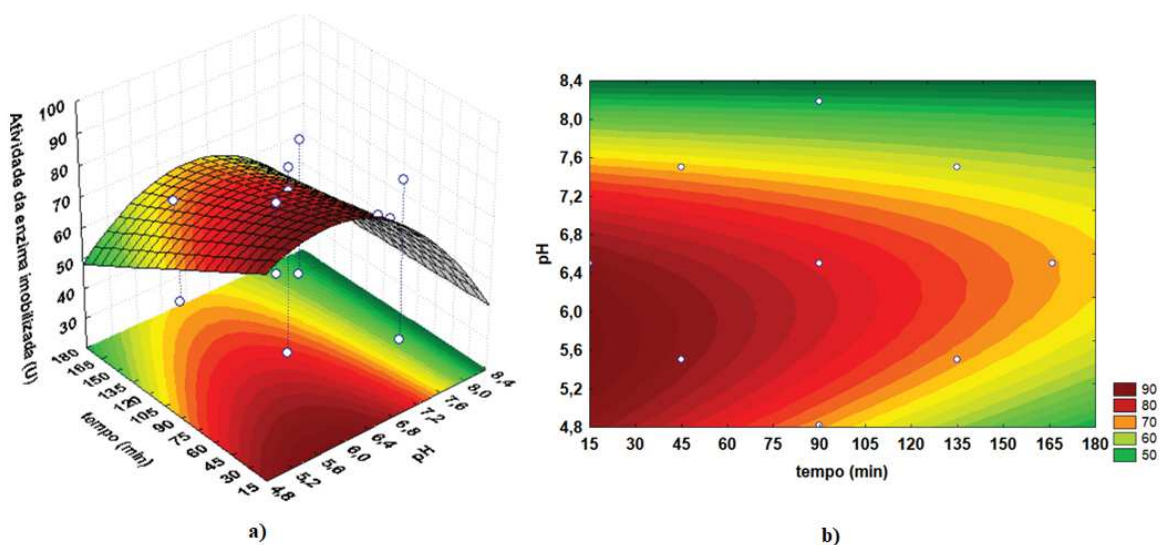
De acordo com a Equação (4.2) verifica-se a mesma tendência observada na Equação (4.1), o sinal negativo do coeficiente X_1 e do coeficiente X_2 indicam que maiores valores para o pH e para o tempo, respectivamente, provocam diminuição na atividade da enzima imobilizada (AI). Por sua vez, o sinal positivo do coeficiente X_3 indica que o aumento na concentração da enzima leva ao aumento da atividade da enzima imobilizada (AI). Essas tendências podem ser confirmadas também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.1.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 95 % da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A partir do modelo reduzido e significativo mostrado na Equação (4.2), foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões ótimas. Nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 foram apresentadas as superfícies de respostas e curvas de contorno para a resposta AI em função do pH (X_1) e tempo (X_2); pH (X_1) e concentração da enzima (X_3); e tempo (X_2) e concentração de enzima (X_3), respectivamente.

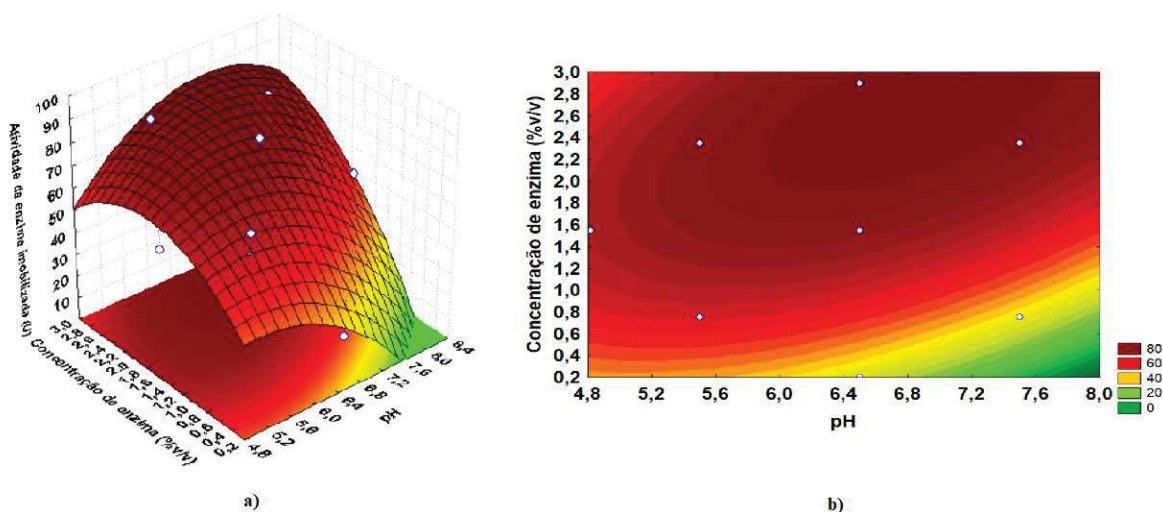
Em seguida, através da função desejabilidade, foi determinada a condição ótima para a atividade da enzima imobilizada (AI) em relação à influência conjunta das variáveis independentes e nessa condição também foi feita a validação do modelo da Equação (4.2).

Figura 4.3 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da enzima imobilizada por adsorção (U) em função do pH e do tempo.



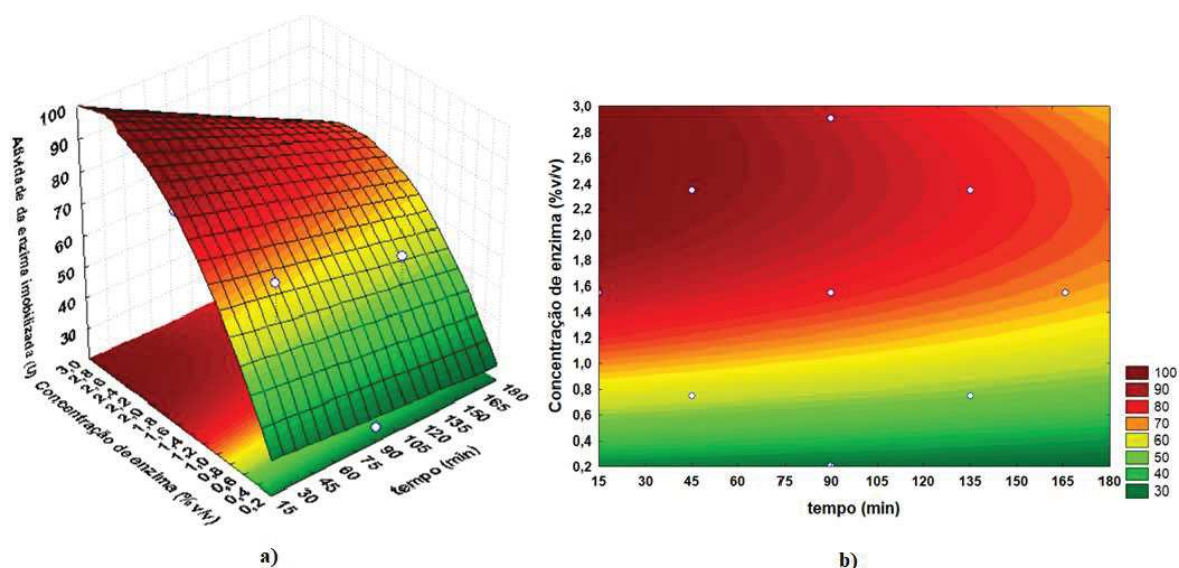
De acordo com a Figura 4.3 percebe-se que para maximizar a atividade da enzima imobilizada o pH deve estar na faixa de 4,80 a 6,70 e o tempo no intervalo de 15 a 55 minutos.

Figura 4.4 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da enzima imobilizada por adsorção (U) em função da concentração de enzima e do pH.



De acordo com a Figura 4.4 percebe-se que para maximizar a atividade da enzima imobilizada o pH deve estar na faixa de 5,30 a 8,00 e a concentração da enzima no intervalo de 1,40 % v/v a 2,90 % v/v. Como a faixa de pH foi delimitada entre 4,80 a 6,70 a partir da Figura 4.3, fazendo-se a intersecção com a faixa de pH definida pela Figura 4.4, entre 5,30 a 8,00 pode-se determinar que a faixa ótima de pH para a atividade da enzima imobilizada está entre 5,30 a 6,70.

Figura 4.5 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da enzima imobilizada por adsorção (U) em função da concentração de enzima e do tempo.



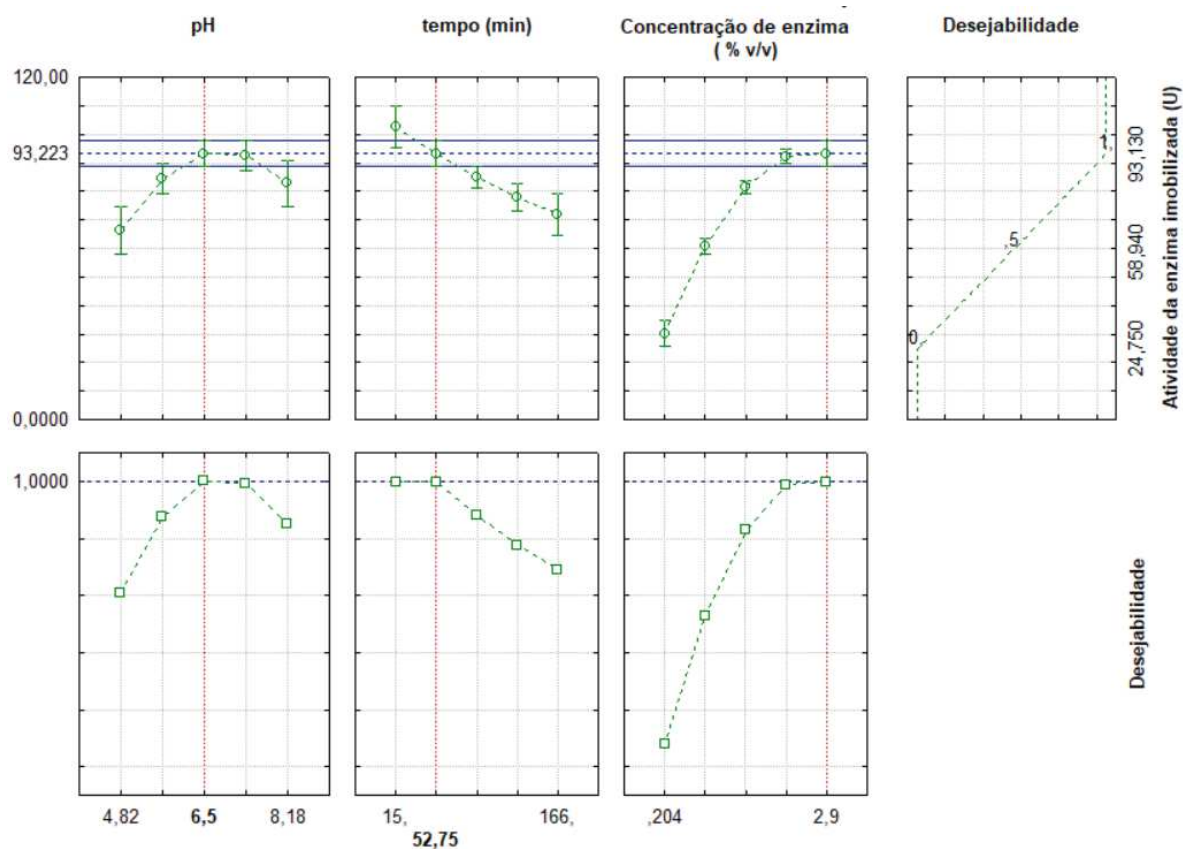
De acordo com a Figura 4.5 percebe-se que para maximizar a atividade da enzima imobilizada (AI) deve haver alta concentração de enzima, pois em concentrações baixas, independentemente do tempo, a atividade da enzima imobilizada (AI) é baixa. Dessa forma, a concentração da enzima deve estar na faixa de 1,80 % v/v a 2,90 % v/v e o tempo de estar entre 15 minutos e 63 minutos.

A partir da Figura 4.4 foi delimitada a faixa de concentração da enzima 1,40 % v/v a 2,90 %. Fazendo a intersecção dessa faixa com a faixa delimitada pela Figura 4.5, obtém-se a faixa de concentração de enzima de 1,80 % v/v a 2,90 % v/v para maximizar a atividade da enzima imobilizada (AI) na região experimental.

Além disso, fazendo-se a intersecção entre a faixa ótima para o tempo na Figura 4.3 e na Figura 4.5, obtém-se a faixa de 15 minutos a 55 minutos, portanto essa é a faixa ótima para a atividade da enzima imobilizada (AI) em relação ao tempo na região experimental considerada.

Em seguida, utilizando-se a função desejabilidade foi possível determinar a condição que otimiza a atividade da enzima imobilizada (AI), considerando a influência conjunta das três variáveis independentes avaliadas, pH, tempo e concentração da enzima, conforme mostrado pela Figura 4.6.

Figura 4.6 – Perfis da função desejabilidade para maximização da atividade da enzima imobilizada (U) por adsorção.



De acordo com a Figura 4.6, os três perfis da parte superior são relativos à variação da atividade da enzima imobilizada (AI) com cada fator. O quarto perfil dessa parte apresenta a faixa de desejabilidade aceitável para a maximização da resposta ($0 \leq d_i \leq 1$). Os três perfis da parte inferior mostram a desejabilidade global, com valor 1. Esse resultado revela um alto nível de confiabilidade para a aplicação desse método de otimização simultânea, realizado a partir dos resultados experimentais, pois o seu objetivo é de que a desejabilidade fique o mais próximo da unidade.

Dessa forma, as condições que otimizam a resposta são: pH 6,50 tempo de imobilização de 52,75 minutos e concentração de 2,90 % v/v da enzima Termamyl® 2X. Esses valores estão de acordo com as análises feitas com base nos resultados obtidos com as superfícies de resposta e curvas de contorno das Figura 4.3 a 4.5.

Após a determinação da condição ótima, ela foi replicada experimentalmente em duplicata (pH de 6,50; tempo de imobilização de 52,75 minutos; concentração da enzima Termamyl® 2X de 2,90 % v/v) para validar o modelo reduzido exposto na Equação (44.2), por meio da comparação entre o valor previsto pelo modelo e o valor obtido experimentalmente, ambos para a atividade da enzima imobilizada (AI).

Os resultados obtidos foram os seguintes: o valor previsto pelo modelo foi de 93,05 U e o valor experimental foi de 95,95 U. Os valores obtidos foram muito próximos, com uma diferença de 3,10 % apenas, portanto, o modelo da Equação (4.2) é válido, assim como as condições ótimas definidas com base nas análises de superfície, derivadas desse modelo.

4.4.2 Atividade Recuperada (AR)

A partir dos valores obtidos para a atividade recuperada e com a utilização do *Software* Statistica 7.0, foram calculados os coeficientes de regressão para as variáveis e suas interações, assim como os valores dos níveis de significância para identificar quais delas eram estatisticamente significativos (com $p < 0,05$). Esses valores são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta AR (%) da imobilização por adsorção.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	P
Termo independente	32,135	0,000
X_1 (L)	-3,031	0,002
X_1 (Q)	-0,891	0,023
X_2 (L)	-1,871	0,004
X_2 (Q)	-2,452	0,003
X_3 (L)	-5,450	0,000
X_3 (Q)	-0,000	0,998
X_1X_2	-0,031	0,867
X_1X_3	4,358	0,001
X_2X_3	-1,323	0,015
$R^2 = 0,91$		

Após a regressão múltipla foi obtida a Equação (4.3) completa com todos os parâmetros:

$$AR(\%) = 32,14 - 3,03X_1 - 0,89X_1^2 - 1,87X_2 - 2,45X_2^2 - 5,45X_3 - 0,03X_1X_2 + 4,36X_1X_3 - 1,32X_2X_3 \quad 4.3$$

A partir da Tabela 4.4 percebe-se que as variáveis e interações são significativas, com exceção dos termos $X_3(Q)$ e X_1X_2 (valor de “p” é maior do que 0,05) que representam, respectivamente, a influência da variável quadrática concentração da enzima e a interação entre as variáveis pH e tempo. Isso indica que a atividade da enzima não é influenciada significativamente pela variável $X_3(Q)$ e pela interação X_1X_2 , mas é influenciada por todas as outras variáveis e suas interações, ou seja, depende de $X_1(L)$, $X_1(Q)$, $X_2(L)$, $X_2(Q)$, $X_3(L)$, X_1X_3 , X_2X_3 .

De acordo com a Equação (4.3) verifica-se que os coeficientes de $X_1(L)$, $X_2(L)$ e $X_3(L)$ são negativos, e isso indica que à medida que pH, tempo e concentração da enzima aumentam, o valor de atividade recuperada (AR) diminui. Essa tendência pode ser confirmada também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.1.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 91 % da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta. Foi feita a análise de variância (ANOVA) e observou-se que o valor de F calculado (7,82) foi superior ao valor de F tabelado (3,41) para um nível de significância de 5%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pela Equação (4.3).

Em seguida foi feita a análise estatística considerando-se apenas os parâmetros significativos (com $p < 0,05$), que são mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AR (%) da imobilização por adsorção.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	P
Termo independente	32,134	0,000
$X_1(L)$	-3,031	0,002
$X_1(Q)$	-0,891	0,021
$X_2(L)$	-1,871	0,004
$X_2(Q)$	-2,452	0,003
$X_3(L)$	-5,450	0,001
X_1X_3	4,358	0,001
X_2X_3	-1,323	0,015
$R^2 = 0,91$		

A partir dos resultados da regressão múltipla da Tabela 4.5 obteve-se a Equação (4.4) com os parâmetros significativos.

$$AR(\%) = 32,13 - 3,03X_1 - 0,89X_1^2 - 1,87X_2 - 2,45X_2^2 - 5,45X_3 + 4,36X_1X_3 - 1,32X_2X_3 \quad 4.4$$

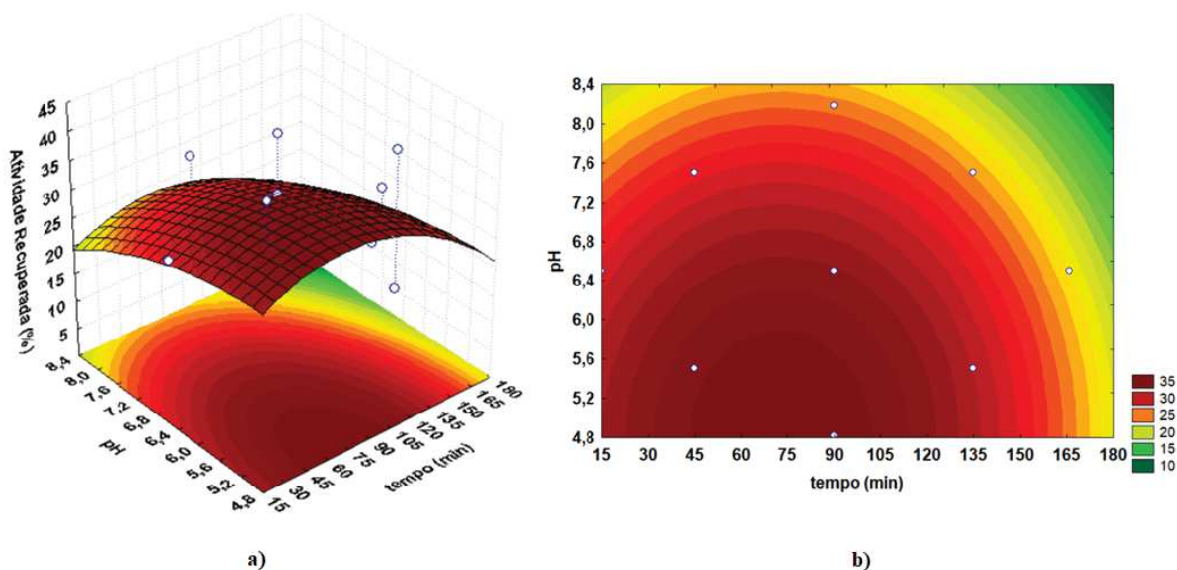
De acordo com a Equação (4.4), verifica-se a mesma tendência observada na Equação (4.3), o sinal negativo dos coeficientes lineares que indicam que o aumento desses fatores provoca diminuição na atividade recuperada (AR). Essa tendência pode ser confirmada também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.1.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 91% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A partir do modelo reduzido e significativo mostrado na Equação (4.4), foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões ótimas. Nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 foram apresentadas as superfícies de respostas e curvas de contorno para a resposta AR em função do pH (X_1) e tempo (X_2); pH (X_1) e concentração da enzima (X_3); e tempo (X_2) e concentração de enzima (X_3), respectivamente.

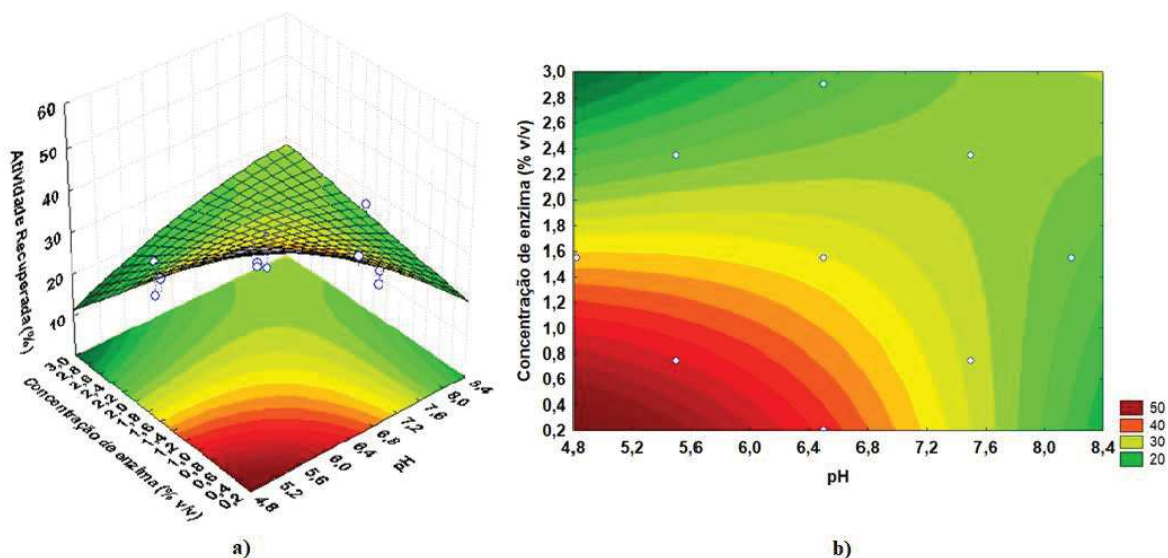
Em seguida, através da função desejabilidade, foi determinada a condição ótima para a atividade da enzima recuperada (AR) em relação à influência conjunta das variáveis independentes e nessa condição também foi feita a validação do modelo da Equação (4.4).

Figura 4.7 Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade recuperada (%) na imobilização por adsorção em função do pH e do tempo.



De acordo com a Figura 4.7 percebe-se que para maximizar a atividade recuperada o pH deve estar na faixa de 4,80 a 6,40 e o tempo no intervalo de 35 a 130 minutos.

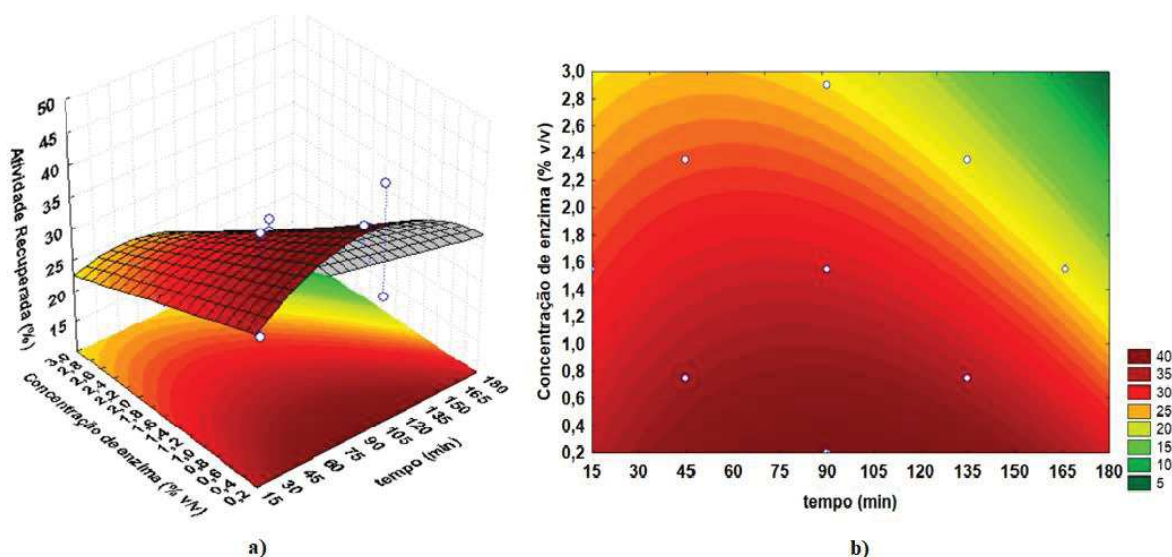
Figura 4.8 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade recuperada (%) na imobilização por adsorção em função da concentração de enzima e do pH.



De acordo com a Figura 4.8 percebe-se que para maximizar AR devem ser considerados valores baixos tanto para o pH quanto para a concentração de enzima. Dessa forma, o pH deve estar na faixa de 4,80 a 5,50 e a concentração da enzima no intervalo de 0,20 % v/v a 0,60 %.

Como a faixa de pH foi delimitada entre 4,80 a 6,40 a partir da Figura 4.7, fazendo-se a intersecção com a faixa de pH definida pela Figura 4.8, pode-se determinar que a faixa ótima de pH para a atividade recuperada está entre 4,80 a 5,50.

Figura 4.9 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade recuperada (%) na imobilização por adsorção em função da concentração de enzima e do tempo.



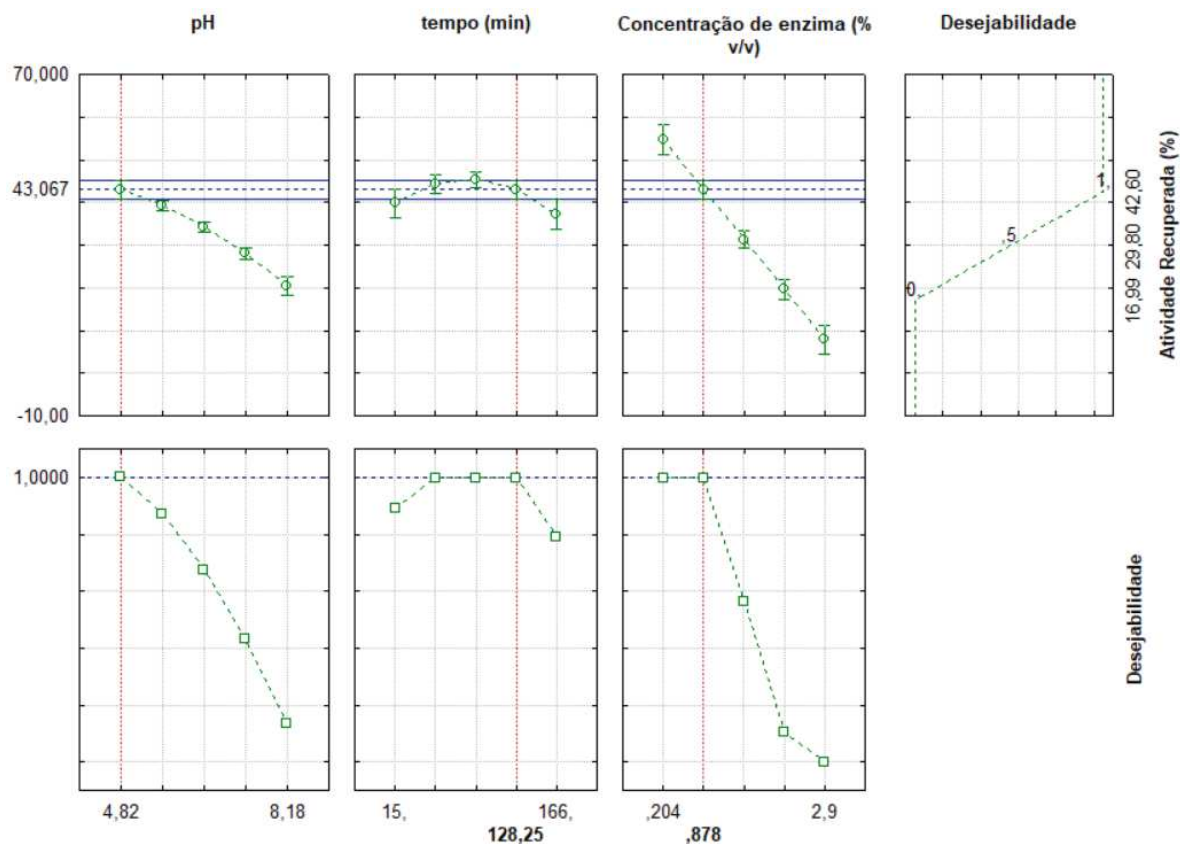
De acordo com a Figura 4.9 percebe-se que para maximizar a atividade recuperada a concentração da enzima deve estar na faixa de 0,20 %v/v a 1,00 %v/v e o tempo de estar entre 35 minutos e 155 minutos.

A partir da Figura 4.8 foi delimitada a faixa de concentração da enzima 0,20 % v/v a 0,60%. Fazendo a intersecção dessa faixa com a faixa delimitada pela Figura 4.9 obtém-se a faixa de concentração de enzima de 0,20 %v/v a 0,60% v/v para maximizar a atividade recuperada na região experimental.

Além disso, a faixa ótima para o tempo na Figura 4.7 é de 35 a 130 minutos, com a intersecção da faixa obtida com a Figura 4.9 percebe-se que a faixa que maximiza a atividade recuperada em relação ao tempo é de 35 a 130 minutos.

Em seguida, utilizando-se a função desejabilidade foi possível determinar a condição que otimizava a atividade recuperada (AR), considerando a influência conjunta das três variáveis independentes avaliadas, pH, tempo e concentração da enzima, conforme mostrado pela Figura 4.10.

Figura 4.10 – Perfis da função desejabilidade para maximização da atividade recuperada (%) na imobilização por adsorção.



De acordo com a Figura 4.10, os três perfis da parte superior são relativos à variação da atividade recuperada (AR) com cada fator. O quarto perfil dessa parte apresenta a faixa de desejabilidade aceitável para a maximização da resposta ($0 \leq d_i \leq 1$). Os três perfis da parte inferior mostram a desejabilidade global, com valor 1. Esse resultado revela um alto nível de confiabilidade para a aplicação desse método de otimização simultânea, realizado a partir dos resultados experimentais, pois o seu objetivo é de que a desejabilidade fique o mais próximo da unidade. Dessa forma, as condições que simultaneamente otimizam a resposta são: pH 4,82, tempo de imobilização de 128,25 minutos e concentração de 0,878% v/v da enzima Termamyl® 2X. Esses valores estão de acordo com as análises feitas para as faixas ótimas em relação ao pH e ao tempo, com base nos resultados obtidos com as superfícies de resposta e curvas de contorno das Figuras 4.7 a 4.9.

Uma observação a ser feita é que a faixa prevista para a concentração de enzima pelas análises foi de 0,20 % v/v a 0,60 % v/v e a desejabilidade indicou a condição ótima como sendo de 0,878 % v/v. Apesar dessa pequena extrapolação do valor em relação ao intervalo ótimo previsto, percebe-se que nas Figuras 4.8 e 4.9, a região de atividade recuperada

correspondente à concentração de 0,878 % v/v aparece com alta atividade recuperada também. Para verificar se essa condição sugerida pela análise da desejabilidade é válida, ela foi verificada pelo teste de validação do modelo.

Após a determinação da condição ótima, ela foi reproduzida experimentalmente em duplicata (pH de 4,82; tempo de imobilização de 128,28 minutos; concentração da enzima Termamyl® 2X de 0,878 % v/v) para validar o modelo reduzido exposto na Equação (4.4), por meio da comparação entre o valor previsto pelo modelo e o valor obtido experimentalmente, ambos para a atividade recuperada (AR).

Os resultados obtidos foram os seguintes: o valor previsto pelo modelo foi de 43,00 % e o valor experimental foi de 29,82 %. Os valores obtidos foram um pouco discrepantes, com uma diferença de 30,65 %. Uma justificativa para isso é que a partir dos experimentos, o valor de R^2 obtido para o modelo da Equação (4.4) não foi suficientemente alto e, portanto o ajuste não foi o melhor possível, mas foi considerado um ajuste bom. Dessa forma, o modelo foi considerado como válido para prosseguir com comparações em outras análises que foram feitas posteriormente.

4.4.3 Eficiência (Ef)

A partir dos valores obtidos para a atividade recuperada e com a utilização do *Software* Statistica® 7.0, foram calculados os coeficientes de regressão para as variáveis e suas interações, assim como os valores dos níveis de significância para identificar quais delas eram estatisticamente significativos (com $p < 0,05$). Esses valores são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta Ef (%) na imobilização por adsorção.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	P
Termo independente	72,411	0,000
X ₁ (L)	-1,683	0,016
X ₁ (Q)	-5,106	0,002
X ₂ (L)	-2,354	0,008
X ₂ (Q)	-3,576	0,004
X ₃ (L)	-4,870	0,002
X ₃ (Q)	-6,337	0,001
X ₁ X ₂	-1,260	0,047
X ₁ X ₃	5,129	0,003
X ₂ X ₃	1,202	0,052
R ² =0,78		

Após a regressão múltipla foi obtida a Equação (4.5) completa com todos os parâmetros:

$$\begin{aligned} \text{Ef}(\%) = & 72,41 - 1,68X_1 - 5,11X_1^2 - 2,35X_2 - 3,58X_2^2 - 4,87X_3 - 6,34X_3^2 \\ & - 1,26X_1X_2 + 5,13X_1X_3 + 1,20X_2X_3 \end{aligned} \quad 4.5$$

A partir da Tabela 4.6 percebe-se que as variáveis e interações são significativas, com exceção da interação X₂X₃ (valor de “p” é maior do que 0,05), que representa a influência da interação entre as variáveis tempo e concentração de enzima. Isso indica que a eficiência (Ef) não é influenciada significativamente pela interação X₂X₃, mas é influenciada por todas as outras variáveis e suas interações, ou seja, depende de X₁(L), X₁(Q), X₂(L), X₂(Q), X₃(L), X₃(Q), X₁X₂, X₁X₃.

De acordo com a Equação (4.5), verifica-se que os coeficientes de X₁(L), X₂(L) e X₃(L) são negativos, e isso indica que à medida que pH, tempo e concentração da enzima aumentam, o valor da eficiência de imobilização (Ef) diminui. Alguns pontos da Tabela 4.1 não seguem essa tendência, mas ela pode ser confirmada de maneira geral pela maioria dos pontos experimentais dessa tabela e também pela análise quando se avalia a variação da resposta em função da variação dos valores de alfa desses fatores, analisando a influência de cada fator individualmente na eficiência.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 78 % da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta. Foi feita a análise de variância (ANOVA) e observou-se que o valor de F calculado (1,62) foi inferior ao valor de F tabelado (3,41) para um nível de significância de 5%. Esses resultados não representam o ajuste ideal, mas o modelo da Equação (4.5) foi considerado aceitável para a continuidade das análises seguintes.

Em seguida foi feita a análise estatística considerando-se apenas os parâmetros significativos (com $p < 0,05$), que são mostrados Tabela 4.7.

Tabela 4.7. - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta Ef (%) na imobilização por adsorção.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	P
Termo independente	72,411	0,000
X_1 (L)	-1,683	0,016
X_1 (Q)	-5,106	0,002
X_2 (L)	-2,354	0,008
X_2 (Q)	-3,576	0,004
X_3 (L)	-4,870	0,002
X_3 (Q)	-6,337	0,001
X_1X_2	-1,260	0,047
X_1X_3	5,129	0,003
$R^2 = 0,78$		

A partir dos resultados da regressão múltipla Tabela 4.7 obteve-se a Equação (4.6) com os parâmetros significativos.

$$\begin{aligned} \text{Ef}(\%) = & 72,41 - 1,68X_1 - 5,11X_1^2 - 2,35X_2 - 3,58X_2^2 - 4,87X_3 - 6,33X_3^2 \\ & - 1,26X_1X_2 + 5,13X_1X_3 \end{aligned} \quad 4.6$$

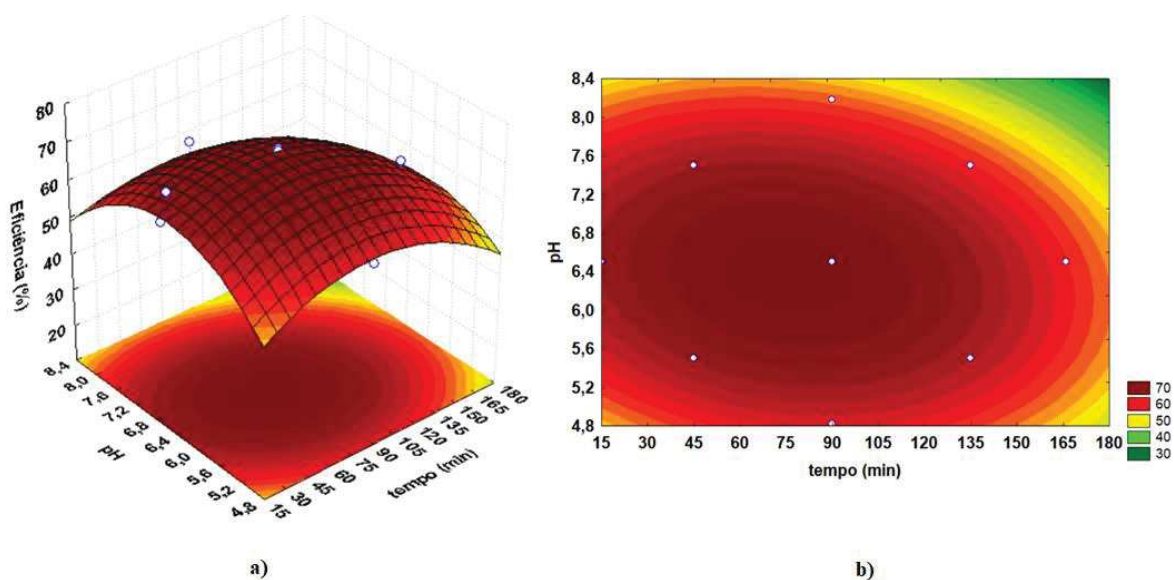
De acordo com a Equação (4.6), verifica-se a mesma tendência observada na Equação (4.5), de que o sinal negativo dos coeficientes lineares que indicam que o aumento desses fatores provoca diminuição na eficiência (Ef).

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 78 % da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A partir do modelo reduzido e significativo mostrado na Equação (4.6), foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões ótimas. Nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 foram apresentadas as superfícies de respostas e curvas de contorno para a resposta E_f em função do pH (X_1) e tempo (X_2); pH (X_1) e concentração da enzima (X_3); e tempo (X_2) e concentração de enzima (X_3), respectivamente.

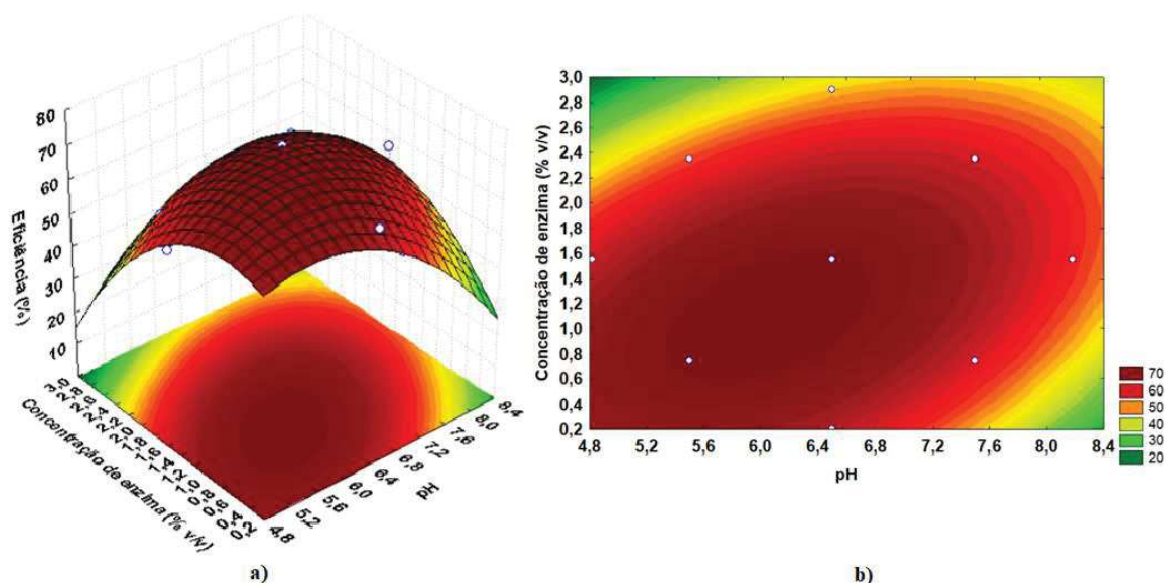
Em seguida, por meio da função desejabilidade foi determinada a condição ótima para a eficiência da imobilização (E_f) em relação à influência conjunta das variáveis independentes e nessa condição também foi feita a validação do modelo da Equação (4.6).

Figura 4.11 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência (%) em função do pH e do tempo na imobilização por adsorção.



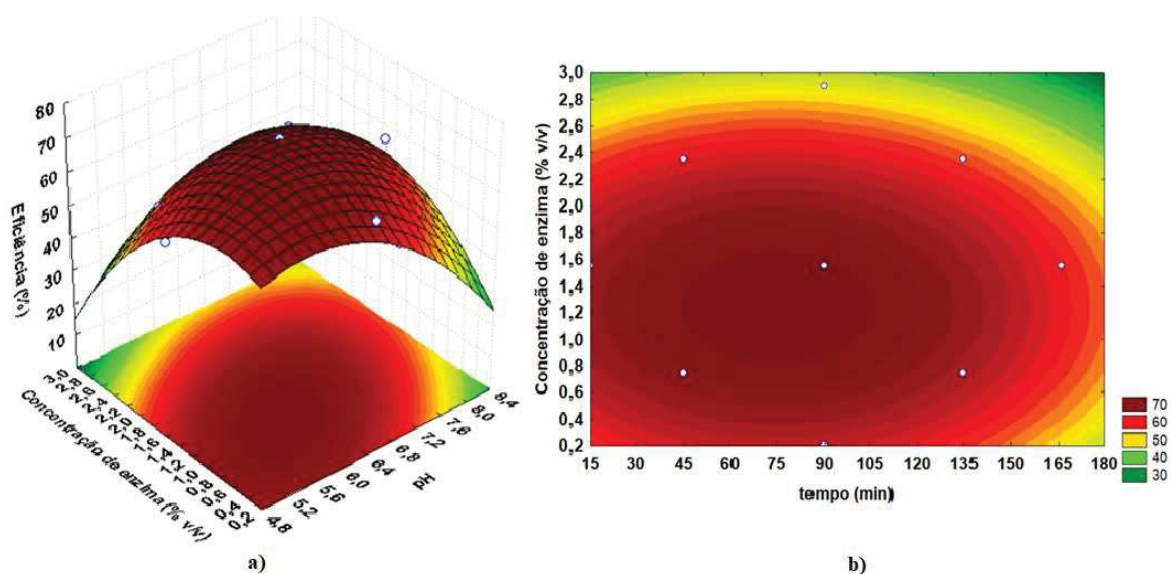
De acordo com a Figura 4.11 percebe-se que para maximizar a atividade recuperada o pH deve estar na faixa de 5,20 a 7,60 e o tempo entre 15 e 138 minutos.

Figura 4.12 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência (%) em função da concentração de enzima e do pH na imobilização por adsorção.



De acordo com a Figura 4.12 percebe-se que para maximizar a eficiência a concentração da enzima deve estar entre 0,20 % v/v a 2,10 % v/v e o pH entre 4,80 e 7,50. Ao fazer a intersecção com a faixa de pH obtida a partir da Figura 4.11, pode-se determinar que a faixa ótima de pH para a eficiência está entre 5,20 e 7,50.

Figura 4.13 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência (%) em função da concentração de enzima e do tempo na imobilização por adsorção.



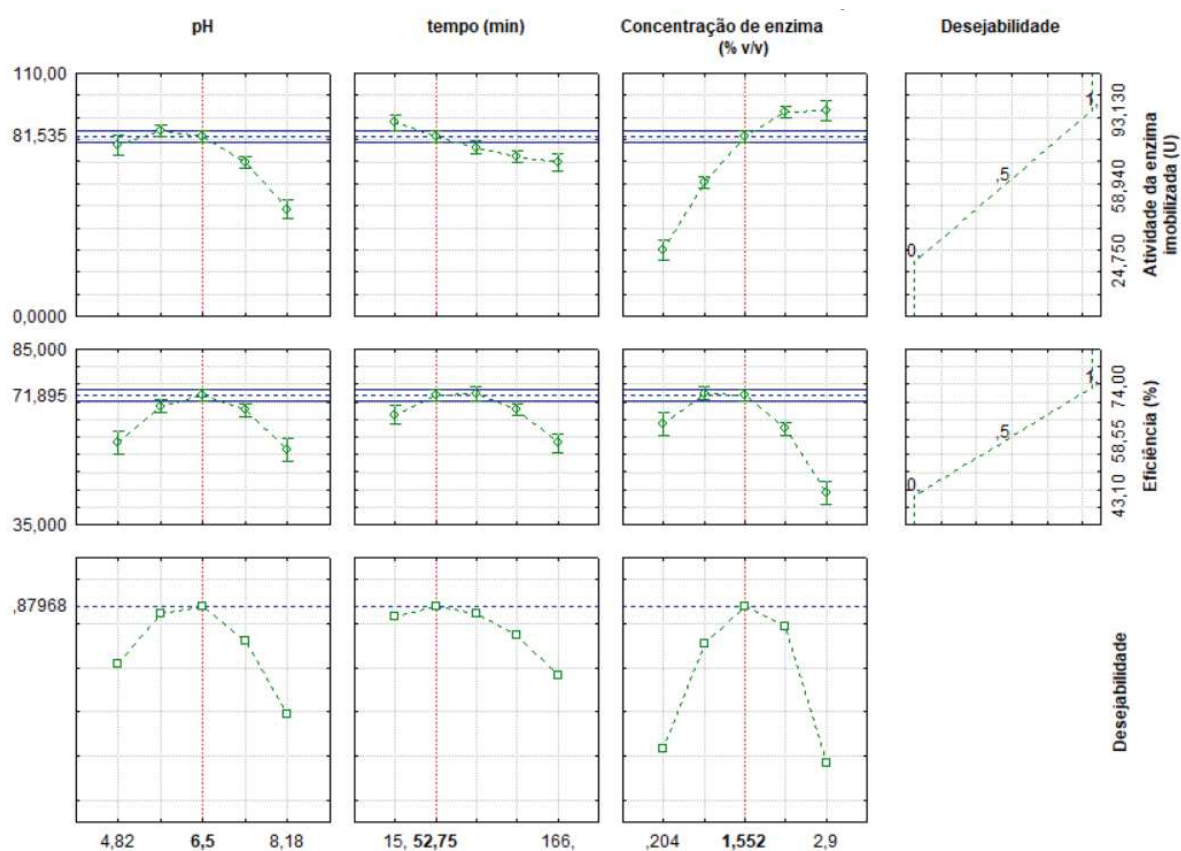
De acordo com a Figura 4.13 percebe-se que para maximizar eficiência, a concentração da enzima deve estar na faixa de 0,40 % v/v a 2,10 % v/v e o tempo de estar entre 20 minutos e 140 minutos.

A partir da Figura 4.12 foi delimitada a faixa de concentração da enzima 0,20 % v/v a 2,10 % v/v. Fazendo a intersecção dessa faixa com a faixa delimitada pela Figura 4.13, obtém-se a faixa de concentração de enzima de 0,40 % v/v a 2,10 % v/v para maximizar a eficiência na região experimental.

Além disso, a intersecção das faixas obtidas em relação ao tempo com a Figura 4.11 e a Figura 4.13 mostra que a eficiência é maximizada no intervalo entre 20 e 138 minutos.

Em seguida, utilizando-se a função desejabilidade foi possível determinar a condição que otimizava simultaneamente a eficiência (Ef) e a atividade da enzima imobilizada (AI), considerando a influência conjunta das três variáveis independentes avaliadas, pH, tempo e concentração da enzima, em ambas as respostas, conforme mostrado pela Figura 4.14.

Figura 4.14 - Perfis da função desejabilidade para maximização simultânea de Ef (%) e AI (U) na imobilização por adsorção.



De acordo com a Figura 4.14 os três perfis da parte superior são relativos à variação da atividade da enzima imobilizada (AI) com cada fator. Os três perfis do meio são relativos à variação da eficiência (Ef) com cada fator. O quarto perfil de cada uma dessas linhas apresenta a faixa de desejabilidade aceitável para a maximização de cada resposta ($0 \leq d_i \leq 1$). Os três perfis da parte inferior mostram a desejabilidade global, com valor 0,88. Esse resultado revela um de confiabilidade considerável para a aplicação desse método de otimização simultânea, realizado a partir dos resultados experimentais, pois o seu objetivo é de que a desejabilidade fique o mais próximo da unidade.

Dessa forma, as condições que simultaneamente otimizam as duas respostas são: pH 6,50; tempo de imobilização de 52,75 minutos e concentração de 1,55 % v/v da enzima Termamyl® 2X. Esses valores estão de acordo com as análises feitas para as faixas ótimas em relação ao pH, ao tempo e à concentração de enzima, com base nos resultados obtidos com as superfícies de resposta e curvas de contorno das Figuras 4.3 a 4.5 e das Figuras 4.11 a 4.13.

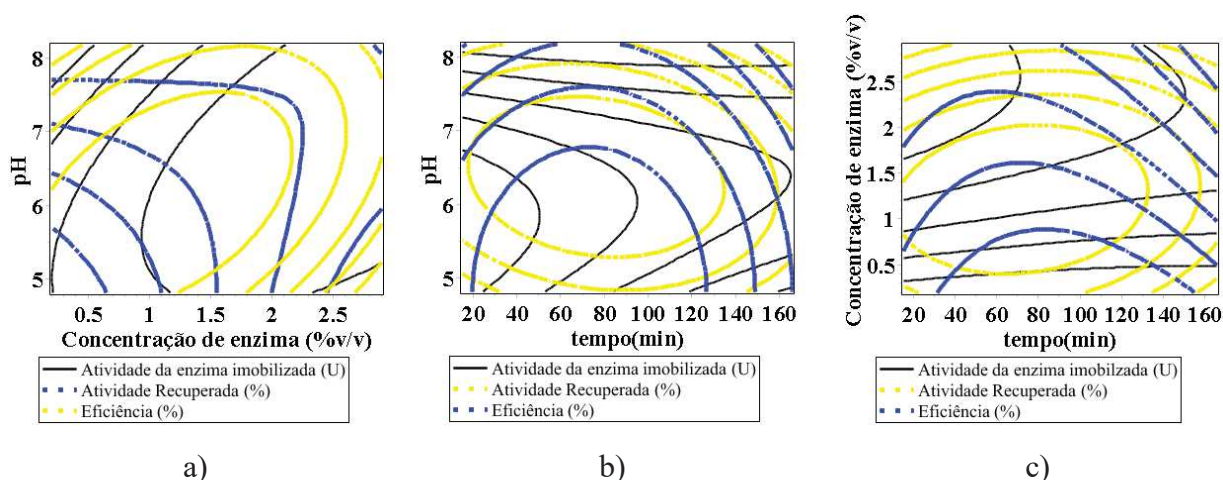
Após a determinação dessa condição ótima, ela foi reproduzida experimentalmente em duplicata (pH de 6,50; tempo de imobilização de 52,75 minutos; concentração da enzima Termamyl® 2X de 1,55 % v/v) para validar o modelo reduzido exposto na Equação (4.6) por meio da comparação entre o valor previsto pelo modelo e o valor obtido experimentalmente, ambos para a eficiência (Ef).

Os resultados obtidos foram os seguintes: o valor previsto pelo modelo foi de 71,90 % e o valor experimental foi de 69,88 %. Os valores obtidos foram muito próximos, com uma diferença de 2,80 % apenas, portanto, o modelo da Equação (4.6) é válido, assim como as condições ótimas definidas com base nas análises de superfície, derivadas desse modelo.

4.4.4 Otimização das três respostas AI, AR e Ef simultaneamente utilizando o software Maple 17

A partir do software Maple 17, foi obtida a Figura 4.15 através da qual foram determinadas as faixas ótimas para a atividade da enzima imobilizada (AI), para a atividade recuperada (AR) e para a eficiência (Ef) simultaneamente, em relação ao pH, tempo e concentração de enzima.

Figura 4.15 - Curvas para maximização de AI (U), AR (%) e Ef (%) em relação às variáveis independentes pelo Maple 17.



Pelas Figuras 4.15 a, b e c percebe-se que a maximização das respostas ocorre, respectivamente, nas seguintes faixas: pH de 5,50 a 6,50 e concentração de enzima de 0,80 % a 1,50 % v/v; pH de 5,50 a 6,50 e tempo de 30 a 60 minutos; concentração de enzima de 0,60 % a 1 % v/v e tempo de 40 a 100 minutos. Ao fazer a intersecção entre esses valores, obtém-se a faixa de concentração de enzima de 0,8 % a 1 %v/v; o pH de 5,50 a 6,50 e o tempo de 40 a 60 minutos. A maximização pelo Maple corresponde à intersecção das regiões abrangidas pelas diferentes cores e onde as linhas estão mais próximas.

Ao utilizar a função desejabilidade do software Statistica® 7.0 para maximização das três respostas simultaneamente, também em relação às três variáveis independentes, obteve-se a seguinte condição: pH 5,66, tempo de 52,75 minutos e concentração de enzima de 0,878 % v/v.

Ao comparar esses valores com os valores obtidos pelo Maple, observa-se que eles estão dentro da faixa delimitada pelo Maple.

4.4.5 Validações complementares para as respostas AI, AR e Ef

Com o objetivo de averiguar a validação dos modelos, para verificar se realmente ao empregar as condições experimentais sugeridas a partir da análise feita pelo Maple 17 e através da função desejabilidade do Statistica® 7.0 eram obtidas respostas satisfatórias, e também a fim de determinar a melhor condição para os experimentos seguintes, em que foi acrescentado o processo de ligação cruzada, foram feitos alguns experimentos complementares de validação para todos os modelos reduzidos das respostas AI, AR e Ef.

Todos os testes realizados, inclusive alguns dos que foram citados anteriormente, estão expostos na Tabela 4.8 a seguir.

Tabela 4.8 - Validações complementares para as respostas AI, AR e Ef.

Respostas maximizadas	pH	t (min)	C enzima (%v/v)	Resposta prevista AI (U)	Resposta experimental AI (U)	Resposta prevista AR (%)	Resposta experimental AR (%)	Resposta prevista Ef (%)	Resposta experimental Ef (%)
AI	6,50	52,75	2,90	93,05	95,95	39,33	23,19	62,18	66,22
AR	4,82	128,25	0,878	53,60	58,44	43,00	29,82	64,88	64,22
AI+AR	4,82	15	0,878	74,59	77,70	39,76	30,43	57,94	54,84
AI+Ef	6,50	52,75	1,55	90,85	71,98	31,99	30,52	71,90	69,88
AI+AR+Ef	5,66	52,75	0,878	71,29	58,21	37,59	28,38	72,80	74,62

De acordo com a Tabela 4.8, percebe-se que nos três primeiros experimentos os valores previstos e os experimentais foram próximos para as respostas AI e Ef, enquanto os valores previstos e experimentais para AR foram mais discrepantes. Por sua vez, no penúltimo experimento da tabela, percebe-se que os valores experimentais e previstos para as respostas AR e Ef foram mais próximos, enquanto estes foram mais discrepantes para a resposta AI e no último experimento os valores que ficaram mais próximos foram da eficiência.

Isso pode ser explicado pelo fato de que à medida que a concentração de enzima aumenta, aumenta a probabilidade de a enzima adsorver, porém isso ocorre até o limite de saturação da resina e desde que não haja mudança na conformação da enzima nesse processo, o que pode provocar redução da sua atividade (essa perda de atividade é menos provável de ocorrer durante a adsorção, mas é uma possibilidade). Em concentrações mais altas então, com a saturação da resina, boa parte da enzima pode estar disponível no sobrenadante, não ser adsorvida e assim a atividade recuperada prevista pelo modelo ser mais alta do que a atividade real. Dessa forma, condições que são favoráveis para validar a atividade da enzima imobilizada podem não ser favoráveis para a validação da atividade da enzima recuperada, pois apesar de concentrações mais altas tenderem a favorecer o aumento da atividade da enzima imobilizada e também o da atividade recuperada até certo limite, é preciso considerar a capacidade de saturação da resina, que influencia no valor da atividade recuperada.

Além disso, mesmo utilizando diferentes concentrações de enzima para verificar a condição mais favorável para a adsorção e considerando a capacidade de adsorção da resina, esse processo de adsorção envolve interações fracas e a enzima pode não ficar firmemente adsorvida nesse processo, o que depende também do tempo de adsorção e do pH em que esse processo ocorre. Também é preciso considerar que a faixa ótima de atuação da enzima em relação ao pH (de 6,00 a 7,00) ocorre em pH diferente da melhor faixa de adsorção da resina (em pHs próximos de 5,00 segundo informações do fabricante).

É preciso citar também que, com o aumento da concentração de enzima, pode haver empacotamento inadequado, que dificulte o acesso ao sítio ativo da enzima, levando a problemas de limitação de transferência de massa (SISO ET AL., 1990). Todos esses fatores, então, provocam diferenças entre os valores previstos e os observados experimentalmente, mostrando alguns dos desafios desse processo de imobilização por adsorção.

Para prosseguir com os experimentos, foi selecionada então a condição de desejabilidade que otimizava a condição de atividade recuperada e atividade imobilizada (pH 4,82, tempo de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878% v/v). Essa condição apresentou resultados válidos, requereu uma baixa quantidade de enzima, foi feita em pH favorável à adsorção na resina e no qual a enzima imobilizada apresentou boa atividade. Outros trabalhos na literatura, que apresentaram resultados satisfatórios no processo de imobilização, também realizaram o processo de imobilização nessa faixa de pH.

Um desses trabalhos foi o de Antony, Balachandran e Mohandan (2016), que desenvolveram o estudo da adsorção de α -amilase (extraída de malte) em óxido de zinco nanoparticulado, em tampão no pH 5,00, com 2 horas de imobilização, utilizando 9,50 mg de enzima. Nesse trabalho a atividade recuperada foi de 51,72% e a eficiência de 80,50%.

Outro trabalho foi o de Guo et al., (2016) que estudaram a imobilização de α -amilase de pâncreas do porco, por ligação covalente, a 40°C e as condições ótimas de imobilização da enzima foram: pH 5,50; tempo de imobilização de 36 horas e 20 mg/mL de enzima. A eficiência do processo de imobilização foi de 43,90%.

Além disso, Marquez et al. (2008) constataram que as condições ótimas de imobilização por adsorção para a enzima invertase na resina Duolite A-568 para produção de açúcar invertido foram: pH 5,00, 12,50 g/L de enzima, a 30°C e 24h.

O ponto experimental selecionado para dar continuidade aos experimentos (pH 4,82; tempo de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878%) apresentou os seguintes resultados: 77,70 U para AI, 39,43% para AR e 54,84% para Ef. Comparando-se com os trabalhos citados anteriormente, esse experimento apresentou eficiência mais alta do que o trabalho de Guo et al. (2016), com tempo de imobilização bem mais curto e pH próximo ao desse trabalho. Por sua vez, a atividade recuperada e a eficiência foram inferiores ao trabalho de Antony, Balachandran e Mohandan (2016), porém no trabalho deles o tempo de imobilização foi maior e o pH foi praticamente o mesmo que o utilizado nesta pesquisa.

Além disso, se for avaliado o último ponto da Tabela 4.8, para um tempo menor, de 52 minutos, com uma baixa concentração de enzima e um pH um pouco mais alto (pH 5,66 e concentração de 0,878% v/v) foi possível obter uma eficiência mais alta, de

aproximadamente 75,00%. Esse ponto não foi selecionado para dar a continuidade aos experimentos, pois não apresentou resultados muito próximos entre os valores previstos e experimentais para AI e AR e também se optou por trabalhar com a adsorção em tempos mais curtos (de 15 minutos).

4.5 Análise dos testes preliminares à imobilização da enzima Termamyl® 2X por ligação cruzada com glutaraldeído

Nesses testes preliminares foi avaliada a influência do glutaraldeído como agente reticulante na atividade enzimática para avaliar qual a melhor condição de reticulação: depois (teste 1) ou antes (teste 2) do processo de imobilização nas condições otimizadas (pH 4,82, tempo de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878% v/v).

Foram determinadas as atividades da enzima imobilizada em ambos os testes:

- Teste 1: atividade de 29,50 U
- Teste 2: atividade de 32,00 U

Os resultados obtidos foram bem próximos, porém como o resultado do teste 2 foi um pouco superior, optou-se por seguir a metodologia desse experimento no próximo DCC que foi realizado.

Do ponto de vista da imobilização, os dois protocolos apresentam mecanismos similares, que envolvem processo rápido de adsorção e posterior ligação covalente. No entanto, no teste 2 há restrição da modificação química somente para os grupos da proteína que estão envolvidos na imobilização, enquanto no teste 1, toda a superfície da proteína pode ser modificada (LÓPEZ-GALLEGU ET AL., 2005).

4.6 Análise e otimização da imobilização de Termamyl® 2X por ligação cruzada com glutaraldeído

Para verificar a influência conjunta das variáveis independentes concentração de enzima e tempo em três respostas - atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência de imobilização - foi realizado um DCC contendo um fatorial completo 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, em um total de 11 experimentos, com alfa de rotacional, cujo valor foi de 1,4142. A concentração de glutaraldeído (X_4) variou de 0,00% a 0,70 % g/L ; o tempo de reticulação (X_5), de 4 minutos a 46 minutos.

A análise estatística de cada resposta foi feita através da determinação dos coeficientes de regressão múltipla, calculados no *software* Statistica® 7.0. Foi considerado um nível de

significância de 90%, ou seja, os parâmetros foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,10$. Os valores nominais e codificados das variáveis estudadas e as respostas obtidas para a atividade da enzima imobilizada (AI), atividade recuperada (AR) e eficiência (Ef) são mostradas Tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Matriz com valores obtidos a partir do DCC com Termamyl 2x imobilizada por ligação cruzada.

Experimento	Concentração de glutaraldeído (X_4) (% m/v)	Tempo (X_5) (min)	Atividade da enzima imobilizada (U)	Atividade Recuperada (%)	Eficiência (%)
1	0,10 (-1)	10 (-1)	42,03	26,80	41,47
2	0,10 (-1)	40 (+1)	46,72	16,29	60,82
3	0,60 (+1)	10 (-1)	27,18	18,19	25,40
4	0,60 (+1)	40 (+1)	29,74	9,66	25,70
5	0,00 ($-\alpha$)	25 (0)	74,44	29,92	88,69
6	0,70 ($+\alpha$)	25 (0)	18,04	12,49	27,29
7	0,35 (0)	4 ($-\alpha$)	24,61	16,07	19,94
8	0,35 (0)	46 ($+\alpha$)	31,31	14,28	34,75
9	0,35 (0)	25 (0)	39,29	23,49	47,74
10	0,35 (0)	25 (0)	41,38	24,53	54,76
11	0,35 (0)	25 (0)	40,77	24,16	48,61

Com Tabela 4.9 observa-se que a atividade da enzima imobilizada (AI) obtida com os experimentos variou de 18,04 U (experimento 6) a 74,44 U (experimento 5); a atividade recuperada (AR) variou de 9,66% (experimento 4) a 29,92% (experimento 5) e a eficiência variou de 19,94% (experimento 7) a 88,69% (experimento 5).

4.6.1 Atividade da enzima imobilizada (AI) por ligação cruzada com glutaraldeído

A partir dos valores obtidos para a atividade da enzima imobilizada e com a utilização do *Software* Statistica® 7.0, foram calculados os coeficientes de regressão para as variáveis e suas interações, assim como os valores dos níveis de significância para identificar quais delas eram estatisticamente significativos (com $p < 0,1$). Esses valores são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta AI (U) por ligação cruzada.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	P
Termo independente	40,482	0,000
X ₄ (L)	-13,988	0,001
X ₄ (Q)	2,765	0,026
X ₅ (L)	2,142	0,030
X ₅ (Q)	-6,502	0,005
X ₄ X ₅	-0,531	0,429
	R ² = 0,87	

Após a regressão múltipla foi obtida a Equação (4.7) completa com todos os parâmetros:

$$AI(U) = 40,48 - 13,99X_4 + 2,77X_4^2 + 2,14X_5 - 6,50X_5^2 - 0,53X_4X_5 \quad 4.7$$

A partir da Equação 4.8 percebe-se que todas as variáveis são significativas, mas a interação X₄X₅ (valor de “p” é maior do que 0,10) não é. Isso indica que a atividade da enzima imobilizada por ligação cruzada não é influenciada significativamente pela interação dos fatores X₄X₅, mas é influenciada pelas outras variáveis individualmente, ou seja, depende de X₄(L), X₄(Q), X₅(L) e X₅(Q).

De acordo com a Equação 4.7 verifica-se que o sinal negativo do coeficiente X₄(L) indica que quanto maior a concentração de glutaraldeído, menor é a atividade da enzima imobilizada (AI). Por sua vez, o sinal positivo do coeficiente X₅(L) indica que o aumento no tempo leva ao aumento da atividade da enzima imobilizada (AI). Essas tendências podem ser confirmadas também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.9.

O coeficiente de correlação (R²) obtido indica que 87% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta. Foi feita a análise de variância (ANOVA) e observou-se que o valor de F calculado (9,54) foi superior ao valor de F tabelado (3,11) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pela Equação (4.7).

Em seguida foi feita a análise estatística considerando-se apenas os parâmetros significativos (com p < 0,10), que são mostrados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AI (U) por ligação cruzada com glutaraldeído.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	P
Termo independente	40,482	0,000
X ₄ (L)	-13,988	0,001
X ₄ (Q)	2,765	0,026
X ₅ (L)	2,142	0,030
X ₅ (Q)	-6,502	0,005
R ² = 0,92		

A partir dos resultados da regressão múltipla da obteve-se a Equação (4.8) com os parâmetros significativos.

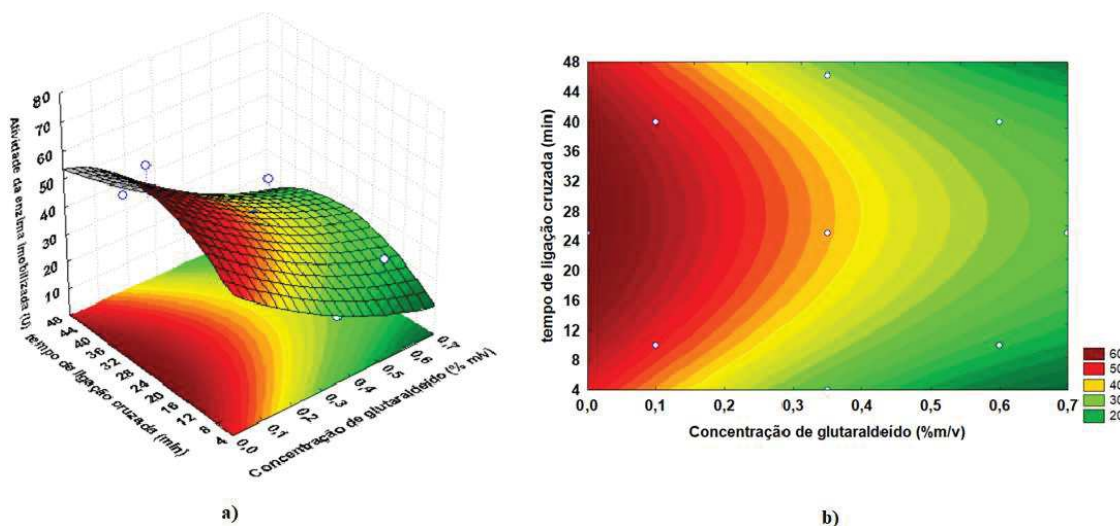
$$AI(U) = 40,48 - 13,99X_4 + 2,77X_4^2 + 2,14X_5 - 6,50X_5^2 \quad 4.8$$

De acordo com a Equação (4.8) verifica-se que o sinal negativo do coeficiente X₄(L) indica que quanto maior a concentração de glutaraldeído, menor é a atividade da enzima imobilizada (AI). Por sua vez, o sinal positivo do coeficiente X₅(L) indica que o aumento no tempo leva ao aumento da atividade da enzima imobilizada (AI). Essas tendências podem ser confirmadas também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.9.

O coeficiente de correlação (R²) obtido indica que 87% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A partir do modelo reduzido e significativo mostrado na Equação (4.8), foi possível construir a superfície de resposta e definir a região ótima da resposta em relação às variáveis independentes. Na Figura 4.16 foi apresentada a superfície de resposta e as curvas de contorno para a resposta AI por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído (X₄) e tempo (X₅).

Figura 4.16 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade da enzima imobilizada (AI) por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído e do tempo.



De acordo com Figura 4.16 percebe-se que para maximizar a atividade da enzima imobilizada por ligação cruzada o tempo deve estar 4 a 46 minutos e a concentração de glutaraldeído entre 0 e 0,2 % m/v.

4.6.2 Atividade recuperada (AR) da imobilização por ligação cruzada com glutaraldeído

A partir dos valores obtidos para a atividade recuperada com a ligação cruzada e com a utilização do *Software Statistica® 7.0*, foram calculados os coeficientes de regressão para as variáveis e suas interações, assim como os valores dos níveis de significância para identificar quais delas eram estatisticamente significativos (com $p < 0,10$). Esses valores são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta AR (%) por ligação cruzada.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	P
Termo independente	24,044	0,000
X ₄ (L)	-5,005	0,001
X ₄ (Q)	-1,552	0,020
X ₅ (L)	-2,677	0,004
X ₅ (Q)	-4,558	0,002
X ₄ X ₅	0,495	0,201
R ² = 0,89		

Após a regressão múltipla foi obtida a Equação (4.9) completa com todos os parâmetros:

$$AR(\%) = 24,04 - 5,01X_4 - 1,55X_4^2 - 2,68X_5 - 4,56X_5^2 + 0,50X_4X_5 \quad 4.9$$

A partir da Equação (4.9) percebe-se que todas as variáveis são significativas, mas a interação X_4X_5 (valor de “p” é maior do que 0,10) não é. Isso indica que a atividade da enzima imobilizada por ligação cruzada não é influenciada significativamente pela interação dos fatores X_4X_5 , mas é influenciada pelas variáveis de forma individual, ou seja, depende de $X_4(L)$, $X_4(Q)$, $X_5(L)$ e $X_5(Q)$.

De acordo com a Equação (4.9) verifica-se que o sinal negativo dos coeficientes $X_4(L)$ e $X_5(L)$ indica que quanto maior a concentração de glutaraldeído e o tempo de reticulação, respectivamente, menor é a atividade recuperada após ligação cruzada (AR). Essas tendências podem ser confirmadas também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.9.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 89% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta. Foi feita a análise de variância (ANOVA) e observou-se que o valor de F calculado (6,25) foi superior ao valor de F tabelado (3,11) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pela Equação (4.9).

Em seguida foi feita a análise estatística considerando-se apenas os parâmetros significativos (com $p < 0,10$), que são mostrados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AR (%) por ligação cruzada com glutaraldeído.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	P
Termo independente	24,044	0,000
$X_4 (L)$	-5,005	0,001
$X_4 (Q)$	-1,552	0,020
$X_5 (L)$	-2,677	0,004
$X_5 (Q)$	-4,558	0,002
$R^2 = 0,89$		

A partir dos resultados da regressão múltipla da Tabela 4.13 obteve-se a Equação (4.10) com os parâmetros significativos.

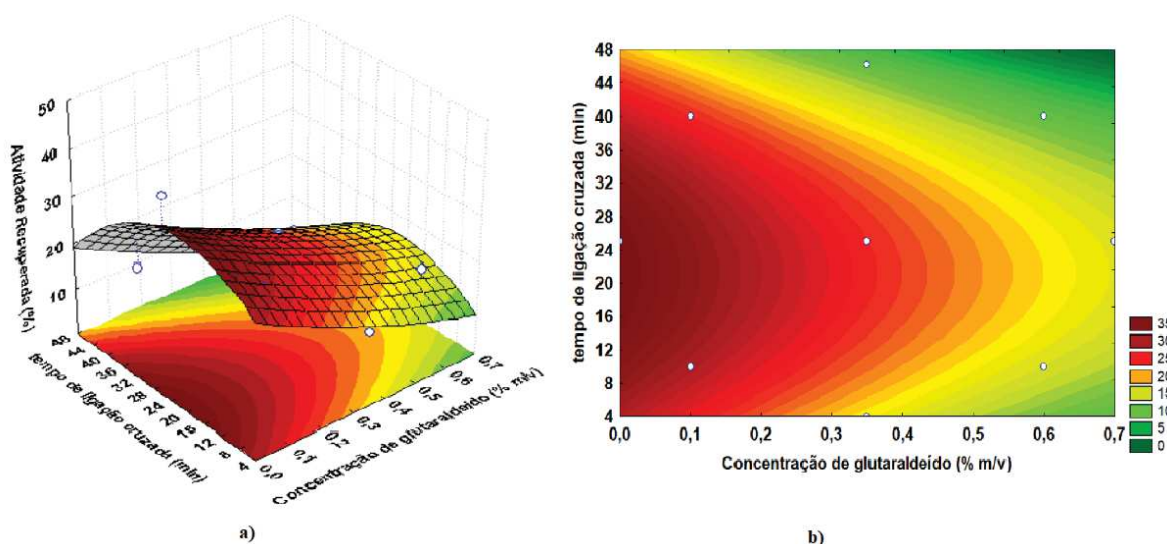
$$AR(\%) = 24,04 - 5,01X_4 - 1,55X_4^2 - 2,68X_5 - 4,56X_5^2 \quad 4.10$$

De acordo com a Equação (4.10) verifica-se que o sinal negativo dos coeficientes $X_4(L)$ e $X_5(L)$ indica que quanto maior a concentração de glutaraldeído e quanto maior o tempo de reticulação, respectivamente, menor é a atividade da enzima imobilizada por ligação cruzada (AR). Essas tendências podem ser confirmadas também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.9.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 89% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A partir do modelo reduzido e significativo mostrado na Equação (4.10), foi possível construir a superfície de resposta e definir a região ótima para a resposta em relação às variáveis independentes. Na Figura 4.17 foi apresentada a superfície de resposta e as curvas de contorno para a resposta AR por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído (X_4) e do tempo (X_5).

Figura 4.17 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade recuperada (%) para a imobilização por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído e do tempo.



De acordo com a Figura 4.17 percebe-se que para maximizar a atividade da enzima imobilizada por ligação cruzada o tempo deve estar 4 a 36 minutos e a concentração de glutaraldeído entre 0 e 0,2 % m/v.

4.6.3 Eficiência (Ef) da imobilização por ligação cruzada com glutaraldeído

A partir dos valores obtidos para a eficiência com a ligação cruzada e com a utilização do *Software* Statistica® 7.0, foram calculados os coeficientes de regressão para as variáveis e suas interações, assim como os valores dos níveis de significância para identificar quais delas eram estatisticamente significativos (com $p < 0,10$). Esses valores são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Coeficientes de regressão para o modelo completo e valores de p para a resposta Ef (%) por ligação cruzada.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	P
Termo independente	50,411	0,002
X_4 (L)	-17,317	0,006
X_4 (Q)	2,774	0,232
X_5 (L)	5,179	0,062
X_5 (Q)	-12,739	0,016
X_4X_5	-4,763	0,131
	$R^2 = 0,94$	

Após a regressão múltipla foi obtida a Equação (4.11) completa com todos os parâmetros:

$$Ef(\%) = 50,41 - 17,32X_4 + 2,77X_4^2 + 5,18X_5 - 12,74X_5^2 - 4,76X_4X_5 \quad 4.11$$

A partir da Equação (4.11) percebe-se que todas variáveis são significativas, com exceção da variável $X_4(Q)$ e da interação X_4X_5 (cujos valores de p são maiores do que 0,10). Isso indica que a eficiência da imobilização por ligação cruzada é influenciada significativamente por $X_4(L)$, $X_5(L)$ e $X_5(Q)$.

De acordo com a Equação (4.11) verifica-se que o sinal negativo do coeficiente $X_4(L)$ indica que quanto maior a concentração de glutaraldeído, menor é a eficiência (Ef). Por sua vez, o sinal positivo do coeficiente $X_5(L)$ indica que o aumento no tempo leva ao aumento da eficiência (Ef). Essas tendências podem ser confirmadas também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.9.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 94% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta. Foi feita a análise de variância (ANOVA) e observou-se que o valor de F calculado (6,99) foi superior ao valor de

F tabelado (3,11) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pela Equação (4.11).

Em seguida foi feita a análise estatística considerando-se apenas os parâmetros significativos (com $p < 0,10$), que são mostrados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 - Coeficientes de regressão para o modelo reduzido e valores de p para a resposta AR (%) por ligação cruzada com glutaraldeído.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	P
Termo independente	52,975	0,001
X_4 (L)	-17,317	0,006
X_5 (L)	5,183	0,062
X_5 (Q)	-13,528	0,013
	$R^2 = 0,91$	

A partir dos resultados da regressão múltipla da Tabela 4.15 obteve-se a Equação (4.12) com os parâmetros significativos.

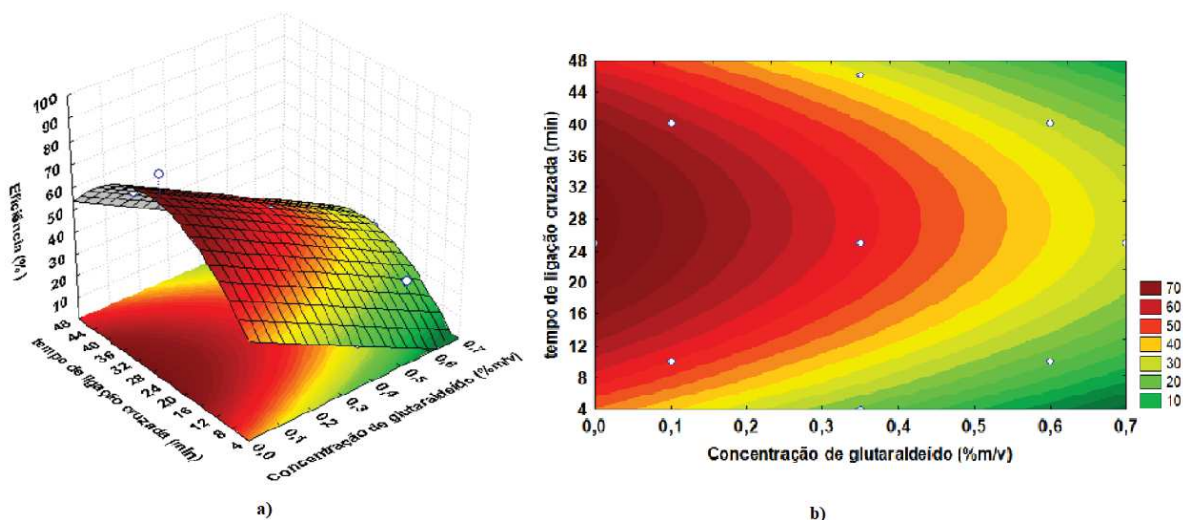
$$Ef(\%) = 52,98 - 17,32X_4 + 5,18X_5 - 13,53X_5^2 \quad 4.12$$

De acordo com a Equação (4.12) verifica-se que o sinal negativo dos coeficientes $X_4(L)$ e $X_5(L)$ indica que quanto maior a concentração de glutaraldeído e quanto maior o tempo de reticulação, respectivamente, menor é a eficiência da enzima imobilizada por ligação cruzada (Ef). Essas tendências podem ser confirmadas também por meio dos resultados obtidos na Tabela 4.9.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido indica que 91% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A partir do modelo reduzido e significativo mostrado na Equação (4.12), foi possível construir a superfície de resposta e definir a região ótima para a resposta em relação às variáveis independentes. Na Figura 4.18 foi apresentada a superfície de resposta e as curvas de contorno para a resposta AR por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído (X_4) e do tempo (X_5).

Figura 4.18 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência da imobilização (%) por ligação cruzada em função da concentração de glutaraldeído e do tempo.



De acordo com a Figura 4.18 percebe-se que para maximizar a eficiência por ligação cruzada o tempo deve estar 12 a 43 minutos e a concentração de glutaraldeído entre 0 e 0,2 % m/v.

4.6.4 Otimização simultânea das três respostas – AI, AR e Ef - na imobilização por ligação cruzada e validação

A condição que maximizava simultaneamente a atividade da enzima imobilizada, a atividade recuperada e a eficiência do processo de imobilização por ligação cruzada foram avaliadas pelo Maple 17 e pela função desejabilidade do Statistica® 7.0, conforme Figuras 4.19 e 4.20.

Figura 4.19 - Curvas para maximização de AI (U), AR (%) e Ef (%) da imobilização por ligação cruzada em relação às variáveis independentes pelo Maple 17.

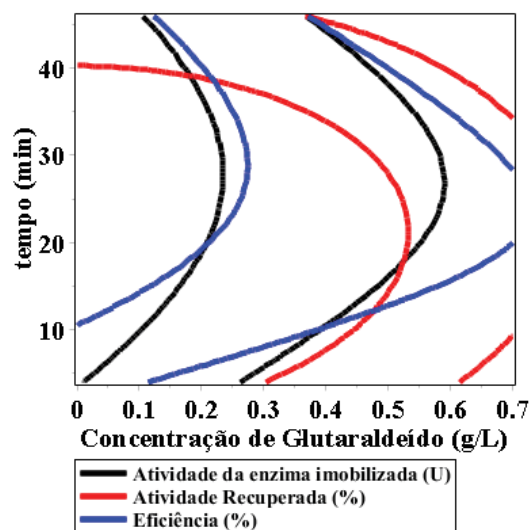
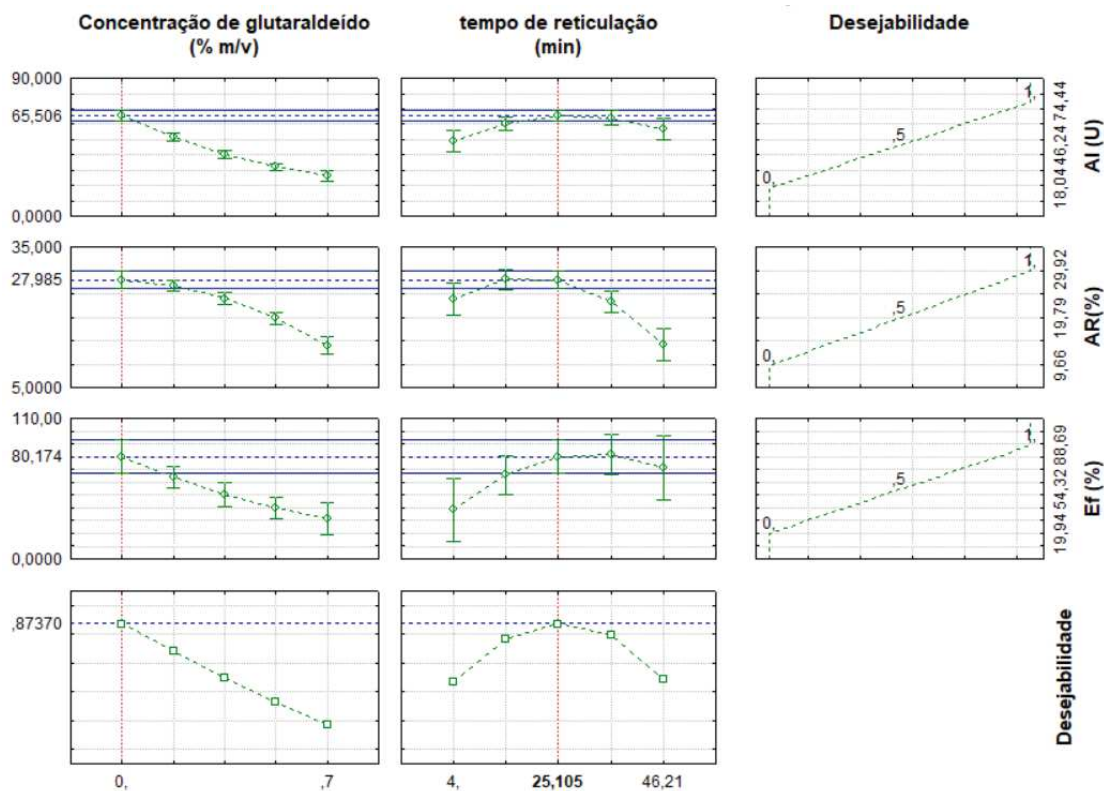


Figura 4.20 - Perfis da função desejabilidade para maximização simultânea de AI (U), AR (%) e Ef (%) na imobilização por ligação cruzada.



De acordo com a Figura 4.19 percebe-se que a faixa que maximiza as três respostas AI, AR e Ef (que estão praticamente sobrepostas) ocorre de 10 a 40 minutos e para

concentrações de glutaraldeído menores do que 0,2% m/v. A maximização pelo Maple corresponde à intersecção das regiões abrangidas pelas diferentes cores e onde as linhas estão mais próximas.

De acordo com a Figura 4.20 os dois perfis das três primeiras linhas dessa figura são relativos à variação, respectivamente, da atividade da enzima imobilizada (AI), da atividade recuperada (AR) e da eficiência (Ef) da imobilização por ligação cruzada em relação cada fator (concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação). O terceiro perfil de cada uma dessas linhas apresenta a faixa de desejabilidade aceitável para a maximização de cada resposta ($0 \leq d_i \leq 1$). Os dois perfis da parte inferior mostram a desejabilidade global, para a maximização simultânea das respostas, com valor 0,87.

Esse resultado revela um nível de confiabilidade aceitável para a aplicação desse método de otimização simultânea, realizado a partir dos resultados experimentais, pois o seu objetivo é de que a desejabilidade fique o mais próximo da unidade.

Dessa forma, as condições que otimizam a resposta são: concentração de glutaraldeído de 0% m/v e tempo de reticulação de 25 minutos. Ao comparar esses valores obtidos com as faixas selecionadas nas Figuras 4.16; 4.17 e 4.18 e com a faixa obtida pelo Maple 17 percebe-se que o tempo e a concentração obtidos com a função desejabilidade estão dentro das faixas avaliadas.

Apesar de esse resultado de otimização revelar que a variação na concentração de glutaraldeído não melhorou diretamente as respostas avaliadas no processo de imobilização (AI, AR e Ef), esse reagente pode ser utilizado para melhorar a estabilidade da enzima e por isso foi feita a validação dos modelos das Equações (4.8), (4.10) e (4.12) numa condição de utilização de baixa quantidade de glutaraldeído e considerando a condição ótima para o tempo obtida com a ferramenta Maple: 0,2% de glutaraldeído e 25 minutos de tempo de reticulação. A validação foi feita por meio da comparação entre o valor previsto pelo modelo de cada equação e o valor obtido experimentalmente para cada uma das respostas.

Em relação à atividade da enzima imobilizada por ligação cruzada, os resultados obtidos foram os seguintes: o valor previsto pelo modelo de AI foi de 49,87 U e o valor experimental foi de 35,66 U. Os valores obtidos apresentaram uma diferença relativamente alta de 28,50%, mas aceitável, devido às dificuldades experimentais, como em relação ao manejo da resina na cesta de aço inox ao longo do processo de imobilização e entre os processos de lavagem. Dessa forma, mesmo com essa discrepância, o modelo da Equação (4.8) foi considerado válido, assim como as condições ótimas definidas com base nas análises de superfície, derivadas desse modelo.

Em relação à atividade recuperada da imobilização por ligação cruzada, os resultados obtidos foram os seguintes: o valor previsto pelo modelo foi de 26,49 U e o valor experimental foi de 31,38 U. Os valores obtidos apresentam uma diferença de 18,46%. Houve também uma certa discrepância entre esses valores, que reflete as dificuldades experimentais, porém o modelo da Equação (4.10) foi considerado válido, assim como as condições ótimas definidas com base nas análises de superfície, derivadas desse modelo.

Em relação à eficiência da imobilização por ligação cruzada, os resultados obtidos foram os seguintes: o valor previsto pelo modelo foi de 60,80 U e o valor experimental foi de 46,51 U. Os valores obtidos apresentaram uma diferença de 23,50%, o que também revela as dificuldades experimentais, porém o modelo da Equação (4.12) foi considerado válido, assim como as condições ótimas definidas com base nas análises de superfície, derivadas desse modelo.

4.6.5 Comparação entre os processos de imobilização

Ao longo dessa pesquisa foram avaliadas duas condições de imobilização: imobilização por adsorção e imobilização por ligação cruzada. Após a otimização das condições para realização de ambos os procedimentos, foram obtidas respostas experimentais para atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência, que estão sintetizadas na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Resultados experimentais para AI, AR e Ef na imobilização por adsorção e por ligação cruzada.

Experimento	AI (U)	AR (%)	Ef (%)
Imobilização por adsorção	77,70	30,43	54,84
Imobilização por ligação cruzada	35,66	31,38	46,51

De acordo com os resultados da Tabela 4.16 percebe-se que as respostas obtidas para a imobilização por adsorção foram mais altas do que para a imobilização por ligação cruzada, com exceção apenas da atividade recuperada, que aumentou um pouco. A utilização de glutaraldeído para realização de ligação cruzada provocou uma redução da atividade da enzima imobilizada e da eficiência, respectivamente, em 54,10% e 15,19%. A atividade recuperada aumentou 3,12%. Esperava-se que a reticulação fosse útil para provocar o aumento das respostas, favorecendo a interação entre enzima e resina, através das ligações cruzadas estabelecidas entre a enzima (GUIDINI ET AL., 2010), que, por sua vez,

melhorariam a interação com a resina. Entretanto, isso não foi observado e o processo de imobilização por adsorção foi melhor para a enzima Termamyl® 2X.

No trabalho de Varavinit, Chaokasema e Shobsngobb (2002), foi feita a imobilização da α -amilase Termamyl 60 L em fibras de celulose (bagasso) por meio de ligação covalente, por 30 minutos, a 50 °C. A eficiência desse processo foi de 44%. Comparando-se com os procedimentos de imobilização dessa pesquisa, ambos apresentaram resultados de eficiência superior (54,84% e 46,51%).

El Sayed et al. (2019) avaliaram o processo de imobilização da enzima α -amilase recombinante derivada de *Laceyella* sp. por adsorção em alginato de cálcio, a 25°C por 1,5 horas e também por ligação covalente em quitosana, ativada por glutaraldeído, por 1 hora e a 4°C. A eficiência do processo de adsorção foi de 95%, porém a atividade recuperada foi de 7,65%. Por sua vez o processo por ligação cruzada apresentou eficiência de 483,6% e atividade recuperada de 565%.

Na pesquisa de Sousa (2018), a β -galactosidase, produzida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* foi imobilizada em resina de troca iônica Duolite® A-568 por adsorção simples e foram feitos testes de reticulação com glutaraldeído nas concentrações de 0,14g/L, 0,35 g/L e 3,50 g/L. O aumento da concentração de glutaraldeído provocou redução na atividade da enzima imobilizada, sendo que a maior concentração de glutaraldeído provocou a maior redução na atividade (93%). Nas duas concentrações mais baixas de glutaraldeído também foram feitos testes para verificar a estabilidade do adsorvente por 2 horas, porém também houve redução da atividade após esse tempo.

No trabalho de Cruz et al. (2015) foi feita a retenção da enzima α -amilase Termamyl em uma matriz polimérica de PVA misturada à pectina, usando como agente reticulante o glutaraldeído em diferentes concentrações: 0,25; 0.5; 0.75; 1.0 e 1,25% v/v. Observou-se que com o aumento da concentração de glutaraldeído, a atividade da enzima imobilizada não apresentou diferenças estatisticamente significativas, mas provocou o aumento da estabilidade da matriz do adsorvente. O aumento excessivo da concentração de glutaraldeído também pode levar à redução da flexibilidade do sítio ativo, alterando sua geometria, o que pode dificultar o a afinidade da enzima com o substrato (WANG ET AL., 2016).

Percebe-se, portanto, que a utilização de glutaraldeído pode aumentar ou não a atividade da enzima no processo de imobilização, dependendo das condições do processo e da metodologia utilizada para imobilizar a enzima. Pela literatura, o glutaraldeído também pode ser utilizado para aumentar a estabilidade da enzima imobilizada, melhorando suas propriedades mecânicas (CRUZ ET AL., 2015). Pelos trabalhos, percebe-se também que

concentrações mais baixas de glutaraldeído podem ser mais adequadas para o processo de imobilização.

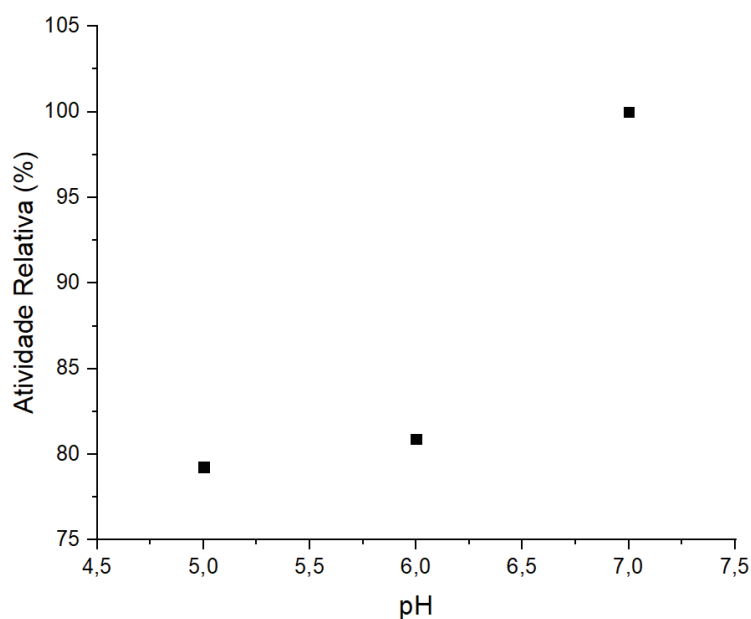
Nesse sentido, foi considerada a condição próxima à condição ótima obtida pela função desejabilidade para a imobilização por ligação cruzada (0,2% m/v de glutaraldeído e 25 minutos de tempo de reticulação) para avaliar, nos experimentos seguintes, a atividade da enzima imobilizada em diferentes pHs, sua estabilidade ao pH, sua capacidade de reuso e a sua estabilidade de armazenamento.

4.6.6 Atividade da enzima Termamyl® 2X na condição selecionada pelo delineamento composto central do estudo da imobilização por ligação cruzada com variação de pH do meio reacional.

Foram feitos experimentos com a enzima imobilizada na região de otimização da imobilização por ligação cruzada (0,2% g/L de glutaraldeído e 25 minutos), para avaliar a sua atividade nos pHs 5,00, 6,00 e 7,00 a 70°C, na hidrólise de amido gelatinizado 1% m/v.

A unidade (U) de atividade da enzima (AI), nesse caso, imobilizada, foi expressa em mg/min (U) e foram calculadas atividades relativas (Arel) em relação à máxima atividade obtida (A_{máx}), conforme a Equação 3.1. A Figura 4.21 mostra a variação da atividade relativa da enzima imobilizada em função do pH. O maior valor de atividade obtido foi assumido como 100% e os outros valores foram calculados em relação a ele.

Figura 4.21 - Atividade relativa em função do pH para a enzima imobilizada por ligação cruzada.



Pela Figura 4.21 percebe-se que a atividade mais alta da enzima imobilizada na faixa avaliada ocorreu em pH 7,00. Nos pHs 5,00 e 6,00 a enzima imobilizada manteve 79% e 81% da atividade máxima, respectivamente. Em relação à enzima livre, o pH de atividade mais alta foi o pH 7,00 também e houve aumento da atividade relativa no pH 5,00 para a enzima imobilizada em relação à livre. No pH 6,00 a atividade relativa da enzima imobilizada (81,00%) foi um pouco mais baixa do que a atividade relativa da enzima livre nesse mesmo pH (85,53%).

A imobilização tende a melhorar a atividade da enzima e isso pode ser explicado por mudanças na conformação do sítio ativo da enzima que ocorrem nesse processo e a estrutura da proteína fica mais estável (KLAPISZEWSKI, ZDARTA, JESIONOWSKI; 2018).

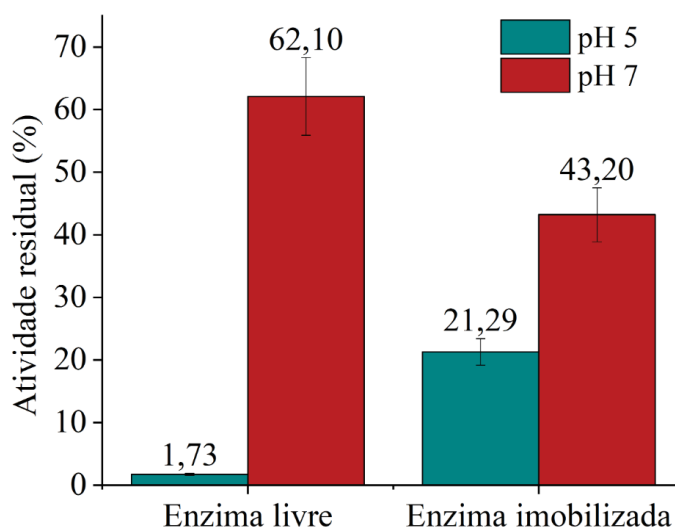
No trabalho de Klapiszewski, Zdarta, Jesionowski (2018), foi feita a imobilização de uma α -Amylase de *Aspergillus oryzae* por meio de ligação covalente e interações físicas em um suporte sintético híbrido de titânio e lignina. A enzima imobilizada apresentou atividade mais alta em pH 6,50 e manteve mais de 80% de atividade na faixa de pH de 5,50 a 7,50, com resultados então similares aos obtidos a partir dessa pesquisa.

Além disso, outro resultado que foi similar ao dessa pesquisa foi o apresentado pelo trabalho de Swarnalatha et al. (2013), no qual foi imobilizada também uma α -Amylase de *Aspergillus oryzae* com a utilização de nanopartículas magnéticas com glutaraldeído estabilizadas por goma de acácia. Nesse estudo, a atividade da enzima imobilizada foi mais alta em pH 7,00 e nos pHs 5,00 e 6,00 a enzima reteve, respectivamente, 81% e 90% da atividade máxima.

4.6.7 Estabilidade da enzima Termamyl® 2X na condição selecionada pelo delineamento composto central do estudo da imobilização por ligação cruzada em relação ao pH

Para avaliar a estabilidade da Termamyl® 2X foi feito o processo de imobilização por ligação cruzada na condição selecionada após a otimização (0,2% g/L de glutaraldeído e 25 minutos de tempo de reticulação, pH 4,82; tempo de 15 minutos de imobilização e concentração de enzima de 0,878% v/v). A resina com a enzima imobilizada foi mantida em banho termostatizado, a 70°C, nos pHs 5,00 e 7,00, por duas horas. Após esse período foi determinada a atividade residual em cada pH, tendo como referência a atividade da enzima na condição ótima de imobilização por ligação cruzada. Os resultados obtidos foram mostrados na Figura 4.22, na qual também são expostos os resultados da estabilidade da enzima livre nas mesmas condições de pH.

Figura 4.22 – Estabilidade da Termamyl® 2X livre e imobilizada por ligação cruzada em relação ao pH.



Percebe-se Figura 4.22 que a enzima imobilizada por ligação cruzada apresentou estabilidade mais alta no pH 7 do que no pH 5. A enzima livre também apresentou estabilidade mais alta em pH 7, pH no qual houve o valor mais alto de estabilidade para a faixa de pH considerada (valor de 62,10% de atividade residual).

O glutaraldeído apresenta dois grupos aldeídos que podem reagir com os grupamentos amino da matriz ou da enzima e por isso, normalmente ele é utilizado como agente reticulante, responsável por promover a conexão entre enzima – enzima e/ou matriz enzima, por meio de ligações covalentes. Consequentemente, a partir do estabelecimento dessas ligações, ele promove o aumento da estabilidade da enzima (BETANCOR ET AL.,2006; GUIDINI ET AL., 2010).

No entanto, nessa pesquisa e no trabalho de Wang et al. (2016), no qual foi feita a imobilização da enzima celobiose 2-epimerase, derivada de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, na resina Duolite A-568 por ligação cruzada com glutaraldeído, observou-se que a estabilidade foi pouco afetada pela adição desse agente reticulante, sendo que neste último trabalho, a estabilidade foi avaliada a 4°C, por 24h, na faixa de pH de 3 a 11 e a enzima imobilizada teve uma faixa restrita de estabilidade, retendo, respectivamente, 65% e 80% da atividade da enzima livre nos pHs 5,00 e 7,00.

Esperava-se que a estabilidade da enzima imobilizada fosse mais alta, porém, de acordo com Guidini et al. (2010), os grupamentos terciários da resina Duolite não sofrem reação de condensação com o glutaraldeído, então não há formação de ligação covalente entre ambos, de forma que isso pode facilitar o processo de dessorção da enzima na resina.

O glutaraldeído provavelmente promoveu a reação de reticulação entre a enzima - enzima, que ajudou na estabilização delas no interior do poro da resina (GUIDINI ET AL., 2010; WANG ET AL., 2016), mas isso não foi suficiente para aumentar consideravelmente a estabilidade nesse processo de imobilização realizado. Para entender melhor essa relação entre estabilidade, ligações estabelecidas entre resina e glutaraldeído, estudos mais aprofundados seriam necessários.

4.6.8 Estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada por adsorção e da enzima imobilizada por ligação cruzada

A estabilidade da enzima Termamyl® 2X foi avaliada após o processo de imobilização por adsorção e por ligação cruzada. No primeiro teste, a atividade da enzima foi avaliada em sua condição ótima (pH 4,82, tempo de imobilização de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878% v/v) após 25 e 35 dias de armazenamento na geladeira a 4°C em pH 6,50. No segundo teste, a atividade da enzima foi avaliada na condição do ponto central do segundo DCC dessa pesquisa (0,35% g/L de glutaraldeído e 25 minutos de tempo para realização da ligação cruzada) após armazenamento por 25 dias, nas mesmas condições citadas anteriormente. Em cada situação foi determinada a atividade residual em relação à atividade da enzima imobilizada antes do armazenamento, considerada o valor de 100%.

No primeiro teste, após 25 dias e 35 dias a enzima praticamente manteve a mesma atividade residual, respectivamente de 9,57% e 9,47%. No segundo teste, após 25 dias, enzima apresentou 18,23% de atividade residual. Percebe-se que houve um aumento da estabilidade da enzima ao armazenamento no procedimento de ligação cruzada com glutaraldeído, porém percebe-se que a enzima apresentou grande perda de atividade em ambos os processos.

No trabalho de Klapiszewski, Zdarta e Jesionowski (2018), foi feita a imobilização de uma α -Amylase de *Aspergillus oryzae* por meio de ligação covalente e interações físicas em um suporte sintético híbrido de titânio e lignina. A estabilidade de armazenamento foi avaliada em pH 5,50 a 5°C e a 25°C, sendo que houve retenção, respectivamente, de 70% e 80% da atividade inicial.

Ao se comparar os resultados do trabalho citado anteriormente com a pesquisa desenvolvida percebe-se, portanto, que o pH de armazenamento pode ter sido um fator desfavorável para manter a estabilidade da enzima. Foi selecionado o pH de 6,50 tendo em vista que a enzima imobilizada apresentou atividades mais altas próximas do pH 7,00 porém

como foi mostrado no Item 4.6.7, a estabilidade da enzima imobilizada em pH 7 não foi alta e esse pH utilizado não foi o ideal para manter a imobilização na resina.

4.6.9 Reusos da enzima Termamyl® 2X na condição selecionada pelo delineamento composto central do estudo da imobilização por ligação cruzada

Na determinação da capacidade de reuso da enzima imobilizada por ligação cruzada na condição próxima à condição de otimização da imobilização por ligação cruzada, a atividade residual foi determinada em cada reuso, após 5 reusos no total, considerando a atividade do primeiro uso como o valor de 100%. As reações foram realizadas com amido 1%, previamente gelatinizado, em pH 7, a 70°C.

Após o primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto reusos foram obtidas, respectivamente, as seguintes atividades residuais: 68,38%; 45,72%; 42,03%; 35,32% e 13%.

Percebe-se que após os 3 primeiros reusos a enzima reteve uma porcentagem considerável de atividade residual, apresentando, portanto, certa estabilidade. Após os 5 reusos a atividade residual decresceu para 13%, sendo que esse valor pode ter ocorrido devido à separação da enzima da resina. Na literatura esse fenômeno também foi uma possibilidade no trabalho de Mardani et al. (2018), porém, no seu trabalho, após 5 reusos da enzima α -amilase imobilizada em nanocompósitos de quitosana com ligação cruzada com glutaraldeído, a atividade residual foi de 47%. No trabalho de Klapiszewski, Zdarta e Jesionowski (2018), a utilização da enzima imobilizada α -Amylase de *Aspergillus oryzae* por meio de ligação covalente e interações físicas em um suporte sintético híbrido de titânio e lignina, após 10 ciclos de reuso, apresentou 90% de atividade residual.

Percebe-se, portanto, que nessa pesquisa houve certa dificuldade em manter a enzima aderida à resina após 5 reusos, mesmo utilizando o glutaraldeído, porém após três reusos a enzima apresentou estabilidade considerável. Para melhorar essa interação entre resina e enzima por mais ciclos de reuso seriam necessários estudos mais aprofundados ou verificar a utilização de outro agente reticulante.

CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

A enzima Termamyl® 2X livre apresentou atividade ótima em pH 7. Ela também se apresentou estável principalmente em pHs 7 e 7,5, mantendo, respectivamente, 62,10% e 60,57% de atividade residual.

No DCC de imobilização por adsorção na resina Duolite® A-568, a análise simultânea da influência das variáveis pH, tempo de imobilização e concentração de enzima nas respostas atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência indicou a condição ótima para os valores de pH 4,82, tempo de 15 minutos e concentração de enzima de 0,878% v/v.

Em sequência, no DCC de imobilização por ligação cruzada, a análise simultânea da influência das variáveis concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação indicou a condição ótima obtida para as respostas atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência com os valores de 0,00% m/v de glutaraldeído e 25 minutos.

No primeiro DCC foi feita a validação da condição ótima dos pontos ótimos obtidos através do Statistica® 7.0 (superfícies de resposta e a função desejabilidade) e do Maple 17, e eles indicaram que as equações de otimização conseguiram descrever o comportamento dos processos de imobilização, validando assim os modelos propostos.

A validação dos modelos propostos também foi feita no segundo DCC, porém ela foi realizada numa condição selecionada na região de otimização, a 0,2% m/v de glutaraldeído e tempo de reticulação de 25 minutos, buscando avaliar a possibilidade de aumento de estabilidade da enzima imobilizada.

Na imobilização por adsorção, os resultados na condição ótima foram os que seguem: 77,70 U de atividade imobilizada, 30,43 % de atividade recuperada e 54,84 %. Na imobilização por ligação cruzada, os resultados da condição ótima foram os seguintes: 35,66 U de atividade imobilizada, 31,38 % de atividade recuperada e 46,51 % de eficiência.

A enzima imobilizada por ligação cruzada apresentou atividade ótima em pH 7. Em relação à estabilidade ao pH, a adição de glutaraldeído não foi tão significativa para o biocatalisador imobilizado.

Após armazenamento de 25 dias em pH 6,5 a 4°C, a enzima imobilizada por adsorção apresentou atividade residual de 9,57% e a enzima imobilizada por ligação cruzada apresentou 18,23% de atividade residual. Em relação ao número de reusos, após três ciclos a enzima imobilizada por ligação cruzada apresentou atividade residual e estabilidade significativas.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

- Fazer o estudo tanto da influência da concentração de substrato (amido) na variação da atividade da enzima livre quanto na atividade da enzima na melhor condição de imobilização.
- Avaliar processo de transferência de massa nos processos de imobilização.
- Testar a atividade da enzima Termamyl® 2X livre e imobilizada em temperaturas menores.
- Avaliar a atividade da enzima Termamyl® 2X livre e imobilizada no processo de gelatinização a frio.
- Comparar resultados entre os estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, A. **Operações de troca iônica**. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro. 2014.

ADEJUMO, A.; AGBOOLA, F.; LAYOKUN, S. Hydrolysis of maize starch using amylolytic enzymes extracted from sorghum malt. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v.3, n. 5, p.1030–1041, 2010. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v3i5.51082>

AEHLE, W. **Enzymes in industry – production and applications**. Leiden: Wiley-VCH. 2007

AKSOY, S.; TUMTURK, H.; HASIRCI, N. Stability of α -amylase immobilized on poly (methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. **Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 37-46, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00179-X)

AL-DHABI, N. A.; ESMAIL, G. A.; GHILAN, A. K. M.; ARASU, M. V.; DURAIPANDIYAN, V.; PONMURUGAN, K. Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n.1, p. 1226-1232, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.018>

ALMEIDA, R. L. J.; DOS SANTOS PEREIRA, T.; DE ANDRADE FREIRE, V.; SANTIAGO, Â. M.; OLIVEIRA, H. M. L.; DE SOUSA CONRADO, L.; DE GUSMÃO, R. P. Influence of enzymatic hydrolysis on the properties of red rice starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 1210–1219, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.072>

ANTONY, N.; BALACHANDRAN, S.; MOHANAN, P. V. Immobilization of diastase α -amylase on nano zinc oxide. **Food Chemistry**, v. 211, p. 624–630, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.049>

ARAÚJO, M. A.; CUNHA, A. M.; MOTA, M. Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in protheses: Identification of the degradation products in solution. **Biomaterials**, v. 25, n.13, p. 2687–2693, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.093>

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial Applications of Immobilized Enzymes. **Molecular Catalysis**, v. 479, 110607, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>

BAYRAMOĞLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: Kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 591–599, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00283-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00283-8)

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Carbohydrates**. In: (org.). Food chemistry (Fourth ed.): Berlin: Springer, 2009, p.248-339. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>

BEMILLER, JAMES. Starches: **Molecular and Granular Structures and Properties**. In: (org.). Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third ed.). Indiana: WPACIP, 2019, p. 159-189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00006-6>

BERSKI, W.; ZIOBRO, R. Pasting and gel characteristics of normal and waxy maize starch in glucose syrup solutions. **Journal of Cereal Science**, v.79, p.253–258, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.11.008>

BERTOFT, E. On the Building Block and Backbone Concepts of Amylopectin Structure. **Cereal Chemistry Journal**, v. 90, n. 4, p. 294-311, 2013. <https://doi.org/10.1094/CCEM-01-13-0004-FI>

BERTOFT, E. Understanding starch structure: Recent progress. **Agronomy**, v.7, n.3, p.56-85, 2017. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030056>

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, G. D.-O. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n.4, p.877–882, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.014>

BISWANGER, H. **Enzymes kinetics – principles and methods**. Weinheim: Wiley-VCH. 2002 ISBN 3-527-30343-X

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. **Immobilization of Enzymes: A Literature Survey**. In: __ (org.). *Immobilization of Enzymes and Cells*. Nova York: Springer 2013, p.15–31. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2

BRYJAK, J. Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 3, p. 347–355. 2003. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00114-1](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00114-1)

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: Structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85–112, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00040-3)

CABRAL, B. V; FALLEIROS, L. N. S.; RIBEIRO, E. J. Estudo da imobilização de invertase em resinas de troca iônica e produção de açúcar invertido. **Horizonte Científico**, v. 6, n.2, 2012.

CAO, L. **Immobilised enzymes: science or art**. *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 9, p. 217-226, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.014>

CARCIOFI, M., BLENNOW, A., JENSEN, S. L., SHAIK, S. S., HENRIKSEN, A., BULÉON, A., HOLM, P. B.; HEBELSTRUP, K. H. Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 1–16, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-223>

CARVALHO, R. V. D.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M. D.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 380-386, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200017>

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de Biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos, *Revista Analytica*, N°23, p. 60-70; 2006.

CHIARAMONTE, E.; RHAZI, L.; AUSSÉNAC, T.; WHITE, D. R. Amylose and amylopectin in starch by asymmetric flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and refractive index detection (AF4-MALS-RI). **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 457–463, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.04.006>

CINELLI, B. A.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. **Fuel**, v. 150, p. 721–729, 2015. <https://10.1016/j.fuel.2015.02.063>

COELHO, G. D.; SOUSA, J. P. DE; GRANDE, C. Potencial de fungos da caatinga para produção de enzimas amilolíticas. **Saúde e Ciência Online**, v. 7, n.2, p. 286–297, 2018.

CRUZ, M.; FERNANDES, K.; CYSNEIROS, C.; NASSAR, R; CARAMORI, S. Improvement of starch digestion using α -amylase entrapped in pectin-polyvinyl alcohol blend. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/145903>

CRUZ-MONTEAGUDO, M.; BORGES, F.; CORDEIRO, M. N. D. S. Desirability-based multiobjective optimization for global QSAR studies: application to the design of novel NSAIDs with improved analgesic, antiinflammatory, and ulcerogenic profiles. **Journal of computational chemistry**, v. 29, n. 14, p. 2445-2459, 2008. <https://doi.org/10.1002/jcc.20994>

CUI, J, D.; JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 35, p. 15–28, 2013. <https://dx.doi.org/10.3109/07388551.2013.795516>

CURÁ, J. A.; JANSSON, P. –E.; KRISMAN, C. R. Amylose is not strictly linear. **Starch**, v. 47, n. 6, p. 207–209, 1995. <https://doi.org/10.1002/star.19950470602>

DAI, Z. Co-immobilization of Thermostable Alpha-amylase and Glucoamylase for Starch Hydrolysis. 240p, 2011. **Dissertation** The Ohio University, Graduate Program in Food, Agricultural and Biological Engineering, Ohio, 2011.

DAOUD, F. B.; KADDOURI, S.; SADOON, T. Immobilization of *Aspergillus Niger* cellulase on ionic exchange isotherma and kinetic studies. **Journal de La Société Algérienne de Chimie**, v. 19, n.2, p.123–138, 2009.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotech**, v. 3, n.1, p. 1–9, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

DE CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 1, n. 4, p. 245–255, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13399-011-0023-1>

DE CASTRO, A. M.; DE ANDRÉA, T. V.; CARVALHO, D. F.; TEIXEIRA, M. M. P.; DOS REIS CASTILHO, L.; FREIRE, D. M. G. Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. **Waste and Biomass Valorization**, v. 2, n. 3, p. 291–302, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12649-011-9075-5>

DE FREITAS, A. C. Desenvolvimento de novas tecnologias para produção de xarope de glicose a partir de amido. 103p. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Rio Claro, 2012.

DE SOUSA, C. C. Síntese e imobilização em resina de troca iônica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*. 143 p., 2018. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Uberlândia, 2018.

DE SOUZA, P. M., E MAGALHÃES, P. DE O. Application of microbial α -amylase in industry - a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850–861, 2010. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822010000400004>

DE SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. DE O. e. APPLICATION OF MICROBIAL - AMYLASE IN INDUSTRY – A REVIEW. . **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.850–861, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>

DEMIREL, D.; ÖZDURAL, A. R.; MUTLU, M. Preparation and characterization of magnetic Duolite–polystyrene composite particles for enzyme immobilization. **Journal of Food Engineering**, v. 62, n. 3, p. 203–208, 2004.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. D. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n.3, p. 945-954, 2009.

DHITAL, S.; SHRESTHA, A. K.; GIDLEY, M. J. Relationship between granule size and in vitro digestibility of maize and potato starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n.2, p. 480–488, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.018>

EL-GHAFFAR, MA; HASHEM, M. S. Immobilization of α -amylase onto chitosan and its amino acid condensation adducts. **Journal of applied polymer science**, v. 112, n. 2, p. 805–814, 2009. <https://doi.org/10.1002/app.29292>

ELLIS, R. P.; COCHRANE, M. P.; DALE, M. F. B.; DUFFUS, C. M.; LYNN, A.; MORRISON, I. M.; PRENTICE, R. D. M.; SWANSTON, J. S.; TILLER, S. A. Starch production and industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, n.3, p. 289–311, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199807\)77:3<289::AID-JSFA38>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199807)77:3<289::AID-JSFA38>3.0.CO;2-D)

EL-SAYED, A. K. A.; ABOU-DOBARA, M. I.; EL-FALLAL, A. A.; OMAR, N. F. Heterologous expression, purification, immobilization and characterization of recombinant α -amylase AmyLa from *Laceyella* sp. DS3. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.132, p. 1274–1281, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.010>

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065-2082, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Áustria: Springer, 2004.

FALLEIROS, L. N. S. S. Imobilização e Estabilização de β -galactosidase por ligações multipontuais em Duolite A-568. 98 p., 2012. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Uberlândia, 2012.

FERRARI, M.; MAZZOLI, R.; MORALES, S.; FEDI, M.; LICCIOLI, L.; PICCIRILLO, A.; CAVALERI T.; OLIVAS, C.; GALLO, P.; BORLA, M.; CARDINALI, M.; PESSIONE, E. Enzymatic laundry for old clothes: immobilized alpha-amylase from *Bacillus* sp. for the biocleaning of an ancient Coptic tunic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 7041–7052, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8437-8>

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. DA S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 26, 226–232, 2014.

GALKIN, J.; KAILIUVIENE, J.; GALKINA, A.; MAZONIENE, E.; LIESIENE, J. Influence of surface-active compounds on starch dispersion in water. Part I. Starch Pasting. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 35, n. 12, p. 1643–1655, 2014. <https://doi.org/10.1080/01932691.2013.879832>

GALVÃO, C. M. A. Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimiotripsina imobilizadas em diferentes suportes. 192p., 2004. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, São Carlos, 2004.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011. <https://dx.doi.org/10.1002/adsc.201100534>

GEOR MALAR, C.; SEENUVASAN, M.; KUMAR, K. S.; KUMAR, A.; PARTHIBAN, R. Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect. **Biochemical Engineering Journal**, v. 158, 107574, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107574>

GIRELLI, A.M.; ASTOLFI, M.L.; SCUTO, F.R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, 125368, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>.

GONÇALVES C.; JASSO, R. M. R.; GOMES N.; TEIXEIRA J. A.; BELO I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 2046–2048, 2010. <https://doi.org/10.1039/C0AY00525H>

GRIFFIN, G. J. L. Starch polymer blends. **Polymer Degradation and Stability**, v.45, n.2, p. 241–247, 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0141-3910(94)90141-4)

GUIDINI, C. Z. Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica. 199 p., 2009. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Uberlândia, 2009.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v.52, n. 2–3, p. 137–143, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.013>

GUO, H.; TANG, Y.; YU, Y.; XUE, L.; QIAN, J. Q. Covalent immobilization of α -amylase on magnetic particles as catalyst for hydrolysis of high-amylase starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 537–544, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.080>

GUO, L. In vitro amylase hydrolysis of amylopectins from cereal starches based on molecular structure of amylopectins. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 238–247, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.039>

GUO, P.; LI, Y.; AN, J.; SHEN, S.; DOU, H. Study on structure-function of starch by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiple detectors: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 226, 115330, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115330>

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)

GUZMÁN – MALDONADO H.; PAREDES - LÓPEZ, O.; BILIADERIS; C. G. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 5, p. 373-403, 1995. <https://doi.org/10.1080/10408399509527706>

HAN, W.; ZHANG, B.; LI, J.; ZHAO, S.; NIU, M.; JIA, C.; XIONG, S. Understanding the fine structure of intermediate materials of maize starches. **Food Chemistry**, v. 233, p. 450–456, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.155>

HETTIARACHCHY, N. S.; FELIZ, D. J.; EDWARDS, J. S.; HORAX, R. **The use of immobilized enzymes to improve functionality.** *Proteins in Food Processing: Second Edition*, p. 569-597, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X>

HSIEH, C. F., LIU, W., WHALEY, J. K., & SHI, Y. C. Structure and functional properties of waxy starches. *Food Hydrocolloids*, v. 94, p. 238–254, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.026>

HUI, Y. H. **Handbook of food science technology and engineering.** Boca Raton: CRC Press, v.1, 2006.

IŞIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I.; YAĞCI, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. *European Polymer Journal*, v. 39, n. 12, p. 2375–2381, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(03\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(03)00184-8)

JÚNIOR, N. P.; BON, E. P. da S.; FERRARA, M. A. **Séries em Biotecnologia: Tecnologia de Bioprocessos.** Escola de Química, UFRJ. v. 1, Rio de Janeiro; 62 p, 2008.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v. 10, n. 1-3, p. 157–176, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00124-7)

KIRAN, S.; SINGH, A.; PRABHA, C.; KUMARI, S.; KUMARI, S. Isolation and Characterization of Thermostable Amylase Producing Bacteria from Hot Springs of Bihar, India. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, v. 7, n. 2, p. 28–34, 2018. <https://doi.org/10.18178/ijpmbs.7.2.28-34>

KLAPISZEWSKI, Ł.; ZDARTA, J.; JESIONOWSKI, T. Titania/lignin hybrid materials as a novel support for α -amylase immobilization: A comprehensive study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.162, p. 90–97, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.045>

KLEIN, M. P.; HACKENHAAR, C. R.; LORENZONI, A. S. G.; RODRIGUES, R. C.; COSTA, T. M. H.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, v.137, p. 184–190, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>

KOCHANĖ, T.; ZABARAUSKĖ, I.; KLIMKEVIČIENĖ, L.; STRAKŠYS, A.; MAČIULYTĖ, S.; NAVICKAITĖ, L.; GAILIŪNAITĖ, S.; BUDRIENĖ, S. Starch hydrolysis using maltogenase immobilized via different techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 544–552, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.131>

Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advanced**, v. 17, n. 4, p. 561-594, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00027-0)

KUMARI, S.; YADAV, B. S.; YADAV, R. B. Synthesis and modification approaches for starch nanoparticles for their emerging food industrial applications: A review. **Food Research International**, v.128, 108765, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108765>

LI, H.; GIDLEY, M. J.; DHITAL, S. High-Amylose Starches to Bridge the “Fiber Gap”: Development, Structure, and Nutritional Functionality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n.2, p. 362–379, 2019. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12416>

LI, H.; QI, Y.; ZHAO, Y.; CHI, J.; CHENG, S. Starch and its derivatives for paper coatings: A review. **Progress in Organic Coatings**, v.135, p. 213–227, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.05.015>

LI, X.; ZHANG, J.; ZHU, S.. Improved thermostable α -amylase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* by low-energy ion implantation. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n.3, p. 2181–2189, 2011. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1081>

LIN, Q.; XIAO, H.; LIU, G. Q.; LIU, Z.; LI, L.; YU, F. Production of Maltose Syrup by Enzymatic Conversion of Rice Starch. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n.1, p. 242–248, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0681-9>

LIU, D. M.; DONG, C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 464–475, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.005>

LIU, G.; GU, Z.; HONG, Y.; WEI, H.; ZHANG, C.; HUANG, S.; CHEN, Y.; LU, Y.; LI, Y. Effects of molecular interactions in debranched high amylose starch on digestibility and hydrogel properties. **Food Hydrocolloids**, v.101, 105498, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105498>

LIU, H.; XIE, F.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Thermal processing of starch-based polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n.12, p. 1348–1368, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.07.001>

LIU, Q. Starch Modifications and Applications. In: CUI, S. W (Ed.). **Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications**, CRC Press: Flórida, 2005.

LIU, Y.; YU, J.; COPELAND, L.; WANG, S.; WANG, S. Gelatinization behavior of starch: reflecting beyond the endotherm measured by differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 284, p. 53-59, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.095>

LÓPEZ-GALLEGO, F; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 70–75, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.021>

MARDANI, T.; KHIABANI, M. S.; MOKARRAM, R. R.; HAMISHEHKAR, H. Immobilization of α -amylase on chitosan-montmorillonite nanocomposite beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.120, p.354–360, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.065>

MARQUEZ, L. D. S. S. Produção de açúcar invertido pelo uso de açúcar invertido. 137 p., 2007. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Uberlândia, 2007.

MARQUEZ, L. D. S.; CABRAL, B. V.; FREITAS, F. F.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 86–92, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.10.018>

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>

MIAO, M.; JIANG, B.; JIN, Z.; BEMILLER, J. N. Microbial Starch-Converting Enzymes: Recent Insights and Perspectives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.17, n.5, p.1238–1260, 2018. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12381>

MILANI, Z. M.; JALAL, R.; GOHARSHADI, E. K. Carbodiimide for Covalent α -Amylase Immobilization onto Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Nanoscience**, v. 16, n. 5–6, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.1142/S0219581X17500156>

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>

MORAN, E. T. Starch: granule, amylose-amylopectin, feed preparation, and recovery by the fowl's gastrointestinal tract. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 28, n. 3, p. 566–586, 2019. <https://doi.org/10.3382/japr/pfy046>

MYERS, A. M.; MORELL, M. K.; JAMES, M. G.; BALL, S. G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 989–997, 2000. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.989>

NATIONAL CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY EDUCATION. <http://www.ncbe.reading.ac.uk/materials/enzymes/termamyl.html>. Acesso em fevereiro de 2019.

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

NIU, H.; ZHANG, M.; XIA, X.; LIU, Q.; KONG, B. Effect of porcine plasma protein hydrolysates on long-term retrogradation of corn starch. **Food Chemistry**, v. 239, p. 172–179, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.103>

NORMAN B.E. New Developments in Starch Syrup Technology. BIRCH G.G.; BLAKEBROUGH N.; PARKER K.J. In: (org.). **Enzymes and Food Processing**. Dordrecht: Springer, 1981, p.15-50. https://doi.org/10.1007/978-94-011-6740-6_3

NORMAN, B. E. New developments in starch syrup technology. **Enzymes and food processing**. Springer: Dordrecht, 1981.

NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N. Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium* sp: isolated from Eastern Nigerian soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 649–658, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132011000400002>

OATES, C. G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n.11, p. 375–382. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01090-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01090-X)

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, CR.; SOCCOL, VT.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, n. 2, pp. 135-152, 2000. <https://10.1042/ba19990073>

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch**, v. 62, n. 8, p. 389–420, 2010. <https://doi.org/10.1002/star.201000013>

PIKUS, S. Small-angle X-ray scattering (SAXS) studies of the structure of starch and starch products. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 13, n. 5, p. 82-86, 2005.

PIMENTA, C. D.; SILVA, M. B.; SALOMON, V. A. P.; PENTEADO, R. B.; F. M., GOMES. Aplicação das metodologias Desirability e Simplex para otimização das propriedades mecânicas em arames de aço temperados. **Production**, v.25, n. 3, p. 598–610, (2014). <https://doi.org/10.1590/0103-6513.094812>

PINTO, É. S. M.; DORN, M.; FELTES, B. C. The tale of a versatile enzyme: Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes. **Chemosphere**, v. 250, 126202, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126202>

PODREPŠEK, G., H.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Activation of cellulase cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in scCO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 154, 104629; 2019. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104629>

PRAKASH, O.; JAISWAL, N. α -Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n.8, p. 2401–2414, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8735-4>

QUEISSADA, D. d.; da silva, J. A. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, v.20, n. 2, p. 272-286, 2020. <http://dx.doi.org/10.14295/holos.v20i2.12378>

Research and Markets (Reports). 2020. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4845903/starch-derivatives-market-analysis-trends-and#pos-1>. Acesso em 25 set. de 2020.

Research and Markets. Global native starch market, production & forecast, by (Corn, Wheat, Cassava, Potato), by (Americas, Europe, Asia Pacific, ROW) by (Confectionery & Drinks, Processed Food, Corrugating & Paper Making, Feed, Pharmaceuticals & Chemicals, Non-food). Dublin, Ireland: Guinness Centre. 2017.

RIANI, J.C. Utilização de resinas de troca-iônica em efluentes de galvanoplastia. 121p., 2008. **Tese de Doutorado**, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. São Paulo, 2008. <https://doi.org/10.11606/T.3.2008.tde-30092008-151250>

RUIZ, M. I.; SANCHEZ, C. I.; TORRESA, R. G.; MOLINA, D. R. Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.12, p. 2337–2343, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001200014>

SCIPIONI, G. C.. Otimização do processo de sacarificação de amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas. 95p., 2011. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Santa Maria, 2011.

SHELDON R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>

SHELDON, R. A.; van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n.15, p. 6223–6235, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. α -Amylases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 3–24, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00001-4>

SINGH, A.; NEGI, M. S.; DUBEY, A.; KUMAR, V.; VERMA, A. K. **Methods of enzyme immobilization and its applications in food industry**. In: (org.). *Enzymes in Food Technology: Improvements and Innovations*. India: Springer, 2018, p. 103–124. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_6

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 79, p. 179–211, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>

SISO, M. I. G.; GRABER, M.; CONDORET, J. -S.; COMBES, D. Effect of diffusional resistances on the action pattern of immobilized alpha-amylase. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.48, n.2, p. 185–200, 1990. <https://doi.org/10.1002/jctb.280480208>

SNEHA, H. P.; BEULAH, K. C.; MURTHY, P. S. **Enzyme immobilization methods and applications in the food industry**. In: (org.). *Enzymes in Food Biotechnology*. India: Academic Press, 2019, p. 645–658. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00037-2>

SOUSA, L. C. F. Hidrólise enzimática do resíduo da fabricação de pamonha. 77p., 2019. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Patos de Minas, 2019.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. **Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte**, p. 529 -568. In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

SUN, H.; GE, X.; WANG, L.; ZHAO, P.; PENG, M. Microbial production of raw starch digesting enzymes. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.9, p. 1734–1739, 2009.

SWARNALATHA, V.; ESTHER, R. A.; DHAMODHARAN, R. Immobilization of α -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 96, p. 6–13, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.05.022>

SWINKELS, J. J. M. Composition and properties of commercial native starches. **Starch**, v. 37, n. 1, p. 1-5, 1985. <https://doi.org/10.1002/star.19850370102>

TABASUM, S.; YOUNAS, M.; ZAEEM, M. A.; MAJEED, I.; MAJEED, M.; NOREEN, A.; NAEEMIQBAL, M; ZIA, K. M. A review on blending of corn starch with natural and synthetic polymers, and inorganic nanoparticles with mathematical modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 969–996, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.092>

TAFARELLO, L. A. B. Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações alfa-amilase termo-estável produzida por bactérias. 183p. **Dissertação de Mestrado**, UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2004.

TAO, Y.; YAN, B.; FAN, D.; ZHANG, N.; MA, S.; WANG, L.; WU, Y.; WANG, M.; ZHAO, J.; ZHANG, H. Structural changes of starch subjected to microwave heating: A review from the perspective of dielectric properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 593-607, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.020>

TAVALLAIE, S.; KHOMEIRI, M.; MOUSIVAND, M.; MAGHSOUDLOU, Y.; HASHEMI, M. Starches from different sources hydrolysis using a new thermo-tolerant amylase complex produced by *Bacillus subtilis* T41a: Characterization and efficiency evaluation. **Lwt**, v.112, 108218, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.116>

TESTER, R. F.; QI, X.; KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. **Animal Feed Science and Technology**, v. 130, n.1-2, p. 39–54, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.01.016>

THIRUMDAS, R.; KADAM, D.; ANNAPURE, U. S. Cold plasma: an alternative technology for the starch modification. **Food Biophysics**, v.12, n. 1, p. 129–139, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9468-5>

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, vol 42, n.07 p.1327-1332, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000043>

TUFVESSON, P.; FU, W.; JENSEN, J. S.; WOODLEY, J. M. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 3–11, 2010. <https://10.1016/j.fbp.2010.01.003>

UTHUMPORN, U.; ZAIDUL, I. S.; KARIM, A. A. Hydrolysis of granular starch at subgelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n.1, p. 47–54, 2010. <https://10.1016/j.fbp.2009.10.001>

VAMADEVAN, V.; BERTOFT, E. Observations on the impact of amylopectin and amylose structure on the swelling of starch granules. **Food Hydrocolloids**, v.103, 105663, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105663>

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, n.2, p. 137–155, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2)>.

VAN SOEST, J. J. G.; BORGER, D. B. Structure and properties of compression-molded thermoplastic starch materials from normal and high-amylose maize starches. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 64, n. 4, p. 631–644, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970425\)64:4<631::AID-APP2>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970425)64:4<631::AID-APP2>3.0.CO;2-O)

VARAVINIT, S.; CHAOKASEM, N.; SHOBSNGOB, S. Immobilization of a thermostable alpha-amylase. **ScienceAsia**, v. 28, n. 3, p. 247 – 251, 2002. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.247>

VIEIRA, C. D. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. 96p. 2009. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em, São Carlos, 2009.

VIHINEN, M.; MANTSILA, P. Microbial amylolytic enzyme. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 24, n. 4, p. 329-418, 1989. <https://doi.org/10.3109/10409238909082556>

WANG, M.; HUA, X.; YANG, R.; SHEN, Q. Immobilization of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on commercial resin Duolite A568. **Food Bioscience**, v. 14, p. 47–53, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.03.001>

WANG, M.; HUA, X.; YANG, R.; SHEN, Q. Immobilization of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on commercial resin Duolite A568. **Food Bioscience**, v.14, p. 47–53, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.03.001>

WANG, Y.-J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J. Amylopectin and intermediate materials in starches from mutant genotypes of the Oh43 inbred line. **Cereal Chemistry**; v. 70, p. 521–525, 1993.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 748–753.2009 <https://doi.org/10.1590/s0101-20612009000400008>

WU, T. Y.; CHANG, C. R.; CHANG, T. J.; CHANG, Y. J.; LIEW, Y.; CHAU, C. F. Changes in physicochemical properties of corn starch upon modifications by atmospheric pressure plasma jet. **Food Chemistry**, v. 283, p. 46–51, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.043>

XU, D.-Y.; YANG, Z. Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater. **Chemosphere**, v. 92, n. 4, p. 391–398, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.076>

XU, Q.-S., YAN, Y.-S., FENG, J.-X. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*.

Biotechnology for biofuels, v. 9, n.1, p. 216, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0636-5>

YANG, Z.; SWEDLUND, P.; HEMAR, Y.; MO, G.; WEI, Y.; LI, Z.; WU, Z. Effect of high hydrostatic pressure on the supramolecular structure of corn starch with different amylose contents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.85, p.604–614, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.018>

YAZGAN, I.; TURNER, E. G.; CRONMILLER, L. E.; TEPE, M.; OZTURK, T. K.; ELIBOL, M. Modification of chitosan-bead support materials with l-lysine and l-asparagine for A-amylase immobilization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 3, 423–434, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1876-x>

YAZID, N. S. M.; ABDULLAH, N.; MUHAMMAD, N.; MATIAS-PERALTA, H. M. Application of Starch and Starch-Based Products in Food Industry. **Journal of Science and Technology**, v. 10, n. 2, p.144-174, 2018. <https://doi.org/10.30880/jst.2018.10.02.023>

ZHANG, B., XIE, F., WANG, D. K., ZHAO, S., NIU, M., QIAO, D.; XIONG, S.; JIANG, F.; ZHU, J.; YU, L. An improved approach for evaluating the semicrystalline lamellae of starch granules by synchrotron SAXS. **Carbohydrate Polymers**, v. 158, p. 29–36., 2017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.002>

ZHANG, J. F.; SUN, X. Mechanical properties of poly (lactic acid)/starch composites compatibilized by maleic anhydride. **Biomacromolecules**, v.5, n.4, p. 1446–1451, 2004. <https://doi.org/10.1021/bm0400022>

ZHANG, Y.; LI, M.; YOU, X.; FANG, F.; LI, B. Impacts of guar and xanthan gums on pasting and gel properties of high-amylose corn starches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 1060-1068, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.231> BIOMAC 13528

ZHU, F.; CUI, R. Comparison of molecular structure of oca (*Oxalis tuberosa*), potato, and maize starches. **Food Chemistry**, v. 296, p. 116–122, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.192>

ZOBEL, H. F. Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. **Starch**, v. 40, n.2, 44–50, 1988. <https://doi.org/10.1002/star.19880400203>

APÊNDICE

A relação entre absorvância e concentração de açúcar redutor foi determinada a partir da curva padrão mostrada a seguir, feita para $\lambda = 540$ nm:

