

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Elionio Galvão Frota

**Coimobilização de amilases em matriz porosa de gelatina e alginato de
cálcio reticulados**

Passo Fundo

2018

Elionio Galvão Frota
Tecnólogo em Alimentos

**Coimobilização de amilases em matriz porosa de gelatina e alginato de
cálcio reticulados**

Dissertação de mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos na área de concentração: processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes.

Orientador: Prof. Dr. Jeferson S. Piccin
Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Colla

Passo Fundo
2018

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**Coimobilização de amilases em matriz porosa de gelatina e alginato de cálcio
reticulados**

Elaborada por

Elionio Galvão Frota

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora


**Jeferson Steffanello Piccin, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**


Luciane Maria Colla, (Coorientadora) Dra., UPF


Rogério Marcos Dallago, Dr., URI


Aline Bettmer, Dra., UPF

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

CIP – Catalogação na Publicação

F941c Frota, Elionio Galvão

Coimobilização de amilases em matriz porosa de gelatina e alginato de cálcio reticulados / Elionio Galvão Frota. – 2018.
112 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Jeferson Stefanello Piccin.

Coorientador: Luciane Maria Colla.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Alimentos - Indústria. 2. Enzimas - Aplicações industriais.
I. Piccin, Jeferson Stefanello, orientador. II. Colla, Luciane Maria, coorientador. III. Título.

CDU: 664

Aos meus pais Maria Marlene Campos Galvão e Ernesto de Aragão Frota, pilares sobre os quais construo minha vida.

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui meus profundos agradecimentos a todos aqueles que de algum modo contribuíram tanto para a construção deste projeto como na minha formação como ser humano.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jeferson Steffanello Piccin, pela orientação, estímulo e confiança;

À minha coorientadora Profa. Dra. Luciane Maria Colla pela confiança e entusiasmo.

À Dra. Ana Cláudia Freitas Margarites, pela paciência incansável em ensinar mais uma vez e mais uma vez, sem perder o ânimo;

A Tainara Paula Machado pela troca de conhecimento.

A Cíntia Guarienti pelo altruísmo e destreza;

A Janayna Monroe pela parceria em todos os momentos, longe ou perto;

À minha assistente Kátia Sartor, pela companhia e trabalho árduo;

Aos colegas do PPGCTA pela amizade e colaboração, especialmente a Cintia Tonieto Gris e Cindiele Karen Zen pelo companheirismo de todas as horas;

Aos membros do LABIO - Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável, pelo esforço em ajudar o outro e por nossas discussões acaloradas e engraçadas;

Aos funcionários da UPF que ao desenvolver um trabalho de qualidade, permitiram a realização deste trabalho.

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela formação;

À CAPES pelo auxílio financeiro que me permitiu desenvolver esse projeto.

“Joga fora todos os medos de preconceitos servis, sob os quais as mentes dos fracos se curvam. Coloca a razão firmemente no trono dela, e apela ao tribunal dela para todos os fatos, todas as opiniões. Questiona com coragem até a existência de Deus; porque, se houver um, ele deve aprovar mais o respeito à razão que o medo cego.”

Thomas Jeferson, 1787.

RESUMO

As amilases são enzimas amplamente utilizadas na indústria, correspondendo a aproximadamente 25 a 30% do mercado mundial de enzimas, sendo utilizadas em indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica e de biocombustíveis. A maior parte das enzimas utilizadas ainda é empregada em sua forma livre e estabilizada em soluções. Entretanto o uso de enzimas imobilizadas pode apresentar benefícios como a recuperação e maior estabilidade do biocatalisador. O estudo de suportes naturais de baixo custo, como a gelatina, tem sido realizado com o objetivo de baratear o processo. Os estudos de imobilização se concentraram, principalmente, na imobilização de uma única enzima. No entanto, em muitos casos uma única enzima não pode catalisar completamente as reações desejadas, sendo necessárias várias enzimas trabalhando em sequência, como no caso da sacarificação do amido. A associação de duas ou mais enzimas em sistemas imobilizados vêm sendo estudada para uso industrial, visando melhorar a eficiência catalítica, porém, poucos estudos relatam a imobilização conjunta ou coimobilização de glicoamilase e α -amilase. Assim, objetivou-se avaliar se a coimobilização das enzimas α -amilase e glicoamilase poderia trazer benefícios aos processos de hidrólise de amido. As enzimas α -amilase (Liquozyme® Supra 2.2X) e glicoamilase (AMG® 300L) foram coimobilizadas em dois suportes distintos (gelatina e gelatina/alginato de cálcio) reticulados com glutaraldeído ou Ca^{2+} , respectivamente. O impacto do glutaraldeído na atividade catalíticas das enzimas imobilizadas foi avaliado. Estudos de pH e temperatura ótimos, rendimento de imobilização, reuso e sacarificação do amido foram realizados. Os suportes foram caracterizados quanto a sua composição química por FTIR, comportamento térmico por DSC e TGA, morfologia, porosidade, grau de reticulação, resistência à compressão, solubilidade e intumescimento. Os resultados obtidos demonstraram que as duas enzimas utilizadas apresentaram comportamento similar quanto aos parâmetros de pH e temperatura ótimos, o que aponta a possibilidade de promover sua imobilização conjunta em uma mesma matriz. Após a coimobilização, em ambos os suportes, as enzimas foram estáveis em temperaturas mais altas. O suporte de gelatina reticulada com glutaraldeído conferiu às enzimas estabilidade em pH mais ácido. O aumento na concentração de glutaraldeído afetou negativamente as atividades enzimáticas. No entanto, em baixas concentrações a eficiência de imobilização foi satisfatória. Os imobilizados puderam ser reutilizados em até 8 ciclos de hidrólise consecutivos e foram mais eficientes na sacarificação do amido que as enzimas livres sob as mesmas condições. Os resultados de composição dos suportes mostraram a interação entre gelatina e alginato no suporte composto. A reticulação pôde ser detectada através da mudança nas interações na estrutura molecular polimérica. A reticulação não afetou o comportamento térmico, porém teve impacto na resistência mecânica, solubilidade e intumescimento dos suportes. Ademais ambos os suportes apresentaram morfologia porosa, porém a porosidade efetiva foi baixa, provavelmente, devido às fortes interações entre seus constituintes. A partir dos resultados, é possível inferir que a coimobilização de amilases é um procedimento profícuo pois pode permitir melhorias na eficiência catalítica em reações enzimáticas em cadeia. Pode-se ainda estabelecer o suporte reticulado com glutaraldeído como o mais indicado para uso na coimobilização. Todavia a imobilização em suporte reticulado com Ca^{2+} também apresentou características promissoras quanto à atividade catalítica, embora sua maior instabilidade estrutural seja um ponto crítico.

Palavras-chave: α -amilase, glicoamilase, imobilização, sacarificação.

ABSTRACT

Amylases are enzymes in the industry accounting for 25 to 30% of the world's enzyme market, being used in the food, beverage, pharmaceutical and biofuel industries. Most of the enzymes used are still used in their free form and stabilized in solutions, however, the use of immobilized enzymes may have benefits such as recovery and greater stability of the biocatalyst. The study of low cost natural supports, such as gelatine, has been carried out in order to make the process cheaper. Immobilization studies focused primarily on the immobilization of a single enzyme. However, in many cases a single enzyme can not completely catalyze the desired reactions and several enzymes are needed in sequence, as in the case of saccharification of the starch. The association of two or more enzymes in immobilized systems has been studied for industrial use in order to improve catalytic efficiency. However, few studies report the joint immobilization or coimmobilization of glycoamylase and α -amylase. Thus, the aim of this study was to evaluate whether the immobilization of the α -amylase and glycoamylase enzymes could bring benefits to the starch hydrolysis processes. α -amylase (Liquozyme® Supra 2.2X) and glycoamylase (AMG® 300L) enzymes were coimmobilized into two distinct supports (gelatin and gelatin/calcium alginate) cross-linked with glutaraldehyde or Ca^{2+} respectively. The impact of glutaraldehyde on the catalytic activity of the immobilized enzymes was evaluated. Optimum pH and temperature studies, immobilization yield, reuse and saccharification of starch were performed. The substrates were characterized for their chemical composition by FTIR, thermal behavior by DSC and TGA, morphology, porosity, degree of crosslinking, compressive strength, solubility and swelling. The results obtained showed that the two enzymes used showed similar behavior regarding the optimum pH and temperature parameters, which suggests the possibility of promoting their joint immobilization in the same matrix. After coimmobilization, in both substrates, the enzymes were stable in higher temperatures. Glutaraldehyde cross-linked gelatin support gave the enzymes stability at more acidic pH. The increase in glutaraldehyde concentration negatively affected the enzymatic activities. However, at low concentrations the immobilization efficiency was satisfactory. The immobilized could be reused in up to 8 consecutive hydrolysis cycles and were more efficient in the saccharification of the starch than the free enzymes under the same conditions. Supports composition showed the interaction between gelatin and alginate in the composite support. Crosslinking could be detected by changing the interactions in the polymer molecular structure. Crosslinking did not affect the thermal behavior, but had an impact on the mechanical strength, solubility and swelling of the supports. In addition, both supports presented porous morphology, but the effective porosity was low probably due to the strong interactions between their constituents. From the results it is possible to infer that the coimmobilization of amylases is a useful procedure since it can allow improvements in the catalytic efficiency in enzymatic chain reactions. Crosslinked support with glutaraldehyde may also be established as the most suitable for use in coimmobilization. However, the immobilization in crosslinked support with Ca^{2+} also presented promising characteristics regarding catalytic activity, although its greater structural instability is a critical point.

Key words: α -amylase, glycoamylase, immobilization, saccharification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Enzimas envolvidas na hidrólise do amido.....	28
Figura 2 - Classificação dos métodos de imobilização de enzimas.....	32
Figura 3 - Fluxograma com os experimentos a serem realizados na pesquisa.	41
Figura 4 - Efeito da temperatura e do pH sobre a atividades enzimática das enzimas α -amilase (a) e glicoamilase. (b)	53
Figura 5 - Efeito da reticulação com glutaraldeído sobre a atividade de α -amilase (a) e glicoamilase (b) imobilizadas por oclusão.	55
Figura 6 - Efeito da reticulação com glutaraldeído sobre a atividade de α -amilase (a) e glicoamilase (b) imobilizadas por ligação covalente.....	56
Figura 7 - Comportamento das enzimas imobilizadas frente a diferentes métodos de imobilização.....	58
Figura 8 - Temperatura e pH ótimos do coimobilizado de gelatina reticulada com glutaraldeído (GG).....	59
Figura 9 - Temperatura e pH ótimos do coimobilizado de gelatina/alginado reticulado com Ca^{2+} (GC).....	60
Figura 10 - Reuso das enzimas coimobilizadas.....	63
Figura 11 - Cinética de sacarificação das enzimas coimobilizadas.....	64
Figura 12 - Comportamento do suporte GG por FTIR.....	66
Figura 13 - Comportamento do suporte GC por FTIR	68
Figura 14 – Análise termogravimétrica (TGA) da gelatina pura (a), alginato de sódio (b), suporte de gelatina reticulado com 0,25% de glutaraldeído (c) e suporte composto de gelatina alginado reticulado com Ca^{2+}	70
Figura 15 – Análise calorimétrica diferencial (DSC) do suporte de gelatina reticulado com 0,25% de glutaraldeído (GG) em comparação com a gelatina pura (GEL)	71
Figura 16 - Análise calorimétrica diferencial (DSC) do suporte de gelatina reticulado com Ca^{2+} (GC) em comparação com a gelatina pura (GEL) e com o alginado de sódio (AGS)	72
Figura 17 - Aspectos da morfologia dos suportes GC (A-C) e GG (D-F) obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	74
Figura 18 - Resistência à compressão dos suportes GG e GC.....	78
Figura 19 - Solubilidade dos suportes GG e GC.	79
Figura 20 - Padrão de intumescimento dos suportes GG e GC.....	80

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento experimental para determinação de pH e temperatura ótimos das enzimas amilolíticas.	43
Tabela 2 - Rendimento (R) e eficiência (E) de coimobilização por diferentes métodos.....	61
Tabela 3 - Parâmetros de DSC para os suportes GG e GC.	73
Tabela 4 - Grau de reticulação dos suportes GG e GC obtidos pelo teste de ninidrina.	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	ENZIMAS	27
2.1.1	Enzimas amilolíticas	27
2.1.2	α -amilase	28
2.1.3	Glicoamilase	29
2.2	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	30
2.3	MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	31
2.3.1	Adsorção	32
2.3.2	Ligação iônica	33
2.3.3	Ligação covalente.....	33
2.3.4	Reticulação	34
2.3.5	Aprisionamento em matriz porosa.....	35
2.3.6	Encapsulação/Microencapsulação	36
2.4	SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	MATERIAL	41
3.1.1	Determinação da atividade enzimática.....	42
3.1.2	Determinação da concentração de proteínas	42
3.2	EFEITO DO pH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	43
3.3	MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	43
3.3.1	Abordagem 1: Preparo do suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído..	44
3.3.1.1	<i>Imobilização por oclusão</i>	44
3.3.1.2	<i>Imobilização por ligação covalente</i>	45
3.3.2	Abordagem 2: Preparo do suporte composto de gelatina/alginato reticulado com Ca^{2+}	45
3.4	COMPORTAMENTO DAS ENZIMAS COIMOBILIZADAS	45
3.4.1	Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas imobilizadas.....	45
3.4.2	Rendimento de imobilização.....	46
3.4.3	Aplicação em processo de sacarificação	47

3.4.4	Estudo de reuso	47
3.5	CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES	47
3.5.1	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	47
3.5.2	Análise Termogravimétrica (TGA)	48
3.5.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	48
3.5.4	Morfologia do suporte	48
3.5.5	Porosidade.....	49
3.5.6	Grau de reticulação.....	49
3.5.7	Resistência à compressão.....	50
3.5.8	Solubilidade	50
3.5.9	Intumescimento	50
3.6	ANÁLISE DOS DADOS	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	EFEITO DO pH E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS LIVRES	53
4.2	ESTUDOS DA IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS ISOLADAS	55
4.3	COMPORTAMENTO DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS	58
4.3.1	Comparação entre abordagens de imobilização	58
4.3.2	Coimobilização em gelatina reticulado por GTA: efeito do pH e da temperatura.....	59
4.3.3	Rendimento de imobilização	61
4.3.4	Reuso das enzimas imobilizadas	62
4.3.5	Aplicação em processo de sacarificação.....	64
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE	66
4.4.1	FTIR	66
4.4.2	TGA.....	69
4.4.3	DSC.....	70
4.4.4	Morfologia.....	74
4.4.5	Porosidade.....	75
4.4.6	Reticulação.....	76
4.4.7	Resistência à compressão.....	77
4.4.8	Solubilidade	78
4.4.9	Intumescimento	80
5	CONCLUSÃO	83

REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	99
ANEXO A – FICHA TÉCNICA DA A-AMILASE.....	109
ANEXO B – FICHA TÉCNICA DA GLICOAMILASE OU AMILOGLICOSIDASE	111

1 INTRODUÇÃO

A demanda global por enzimas para diferentes áreas deverá crescer em média 4,6% até 2020, alcançando US\$ 7,2 bilhões. Este mercado inclui enzimas usadas em aplicações industriais (alimentos, bebidas, produtos de limpeza, biocombustíveis, ração animal, entre outros) e aplicações especiais (pesquisa, biotecnologia, diagnósticos e biocatalisadores) (FREEDONIA GROUP, 2016). Neste contexto, os avanços obtidos na área de bioprocessos enzimáticos, como o uso combinado de várias enzimas ou mesmo enzimas de origem geneticamente modificada, têm dado maior rapidez aos processos industriais e otimizado seus rendimentos a partir da mesma quantidade de matéria-prima (MARKETS AND MARKETS, 2016).

A necessidade de carboidrases no processamento de alimentos, bem como na produção de biocombustíveis, surge como um dos principais estímulos ao mercado de enzimas. Dentre as enzimas de maior importância comercial e biotecnológica estão as amilases, uma classe de biocatalisadores tipicamente empregados na hidrólise do amido, que perfaz aproximadamente 25 a 30% do mercado mundial (DEB et al., 2013; SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

As enzimas glicoamilases e α -amilases estão entre as principais amilases envolvidas na hidrólise enzimática do amido, que comparada com a hidrólise química tem vantagens como: ser uma reação executada sob condições moderadas, apresentar um rendimento teórico elevado devido a especificidade das enzimas pelo substrato e não formar subprodutos indesejáveis (COSTA-SILVA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016). Porém, grande parte das amilases comerciais está disponível na forma livre, dispersas em uma solução de conservação. Essa forma de utilização possui alguns inconvenientes como sensibilidade a grandes variações nas condições operacionais, principalmente de temperatura e pH, vida de prateleira reduzida e inativação ao final do processo (MATEO et al., 2007), entraves que necessitam ser superados para melhorar a viabilidade econômica do seu uso.

Considerando que as enzimas são produtos de alto valor agregado, devido às dificuldades na sua produção e purificação, métodos que permitem sua ligação ou imobilização em suportes inertes têm sido propostos como meio para superar esses obstáculos econômicos. Estudos para imobilização de glicoamilase e α -amilase têm sido realizados com vistas a promover a hidrólise do amido e reciclar posteriormente os biocatalisadores (AHMED; MOSTAFA; OUIS, 2018; JADHAV; SINGHAL, 2013; JAISWAL et al., 2012a; PARK et al., 2005; XU; YAN; FENG, 2016).

A imobilização, conforme descrito por Brady e Jordaan (2009), pode alterar os pontos ótimos de pH e temperatura das enzimas promovendo maior estabilidade. A maneira como ocorrem essas alterações dependerá não somente do método de imobilização utilizado, mas também das características intrínsecas da enzima em questão, do tipo de suporte adotado, assim como da reação catalisada (BARBOSA, 2009; MATEO et al., 2007). Se devidamente concebida, a imobilização pode se tornar um meio eficaz para obter biocatalisadores com as propriedades desejadas (COSTA-SILVA et al., 2013).

Há uma grande variedade de métodos de imobilização que podem ser classificados quanto à natureza das interações em métodos onde há ligação entre a enzima e o suporte e métodos onde o biocatalisador é aprisionado no interior do suporte. As propriedades das enzimas imobilizadas são governadas pela interação entre a enzima e o suporte. Entre os suportes comumente utilizados na imobilização, a gelatina figura como um biopolímero de origem natural, servindo como matriz onde enzimas podem ser imobilizadas, tendo mostrado excelentes características para a concepção de biomateriais (CANTONE et al., 2013; FRANSSEN et al., 2013; RUEDA et al., 2016).

Sistemas imobilizados multi-enzimáticos vêm sendo estudados para uso industrial, mas poucos estudos relatam a imobilização conjunta de glicoamilase e α -amilase para hidrólise do amido, de modo que se justifica o desenvolvimento de um sistema em que ambas as enzimas estejam coimobilizadas. Neste contexto o objetivo desta dissertação foi avaliar se a imobilização das enzimas α -amilase e glicoamilase poderia trazer benefícios aos processos de hidrólise de amido. Tendo como objetivos específicos:

- a) caracterizar as enzimas livres quanto a pH e temperatura ótimos;
- b) estimar o efeito do glutaraldeído sobre a atividade das enzimas;
- c) coimobilizar α -amilase e glicoamilase em dois suportes diferente;
- d) empregar diferentes métodos para a coimobilização;
- e) determinar o rendimento de imobilização das enzimas e seu comportamento operacional;
- f) avaliar os suportes quanto a interação entre seus componentes e o impacto da reticulação sobre suas características.

Neste sentido, a linha de pesquisa “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes”, do PPGCTA/UPF, engloba a temática deste projeto, dado que o emprego de enzimas imobilizadas pode contribuir para a obtenção de produtos como maltose e xaropes de glicose, bebidas fermentadas e etanol com maior eficiência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS

Desde a antiguidade, enzimas têm sido componentes chave em muitas atividades humanas, especialmente no processamento de alimentos, bem antes de sua natureza ou função serem conhecidas. Desde então, seu papel nos processos biológicos tem sido extensivamente estudado, a fim de estender sua utilização em condições controladas (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

As enzimas são catalisadores biológicos responsáveis por reduzir a energia de ativação das reações biológicas, acelerando-as sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (SANTOS, 2014; GÜRSEL et al., 2003; UYGUN et al., 2015).

Em geral, a utilização de enzimas proporciona vias sintéticas que geram menos resíduos e que são mais eficientes do que a síntese orgânica convencional. As enzimas são específicas, tanto para as reações que catalisam, como para a interação com os substratos. Na maioria das vezes, uma enzima catalisa apenas uma reação química, ou um conjunto de reações intimamente relacionadas (SANTOS, 2014; GÜRSEL et al., 2003; UYGUN et al., 2015). Mas, apesar de suas propriedades, as aplicações de enzimas para fins industriais são restritas devido à sua baixa estabilidade e impossibilidade de reutilização (GÜRSEL et al., 2003; SANTOS, 2014; UYGUN et al., 2015).

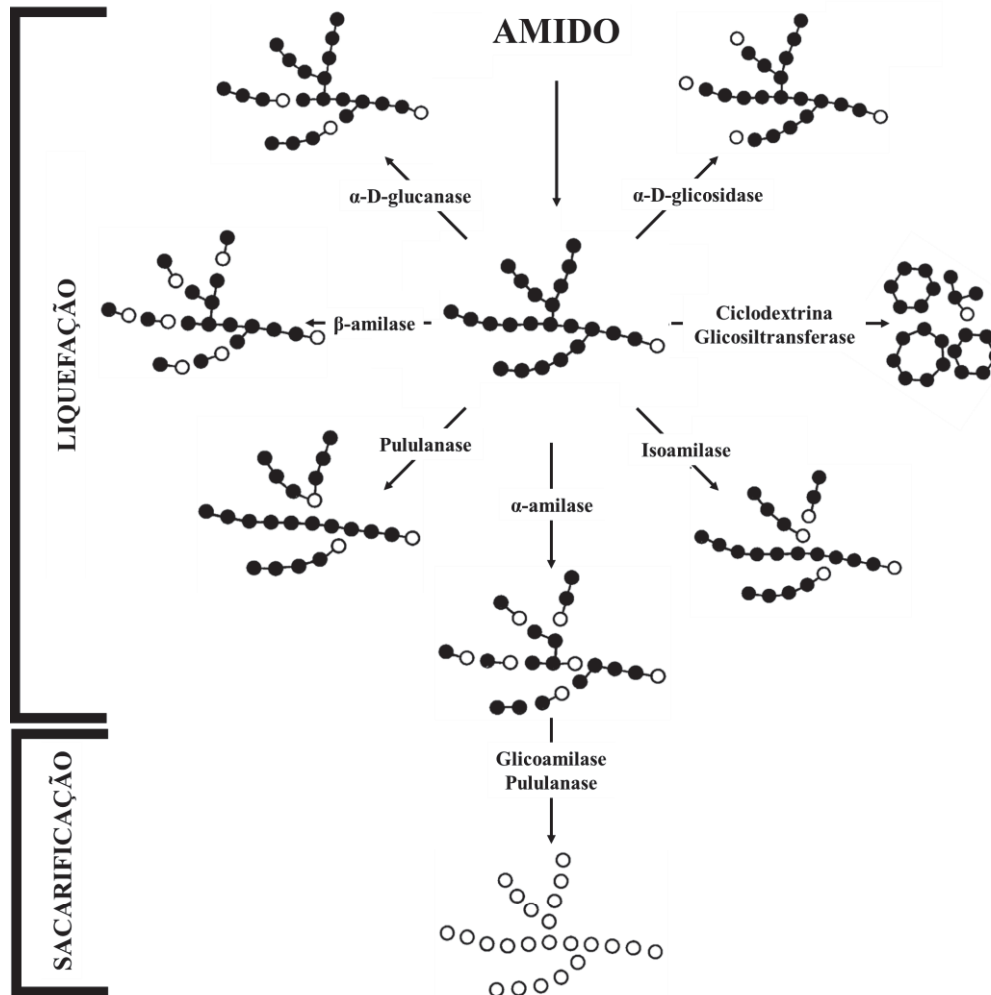
2.1.1 Enzimas amilolíticas

As amilases são produzidas por uma vasta gama de organismos, tais como bactérias, fungos, plantas e animais, de modo que cada fonte produz enzimas diferentes quanto a parâmetros como pH, temperatura ótima, bem como necessidade de íons metálicos que estabilizam sua estrutura (SHARMA; SHARMA; MAJUMDAR, 2014).

O amido é o principal substrato das amilases, sendo necessária uma combinação de enzimas para realizar a hidrólise de sua estrutura (HII et al., 2012). O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação (Figura 1), existindo, basicamente, quatro grupos de amilases que atuam nesse processo de conversão: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases. Apesar disso, α -amilase e glicoamilase são mais frequentemente utilizadas na produção de xaropes de glicose,

maltodextrinas, glicose cristalina (dextrose) e a maltose (TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012; VENGADARAMANA A., 2013).

Figura 1 - Enzimas envolvidas na hidrólise do amido.



Fonte: (DAI, ZIFEI, 2011; SHARMA; SHARMA; MAJUMDAR, 2014; TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012; VAIDYA et al., 2015)

2.1.2 α-amilase

A α-amilase (EC 3.2.1.1) também conhecida como 1,4-α-D-glicano-hidrolase é uma endoenzima responsável, em especial, por reduzir rapidamente a massa molecular média de polímeros de amido por meio da hidrólise das ligações α-1→4. Ela é o membro representativo da família GH 13 das glicosidases, sendo que várias delas são usadas no processamento de amidos. São metaloenzimas de cálcio, isto é, são inativas na ausência de íons Ca^{2+} que está fortemente ligado e serve para estender a estabilidade da enzima ao pH para valores entre 6 e 10. Elas atuam aleatoriamente ao longo da cadeia de amido liberando dextrinas, maltose e

maltotriose, entre outros (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012; VAIDYA et al., 2015).

Essa família é caracterizada por ter pelo menos três domínios separados dentro da proteína, um para catálise, outro para servir de sítio de ligação para amido granular e o terceiro para fornecer ligação para o cálcio e ligar os outros dois domínios. A sua massa molecular varia no intervalo de 50 a 70 kDa (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Existem diversas fontes de α -amilases: bactérias, fungos, plantas e animais, embora a maioria seja microbiana. Os produtos finais típicos da ação das α -amilases são α -dextrinas-limite ramificadas e malto-oligossacarídeos de 2 a 12 unidades de glicose, predominantemente na parte superior desse intervalo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Entre as várias enzimas extracelulares a α -amilase ocupa o primeiro lugar em termos de usos comerciais. Além de seu uso na sacarificação de amido, elas também encontram aplicações em panificação, fabricação de cerveja, detergente, indústria têxtil e de papel (VENGADARAMANA, 2013).

A estabilidade térmica assim como o pH das α -amilases é muito dependente da origem. Entre as amilases microbianas, os parâmetros ótimos geralmente são encontrados em intervalos de pH entre 4 e 7 e temperatura entre 30 °C e 130 °C (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

2.1.3 Glicoamilase

A glicoamilase (1,4- α -D-glicano glicano-hidrolase, EC 3.2.1.3), também conhecida trivialmente como amiloglicosidase, é uma exoenzima membro da família de GH 15 das glicosidases, que hidrolisa unidades de glicose a partir da extremidade não redutora de fragmentos lineares de amido. Embora a glicoamilase seja seletiva para ligações α -1 \rightarrow 4 glicosídicas, ela pode agir lentamente sobre as ligações α -1 \rightarrow 6 da amilopectina. (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; VAIDYA et al., 2015). Assim, o produto exclusivo da digestão exaustiva da glicoamilase é a glicose.

A ação da amiloglicosidase é lenta no ataque inicial à amilose, pois, sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012). Ela tem propriedades estruturais e mecanismo similares aos da α -amilase e algumas glicoamilases podem agir sobre amido nativo (cru) granular.

As fontes primárias de glicoamilases são bactérias e fungos; elas apresentam massa molecular no intervalo de 37 a 112 kDa, e podem existir sob múltiplas isoformas, não têm

cofatores e exibem pHs ótimos no intervalo de 3,5 e 6,0 e temperaturas entre 40 e 70°C. Estas glicosidases são relativamente lentas em relação a outras enzimas envolvidas na transformação de amido, sendo que os esquemas de processamento têm evoluído no sentido de acomodar essa propriedade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Glicoamilases têm diversas aplicações na indústria de alimentos e têm sido intensamente utilizadas para a preparação de adoçantes, produção de xaropes de glicose e álcool. Tradicionalmente, os processos enzimáticos industriais usam enzimas solúveis incubadas com soluções de substrato, sendo que no final do processo, seja devido às condições operacionais, seja pela saturação dos sítios catalíticos, estas enzimas são inativadas. De modo que uma medida que pode ser economicamente muito viável seria se essas enzimas pudessem ser reutilizadas (UYGUN et al., 2015)

2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O termo enzima imobilizada refere-se a um conjunto de técnicas que vêm sendo aplicadas com o intuito de aprimorar o uso de diversas enzimas em larga escala. Neste caso, a enzima pode ser física ou quimicamente confinada a uma estrutura sólida, com retenção de sua atividade catalítica podendo ser usada repetidamente e de forma contínua (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Além disso, a ligação de uma enzima a um suporte sólido (material inerte, orgânico ou inorgânico e insolúvel), pode aumentar a sua resistência a várias alterações ambientais tais como pH e temperatura (HOMAEI, 2015).

A primeira observação científica que levou ao uso de enzimas imobilizadas foi feita por Nelson e Griffin (1916) que demonstraram a viabilidade de adsorver a invertase (β -D-frutofuranosidase) em carvão ativado, sem perda apreciável da atividade enzimática inicial. Contudo, foi a partir dos anos 1950 e 1960 que as pesquisas se intensificaram no sentido de estabelecer métodos eficientes para ligar enzimas, quer por meios físicos, quer químicos, a suportes inertes insolúveis (LIMA et al., 2005).

O primeiro uso industrial de enzimas imobilizadas foi relatado em 1966 por Chibata e colaboradores, que imobilizaram a aminoacilase de *Aspergillus oryzae* para a síntese de aminoácidos racêmicos D-L (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). A partir de então, várias enzimas foram imobilizadas de diferentes formas e muitos artigos e patentes têm sido publicadas sobre técnicas de imobilização.

Existem várias razões para a utilização de uma enzima imobilizada. Em muitos casos, enzimas imobilizadas demonstraram ser altamente eficientes para usos comerciais, oferecendo

condições vantajosas como maior estabilidade, facilidade no isolamento do produto da reação, reúso da enzima, estabilidade térmica melhorada em condições de armazenamento e de processo, uso em processo contínuo e conveniência econômica (DAI, 2011; HOMAEI, 2015).

A tecnologia de imobilização de enzimas envolve basicamente a escolha de um suporte e do método de imobilização nesse suporte, que resulte em um preparado imobilizado ativo e estável. Dispõe-se de várias técnicas de imobilização de enzimas, assim como de um grande número de matrizes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos (DA RÓS et al., 2010; PAULA et al., 2008).

A escolha do suporte é um fator importante que influencia a reação enzimática uma vez que estudos comparativos indicaram que a mesma molécula pode apresentar diferentes propriedades catalíticas após imobilização em diferentes suportes e a maioria dos estudos relata mudanças nas propriedades das enzimas quando imobilizadas (DA RÓS et al., 2010; PAULA et al., 2008). Até agora, vários suportes e metodologias foram utilizados para imobilização de enzimas, a fim de melhorar as propriedades das enzimas livres (HOMAEI et al., 2016). As mais recentes tecnologias requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais. Materiais híbridos têm sido preparados pela combinação de componentes orgânico-inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações (PAULA et al., 2008).

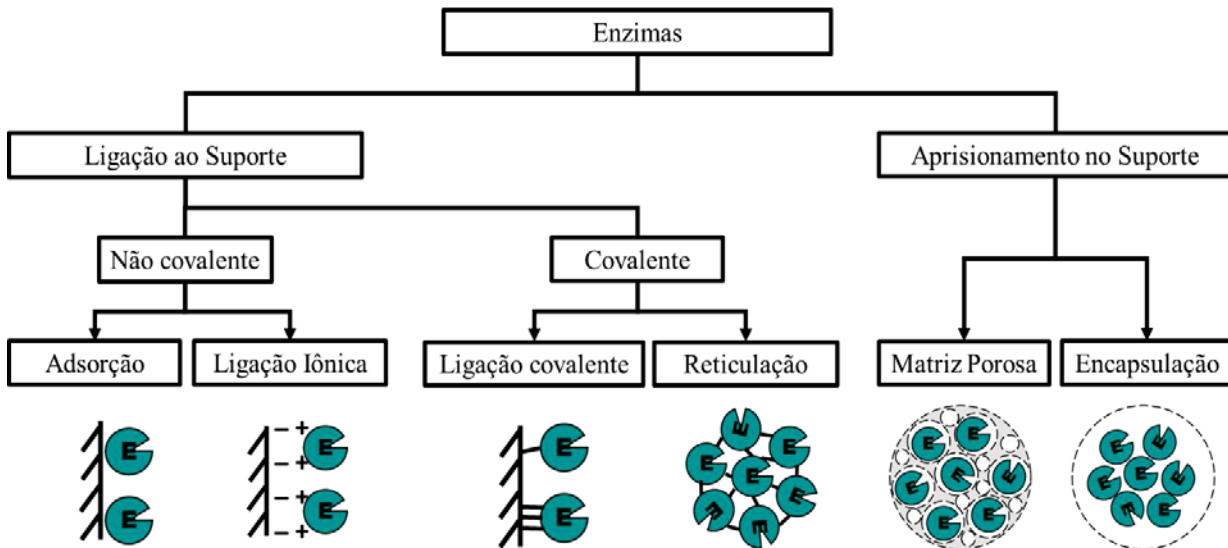
2.3 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Existem diversas classificações possíveis para os métodos de imobilização de enzimas. Para cada uma das diferentes abordagens há vantagens e desvantagens a serem consideradas, dado que no processo de imobilização a interação da enzima com o suporte geralmente implica na alteração de parâmetros relacionados à reação por ela catalisada. O caráter e a intensidade dessas mudanças não dependerá somente do método de imobilização utilizado mas também das características intrínsecas da enzima em questão, do tipo de suporte adotado, assim como da reação catalisada (BARBOSA, 2009).

As enzimas podem ser imobilizadas no suporte por meio de interações físicas (adsorção), ligações químicas (ligações covalentes, reticulação) ou retenção física (aprisionamento). Os métodos de imobilização são muitas vezes classificados, com base na natureza dessas interações, em dois grupos, denominados: métodos onde há ligação da enzima

ao suporte e métodos onde o biocatalisador é aprisionado no interior da matriz de suporte, Figura 2.

Figura 2 - Classificação dos métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: adaptado de Homaei et al. (2016); Santos, (2014).

2.3.1 Adsorção

A adsorção é o método mais simples, barato e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte, como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas) e ligações de hidrogênio (MENDES et al., 2011). A imobilização por adsorção geralmente preserva a atividade catalítica da enzima (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

As principais vantagens da imobilização por adsorção são a facilidade e simplicidade do processo, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. As fracas interações não covalentes permitem que, quando a atividade enzimática decai, o suporte possa ser regenerado e recarregado com novas enzima.

A grande desvantagem dessa técnica é a lixiviação da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica, principalmente em solventes aquosos (BRADY; JORDAAN, 2009). O método é simples e reversível, mas, em geral é difícil encontrar condições em que a enzima permanece tanto fortemente ligada, quanto totalmente ativa. Esse método é particularmente importante para a imobilização de enzimas lábeis para aplicações em sistemas biocatalíticos (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

Após a adsorção, o sistema de enzima imobilizada precisa ser lavado extensivamente porque a adsorção tende a ser não específica. Pode haver, também, problemas com sobrecarga, que podem reduzir a atividade da enzima em função do impedimento estérico entre dois sítios catalíticos sobre o suporte. De maneira geral o suporte adequado deve ter alta afinidade e capacidade de ligação com a enzima com pouco efeito sobre sua atividade catalítica (DAI, 2011).

2.3.2 Ligação iônica

A ligação iônica envolve a interação entre a enzima e o material de suporte por meio de pontes salinas. Isso acontece quando o suporte, ativado ou não, apresenta cargas iônicas que interajam com a enzima. Embora essas interações sejam mais fortes do que as forças de Van de Waals, o complexo enzima-suporte formado é reversível, permitindo a reutilização do suporte quando houver declínio da atividade enzimática, através da substituição das enzimas, por alterações no pH, temperatura e na força iônica do meio reacional (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012; NISHA S; ARUN KARTHICK S; GOBI N, 2012). A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a energia envolvida entre a enzima e o suporte, pois as ligações iônicas são mais fortes do que as forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, porém mais fracas do que a ligação covalente (ROCHA et al., 2006).

2.3.3 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima (MENDES et al., 2011). A ligação covalente é normalmente formada entre grupos funcionais na matriz de suporte e a superfície da enzima que contém os resíduos de aminoácidos. Esta ligação envolve a ativação de grupos eletrofílicos sobre o material de suporte, de modo que estes reajam com os fortes grupos nucleófilos das proteínas (NISHA; ARUN; GOBI, 2012). O grupo ϵ -amino da lisina é tipicamente utilizado como o ponto de ligação covalente, devido à presença frequente desse aminoácido na superfície da proteína, alta reatividade e boa estabilidade da ligação. Outras cadeias laterais dos aminoácidos aspártico e ácido glutâmico (grupo carboxílico) também estão envolvidas (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Grupos epóxi são tipicamente usados no suporte de ligação uma vez que são relativamente estáveis e podem ligar-se à lisina em condições brandas (BRANDY; JORDAAN, 2009).

A ligação entre a enzima e o material de suporte pode ser feita por dois diferentes mecanismos de ligação: unipontual e multipontual.

Na ligação unipontual, a enzima fixa-se ao suporte por meio de uma única ligação ou braço espaçador. Possui a vantagem de manter sua configuração e proporcionar maior grau de mobilidade, enquanto que na ligação multipontual diversos braços espaçadores ligam a enzima ao suporte, o que confere maior estabilidade, mas reduz a mobilidade da enzima e pode favorecer sua inativação (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012).

A ligação covalente é forte e estável, mas possui a desvantagem de ser irreversível, o que significa que uma vez que o biocatalisador é ligado ao suporte, ele não pode ser separado sem destruir a atividade biológica da enzima (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). O melhor suporte para imobilização deve conter braços espaçadores curtos e uma elevada densidade de grupos reativos (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e a sua geometria para reduzir a formação de complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Suas principais vantagens são a natureza estável das ligações formadas entre a enzima e o suporte, a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura, solventes orgânicos e evitar dessorção ou lixiviação do biocatalisador (MENDES et al., 2011). No entanto, a fim de alcançar níveis elevados de atividade, os resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade catalítica não devem estar envolvidos na ligação covalente ao suporte, e este pode ser um requisito difícil de cumprir em alguns casos (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

2.3.4 Reticulação

A imobilização de enzimas sem a presença de suporte é chamada de reticulação ou cross-linking sendo realizada por meio de ligação cruzada. A ligação ocorre através da reação entre o grupamento amino da superfície da enzima com um reagente bifuncional, tais como glutaraldeído, em que enzimas se ligam umas às outras, sem recorrer a outro tipo de suporte (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012). Algumas técnicas de imobilização por reticulação que vêm sendo desenvolvidas são cristais de enzimas reticuladas (CLECs), agregados de enzimas reticuladas (CLEAs) e *Spheryzymes* (esferas de enzimas).

Os cristais de enzima reticulada (CLECs) exibem excelente atividade e estabilidade operacional, mas possuem desvantagens de requerer elevado grau de pureza das enzimas para que ocorra a cristalização e apenas pode ser obtido a partir de enzimas cristalizáveis. A formação de agregados de enzimas reticulados (CLEAs) envolve a precipitação da enzima, combinando purificação e imobilização em uma única operação. As enzimas precipitadas formam agregados pela adição de sais, solventes orgânicos, polímeros não iônicos ou ácidos. Outra variação do método de reticulação são as *Spherezymes* (ENS), uma abordagem inovadora que consiste em macropartículas compostas de enzimas reticuladas em uma emulsão de óleo, gerando partículas esféricas (BRANDY; JORDAAN, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012).

2.3.5 Aprisionamento em matriz porosa

O método de aprisionamento é baseado na oclusão da enzima dentro de uma rede polimérica que permite que o substrato e os produtos passem através do suporte ou matriz, mantendo, porém, a enzima presa em seu interior (NISHA; ARUN; GOBI, 2012). Este método diferencia-se dos demais métodos de imobilização pelo fato de que a enzima não está ligada à matriz por qualquer interação física ou química, mas somente retida em seu interior. A porosidade da matriz de gel ou membrana é controlada para evitar a fuga de enzima e para permitir a passagem dos substratos e produtos livremente. Existem diversas abordagens para imobilização por esse método, tais como aprisionamento em gel, fibras, membranas e encapsulação (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; DAI, 2011).

As vantagens do aprisionamento na imobilização de enzimas são a oclusão física, que pode minimizar os efeitos da imobilização sobre a atividade da enzima, rapidez, condições brandas de processo, proteção da enzima contra a lixiviação e possibilidade de imobilização usando a combinação de duas ou mais enzimas. A desvantagem principal é a limitação de transferência de massa através das membranas ou géis (NISHA; ARUN; GOBI, 2012). Os métodos de imobilização de enzimas por aprisionamento são relativamente fáceis e as enzimas são aprisionadas em um microambiente que pode protegê-las de condições adversas no ambiente externo. Além disso, a permeabilidade da matriz de gel ou membrana pode ser concebida para satisfazer diferentes finalidades (DAI, 2011).

2.3.6 Encapsulação/Microencapsulação

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos.

As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato com a enzima no interior de um volume relativamente pequeno e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização, a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e os possíveis efeitos de difusão de substratos com massa molecular elevada e/ou produtos no interior da matriz porosa (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; MENDES et al., 2011).

2.4 SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As propriedades das enzimas imobilizadas são governadas pela interação entre a enzima e o suporte ou matriz que origina um imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas.

O suporte deve ter as seguintes propriedades: ter ampla área de superfície e alta permeabilidade; grupos funcionais que interajam com a enzima em condições não desnaturantes; carácter hidrofílico; insolubilidade em água; estabilidade química, térmica e resistência física mecânica; resistência ao ataque microbiano; segurança toxicológica e baixo custo (HOMAEI, 2015). Outras características físicas das matrizes tais como o diâmetro médio de partícula e porosidade são de grande importância para o desempenho dos sistemas imobilizados pois afetam criticamente a capacidade de ligação de enzimas ao suporte e ao substrato. Os suportes não-porosos apresentam poucas limitações de difusão, mas têm uma baixa capacidade de carga. Portanto, os suportes porosos são geralmente preferidos porque a elevada área superficial permite uma carga enzimática mais elevada e a enzima imobilizada fica mais protegida do ambiente (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

Minganyu et al. (2017) promoveram uma imobilização multi-enzima de 3-quinuclidinol redutase e glicose-desidrogenase em suporte poroso composto de Ni²⁺-agarose. Os biocatalisadores resultantes mostraram uma eficiência de imobilização de 92,3%. Como

consequência direta, o biocatalisador catalisou a conversão do substrato 3-quinuclidinona com > 95% de rendimento de conversão.

Os suportes podem ser classificados como inorgânicos e orgânicos, de acordo com sua composição química. Os suportes orgânicos podem ser subdivididos em polímeros naturais e sintéticos (HOMAEI, 2015), conforme a Quadro 1.

Quadro 1 - Tipos de suportes empregados em imobilização enzimática.

Suporte	Material	Vantagens	Desvantagens
Inorgânico	Sílica, Alumina, Celite, Bentonita, Vidro poroso	Maior estabilidade	Abrasivos
Orgânico natural	Celulose, Agarose, Gelatina, Quitosana, Alginato, Albumina	Boa compatibilidade com as enzimas	Fraca ligação, baixa estabilidade mecânica
Orgânico sintético	Eupergit® C, PVC, Poliacrilamida, Resina de troca iônica	Adequado ao tipo de enzima	Limitações de difusão

Fonte: adaptado de Brena; González-pombo; Batista-viera, (2013); Miletic; Nastasovic; Loos, (2012).

Uma ampla gama de materiais diferentes pode ser usada como suporte de imobilização. Os suportes inorgânicos muitas vezes são mais estáveis devido à sua maior inércia para as condições de reação, como alta pressão e temperatura. Por outro lado, podem promover a abrasão em reatores com agitação (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012). Entre os materiais mais utilizados quando se realizam imobilizações de enzimas em suportes inorgânicos estão a sílica (WU et al., 2012; (ABAHÁZI; BOROS; POPPE, 2014), silicatos, borosilicatos e aluminosilicatos, alumina (LIU et al., 2017), argila, terra de diatomáceas, cerâmica, celite, (SHARMA et al., 2015), vidros porosos, óxido de titânio e outros óxidos. Mais recentemente, algumas formas de carbono elementar (SINGH et al., 2014), silício e certos metais foram também propostos em certas aplicações (MOHAMAD et al., 2015; ZUCCA; SANJUST, 2014).

Apesar das vantagens dos suportes inorgânicos (por exemplo, elevada estabilidade contra a degradação física, química e microbiana), a maioria das aplicações industriais são realizadas com matrizes orgânicas (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Os polímeros orgânicos de fonte natural têm grande compatibilidade com as enzimas

devido à sua hidrofiliçidade, eles sofrem apenas interações fracas com a enzima, levando a uma inativação mínima, entretanto, eles também conduzem a uma ligação fraca e, por conseguinte, os materiais têm frequentemente de ser funcionalizados. A estabilidade mecânica destes materiais é bastante fraca podendo ser superada por meio de reticulação (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012). Dentre os polímeros naturais majoritariamente empregados em imobilização estão o alginato (MOGHARABI et al., 2012), gomas arábica e acácia (SWARNALATHA; ALURI ESTHER; DHAMODHARAN, 2013), quitosana (ROMDHANE et al., 2013), agarose, celulose, ágar (SHARMA; SHARMA; MAJUMDAR, 2014), gelatina (JAISWAL et al., 2012) colágeno, albumina, k-carragena (TAN; LEE, 2015) entre outros.

A gelatina é, dentre os suportes orgânicos naturais, um material biocompatível obtido a partir da hidrólise parcial do colágeno, em que a estrutura de tripla hélice é desagregada. A gelatina mostrou excelentes características para a concepção de biomateriais compatíveis como suportes de células (SAMAL et al., 2015). A agência americana Food and Drug Administration (FDA, 1979) classifica a gelatina como um excipiente seguro, não havendo evidências que demonstrem perigo no uso desse composto pelo público como alimento ou ingrediente alimentar.

A formação helicoidal das moléculas de gelatina é importante para a formação de gel. Entre os principais grupos reativos da gelatina, hidroxil, carboxil e grupos amino devem ser mencionados (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010). A imobilização enzimática neste tipo de material pode ocorrer, por exemplo, através da interação covalente da molécula de enzima com os grupos amino livres de gelatina. Em comparação com outros materiais utilizados para imobilização como ácido algínico e poliácridamida, o custo deste suporte é baixo (BEZERRA et al., 2015).

Kikani et al. (2013) por exemplo, estudaram o acoplamento covalente de α -amilase de *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 com gelatina, usando glutaraldeído como um agente de reticulação. Os autores observaram que as estabilidades térmicas e ao pH foram significativamente aumentadas após a imobilização.

Encapsulamento eficiente de β -galactosidase foi conseguido por Shen et al. (2011) com suporte composto de alginato-gelatina-fosfato que impediu o lixiviamento enzimático e proporcionar maior estabilidade mecânica. Além disso a atividade relativa da enzima imobilizada foi superior a 60% após o 20º reciclo e cerca de 90% após 30 dias de armazenamento.

Outros tipos de suporte muito usados em imobilização enzimática são os polímeros orgânicos sintéticos. Resinas acrílicas macroposas tais como Eupergit® C (Röhm, Darmstadt,

Alemanha) e Sepabeads® EC (Resindion, Milão, Itália) são muito utilizadas por serem estáveis numa vasta gama de pHs. De forma semelhante Amberlite XAD-7 e Novozym 435, têm sido empregados (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

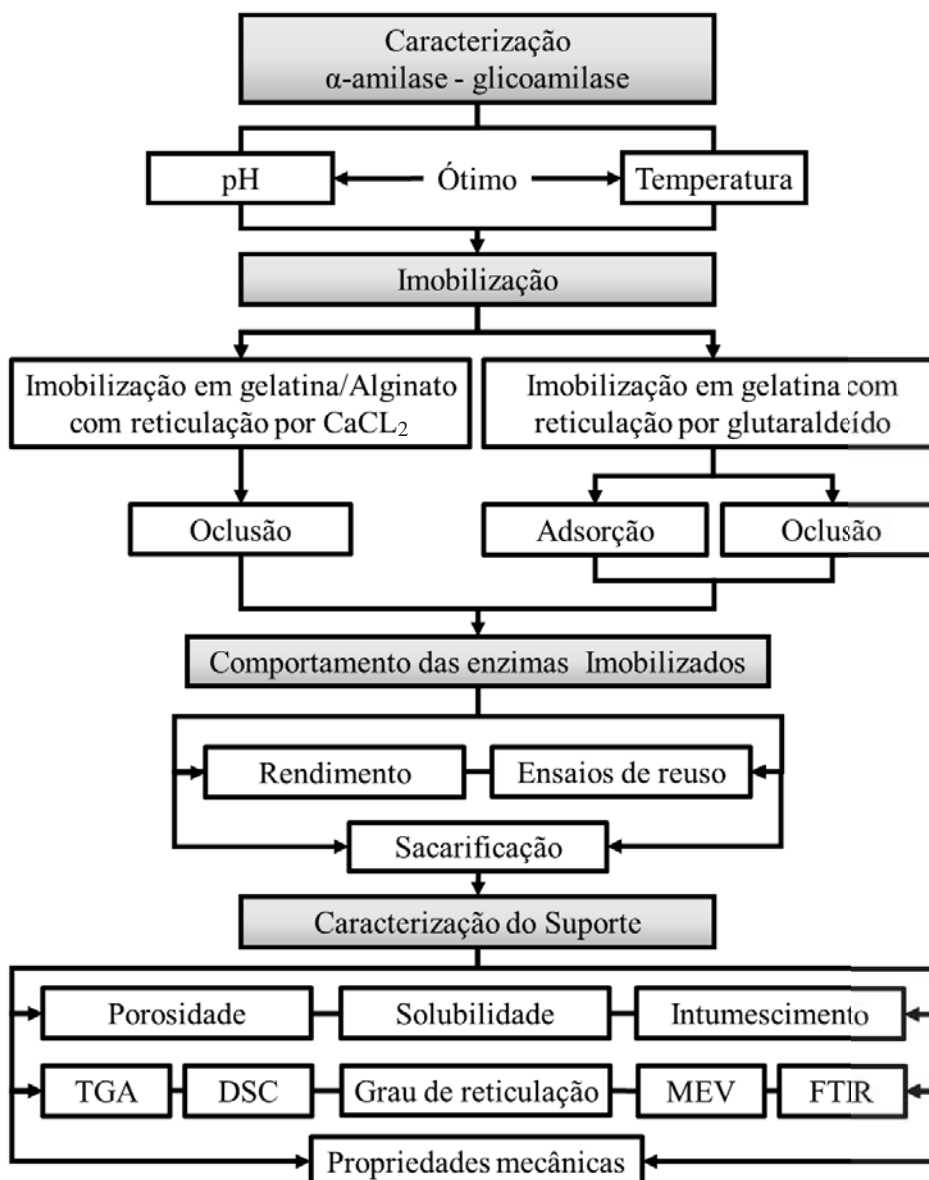
Datta et al. (2013) relatam suporte de cloreto de polivinila, poliuretano, epóxis, (LOPRESTO et al., 2015), metacrilato, poliacrilamida, polianilina (ASHLY; JOSEPH; MOHANAN, 2011), sol-gel (EVSTATIEVA et al., 2014) e resinas de troca iônica (GUPTA et al., 2013). Mais recentemente suportes nanométricos tais como microesferas de polímero (GAN et al., 2012), fibras, tubos, bem como nanopartículas magnéticas (SOHRABI; RASOULI; TORKZADEH, 2014) têm sido relatadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Para a realização da imobilização foram utilizadas as enzimas α -amilase (EC 3.2.1.1), Liquozyme® Supra 2.2X e glicoamilase (EC 3.2.1.3) AMG 300L gentilmente cedidas pela Novozymes®. Para a imobilização foi usado gelatina tipo B (índice de Bloom 220) (Biomica Ind. e Com. de Prod. Ltda.). Todos os demais reagentes utilizados no processo de imobilização e ensaios posteriores foram de pureza analítica. A Figura 3 apresenta o fluxograma geral das etapas experimentais da pesquisa.

Figura 3 - Fluxograma com os experimentos a serem realizados na pesquisa.



3.1.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada com base na quantificação de açúcares redutores liberados durante a reação de hidrólise enzimática utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como descrito por Miller (1959).

Para a determinação da atividade enzimática das enzimas livres 1 mL do extrato enzimático foi adicionado a 4 mL de solução de amido a 1% (m/v) em tampão fosfato de sódio 0,2 mol L⁻¹, em temperatura e pH desejados, por 30 minutos. Após o período de hidrólise, a reação foi paralisada com adição de 5 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹ seguida de aquecimento a 100 °C por 10 min.

Posteriormente, para determinação da concentração de açúcares redutores liberados pela hidrólise 1 mL de DNS que foi adicionado a 1 mL do hidrolisado durante 5 minutos a 100 °C, seguido por resfriamento por 10 min em banho de gelo. A alíquota foi avolumada até um total de 10 mL e a leitura realizada em 540 nm. A concentração de açúcares redutores foi quantificada com base em curva analítica de glicose anidra ($y = 0,3595x + 0,0044$, R² 0,998) a uma concentração máxima de 2 g.L⁻¹ obtida através do método de DNS

Uma unidade de atividade enzimática (1U = 1µmol.ml⁻¹.min⁻¹) foi definida como a quantidade de açúcares (estimados como glicose) liberados por mL de enzima por minuto sob condições padrão de pH e temperatura, conforme a Equação 1 (CHANDRASEKARAN, 2012):

$$U = \frac{[AR]}{MM \cdot t} \quad (1)$$

sendo, [AR] a concentração de açúcares redutores (g.L⁻¹), t o tempo de hidrólise (min) e MM a massa molecular da glicose (1,8·10⁻⁴ g.µmol⁻¹).

3.1.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais dos extratos enzimáticos foi realizada por meio do método de Lowry et al. (1951), em que 0,5 mL de amostra foi adicionado em tubo de ensaio e acrescido de 0,5 mL de solução de NaOH 1 mol.L⁻¹. A mistura foi posta a reagir em banho-maria a 100 °C durante 5 min e resfriada até temperatura ambiente. Em seguida, 2,5 mL de solução composta por carbonato de sódio 5% (m/v), sulfato de cobre II 1% (m/v) e tartarato de sódio e potássio 1% (m/v) foram adicionados.

Os tubos foram agitados em vortex e permaneceram em repouso por 10 min. Transcorrido esse tempo 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu foi adicionado, mantendo as amostras no escuro por 30 min. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 750 nm. A concentração de proteínas foi determinada com base em curva analítica de albumina ($y = 383,54x - 6,2899$, $R^2 0,9974$) a uma concentração máxima de $192 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína.

3.2 EFEITO DO pH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O pH e a temperatura ótimos das enzimas foram determinadas de acordo com sua atividade em diferentes condições conforme listado na Tabela 1. Para isso, as enzimas comerciais foram diluídas a uma razão de 1:2000 (v/v) e uma alíquota foi transferida para tubos de ensaio contendo solução 1% (m/v) de amido em solução tampão fosfato de sódio $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com diferentes valores de pH. Cada conjunto de tubos foi incubado a temperaturas variáveis durante 30 minutos. Após o período de hidrólise foi realizada a inativação enzimática e sua atividade determinada conforme descrito no item 3.1.1

Tabela 1 - Delineamento experimental para determinação de pH e temperatura ótimos das enzimas amilolíticas.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH
1	40	5,0
2	40	5,5
3	40	6,0
4	50	5,0
5	50	5,5
6	50	6,0
7	60	5,0
8	60	5,5
9	60	6,0
10	70	5,0
11	70	5,5
12	70	6,0

3.3 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

No processo de imobilização foram adotadas duas abordagens distintas: na primeira utilizou-se como suporte o polímero orgânico natural gelatina (GEL), e glutaraldeído (GTA) como agente de reticulação, sendo a imobilização realizada pelos métodos de oclusão e adsorção; já na segunda abordagem foi produzida uma mistura de gelatina e alginato de sódio (AGS), reticulado por cloreto de cálcio (CaCl_2), sendo as enzimas imobilizadas por oclusão.

Na primeira abordagem, inicialmente, foram avaliados (e comparados com os resultados da enzima livre) o efeito da concentração de agente reticulante (GTA) sobre a atividade enzimática das enzimas isoladas. Estes ensaios foram realizados nas condições otimizadas de pH e temperatura da enzima livre.

Definidas as concentrações de GTA e tempos de reticulação para a primeira abordagem iniciou-se os estudos de coimobilização. Nesta etapa, além do uso da primeira abordagem também foi incluída a segunda abordagem de imobilização, sendo que um novo estudo do efeito do pH e da temperatura foi conduzido, com o objetivo de verificar se as condições ótimas das enzimas foram alteradas.

3.3.1 Abordagem 1: Preparo do suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído

Os suportes de gelatina foram preparados de acordo com a metodologia de formação por gás descrita por Poursamar et al. (2016) com modificações em que uma solução aquosa de gelatina a 20% (m/v) foi preparada por dissolução da quantidade apropriada de gelatina em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 5,5.

A solução de gelatina foi submetida a aeração em agitador mecânico tipo turrax (Tecnal, Turratec TE-102) a 14.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente a solução aerada foi moldada, até uma altura de 5 mm, em placas de Petri previamente resfriadas que foram transferidas para um congelador ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 5 min até sua completa solidificação. As amostras solidificadas foram então removidas dos moldes e cortadas com 1,5 mm de aresta.

As variantes de cada um dos métodos usados nesta abordagem são descritas a seguir.

3.3.1.1 Imobilização por oclusão

Na imobilização por oclusão, após a aeração da solução de gelatina, 1,0 mL de extrato enzimático (sendo 0,5 mL de cada enzima α -amilase e glicoamilase - nos ensaios de coimobilização) foi adicionado à gelatina sob agitação até sua homogeneização na solução, seguindo os procedimentos de solidificação e corte da seção 3.3.1. O imobilizado obtido foi reticulado por imersão em solução de glutaraldeído nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1% em períodos de 2 h, 3 h e 4 h a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram triplamente lavadas com solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.1.2 Imobilização por ligação covalente

No método por ligação covalente, os suportes previamente preparados e cortados de acordo com o item 3.3.1. foram reticulados em soluções de GTA nas concentrações, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1% por de 2 h, 3 h e 4 h a temperatura ambiente. Decorridos os tempos de reticulação, os suportes foram triplamente lavados com solução tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹ para a remoção do reticulante residual e colocadas em contato com o suporte na proporção de 0,1 mL de enzima por g de suporte (no caso da coimobilização a relação foi de 0,5 mL.g⁻¹ de cada enzima), por um período de 1 h sob agitação moderada. Após o tempo de contato as amostras foram novamente lavadas com o intuito de remover o biocatalisador não ligado à superfície do suporte.

3.3.2 Abordagem 2: Preparo do suporte composto de gelatina/alginato reticulado com Ca²⁺

O suporte composto de gelatina e alginato (GEL/AGS) foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Mogharabi et al. (2012) com modificações. Um gel misto de gelatina, alginato e enzimas foi preparado adicionando 0,1 g de alginato de sódio a 10 mL de uma solução contendo 20% (m/v) de gelatina e 0,5 mL de cada enzima. A mistura foi homogeneizada à temperatura ambiente. Então, a mistura foi aerada em agitador mecânico tipo turrax (Tecnal, Turratec TE-102) a aproximadamente 14.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente a mistura foi gotejada em uma solução de CaCl₂ 200 mmol L⁻¹ sob agitação, e as esferas resultantes foram reticuladas durante 1 h. Após esse período, as esferas (pérolas) resultantes foram lavadas três vezes com água deionizada para remover o excesso de reticulante e depois armazenadas a 4 °C até o uso.

3.4 COMPORTAMENTO DAS ENZIMAS COIMOBILIZADAS

3.4.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas imobilizadas

O comportamento dos sistemas imobilizados frente ao pH e a temperatura foi determinado visando observar se houve incremento ou decaimento da atividade dos biocatalisadores frente ao processo de imobilização. Portanto pesou-se em balança analítica SHIMADZU modelo ATX224 uma quantidade de imobilizado equivalente à concentração de

enzimas utilizadas nos ensaios de determinação de pH e temperatura ótimos, levando em consideração o volume de enzima por grama de suporte. A determinação da atividade dos imobilizados foi determinada de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2.

3.4.2 Rendimento de imobilização

Para avaliar o processo de imobilização foram calculados o rendimento de imobilização, que indica a quantidade de enzima que foi imobilizada e a eficiência de imobilização, que indica o incremento (ou redução) na atividade enzimática da enzima imobilizada em relação à enzima livre, de acordo com as equações 2 e 3.

O rendimento de atividade foi definido como a razão entre a concentração total de enzimas imobilizadas em relação a concentração inicial de enzimas utilizada, conforme a equação 2. Para isso, foi determinada a massa de proteína no sobrenadante após a reticulação ($[P]_i$). Deste valor foi descontada a massa de proteína no sobrenadante de um processo de reticulação conduzido em a presença da enzima, denominada branco ($[P]_b$). Este processo se fez necessário pois a matriz do suporte utilizado era de origem protéica, podendo ter sido carregado ao sobrenadante proteína doriginária da gelatina. Então, este valor foi relacionado com a massa de proteína correspondente à enzima livre adicionada no processo de reticulação ($[P]_L$).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{[P]_i - [P]_b}{[P]_L} \cdot 100 \quad (2)$$

sendo, $[P]_i$ a quantidade de proteína no sobrenadante de reticulação (mg), $[P]_b$ a quantidade de proteína no sobrenadante no ensaio em branco (mg) e $[P]_L$ a quantidade de proteína adicionada na forma de enzima livre no processo de imobilização (mg).

Já eficiência de imobilização foi determinada relacionando a atividade enzimática da enzima imobilizada em relação a a atividade enzimática da enzima livre, de acordo com a equação 3. Para isso, conhecendo o rendimento de imobilização, uma massa de imobilizado contendo uma determinada quantidade de enzima foi submetido a determinação da atividade enzimática (A_I). Este valor foi relacionado com a atividade enzimática de uma mesma quantidade de enzima, entretanto, livre (A_L) (SHELDON; VAN PELT, 2013; SHUKLA; SINGH, 2016).

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{A_I}{A_L} \cdot 100 \quad (3)$$

sendo, A_L a atividade da enzima livre (U), A_I a atividade da enzima imobilizada (U).

3.4.3 Aplicação em processo de sacarificação

Os ensaios de sacarificação foram realizados em duplicata utilizando amido bruto de mandioca (*Manihot spp.*) na concentração de 100 g.L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5, temperatura de 50 °C e sob constante agitação a 100 rpm. A proporção de imobilizado utilizado durante a sacarificação foi de 10% (m/v) que corresponde a aproximadamente 1 mL do extrato enzimático livre, 0,5 mL de α -amilase e 0,5 mL de glicoamilase.

Foi avaliada a liberação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959) em intervalos de 2 h durante 24 h.

3.4.4 Estudo de reuso

Os ensaios para determinar a capacidade de reuso ou reciclo do sistema imobilizado foram realizados a partir de ciclos sucessivos de hidrólise utilizando solução de amido a 1% como substrato em pH 5,5 e temperatura de 50°C. Entre cada etapa de reciclo, as amostras de imobilizado foram removidas do meio reacional e duplamente lavadas com tampão fosfato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, para evitar variações bruscas de pH, antes de serem inseridas em um novo substrato. A atividade residual foi verificada através da determinação concentração de açúcares redutores liberada a cada ciclo de 60 min, conforme 3.2.1.

A atividade enzimática da primeira reação de hidrólise foi fixada como 100% e o tempo de meia vida considerado foi o período em que a enzima manteve pelo menos 50% da sua atividade inicial.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES

3.5.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As características da estrutura molecular dos suportes e a interação entre seus constituintes foi analisada por FTIR com um instrumento modelo Cary 630 da Agilent

Tecnologias em que as amostras foram pressionadas sobre um cristal Zn-Se e a transmitância registrada em uma faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} .

3.5.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A decomposição térmica de polímeros é normalmente verificada pelo ensaio de termogravimetria (TGA). As curvas de TGA revelam as perdas de massa em relação ao aumento de temperatura a uma temperatura e taxa controlada (MILLÁS, 2012).

Os ensaios de TGA foram realizados em um equipamento Netzsch modelo STA 449 F3 em atmosfera inerte de nitrogênio a uma razão de 20 mL/min. Amostras de 10 a 15 mg foram submetidas a temperaturas variando de 25 °C até 600 °C, utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. A variação da massa das amostras foi monitorada ao longo do aquecimento.

3.5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os dados relativos ao comportamento térmico das amostras foram coletados usando um equipamento da SHIMADZU modelo DSC-60 em atmosfera inerte de nitrogênio a uma taxa de purga de 50 mL.min⁻¹. Após a calibração do instrumento usando índio como padrão ($\Delta H_f = 28,4 \text{ J.g}^{-1}$ e $T_f = 156,6 \text{ °C}$), as amostras de imobilizados (2 a 5 mg) foram seladas hermeticamente em cadinhos de alumínio e aquecidas a uma razão de 10 °C min⁻¹ na faixa de temperatura entre 25 e 300 °C utilizando um cadinho vazio idêntico ao utilizado na amostra como referência. Os cálculos de entalpia e as temperaturas de transição foram analisados usando o software Universal Analysis da TA Instruments.

3.5.4 Morfologia do suporte

A morfologia dos suportes de imobilização foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) modelo VEGA 3 da Tescan usando uma tensão de aceleração de 5 kV. Com o MEV se analisou a homogeneidade, morfologia e o tamanho relativo dos poros. As amostras liofilizadas e fraturadas foram fixadas em *stubs* de alumínio usando fita de carbono e, em seguida, revestidas com uma fina camada de Au usando o equipamento da Quorum, modelo Q150R ES. A metalização das amostras foi realizada com o intuito de permitir a melhor condução do feixe de elétrons e melhorar o contraste nas amostras.

3.5.5 Porosidade

A porosidade das amostras foi medida por um método que relaciona as densidades dos suportes aerados e da gelatina não aerada (FRAZIER; SRUBAR, 2016; WU et al., 2010).

A densidade dos suportes foi determinada em uma amostra com volume de 1 cm³ usando a proporção de massa para volume. As massas dessas amostras foram determinadas usando balança analítica (SHIMADZU, ATX224). A partir destas informações, a porosidade de cada suporte pôde ser calculada usando a Equação 4:

$$P (\%) = \frac{V_s - V_g}{V_s} \cdot 100 = \frac{V_s - (M_s/\rho)}{V_s} \cdot 100 \quad (4)$$

sendo, V_s o volume do suporte (cm³), V_g o volume de gelatina (cm³), M_s a massa do suporte(g) e ρ a massa específica da gelatina (1,037 g/cm³)

3.5.6 Grau de reticulação

Para analisar o grau de reticulação, o teor de amina primária presente na amostras foi determinada por meio da reação com ninidrina (SARKER et al., 2014; YOU et al., 2016).

A reação de ninidrina foi realizada por incubação de 0,5 g da amostra em tubo de ensaio com 5 mL de solução de ninidrina a 2 % (m/v) a 100 °C durante 20 min e então resfriada até a temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi diluída com de etanol 50% (v/v) para 10 mL e depois medida a absorbância a 570 nm por espectroscopia UV-Vis FEMTO modelo 600S. O teor de amina primária foi calculado de acordo com a curva padrão de glicina. O grau de reticulação foi calculado por meio da Equação 5:

$$GR (\%) = \frac{NH_{2NR} - NH_{2R}}{NH_{2NR}} \cdot 100 \quad (5)$$

sendo, NH_{2NR} a concentração de grupos amino na amostra de referência não reticulada (mmol L⁻¹) e NH_{2R} a concentração de grupos amino na amostra reticulada (mmol L⁻¹).

3.5.7 Resistência à compressão

O teste de resistência à compressão uniaxial foi realizado usando um analisador de textura universal (Stable Micro Systems, TA.XT.plus) calibrado usando uma célula de carga de 2 kg. As amostras cilíndricas (25 mm de diâmetro e 5 mm de altura) hidratadas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) foram submetidas a tensão de compressão uniaxial com um probe P20 de alumínio lubrificado descendente (20 mm de diâmetro) até 80% de deformação a uma taxa constante de $0,5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, conforme metodologia adaptada de Cuadros; Erices; Aguilera, (2015).

3.5.8 Solubilidade

O grau de solubilização dos suporte foi determinado através da metodologia descrita por Wu et al. (2010) com modificações. Aproximadamente 1 g de amostra foi imerso em solução tampão fosfato pH 5,5 a 50 °C sob agitação de 100 rpm. As amostras foram retiradas do tampão em intervalos de tempo de 0, 4, 6, 12, 18 e 24 h, por filtração a vácuo, secas em estufa a 105 °C até peso constante e pesadas. A porcentagem de solubilidade foi calculada utilizando a Equação 6:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{M_0 - M_f}{M_0} \cdot 100 \quad (6)$$

sendo, M_0 a massa inicial da amostra (g) e M_f a massa final da amostra (g).

3.5.9 Intumescimento

O grau de intumescimento foi determinado gravimetricamente, onde aproximadamente 1 g de suporte foi imerso em solução tampão fosfato pH 5,5 a 50 °C. As amostras inchadas foram retiradas do tampão em intervalos de tempo de 0, 4, 6, 12, 18 e 24 h, por filtração a vácuo e pesadas. A porcentagem de intumescimento foi calculada utilizando a Equação 7.

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{M_u - M_s}{M_s} \cdot 100 \quad (7)$$

sendo, M_u massa da amostra úmida (g) e M_s a massa da amostra seca (g).

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

As diferenças entre as médias dos ensaios foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) no nível de 95% de confiança e posterior comparação entre estas pelo Teste de Tukey. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, exceto quanto especificado.

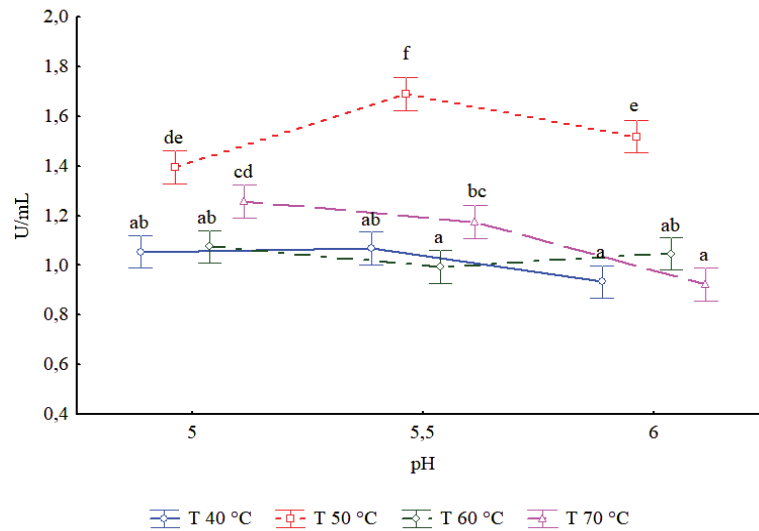
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DO pH E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS LIVRES

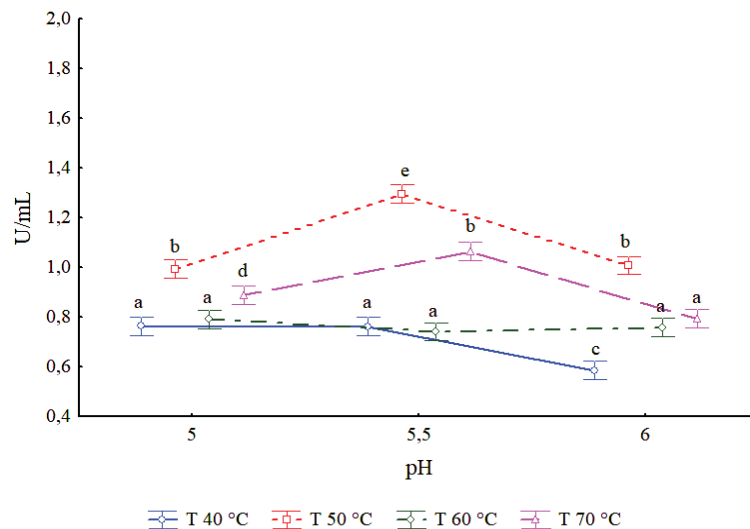
O efeito do pH sobre a atividade tanto de α -amilase (AA) quanto de glicoamilase (AMG) livres foi investigado com relação a diferentes temperaturas, como mostra a Figuras 4.

Figura 4 - Efeito da temperatura e do pH sobre a atividades enzimática das enzimas α -amilase (a) e glicoamilase. (b).

a)



b)



Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si a nível de 95% de confiança (Média \pm DP). Valores considerando uma diluição de 1:2000 do extrato enzimático.

As enzimas exibiram comportamento semelhante, apresentando pH em 5,5 tanto para AA como AMG. De maneira geral, as enzimas são bastante estáveis em seu pH ótimo e, portanto, recomenda-se a sua manutenção nessas condições, não apenas para testes, mas também para armazenamento (BISSWANGER, 2014).

Jaiswal e Prakash, (2011), em seu estudo sobre a imobilização de α -amilase em gelatina utilizando glutaraldeído como agente reticulante, relatam que o pH ótimo para a enzima livre era de 5,5. Outros estudos também têm demonstrado que o pH ótimo em amilases livres situa-se em torno de 4,5 e 6,5, estando os valores encontrados em nosso trabalho de acordo com estes relatos (BAI; LI; WANG, 2006; BRYJAK, 2003; LI et al., 2016; SHARMA; SHARMA; MAJUMDAR, 2014).

Essa variação encontrada na literatura para valores de pH tem reflexo na procedência do biocatalisador, já que conforme sua origem, microbiana (microrganismos mesófilos ou termófilos), de tecidos vegetais ou animais alteram-se consequentemente as características da enzima.

A dependência da atividade das enzimas em função da temperatura se assemelha, de certo modo à dependência do pH, onde o ponto de máxima atividade é frequentemente descrito como a temperatura ótima (BISSWANGER, 2014). O efeito da temperatura na atividade das enzimas livres foi avaliado em temperaturas variando de 40 °C a 70 °C, sendo que as temperaturas ótimas das enzimas livres foram encontradas a 50 °C. Respostas similares foram reportadas por Sharma et al. (2014) que, ao imobilizar α -amilase em ágar, observaram que a temperatura ótima da enzima livre era de 50 °C.

Outros estudos obtiveram temperaturas ótimas correlacionadas com os valores encontrados em nosso trabalho (JAISWAL; PRAKASH, 2011; KIKANI; PANDEY; SINGH, 2013; UYGUN ET AL., 2015). Bryjak (2003) encontraram valores de temperatura ótima de 50 °C e 60 °C para α -amilase e glicoamilase, respectivamente. Tais respostas reiteram que há grande variação das características intrínsecas das enzimas conforme a sua origem.

Correlacionando os dados de temperatura e pH ótimos para as duas enzimas, nota-se que há uma coincidência entre seus pontos ótimos de atuação (50 °C e pH 5,5). Isso assinala que há a possibilidade de coimobilização das enzimas sob a perspectiva de realizar concomitantemente as etapas de liquefação e sacarificação na hidrólise do amido. Ao mesmo tempo, as condições relativamente brandas de atividade dessas enzimas, tornam conveniente sua imobilização com menores gastos energéticos e operacionais.

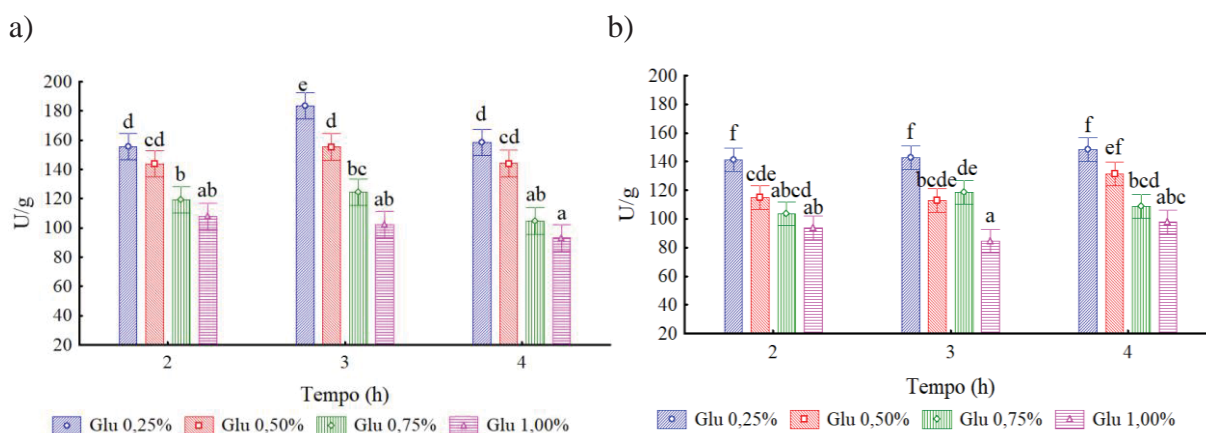
Para Garcia-Galan et al. (2011), cineticamente, a coimobilização é vantajosa pois duas ou mais enzimas podem atuar em consórcio sendo que uma enzima poderá atuar sobre o produto

formado por outra dentro do suporte, com uma concentração muito alta e sem a necessidade de que este produto se difunda para o meio externo.

4.2 ESTUDOS DA IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS ISOLADAS

Nesta etapa do estudo, ao se determinar o método apropriado para coimobilização de α -amilase e glicoamilase foram escolhidos dois materiais de suporte diferentes: Gelatina (GG) e uma mistura de Gelatina/Alginato de sódio (GC) reticulados com Glutaraldeído (GTA) e CaCl_2 respectivamente. Dois métodos de imobilização diferentes foram aplicados (ligação covalente e oclusão), sendo as atividades enzimáticas determinadas nas condições otimizadas das enzimas livres (pH 5,5 e temperatura de 50 °C). As Figuras 5 e 6 apresentam o efeito da concentração de GTA e do tempo de reticulação sobre a atividade das enzimas imobilizadas em suporte de gelatina por oclusão e ligação covalente respectivamente.

Figura 5 - Efeito da reticulação com glutaraldeído sobre a atividade de α -amilase (a) e glicoamilase (b) imobilizadas por oclusão.



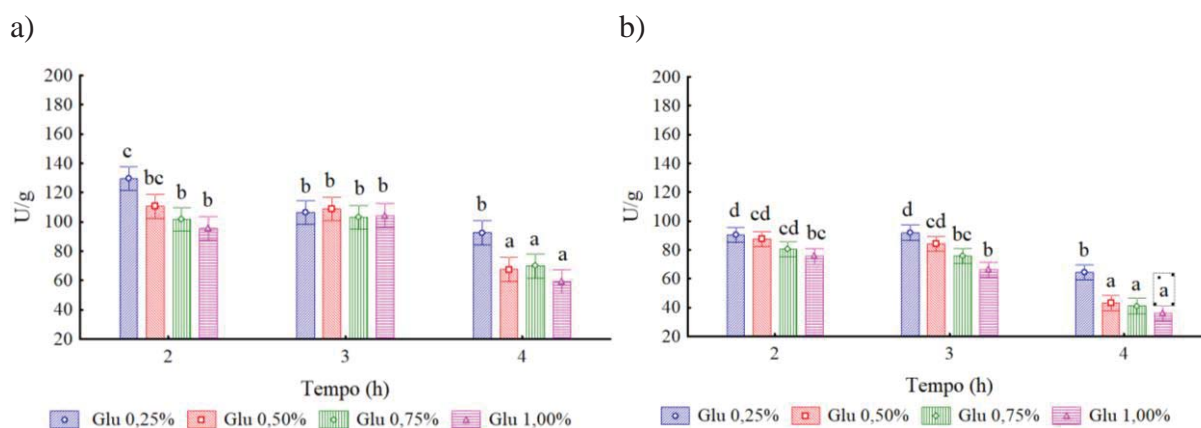
Legenda: letras iguais não apresentam diferença significativa entre si a nível de 95% de confiança (Média \pm DP).

De acordo com a Figura 5, com o aumento da concentração do reticulante, reduz-se significativamente ($p < 0,05$) a atividade do biocatalisador, de modo que a melhor condição de imobilização foi encontrada a uma concentração de GTA de 0,25%. De modo análogo, para a imobilização por adsorção (Figura 6) a concentração de GTA de 0,25% foi mantida como mais adequada.

O glutaraldeído (GTA) é um dos agentes de reticulação mais utilizados na estabilização de materiais colagenosos, bem como agente de acoplamento enzimático, devido ao seu baixo custo e excelente eficiência (AKHOND et al., 2016; BIGI et al., 2001; FARRIS; SONG;

HUANG, 2010; GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2018). No entanto, devido a sua toxicidade (LIU; MA, 2009; SAARAI et al., 2013), recomenda-se utilizá-lo em baixas concentrações para reduzir tal efeito (FARRIS; SONG; HUANG, 2010; LI et al., 2016).

Figura 6 - Efeito da reticulação com glutaraldeído sobre a atividade de α -amilase (a) e glicocamilase (b) imobilizadas por ligação covalente.



Legenda: letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

Na imobilização por oclusão em suporte de gelatina, a reação com o glutaraldeído envolve aprisionamento físico e ligação covalente de modo que o glutaraldeído promove a ligação entre a enzima e a gelatina (JAISWAL et al., 2012; KUMAR et al., 2005). A formação de ligações covalentes entre enzima e suporte pode ter impacto na sua atividade considerando-se que a presença de glutaraldeído poderia afetar a estrutura terciária da enzima e, conseqüentemente, alterar sua acessibilidade para as moléculas do substrato (AKHOND et al., 2016). Além disso, quando a concentração de glutaraldeído é excessiva, as moléculas de enzima podem formar ligações em múltiplos pontos com o suporte, constituindo obstáculos estruturais espaciais que podem comprometer sítios ativos da enzima (CHEN et al., 2013; YAZGAN et al., 2018).

Por outro lado, na imobilização por ligação covalente as enzimas ficam ancoradas à superfície do suporte pela cadeia do glutaraldeído de tal modo que o biocatalisador fica muito mais suscetível à ação do reticulante, pois, diferente da oclusão onde as moléculas de gelatina podem desenvolver um papel de proteção, na adsorção há contato mais direto entre o glutaraldeído e a enzima. Além disso, a enzima pode sofrer dessorção da matriz sendo perdida para o meio (RUEDA et al., 2016).

Resultados semelhantes foram encontrados por Li et al. (2016) que observaram o efeito de concentrações de glutaraldeído entre 0,2% e 9% (v/v) na atividade de glicocamilase

reticulada. A máxima atividade foi obtida a 0,5% (v/v) diminuindo acentuadamente com o aumento da concentração de GTA. A uma concentração de 9% de GTA aproximadamente 80% da atividade foi perdida devido a uma reticulação demasiada fazendo com que a enzima perdesse a flexibilidade mínima necessária para a sua atividade.

Por sua vez Gür et al. (2018) estudando o efeito de diferentes concentrações de glutaraldeído na coimobilização de α -amilase, protease e pectinase determinaram que uma concentração de glutaraldeído de 0,25% foi ideal na manutenção da atividade relativa das enzimas coimobilizadas.

Desta forma, os resultados encontrados em nosso estudo corroboram com , de modo que a dependência entre a atividade das enzimas e a concentração de reticulante bem como ao período de imobilização, é atribuída ao aumento do grau de reticulação entre o suporte e o biocatalisador, pois a concentração do reticulante pode ter um impacto significativo em suas propriedades.

Observando o tempo de reticulação, fica evidente ($p > 0,05$) que este parâmetro teve menor impacto na atividade das enzimas amilolíticas em comparação com a concentração de GTA para ambos os métodos. Quando a imobilização ocorreu por oclusão, a enzima AMG não apresentou diferença significativa de atividade para todos os tempos testados. Em contrapartida a enzima α -amilase teve atividade superior no período de 3 h justificando o uso desse tempo para imobilização.

Porém, para a imobilização por ligação covalente, os períodos de reticulação, 2 h e 3 h foram melhores, sendo, mais conveniente utilizar 2 h, gerando uma economia de tempo no processo. Além disso, após 4 h de contato com o suporte ativado com GTA percebe-se uma perda acentuada da atividade amilolítica que é atribuída ao excesso de reticulação.

De acordo com Akhond et al. (2016) o tempo de imobilização de 3 h foi suficiente para os grupos aldeídos, localizados na superfície do suporte, reagirem com os grupos amino da α -amilase. Os resultados apresentados revelaram que a atividade relativa da enzima imobilizada diminuiu após 3 h devido a saturação dos grupos aldeído. Gür et al. (2018) ressaltam ainda que 3 h foi o tempo de imobilização considerado mais apropriado na coimobilização de α -amilase, protease e pectinase.

A escolha da razão enzima-glutaraldeído, bem como a sua concentração final, é crítica, pois a insolubilização da enzima deve resultar numa distorção mínima da sua estrutura de modo a reter a atividade catalítica (FARRIS; SONG; HUANG, 2010). Portanto, diante dos dados avaliados o método mais apropriado para imobilização das amilases é a oclusão tendo em vista que reteve melhor a atividade catalítica das enzimas. Ao mesmo tempo, as condições de

reticulação foram estabelecidas em concentração de glutaraldeído de 0,25%, menor concentração avaliada, e 3 h de reticulação pois permitiu a reticulação do suporte interferindo o mínimo possível na atividade enzimática.

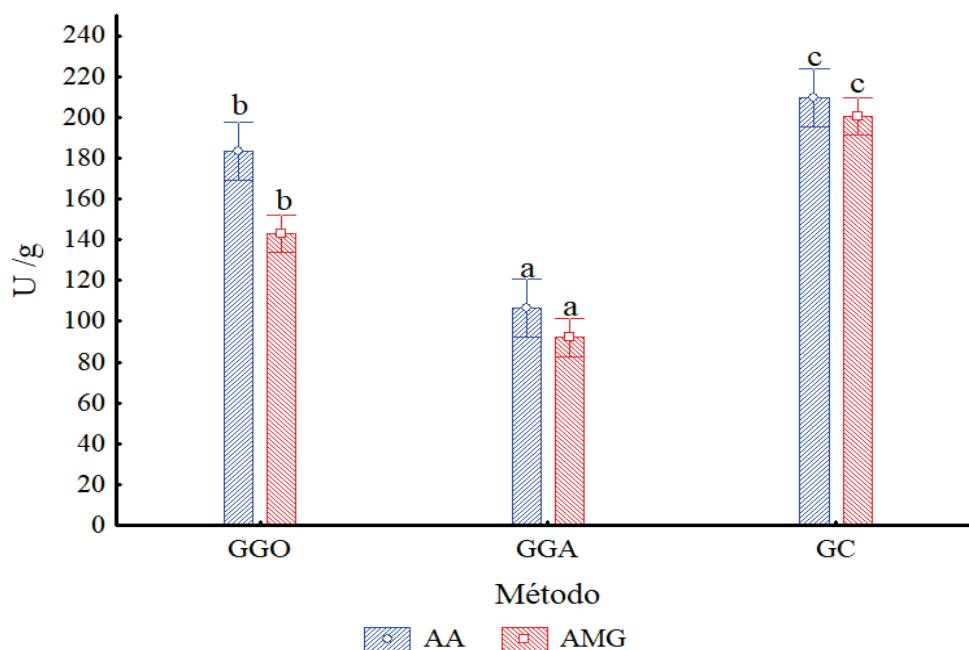
4.3 COMPORTAMENTO DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

4.3.1 Comparação entre abordagens de imobilização

Como alternativa ao uso do glutaraldeído para imobilização, se propôs a reticulação por gelificação iônica do alginado de sódio reticulado com Ca^{2+} , de modo que o alginado formaria uma rede reticulada que prenderia a gelatina estruturando toda a matriz polimérica.

A Figura 7 compara os resultados obtidos para todas as abordagens/métodos de imobilização, sendo a atividade enzimática avaliada em pH 5,5 e temperatura 50 °C, condições estas selecionadas nos ensaios anteriores.

Figura 7 - Comportamento das enzimas imobilizadas frente a diferentes métodos de imobilização.



Legenda: GGO – Imobilização por oclusão reticulada com glutaraldeído; GGA – Imobilização por ligação covalente reticulada com glutaraldeído; GC – Imobilização por oclusão reticulada com Ca^{2+} . Letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

Sob as condições de imobilização estudadas a atividade de ambas as amilases no suporte composto de gelatina/alginado reticulado com Ca^{2+} foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao

das enzimas imobilizadas por oclusão ou ligação covalente (GGO) reticuladas com 0,25% de GTA . Sabe-se que a gelificação de polímeros polianiônicos pela adição de íons multivalentes é um método simples e comum de imobilização enzimática por oclusão devido a restrição física da enzima dentro da rede polimérica. Os alginatos são um dos polímeros mais utilizados, devido às propriedades de gelificação suaves e à não toxicidade (ERTAN; YAGAR; BALKAN, 2007).

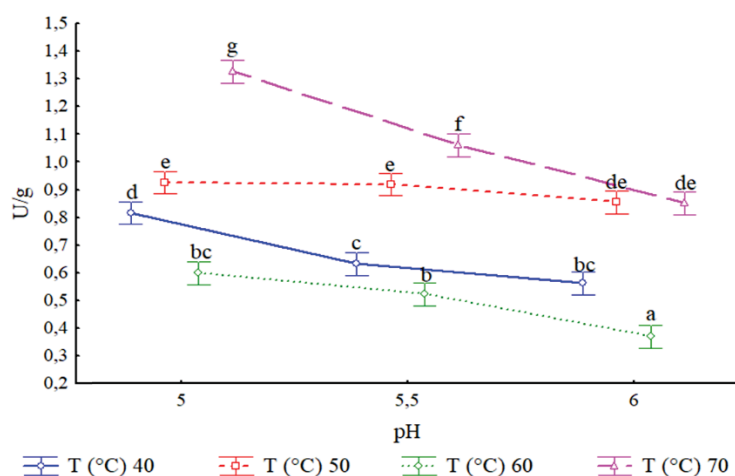
Além disso, muitos trabalhos (AKHOND et al., 2016; DEB et al., 2013b; PASCOAL; MITIDIERI; FERNANDES, 2011; TÜMTÜRK, 2000) destacaram os efeitos dos íons bivalentes, principalmente Ca^{2+} , na estabilização da atividade de amilases.

Portanto, como a atividade enzimática da imobilização por adsorção foi significativamente menor, optou-se por proceder os ensaios sucessivos utilizando as condições e a metodologia de imobilização por oclusão das amilases, em suportes compostos por gelatina reticulada com glutaraldeído (GG) e gelatina/alginato de cálcio (GC).

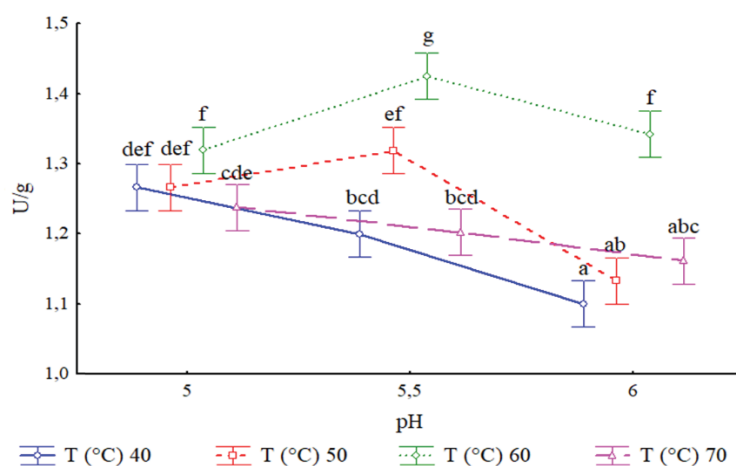
4.3.2 Coimobilização em gelatina reticulada por GTA: efeito do pH e da temperatura

Devido a correspondências das características intrínsecas de AA e AMG os biocatalisadores foram coimobilizados por oclusão nos suportes de gelatina reticulada com glutaraldeído (GG) e gelatina/alginato de sódio reticulada com Ca^{2+} (GC) previamente selecionados. As Figuras 8 e 9 mostram o desempenho das enzimas imobilizadas frente às variações de pH e temperatura do meio reacional.

Figura 8 - Temperatura e pH ótimos do coimobilizado de gelatina reticulada com glutaraldeído (GG).



Legenda: Letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

Figura 9 - Temperatura e pH ótimos do coimobilizado de gelatina/alginado reticulado com Ca^{2+} (GC).

Legendas: Letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

As enzimas coimobilizadas no suporte GC mantiveram seu pH ótimo a 5,5 enquanto que a coimobilização no suporte GG levou ao deslocamento do pH ótimo do imobilizado de 5,5 para 5.

Esta alteração no pH após a imobilização pode ser devido à estabilidade estrutural e conformacional das diferentes proteínas (SHELDON; VAN PELT, 2013). Além da natureza da enzima, alterações do valor ótimo de pH dependem também da composição da matriz utilizada para imobilização, bem como da interação entre a enzima e o suporte que afeta sua conformação (GUPTA et al., 2003; PASCOAL; MITIDIERI; FERNANDES, 2011).

Relatos como de Uygun et al. (2015) que realizaram a imobilização glicoamilase em criogéis de Poly (MMA-GMA) mostram que o pH ótimo da enzima (pH 5,0) não se alterou após a imobilização.

Por outro lado, numerosos estudos relatam deslocamento do pH de amilases imobilizadas em diferentes níveis (AKHOND et al., 2016; JAISWAL et al., 2012; PARK et al., 2005; PASCOAL; MITIDIERI; FERNANDES, 2011; PEREIRA; FERNANDES; ULHOA, 2017; TAVANO et al., 2013). Por exemplo, Jadhav e Singhal (2013) ao estudar a coimobilização de AA e AMG mostraram que o sistema enzimático foi mais estável em condições ácidas de pH em comparação com a mistura enzimática livre.

Em relação ao efeito da temperatura, quando comparada com o comportamento das enzimas livres, observou-se um aumento na condição ótima após a imobilização. A enzima livre apresentou maior atividade a 50 °C; no entanto, as enzimas coimobilizadas nos suportes GG e GC apresentaram melhor atividade a 70 °C e 60 °C, respectivamente. A rigidez da estrutura

enzimática através da ligação multiponto e a redução de problemas de dissociação através da imobilização de múltiplas subunidades são as explicações mais prováveis para esses resultados (TAVANO et al., 2013).

Sharma et al. (2014) ao imobilizar α -amilase em ágar, observaram que a temperatura ótima da enzima foi alterada de 50 °C na enzima livre, para 55 °C após a imobilização. Ao realizar a hidrólise do amido com um sistema de AA e AMG coimobilizadas Park et al. (2005) observaram mudanças na temperatura ideal de 50 °C para 60 °C após a imobilização. Essas variações na temperatura ótima e na energia de ativação das enzimas coimobilizadas foram causadas pela formação de ligações covalentes levando à redução da flexibilidade conformacional. Akhond et al. (2016) afirmam que a estabilidade térmica de α -amilase imobilizada aumentou devido à formação de fortes ligações covalentes entre enzima e suporte mediada pelos grupos funcionais de glutaraldeído.

Observa-se ainda que fora da temperatura ótima, ambos os imobilizados exibiram uma redução da atividade catalítica indicando alterações conformacionais na estrutura química da enzima. Em temperaturas mais elevadas, a estrutura terciária da enzima é alterada drasticamente levando a uma degradação lenta (SINGH; KUMAR, 2011). Em todos os casos, a atividade das enzimas coimobilizadas foi maior do que das enzimas livres em temperaturas mais elevadas mostrando que a técnica de imobilização melhorou de forma satisfatória.

4.3.3 Rendimento de imobilização

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes ao rendimento de imobilização para os dois suportes testados.

Tabela 2 - Rendimento (R) e eficiência (E) de coimobilização por diferentes suportes.

Suporte	R (%)	E (%)
Gelatina + Glutaraldeído (GG)	96,40 ± 0,4	95,28 ± 0,2
Gelatina/Alginato + Ca ²⁺ (GC)	98,07 ± 0,2	106,49 ± 0,1

O rendimento de imobilização deve ser usado para descrever a porcentagem de enzima a partir da solução enzimática livre que foi imobilizada (SHELDON; VAN PELT, 2013). De acordo com os resultados, o suporte reticulado por cátions bivalentes Ca²⁺ foi o que apresentou melhor rendimento de imobilização, levemente superior ao encontrado para a imobilização com reticulação com glutaraldeído. Estes resultados são considerados satisfatórios, mostrando que a atuação do GTA nos grupos amino dos peptídios não promoveu redução da atividade

catalítica. Além disso, os resultados indicam que em ambos os suportes o efeito da oclusão não inviabilizou o contato enzima/substrato.

Ao coimobilizar as enzimas, AA e AMG oclusas em pérolas de alginato, Jadhav e Singhal, (2013) relatam um rendimento de imobilização de 85%. Por sua vez, Jaiswal et al. (2012) que imobilizaram α -amilase sobre matriz de gelatina utilizando glutaraldeído como agente reticulante mostraram que 20% de gelatina (p/v), 10% de glutaraldeído (v/v) e 1 h de tempo de reticulação proporcionaram rendimento de imobilização de 82,5%.

Outro parâmetro usado para descrever o sucesso da imobilização enzimática é a eficiência da imobilização. A eficiência de imobilização nos suportes GG e GC foram de 95% e 106% representando a porcentagem de atividade enzimática observada nos imobilizados. Em teoria, é possível ter um rendimento de imobilização de 100% e uma eficiência de imobilização de 0%. Isso significaria que 100% da solução enzimática foi imobilizada, mas nenhuma atividade é encontrada após a imobilização porque a enzima foi desativada ou tornou-se inacessível por algum motivo após a imobilização (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Seguindo o padrão apresentado pelo rendimento de imobilização, a eficiência das enzimas coimobilizadas no suporte GC foi maior que do suporte GG.

Em síntese, rendimentos menores que 100% indicam que nem toda a enzima (proteína) foi imobilizada no suporte. No caso do suporte GG a eficiência de imobilização indica que de cerca de 96% de enzima que foi imobilizada 95% permaneceu ativa. Agora, se a eficiência de imobilização for superior ao rendimento, a imobilização provavelmente gerou interações entre biocatalisador e suporte intermediadas pela ação do reticulante que incrementaram sua atividade catalítica.

Vários relatos na literatura mostram diferentes rendimento e eficiência na imobilização enzimática (GANGADHARAN et al., 2009; JADHAV; SINGHAL, 2013; PARK et al., 2005; PASCOAL; MITIDIERI; FERNANDES, 2011). As causas dessas variações são muito amplas, no entanto estão relacionadas às mudanças das propriedades intrínsecas de cada biocatalisador geradas pela imobilização.

4.3.4 Reuso das enzimas imobilizadas

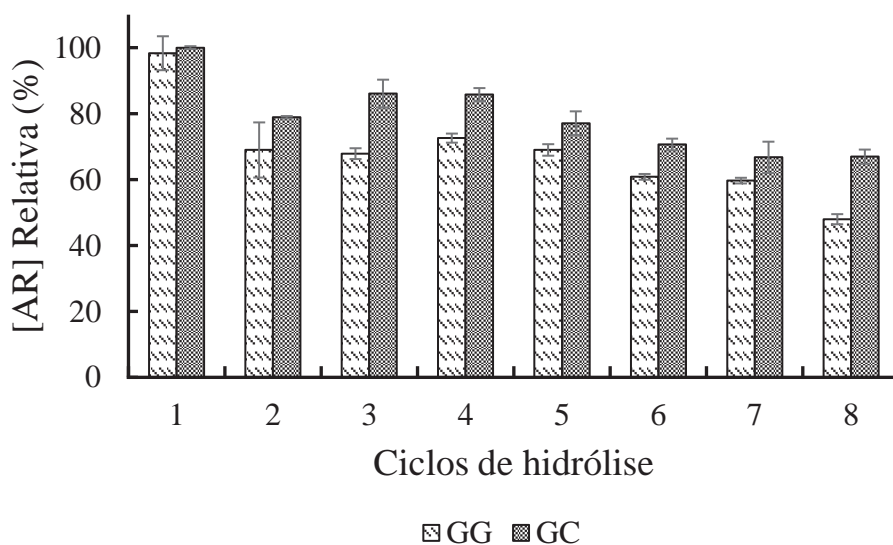
As enzimas são geralmente caras e seus custos de produção e purificação muitas vezes invalidam sua aplicação em bioprocessos (SINGH; SINGH, 2013). A reciclagem e múltiplas reutilizações de enzimas imobilizadas representa o aspecto mais importante para aplicações industriais, reduzindo o custo de produção devido ao seu uso repetidas vezes (NADAR;

RATHOD, 2016; YAZGAN et al., 2018). O estudo do desempenho de reciclo das enzimas imobilizadas nos dois diferentes suportes está apresentado na Figura 10. Observou-se que após o primeiro ciclo a atividade da enzima imobilizada por ambos os métodos diminuiu gradativamente, mas se manteve acima de 50% da atividade inicial ao final de oito ciclos

O suporte GC foi o que apresentou melhor reutilização, pois reteve cerca de $67,2 \pm 2,1\%$ da atividade relativa após 8 ciclos de hidrólise de 60 min, no entanto, sob as mesmas condições as enzimas imobilizadas sobre GG mantivera cerca de $53,1 \pm 1,5\%$ de sua atividade relativa inicial.

A redução da atividade catalíticas das enzimas imobilizadas é geralmente devida à lixiviação da enzima do suporte durante a lavagem após cada uso ou a alterações conformacionais causadas pelo uso repetido da enzima (PEREIRA; FERNANDES; ULHOA, 2017).

Figura 10 - Reuso das enzimas coimobilizadas.



Legenda: GG - suporte de gelatina reticulada com glutaraldeído a 0,25%. GC - suporte composto de gelatina alginato reticulada com Ca^{2+} .

Segundo Singh e Kumar, (2011) certos ambientes de trabalho têm efeito desnaturante sobre as enzimas, acarretando mudanças na estrutura terciária que é a principal razão da desativação da maioria das enzimas. Além disso, dificuldades na difusão do substrato e produto da hidrólise através de matrizes poliméricas também foram relatados (MOGHARABI et al., 2012).

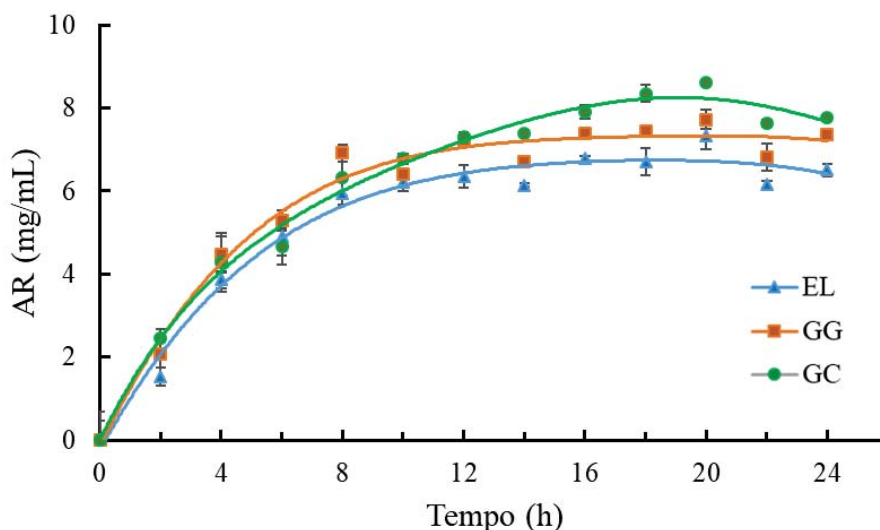
Park et al. (2005) obtiveram recuperação de 92,3% e 88,9% da atividade em sistema de amilases coimobilizadas, mesmo após 10 ciclos de reutilização. Outros estudos descrevem o potencial de reutilização de amilases imobilizadas no intervalo de atividade de 50% a 90% por 5 a 15 ciclos consecutivos de hidrólise (AKHOND et al., 2016; ERTAN; YAGAR; BALKAN, 2007; GANGADHARAN et al., 2009; JAISWAL et al., 2012a; PEREIRA; FERNANDES; ULHOA, 2017; YAZGAN et al., 2018).

Tendo em vista que em um biorreator industrial econômico para hidrólise de amido, a reutilização e a estabilidade da enzima são dois fatores importantes, a coimobilização das amilases ofereceu a vantagem do reuso, em batelada, por até oito vezes. Além disso, os suportes puderam ser facilmente recuperados por filtração, facilitando a operação.

4.3.5 Aplicação em processo de sacarificação

A fim de investigar o sistema enzimático que poderia funcionar melhor para a hidrólise de amido foi realizada a cinética de conversão do substrato em produtos nos três sistemas enzimáticos (Figura 11).

Figura 11 - Cinética de sacarificação das enzimas coimobilizadas.



Legenda: EL – Enzimas livres; GG – coimobilizado de gelatina reticulado com glutaraldeído a 0,25%; GC – coimobilizado com suporte de gelatina alginato reticulado com Ca^{2+} .

Analisando a Figura 11 pode-se observar que tanto as enzimas livres como imobilizadas tiveram comportamento semelhante de conversão do amido em glicose sob as mesmas condições. No decorrer de 24 horas, a maior conversão relativa obtidas ocorreu após 18 horas

de hidrólise ($P < 0,05$). Portanto nessas condições o processo de hidrólise poderia ser interrompido para o início do ciclo seguinte.

Dentre as condições avaliadas, as enzimas coimobilizadas em suporte GC foram as que apresentaram valores de conversão mais satisfatórios $8,60 \pm 0,21 \text{ mg.mL}^{-1}$ de açúcares redutores. Por sua vez, as enzimas imobilizadas em GG tiveram $7,70 \pm 0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ de conversão. Estes resultados são 14,8% e 10,2% maiores que os obtidos para as enzimas livres, de modo que a coimobilização parece ter afetado positivamente a capacidades das enzimas de hidrolisar o substrato.

Jadhav e Singhal (2013) obtiveram resultados semelhantes, ao avaliar a conversão de amido por AA e AMG coimobilizadas sob condições operacionais parecidas. Porém em período de reação mais curto de 2 h. Deste modo um meio pelo qual seria possível encurtar o tempo de sacarificação seria avaliar o aumento da concentração e a proporção entre as enzimas como mostrado em estudos anteriores (FU; LU, 2014; PARK et al., 2005). Cabe ressaltar, no entanto, que a resistência a um longo período de hidrólise aliado à possibilidade de reciclo destacada na seção 4.3.2 indicam a possibilidade de uso dos imobilizados por longos períodos com pequenas perdas de atividade catalítica.

De acordo com Talekar et al. (2017) que coimobilizaram α -amilase, glicoamilase e pululanase comerciais em nanopartículas magnéticas usando glutaraldeído, as enzimas coimobilizadas foram 30% mais eficientes na conversão do amido de batata que a mistura de enzimas livres. Roy e Gupta (2004) citam que a hidrólise de amido utilizando uma mistura de glucoamilase e pululanase aprisionadas individualmente em pérolas de alginato de cálcio foi mais eficiente do que o uso sequencial das duas enzimas.

Na maioria dos processos enzimáticos em série, o produto da primeira reação é o substrato da próxima reação. Portanto, a coexistência de duas etapas de hidrólise, liquefação e sacarificação, em um único sistema de reação, e o uso combinado de duas enzimas deveria produzir mais glicose do que o uso das enzimas livres, pois a imobilização de duas enzimas em um suporte as mantém em estreita proximidade, o que permite melhores chances de um produto da primeira reação se tornar um substrato para a segunda antes de se difundir no ambiente reacional (JADHAV; SINGHAL, 2013; PARK et al., 2005).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE

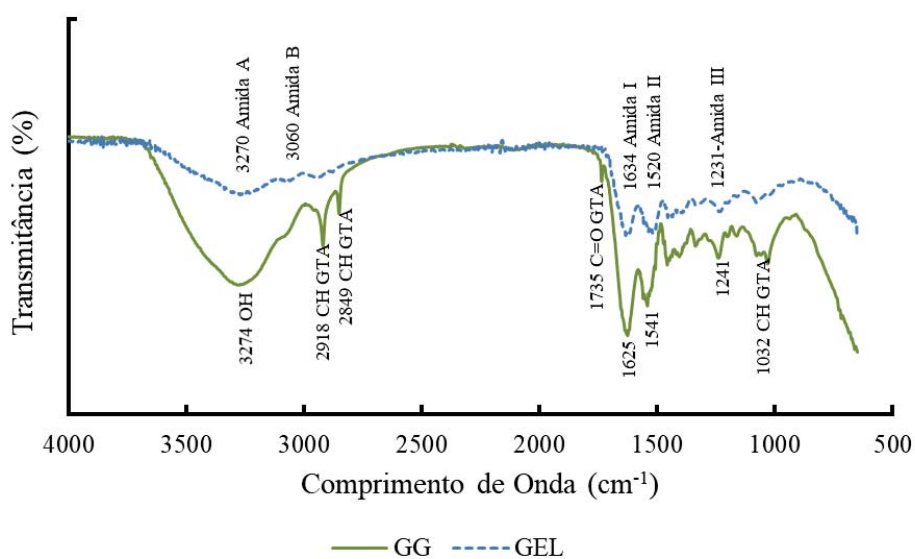
4.4.1 FTIR

A análise FTIR dos suportes foi realizada com o intuito de caracterizar as mudanças induzidas pela incorporação do reticulante e distinguir mudanças vibratórias relacionadas às interações químicas no processo de formação da matriz. A Figura 12 mostra os espectros da gelatina pura (GEL) e do suporte reticulado com 0,25% de glutaraldeído.

De maneira geral, os espectros de FTIR do suporte reticulado e do controle exibiram as principais bandas de vibração semelhantes, porém com variações na amplitude das bandas devido a reticulação.

Os espectros de gelatina apresentaram bandas de absorção típicas em torno de 3270 e 3060 cm^{-1} correspondendo à amida A e amida B respectivamente (FRAZIER; SRUBAR, 2016; LIN et al., 2018). A banda de amida A representa vibrações em torno de 3500 e 3100 oriundas do estiramento da ligação NH acoplado à ligações de hidrogênio OH que indicam interação intermoleculares (JALAJA et al., 2016; TONGNUANCHAN et al., 2015). As bandas formadas pela amida B representam o estiramento assimétrico das ligações CH que devido o baixo momento dipolar da ligação possui amplitude inferior (MORSY et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

Figura 12 - Comportamento do suporte GG por FTIR.



Legenda: GEL – Gelatina padrão não reticulada; GG - suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído a 0,25%.

A banda observada a 1634 cm^{-1} é característica da amida I indicando vibrações de estiramento do grupo C=O de amidas primárias associadas (MORSY et al., 2017; QIAO et al., 2017) já a banda correspondente a amida II, a 1520 cm^{-1} , é atribuída a vibrações de flexão de NH e estiramento de CN na cadeia polipeptídica. A frequência da banda amida I é particularmente sensível à estrutura secundária baseada em diferentes arranjos de ligações de hidrogênio que permitem a conformação da cadeia polipeptídica em estruturas secundárias α -hélice, folha- β e alças (MILLER; BOURASSA; SMITH, 2013).

Na região em torno de 1231 cm^{-1} se observam as bandas relativas à amida III que apresentam um modo de vibração muito complexo resultante da combinação de flexão de NH no plano e estiramento de CN, bem como absorções resultantes de vibrações de grupos CH_2 da glicina e cadeias laterais da prolina (BOATENG et al., 2015; DONG; WANG; DU, 2006; HASHIM et al., 2010; JIN et al., 2015; LI; MU; LIN, 2016; MORGANTI et al., 2013; QIAO et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

A primeira diferença notável é observada na banda a aproximadamente 2849 e 2918 cm^{-1} correspondentes ao estiramento do grupo CH dos aldeídos (PIAO; CHEN, 2017; SAARAI et al., 2013). Outras diferenças podem ser observadas entre 1079 e 1032 cm^{-1} onde o aumento da intensidade dessa banda indica o modo de flexão no plano da ligação CH. Este fenômeno pode estar relacionado com a formação de reticulação entre grupos amino não protonados da GEL com grupos carbonila do GTA (FARRIS; SONG; HUANG, 2010).

A presença de uma banda a 1735 cm^{-1} na amostra reticulada, que está ausente no espectro da GEL, se relaciona a grupos aldeído residuais do GTA já que o grupo C=O dos aldeídos apresenta forte vibração de estiramento em torno de 1700 cm^{-1} (PIAO; CHEN, 2017). Em contrapartida a baixa intensidade da banda aponta para o fato de que a maior parte do GTA reagiu na reticulação da gelatina. Além disso a banda de absorção correspondente à amida I se deslocou para um comprimento de onda inferior.

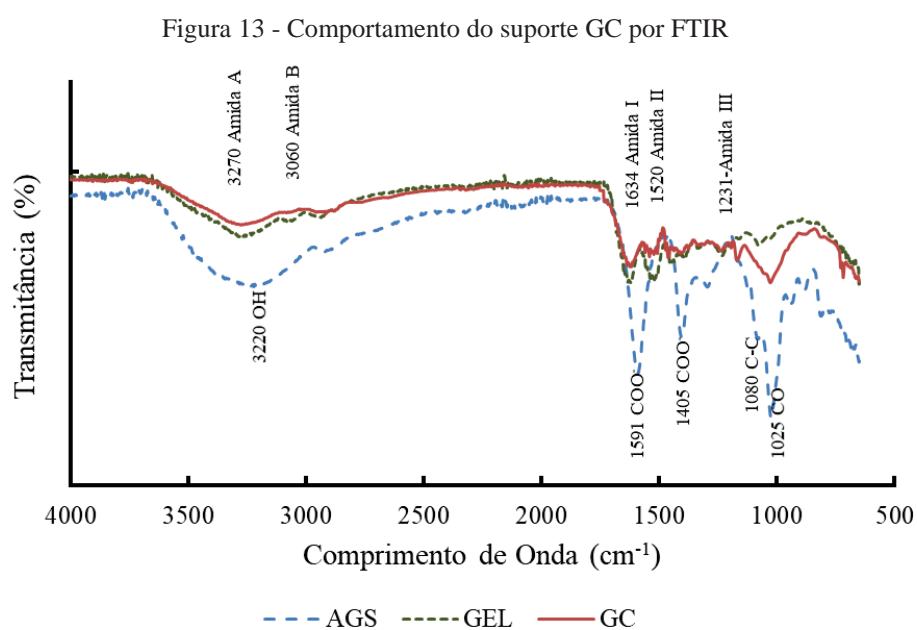
De acordo com Liu et al. (2011) a banda de absorção característica das bases de Schiff está localizada a aproximadamente 1690 e 1590 cm^{-1} , sendo semelhante à banda amida I da gelatina. Assim, o deslocamento e a intensificação da banda amida I no espectro do suporte reticulado a 1625 cm^{-1} , sugere que a gelatina reagiu com glutaraldeído, resultando na formação de bases de Schiff. Em consonância, Saarai et al. (2013) ao comparar películas de gelatina reticuladas com GTA observaram que as bandas amida I e II tiveram maior intensidade o que os levou a supor que estas bandas estejam, provavelmente, envolvidas na reticulação química com o GTA.

Um aumento da absorção pode ser notado na região das amidas A e B provavelmente devido a interação entre o grupo OH com as moléculas de água adsorvidas. Na região das amidas II e III, observou-se um aumento de intensidade de ambas. Para Yakimets et al. (2005) a banda amida II embora seja menos sensível à estrutura secundária do que a amida I, é muito influenciada pela hidratação. Em seu trabalho o deslocamento da amida II indicou níveis crescentes de hidratação, observado pelas altas taxas iniciais de mudanças nos espectros infravermelhos para a banda OH e amida II da proteína.

Os espectros FTIR do suporte composto de gelatina/alginate reticuladas com Ca^{2+} (GC) e dos biopolímeros de referência são apresentados na Figura 13.

Pode-se perceber que o comportamento de GC segue a tendência do espectro da GEL. Isso é explicado pelo fato de a concentração de alginato de sódio (AGS) ser de apenas 1% em massa na composição do suporte.

A banda de absorção em torno de 3220 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de OH, apresenta intensidade reduzida provavelmente devido à diminuição das ligações intramoleculares. Do mesmo modo, as bandas de estiramento assimétrico a 1591 cm^{-1} e simétrico a 1405 cm^{-1} resultantes da interação entre o grupamento COO^- do AGS com Ca^{2+} não aparecem no espectro GC onde prevalecem as bandas amida I e II oriundas da estrutura proteica da gelatina. (DEVI; KAKATI, 2013; LI et al., 2017).



Legenda: GEL – Gelatina padrão não reticulada; AGS – Alginato padrão não reticulado; GC - suporte composto de gelatina-alginato reticulado com Ca^{2+} .

Li et al. (2011) avaliando o complexo AGS/GEL por FTIR em diferentes concentrações, verificaram que a intensidade das bandas a 1593 e 1411 cm^{-1} do AGS puro diminuem gradualmente com o aumento do teor de gelatina. Por outro lado, as bandas de estiramento C-C e C=O a cerca de 1080 e 1025 cm^{-1} apresentam uma intensidade relativamente alta considerando o espectro de absorção de GC. De acordo com Saari et al. (2013) estas bandas podem ser atribuídas à presença de reticulação. O pico de alongamento C=O (ao redor de 1025 cm^{-1}) mostra uma intensidade maior, sugerindo uma vibração de ligação OH mais forte ou uma ligação mais forte do Ca^{2+} aos ácidos glicurônicos do AGS.

Portanto, os espectros de absorção indicam que os grupos negativos de alginato podem se associar com gelatina carregada positivamente formando interações relacionadas a ligações de hidrogênio, interação iônicas e eletrostáticas entre os biopolímero, porém, devidos à baixa concentração de alginato utilizadas para compor o suporte, não foi possível detectar suas principais bandas de absorção o que pode indicar uma interação insuficiente entre ambos.

4.4.2 TGA

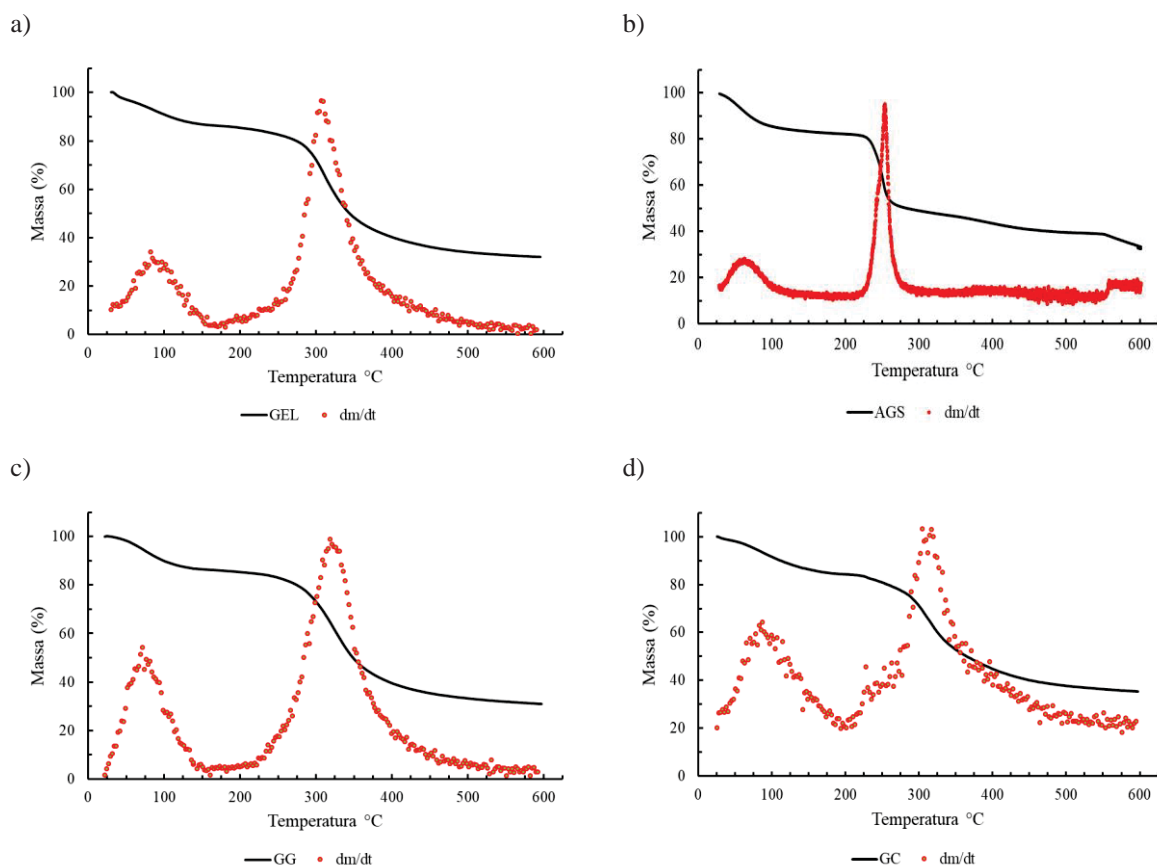
A Figura 14 apresenta as curvas TGA para ambos os suportes reticulados com glutaraldeído (GG) e Ca^{2+} (GC) e seus respectivos constituintes gelatina (GEL) e alginato de sódio (AGS).

Conforme os termogramas mostram, o comportamento de degradação térmica da gelatina ocorre em dois estágios diferentes: O primeiro estágio ocorre desde a temperatura inicial 25 °C até aproximadamente 200 °C, com uma perda de massa de cerca de 14,5%, que está relacionado à perda da água associada aos grupos hidrofílicos do polímero (BARRETO; PIRES; SOLDI, 2003; CORREIA et al., 2013). O segundo estágio de degradação ocorre entre 200 °C e 500 °C e está associado à real degradação das ligações peptídicas (CORREIA et al., 2013).

Ambos os suportes apresentaram estabilidade semelhantes à da GEL, porém o suporte GC teve menor perda de massa (46,6%) na segunda fase, contra (52,5%) para GG, seguindo as características apresentadas pelo AGS.

Sabe-se que a gelatina é uma polianfótero típico, e seus grupos carboxilo carregados (COO^-) podem interagir ionicamente com grupos amina de cargas opostas (NH_3^+). Além disso, um grande número de grupos polares, tais como COOH , NH_2 e grupos OH , na gelatina são capazes de formar ligações de hidrogênio (QIAO et al., 2017), o que pode implicar tanto na adsorção de moléculas de água quanto em sua maior estabilidade.

Figura 14 – Análise termogravimétrica (TGA) da gelatina pura (a), alginato de sódio (b), suporte de gelatina reticulado com 0,25% de glutaraldeído (c) e suporte composto de gelatina alginato reticulado com Ca^{2+} (d).



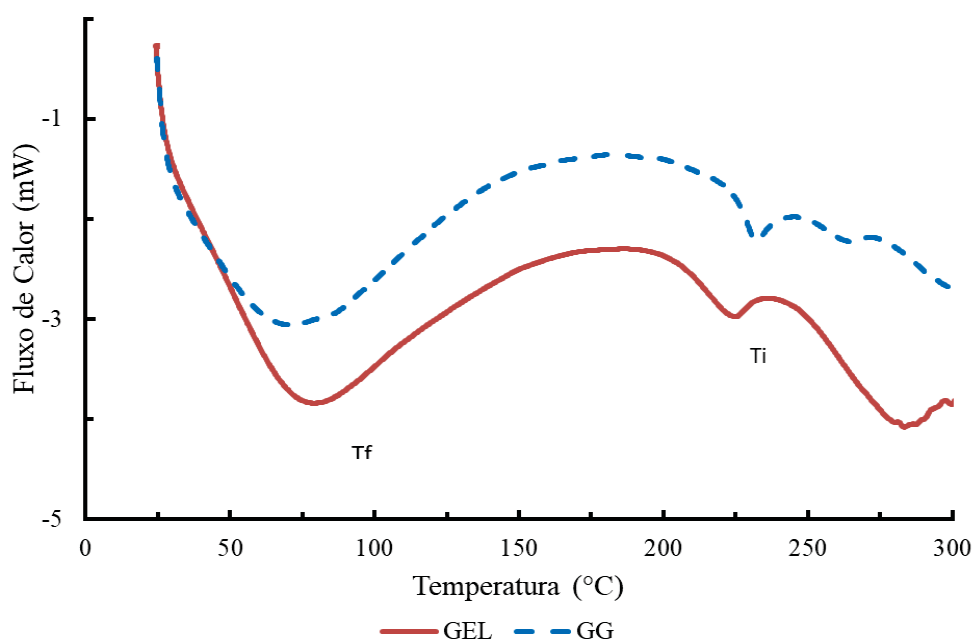
No termograma referente ao AGS observa-se que este apresentou um padrão de perda de peso, antes da decomposição, semelhante ao da GEL, com perda de massa mais acentuada da ordem de 16,5%. Porém a temperatura de decomposição do AGS foi inferior à das demais amostras, indicando que o alginato possui menor estabilidade térmica.

Como também foi determinado pela análise química (FTIR), a presença do AGS na composição do suporte GC não resultou em modificações expressivas a nível molecular. No entanto como relatado por Devi e Kakati, (2013) a amostra de AGS apresentou menor perda de massa (44%) do que a gelatina (51%) após a decomposição, o que pode ser observado também no suporte GC.

4.4.3 DSC

As varreduras realizadas nos suportes GG e GC modificados e biopolímeros originais não modificados (GEL e AGS) são mostradas nas Figuras 15 e 16 respectivamente.

Figura 15 – Análise calorimétrica diferencial (DSC) do suporte de gelatina reticulado com 0,25% de glutaraldeído (GG) em comparação com a gelatina pura (GEL)



Para as amostras de suporte reticulados com GTA ou Ca^{2+} analisadas por DSC observa-se um comportamento semelhante ao da gelatina não modificada, indicando que a reticulação não influenciou as propriedades térmicas da gelatina.

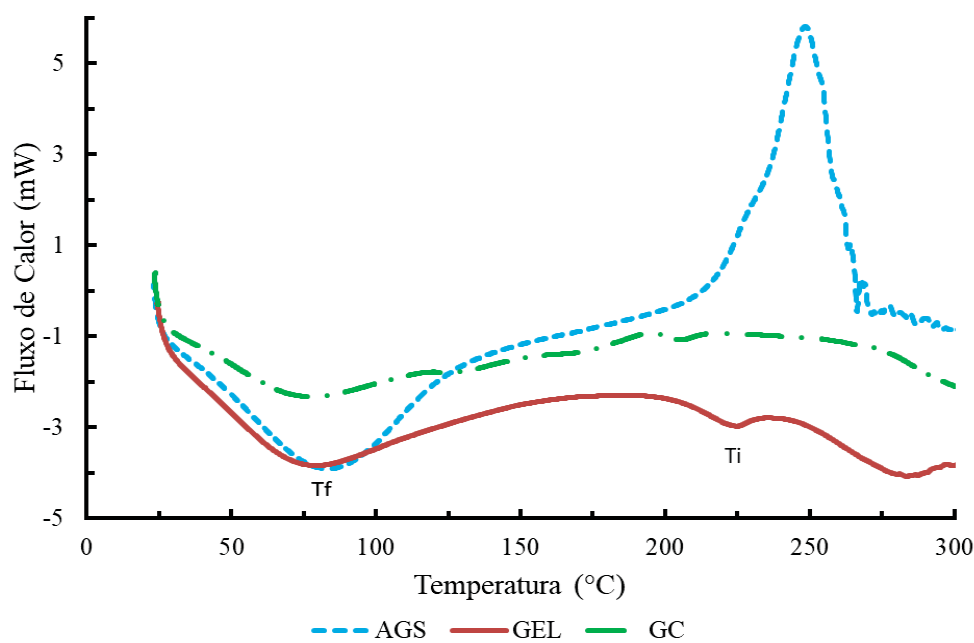
Observou-se um amplo pico endotérmico na faixa de temperaturas entre aproximadamente 28 °C e 80 °C, que está associada à evaporação da água adsorvida na estrutura dos suportes devido ao contato com o ar (CORREIA et al., 2013; PEÑA et al., 2010). As análises de TGA estão de acordo com essa afirmação, já que percebe-se que os suportes perderam, em média, 15 % da água na primeira fase de perda de massa.

A estrutura da gelatina é geralmente descrita como tendo fases amorfas e cristalinas. Durante o aquecimento da gelatina o calor transfere energia para suas moléculas e induz mudanças estruturais, como a transição vítrea da fase amorfa e a fusão dos cristais.

Quando a temperatura aumenta, a fase cristalina, atribuída à hélices triplas (COPPOLA; DJABOUROV; FERRAND, 2012), derrete a uma temperatura de fusão (T_f), associada ao primeiro pico endotérmico, e a energia necessária para esta fusão é denominada entalpia de fusão ($\Delta H \text{ J g}^{-1}$) (DÍAZ-CALDERÓN et al., 2014). Conforme a temperatura continua a aumentar, as cadeias de gelatina, com arranjo espacial em hélices simples, absorverão energia suficiente para passar do estado de conformação *trans* (mais estável) para o estado de conformação *cis* (menos estável). Isso é devido ao seu rico conteúdo de prolina. Esta

isomerização requer energia fornecida em temperaturas elevadas, em torno de 200 °C (DUCONSEILLE et al., 2017).

Figura 16 - Análise calorimétrica diferencial (DSC) do suporte de gelatina reticulado com Ca^{2+} (GC) em comparação com a gelatina pura (GEL) e com o alginato de sódio (AGS)



Legenda: GEL – Gelatina padrão não reticulada; AGS – Alginato padrão não reticulado; GC - suporte composto de gelatina alginato reticulado com Ca^{2+} .

O termograma referente ao suporte GC, mostrado na Figura 16 exibe um amplo pico endotérmico com T_f de 77,66 °C menor que a do AGS (87,57 °C) e mais próxima da T_f apresentada pela GEL (78,60 °C). Uma vez que o AGS tem menor estabilidade térmica do que a gelatina, demonstrada por meio da técnica de TGA, este comportamento pode estar relacionado a este fato. Além disso a baixa concentração de AGS é notado quando o comportamento térmico do suporte se assemelha mais ao perfil da GEL seu componente majoritário.

Vale ressaltar que o segundo pico endotérmico, embora tenha apresentado deslocamento da temperatura de isomerização (T_i), de 224,88 °C na GEL para 205,58 °C na amostra reticulada, teve também uma redução da entalpia (ΔH) de -8,21 para -2,4 J g^{-1} conforme a Tabela 3. Esses resultados sugerem que na presença do reticulante ocorrem interações associativas formadas localmente quando ambos os polímeros estão em conformação aleatória de bobina (PEÑA et al., 2010; VARGHESE; CHELLAPPA; FATHIMA, 2014).

Por fim Li et al. (2011), afirmam com base na análise da temperatura de transição vítrea em géis composto de AGS e GEL que os polímeros são miscíveis, atribuindo este resultado à fortes ligações de hidrogênio intermoleculares e à atração eletrostática, limitando a flexibilidade e a livre mobilidade das cadeias de polímero, conforme verificado pelas análises FTIR apresentada. Além disso, o T_g detectável indicou aos autores que o grau de complexação iônica não é muito forte, concordando novamente com os espectros FTIR e análise TGA das amostras.

Tabela 3 - Parâmetros do DSC para os suportes estudados e os materiais utilizado na sua produção em seus diferentes eventos

Amostra	Eventos	T_{on} °C	T_{end} °C	T_f °C	ΔH J g ⁻¹
GEL	1°	28,88	131,06	78,60	-263,49
AGS		54,55	123,05	83,57	-340,04
GG		28,15	144,56	71,03	-289,78
GC		29,69	190,17	77,66	-275,42
$T_{i/d}$ °C					
GEL	2°	208,54	230,56	224,88	-8,21
AGS		230,78	266,54	248,44*	357,46
GG		226,49	238,14	232,32	-7,90
GC		199,48	212,32	205,58	-2,40

Legenda: ΔH : entalpia do pico; T_{on} : temperatura de início do pico; T_{end} : temperatura de término do pico; T_f : temperatura de fusão; $T_{i/d}$: temperatura de isomerização (i) ou de degradação térmica (d) no caso do AGS*.

O termograma DSC do suporte GG apresenta um pico endotérmico entre 28,15 °C e 144,56 °C sendo 71,03 °C a temperatura de fusão (T_f) e um pico secundário situado a 232,32 °C.

De acordo com Mukherjee e Rosolen, (2013), a varredura do primeiro aquecimento mostra um grande pico endotérmico na gelatina (variando de 50 °C a 180 °C) relacionado à sobreposição de duas transições de primeira ordem, T_e e T_f , relacionadas a fenômenos de evaporação da água e transição de fusão das zonas de domínio cristalino, respectivamente e a transição vítrea de segunda ordem (T_g). Além disso, o pequeno pico endotérmico variando de 180 a 250 °C é atribuído à transição de primeira ordem T_i , uma consequência do processo de isomerização das ligações peptídicas que constituem as hélices da gelatina (SALERNO et al., 2018). Estas características são claramente visíveis tanto no suporte GG como na GEL utilizada como referência. No entanto, aponta-se o fato de a T_f do suporte (71,03 °C) foi inferior ao da referência (78,60 °C) o que denota menor estabilidade por parte do suporte.

Relatos na literatura mostram que a T_f dependeram fortemente do grau de reticulação da estrutura de polímeros (JALAJA et al., 2015, p. 201; SANTOS et al., 2018). Por outro lado Correia et al. (2013) afirmam que a reticulação da gelatina com GTA promove ligação cruzada

associada a moléculas mais rígidas com estruturas menos ordenadas. A interação proteína-proteína é, portanto, aparentemente afetada pela reticulação e diminuindo a estabilidade térmica. Peña et al. (2010) ressaltam ainda que o aumento da temperatura do segundo pico endotérmico de 208,54 °C na GEL para 226,49 °C no suporte sugerem a presença de reticulação devido a alteração da estrutura helicoidal característica da gelatina.

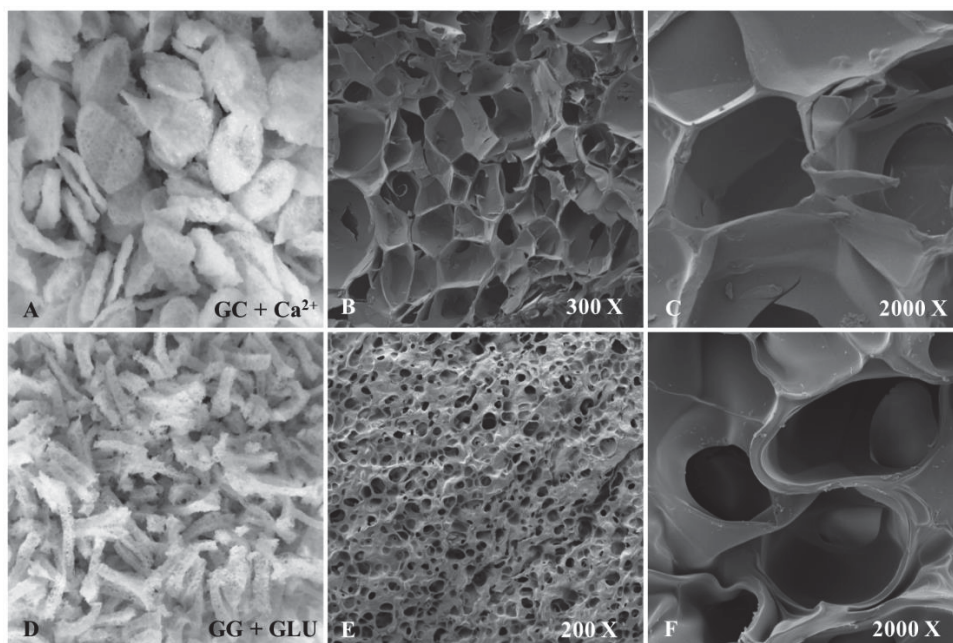
A estrutura da gelatina apresenta alto grau de complexidade e é influenciada por muitos fatores. É estabilizada por diferentes tipos de ligações covalentes e sua modularidade é possível graças a numerosas interações fracas (DUCONSEILLE et al., 2017). Além disso, O grau de umidade da gelatina também influencia seu estado estrutural, porque a água atua como plastificante de estruturas de gelatina, tornando as cadeias de gelatina mais móveis, resultando em mudanças no seu comportamento térmico.

4.4.4 Morfologia

A

Figura 177 mostra a morfologia da seção transversal das amostras avaliadas por meio de MEV. As imagens evidenciam diferenças morfológicas claras entre os materiais porosos oriundos da reticulação com GTA e Ca^{2+} .

Figura 17 - Aspectos da morfologia dos suportes GC (A-C) e GG (D-F) obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)



Na Figura 17 A pode-se observar os aspectos gerais do suporte composto GC, sem ampliação que apresentou aspecto externo poroso com formato elipsoide oriundo da etapa de reticulação em que a matriz líquida foi gotejada em solução de CaCl_2 . A estrutura interna do suporte evidenciada na Figura 17 B mostra um perfil de malha interligada com muitos poros irregulares.

Voo et al. (2015) apontam que este tipo de rede interconectada poderia ser formada devido a interações entre as cadeias dos blocos M-G do AGS, que ocorrem através de uma ligação tipo carboxilato- (Ca^{2+}) -carboxilato, resultando em uma mudança abrupta do ângulo de orientação das moléculas de polímero.

A forma e o tamanho dos poros são o resultado das bolhas de ar que foram incorporadas na matriz, durante a etapa de intensa aeração para formação do suporte, bem como da interação entre os polímeros. O tamanho dos poros é variado, o que indica que pode ter ocorrido coalescência das bolhas de ar antes da reticulação. As paredes entre os poros são bem definidas, com aspecto poligonal, Figura 17 C. Por sua vez, a conexão entre os poros, aparentemente não é muito ampla o que pode ser atribuído à fortes interações entre os polímeros e homogeneidade da estrutura do gel, capaz de formar películas muito resistentes que depois da reticulação se tornaram as paredes dos poros.

Não obstante, a olho nú o suporte GG também se mostrou poroso, porém com formato mais regular, de paralelepípedo, devido ao corte do suporte antes da reticulação (Figura 17 D). Sua morfologia interna exhibe uma superfície de aspecto mais compacto e poros com estruturas internas irregulares, elipsoides e esferoides, interconectados entre si (Figura 17 E).

As paredes entre os poros se mostraram virtualmente mais espessas que as presentes no suporte GC, Figura 17 F, devido provavelmente às fortes interações intermoleculares presentes na cadeia polipeptídica que favorecem reestruturação parcial nas moléculas de gelatina na forma de hélice-bobina (DUCONSEILLE et al., 2017; YAKIMETS et al., 2005). Este aspecto de transição das moléculas de gelatinas pode também explicar o fato de que os poros apresentam tamanho mais homogêneo pois as forças envolvidas nas mudanças de conformação aliadas à reticulação permitem a formação de um gel mais resistente.

4.4.5 Porosidade

A porosidade calculada a partir de fórmulas teóricas foi de $42,4 \pm 7,5\%$ para o suporte GG e $28 \pm 3,8\%$ para o suporte GC.

Como pode ser claramente observada nas micrografias MEV dos suportes, a perspectiva é completamente diferente, onde suporte GC é aparentemente mais poros e com poros mais nítidos. No entanto, como já foi discutido, as interconexões entre os poros desta estrutura são claramente reduzidas e a maior parte dos poros visíveis, possui parede fechada. Isto parece estar relacionado com a baixa porosidade calculada pois a parede dos poros dificulta a permeação de líquidos até seu interior.

Outro fator interferente pode ser a concentração do polímero, pois de acordo com Wu et al. (2010) a porosidade de estruturas aeradas, feitas a partir de várias concentrações de gelatina aumentou quase linearmente com a diminuição da concentração do biopolímero. O motivo é simples, uma vez que a fração de volume real ocupada pelo próprio material diminuiu quando a concentração de gelatina caiu.

4.4.6 Reticulação

A Tabela 4 mostra os dados relativos ao grau de reticulação nas amostras. A reticulação ocorreu de forma mais significativa, no suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído 48,8% \pm 0,5% enquanto que se detectou um pequeno grau de reticulação para os suportes usados como controles 7,7% e 8,7% para GG (C) e GC (C) respectivamente. Já para o suporte composto de GEL/AGS curiosamente o grau de reticulação ficou em torno de 12,6%.

Tabela 4 - Grau de reticulação dos suportes GG e GC obtidos pelo teste de ninidrina.

Amostra	(%) Reticulação
GG (C)	7,7% \pm 0,2% ^a
GG	48,8% \pm 0,5% ^c
GC (C)	8,7% \pm 5,6% ^a
GC	12,6% \pm 2,3% ^b

Legenda: GG - suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído a 0,25%. GC - suporte composto de gelatina alginato reticulado com Ca²⁺; GG (C) - suporte GG controle não reticulado; GC (C) - suporte GC (C) controle não reticulado. Letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média \pm DP).

O aumento da concentração de GTA, tem sido relatado por conduzir ao maior grau de reticulação da rede de hidrogel de GEL (PAN et al., 2016; SAARAI et al., 2013) proporcionando moléculas mais rígidas com estruturas menos ordenadas (CORREIA et al., 2013). Vale ressaltar que a reação da ninidrina, utilizada para quantificar o grau de reticulação nas amostras, detecta a presença de grupos α -amino livres nos aminoácidos, grupos amino terminais de peptídeos e proteínas e o grupo ϵ -amino da lisina (KALE; BAJAJ, 2010;

SALERNO et al., 2018). Portanto este método não quantifica a reticulação do AGS por Ca^{2+} mas sim as interações a nível molecular na gelatina acarretariam tais respostas tanto para o suporte GC como também, mas em menor grau nos suportes controle.

Xing et al. (2015) afirmam que a gelatina contém quantidades traço de íons metálicos divalentes, como Cu^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+} , que desempenham papéis importantes na formação da rede do gel, formando ligações iônicas com grupos de ácidos carboxílicos nas cadeias moleculares da gelatina o que explica o fato de mesmo os suportes utilizados como controle terem um certo grau de reticulação. Além disso, durante o processo de gelificação, os peptídios da GEL se agregam e se reticulam fisicamente entre si para formar o gel. Alguns grupos de ácido carboxílico com carga negativa também atraem grupos amina carregados positivamente através de interações eletrostáticas.

Para Sisson et al. (2009) sem reticulação, suportes de colágeno e gelatina se dissolvem em meios aquosos, tornando-os inadequados para aplicações de longo prazo. De modo que, de acordo com os resultados, o suporte GG por ter maior grau de reticulação poderá apresentar maior estabilidade frente aos demais.

4.4.7 Resistência à compressão

A Figura 18 mostra as diferenças nos valores de resistência à deformação compressiva entre os dois suportes e seus respectivos controles. Em comparação com o controle, o suporte GG se mostrou significativamente mais resistente. Estes resultados podem ser atribuídos às interações da molécula de gelatina com o reticulante.

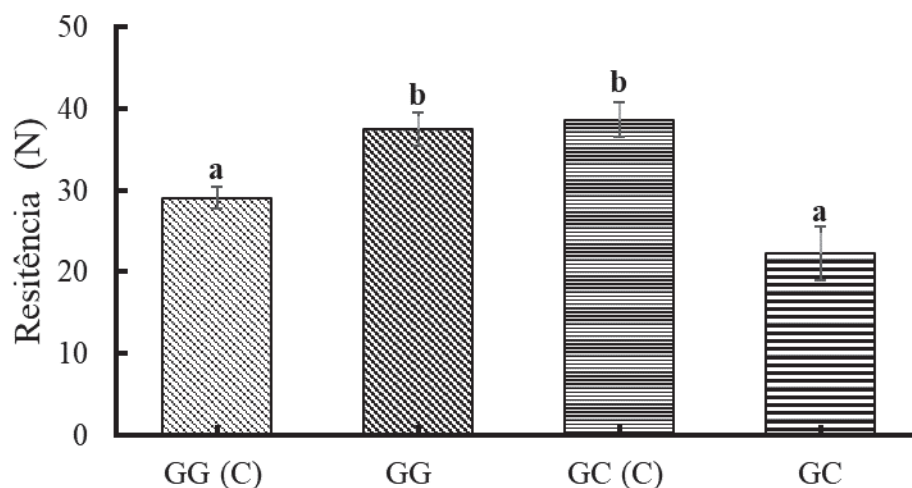
Em seu estudo sobre a formação de suportes de gelatina/alginato reticulas, Pan et al. (2016) relatam que suportes reticulados com CaCl_2 foram mais flexíveis do que os reticulados com GTA e a reticulação com GTA aumentou a rigidez dos suportes progressivamente com o aumento da concentração de GTA. Contudo a reticulação excessiva pode reduzir a resistência à compressão pois à medida que aumenta o grau de reticulação, a estrutura torna-se quebradiça (WU et al., 2010).

A caracterização da estrutura do suporte demonstrou que a reticulação com GTA forneceu uma estrutura externa e interna satisfatória, enquanto que os suportes tratados com CaCl_2 não foram suficientemente fortes.

As respostas reladas pelos autores corroboram com o fato de que o suporte composto GC mostrou ser menos resistente. Essa diferença também pode ser devida

ao processo de aeração do suporte, pois com a incorporação de ar e aumento da porosidade pode ocorrer colapso da estrutura frente a forças compressivas. De fato, as paredes mais finas dos poros de GC, indicadas pela análise morfológica, podem ter acarretado sua menor resistência.

Figura 18 - Resistência à compressão dos suportes GG e GC.



Legenda: GG - suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído a 0,25%. GC - suporte composto de gelatina alginato reticulado com Ca^{2+} . GG (C) e GC (C) correspondem a amostras controle não reticuladas. Letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

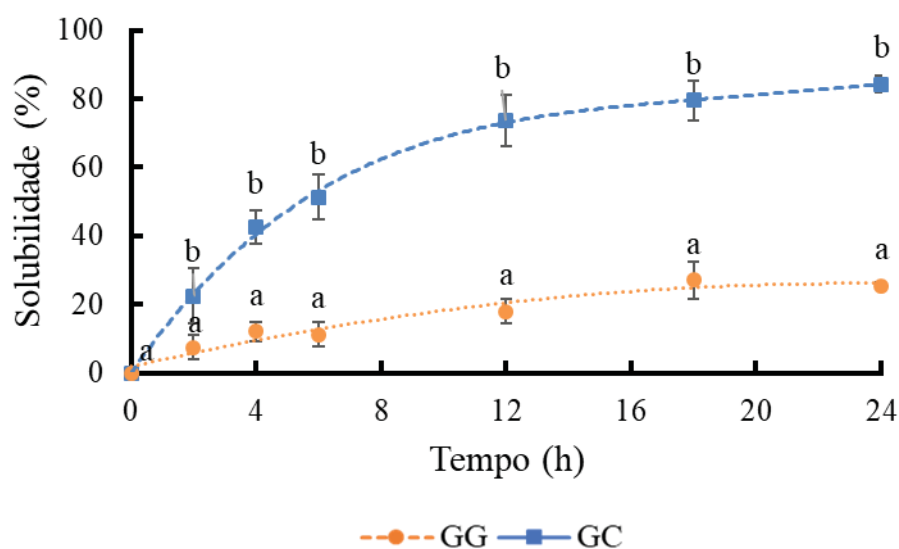
A estrutura macroporosa desempenha um papel determinante nas propriedades mecânicas de suportes, de modo que um suporte para imobilização de enzimas deverá sofrer várias tensões durante a operação, mantendo sua integridade e, conseqüentemente, a enzima agregada (CANTONE et al., 2013; PAN et al., 2016). Nesse sentido, é possível aperfeiçoar a resistência à compressão dos suportes aumentando a concentração ou utilizando diferentes proporções entre os biopolímeros, alterando a quantidade de agente reticulante ou selecionando alginatos com maior peso molecular (CZERNER et al., 2016; LIU; MA, 2009; MOGHARABI et al., 2012; PANG et al., 2014).

4.4.8 Solubilidade

A solubilidade dos suportes a pH 5,5 e temperatura de 50°C é uma propriedade importante que determina a estabilidade das amostras sob condições operacionais. A Figura 19 descreve a degradação de ambos os suportes no decorrer do tempo.

O grau de degradação aumentou com o tempo para ambos os suportes. Porém o suporte GC, composto por GEL/AGS teve maior solubilização, em torno de $84\% \pm 2,4\%$, em comparação com o suporte GG que apresentou solubilidade de $25,5\% \pm 1\%$, após 24 h em tampão fosfato de sódio. Tal padrão de degradação, relaciona-se ao grau de reticulação, como também à interação entre os polímeros.

Figura 19 - Solubilidade dos suportes GG e GC.



Legenda: GG - suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído a 0,25%. GC - suporte composto de gelatina alginato reticulado com Ca^{2+} . Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si a nível de 95% de confiança (Média \pm DP).

Qiao et al. (2017) relatam que uma das desvantagens da gelatina em relação a aplicações de longo prazo é que a proteína se dissolve rapidamente em um ambiente aquoso. A reticulação com glutaraldeído tem sido empregada para superar essa limitação (BIGI et al., 2001; KANOKPANONT et al., 2012).

Como tem sido discutido, a presença do AGS reticulado na proporção utilizada não teria sido suficiente para manter a estrutura do suporte.

Sarai et al. (2013) informaram que o aumento da concentração de AGS aumentou o tempo de dissolução de esferas, isso pode ser atribuído ao aumento do número de locais de ligação de íons Ca^{2+} , resultando na formação de uma rede mais estável e densa. A literatura cita casos onde gelatina tratada com CaCl_2 não foi reticulada, de modo que as estruturas se colapsaram facilmente, enquanto que concentrações crescentes de GTA levam a uma diminuição da taxa de degradação, mostrando que os métodos de reticulação desempenharam um papel vital no comportamento de degradação (PAN et al., 2016). Portanto, a maior

solubilidade do suporte GC provavelmente deveu-se ao fato de que o baixo teor de AGS no hidrogel foi insuficiente para formar uma rede coerente interligada com os íons Ca^{2+} , o que levou à formação de hidrogéis com propriedades mecânicas precárias e mesmo a dissolução lenta (SAARAI et al., 2013).

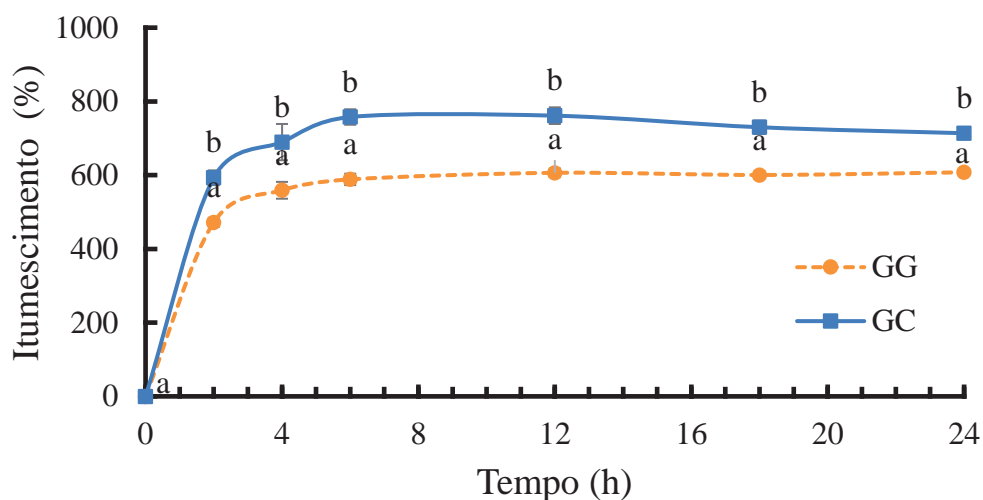
Voo et al. (2015) verificaram que esferas de alginato de cálcio a 2% (m/v) permaneceram intactas após incubação na solução de HCl (pH 1,2) durante 2 h, enquanto que foram dissolvidas em solução tampão fosfato (pH 7,4). Embora essas não sejam as mesmas condições de ensaio aqui empregadas, tal comportamento sugere que a força iônica do tampão tenha favorecido a dissolução com base na troca iônica entre os íons Na^+ presentes na solução do tampão fosfato e os íons Ca^{2+} que estavam ligados ao alginato do suporte GC (XING et al., 2015). Além disso, a reticulação de AGS depende da difusão de Ca^{2+} da superfície em direção ao núcleo, ocorrendo devagar devido à resistência à difusão de Ca^{2+} nesta região. Assim, a reticulação ou gelificação tende a não ser uniforme em todas as partes do suporte (VOO et al., 2015).

4.4.9 Intumescimento

Os comportamentos de intumescimento dos suportes GG e GC em função do tempo estão representados na

Figura 20.

Figura 20 - Padrão de intumescimento dos suportes GG e GC.



Legenda: GG - suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído a 0,25%. GC - suporte composto de gelatina alginato reticulado com Ca^{2+} . Letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

Como pode ser visto, ambos os suportes apresentaram absorção de água, provavelmente devido à porosidade presente nas amostras atuar facilitando a difusão de líquidos para seu interior que hidratarão mais facilmente as cadeias poliméricas (PATEL et al., 2018; WU et al., 2010). A rede de polímero de gelatina é altamente hidrofílica, absorvendo água através de ligações de hidrogênio formadas entre moléculas de água e ácido carboxílico e grupos amino (XING et al., 2015).

O intumescimento da matriz porosa pode desempenhar um papel importante permitindo a transferência do substrato no interior do suporte e o contato enzima-substrato. (GARCIA-GALAN et al., 2011). É relatado também que o intumescimento aumenta o tamanho dos poros e a porosidade total, maximizando assim a área de superfície interna para infusão. No entanto, o intumescimento deve ser controlado, sob o risco de causar o enfraquecimento e rápida degradação do suporte (MAJI et al., 2016).

Após a imersão em meio durante 6 h, tanto o suporte GG reticulado com GTA como o suporte GC reticulado com Ca^{2+} atingiram o seu ponto de equilíbrio de expansão. A razão de intumescimento do suporte GC atingiu $713 \pm 15,5\%$, enquanto que para o suporte GG foi de apenas $607 \pm 10,6\%$, após 24 h. Esse fato pode estar relacionado ao grau de reticulação mostrando que o GTA foi mais efetivo na reticulação da amostra frente ao Ca^{2+} .

Pan et al. (2016) relatam que em comparação com CaCl_2 , suportes compostos de GEL/AGS reticulados com GTA em concentrações maiores que 0,25% intumesceram muito menos, devido a atenuação da restauração viscoelástica, de modo que o tempo necessário para os suportes tratados com GTA a 0,25% atingirem o equilíbrio de expansão foi de cerca de 5 h. Bigi et al. (2001) informaram ainda que o processo de reticulação de GEL com GTA proporcionou uma redução significativa do intumescimento, o que deveria ser causado pelos diferentes graus de reticulação. Por outro lado, o maior grau de intumescimento apresentado pelo suporte GC pode estar relacionado a dois fatores: reticulação insuficiente do AGS pelo Ca^{2+} como revelado pelas análises de FTIR, TGA e DSC; ou isso também pode estar relacionado a baixa concentração em massa de AGS na matriz, pois sendo função do AGS criar uma rede que mantenha a estrutura do gel de GEL, a concentração empregada pode não ter sido suficiente para manter as propriedades ideais. Deve-se notar que a reticulação física de hidrogéis derivados de gelatina e alginato induz apenas a forças físicas secundárias fracas,

proporcionando uma estrutura de rede solta e exibindo força mecânica insuficiente após a absorção de líquido. Como resultado, eles se dissolvem (SAARAI et al., 2013).

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, as enzimas α -amilase e glicoamilase foram coimobilizadas em dois tipos de suportes: um composto de gelatina reticulada com glutaraldeído (GG) e outro composto por gelatina/alginato de cálcio reticulado com Ca^{2+} (GC). Os resultados obtidos demonstraram que:

- a) as enzimas livres apresentaram comportamento similar quanto aos parâmetros de pH e temperatura ótimos, permitindo sua coimobilização;
- b) após a coimobilização, em ambos os imobilizados, a temperatura ótima foi mais elevada;
- c) o pH ótimo das enzimas coimobilizadas no suporte de gelatina reticulada com glutaraldeído foi deslocado de 5,5 para 5.
- d) o aumento gradual da concentração do reticulante glutaraldeído reduziu a atividade enzimática assim como o contato por período superior a 3 h
- e) o rendimento e a eficiência de imobilização foram satisfatórios, sendo superiores a 90%;
- f) os imobilizados puderam ser reutilizados em até 8 ciclos de hidrólise consecutivos;
- g) comparado com as enzimas livres, os imobilizados foram mais eficientes na sacarificação;
- h) os suportes apresentaram boa interação química entre seus componentes;
- i) os suportes apresentaram morfologia porosa, mas a porosidade efetiva foi relativamente baixa devidos às fortes interações entre seus constituintes;
- j) A reticulação não afetou o comportamento térmicos dos suportes, mas teve impacto em sua resistência mecânica, solubilidade e intumescimento.

À luz dos resultados obtidos neste trabalho, é possível inferir que a coimobilização de amilases é um procedimento profícuo, pois pode permitir melhorias na eficiência catalítica em reações enzimáticas em cadeia. Pode-se ainda estabelecer o suporte reticulado com GTA como o mais indicado para uso na coimobilização. Todavia a coimobilização em suporte composto GC também apresentou características promissoras quanto à atividade catalítica, embora sua maior instabilidade estrutural seja um ponto crítico.

Sob esta perspectiva, propõe-se para futuros estudos, otimizar a composição do suporte GC avaliando outras concentrações de alginato/gelatina bem como o uso de outros reticulantes. Além disso, a otimização da concentração de enzima imobilizada para obter a conversão máxima do substrato em produto e avaliar a estabilidade ao armazenamento tornam-se relevante.

REFERÊNCIAS

ABAHÁZI, E.; BOROS, Z.; POPPE, L. Additives enhancing the catalytic properties of lipase from burkholderia cepacia immobilized on mixed-function-grafted mesoporous silica gel. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9818–9837, 8 jul. 2014.

AHMED, S. A.; MOSTAFA, F. A.; OUIS, M. A. Enhancement stability and catalytic activity of immobilized α -amylase using bioactive phospho-silicate glass as a novel inorganic support. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 371–382, jun. 2018.

AKHOND, M. et al. Efficient immobilization of porcine pancreatic α -amylase on amino-functionalized magnetite nanoparticles: characterization and stability evaluation of the immobilized enzyme. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 180, n. 5, p. 954–968, nov. 2016.

ASHLY, P. C.; JOSEPH, M. J.; MOHANAN, P. V. Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (panis). **Food chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1808–1813, ago. 2011.

BAI, Y.X.; LI, Y.F.; WANG, M.T. Study on synthesis of a hydrophilic bead carrier containing epoxy groups and its properties for glucoamylase immobilization. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, n. 4, p. 540–547, ago. 2006.

BARBOSA, E. F. **Avaliação da atividade da invertase de saccharomyces cerevisiae imobilizada em polianilina sobre o caldo de cana**. [dissertação]—goiânia: universidade federal de goiás, 2009.

BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer degradation and stability**, v. 79, n. 1, p. 147–152, jan. 2003.

BEZERRA, C. S. et al. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: past, present, and future trends. **Journal of applied polymer science**, v. 132, n. 26, p. n/a-n/a, 10 jul. 2015.

BIGI, A. et al. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 763–768, abr. 2001.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in science**, v. 1, n. 1–6, p. 41–55, maio 2014.

BOATENG, J. et al. Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 63–71, ago. 2015.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, nov. 2009.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. in: guisan, j. m. (ed.). **Immobilization of enzymes and cells**. totowa, nj: humana press, 2013. v. 1051p. 15–31.

BRYJAK, J. Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. **Biochemical engineering journal**, v. 16, n. 3, p. 347–355, dez. 2003.

CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **chemical society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262, 2013.

CHANDRASEKARAN, M. (ed.). **Valorization of food processing by-products**. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2012.

CHEN, H. et al. The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized β -galactosidase on chitosan bead. **Advance journal of food science and technology**, v. 5, n. 7, p. 932–935, 2013.

COPPOLA, M.; DJABOUROV, M.; FERRAND, M. Unified phase diagram of gelatin films plasticized by hydrogen bonded liquids. **Polymer**, v. 53, n. 7, p. 1483–1493, mar. 2012.

CORREIA, D. M. ET AL. Thermal and hydrolytic degradation of electrospun fish gelatin membranes. **Polymer testing**, v. 32, n. 5, p. 995–1000, ago. 2013.

CUADROS, T. R.; ERICES, A. A.; AGUILERA, J. M. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 46, p. 331–342, jun. 2015.

CZERNER, M. et al. Deformation and fracture behavior of physical gelatin gel systems. **food hydrocolloids**, v. 60, p. 299–307, out. 2016.

DA RÓS, P. C. M. et al. Evaluation of the catalytic properties of burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5508–5516, jul. 2010.

DAI, Z. **co-immobilization of thermostable alpha-amylase and glucoamylase for Starch hydrolysis**. dissertação—[s.l.] ohio state university, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **química de alimentos de fennema (4a. ed.)**. [s.l.] grupo a - artmed, 2000.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, fev. 2013.

DEB, P. et al. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from bacillus amyloliquefaciens p-001. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 154, 2013.

DEVI, N.; KAKATI, D. K. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of food engineering**, v. 117, n. 2, p. 193–204, jul. 2013.

DÍAZ-CALDERÓN, P. et al. Molecular configuration of gelatin–water suspensions at low concentration. **Food hydrocolloids**, v. 39, p. 171–179, ago. 2014.

DONG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. **Journal of membrane science**, v. 280, n. 1–2, p. 37–44, set. 2006.

DUCONSEILLE, A. et al. The effect of origin of the gelatine and ageing on the secondary structure and water dissolution. **Food hydrocolloids**, v. 66, p. 378–388, maio 2017.

ERTAN, F.; YAGAR, H.; BALKAN, B. Optimization of α -amylase immobilization in calcium alginate beads. **preparative biochemistry and biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 195–204, maio 2007.

EVSTATIEVA, Y. et al. Sol–gel immobilization as a suitable technique for enhancement of α -amylase activity of *aspergillus oryzae* pp. **Biotechnology & biotechnological equipment**, v. 28, n. 4, p. 728–732, 4 jul. 2014.

FARRIS, S.; SONG, J.; HUANG, Q. Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 2, p. 998–1003, 27 jan. 2010.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, dez. 2013.

FRANSSEN, M. C. R. et al. Immobilised enzymes in biorenewables production. **Chemical society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6491, 2013.

FRAZIER, S. D.; SRUBAR, W. V. Evaporation-based method for preparing gelatin foams with aligned tubular pore structures. **Materials science and engineering: c**, v. 62, p. 467–473, maio 2016.

FREEDONIA GROUP. **world enzymes**, 2016. disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/documentdetails.aspx?referrerid=rf-prnews&studyid=3417>>. Acesso em: 18 out. 2016

FU, K.; LU, D. Reaction kinetics study of α -amylase in the hydrolysis of starch size on cotton fabrics. **the journal of the textile institute**, v. 105, n. 2, p. 203–208, fev. 2014.

GAN, Z. et al. Temperature-triggered enzyme immobilization and release based on cross-linked gelatin nanoparticles. **Plos one**, v. 7, n. 10, p. e47154, 10 out. 2012.

GANGADHARAN, D. et al. Immobilized bacterial α -amylase for effective hydrolysis of raw and soluble starch. **food research international**, v. 42, n. 4, p. 436–442, maio 2009.

GARCIA-GALAN, C. ET AL. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced synthesis & catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, nov. 2011.

GUPTA, K. et al. Immobilization of α -amylase and amyloglucosidase onto ion-exchange resin beads and hydrolysis of natural starch at high concentration. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 11, p. 1715–1724, nov. 2013.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **process biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, jun. 2003.

GÜR, S. D.; IDIL, N.; AKSÖZ, N. Optimization of enzyme co-immobilization with sodium alginate and glutaraldehyde-activated chitosan beads. **applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, n. 2, p. 538–552, fev. 2018.

GÜRSEL, A. et al. Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting h-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. **Reactive and functional polymers**, v. 57, n. 1, p. 57–65, nov. 2003.

HASHIM, D. M. et al. Potential use of fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. **Food chemistry**, v. 118, n. 3, p. 856–860, fev. 2010.

HOMAEI, A. Enzyme immobilization and its application in the food industry. in: rai v, r. (ed.). **Advances in food biotechnology**. chichester, uk: john wiley & sons ltd, 2015. p. 145–164.

JADHAV, S. B.; SINGHAL, R. S. Co-conjugation vis-à-vis individual conjugation of α -amylase and glucoamylase for hydrolysis of starch. **carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 1191–1197, out. 2013.

JAIWAL, N. et al. α -amylase immobilization on gelatin: optimization of process variables. **Journal of genetic engineering and biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 161–167, jun. 2012.

JAIWAL, N.; PRAKASH, O. Immobilization of soybean α -amylase on gelatin and its application as a detergent additive. **Asian journal of biochemistry**, v. 6, n. 4, p. 337–346, 1 abr. 2011.

JALAJA, K. et al. Fabrication of cationized gelatin nanofibers by electrospinning for tissue regeneration. **Rsc advances**, v. 5, n. 109, p. 89521–89530, 2015.

JALAJA, K. et al. Potential of electrospun core-shell structured gelatin-chitosan nanofibers for biomedical applications. **carbohydrate polymers**, v. 136, p. 1098–1107, jan. 2016.

JIN, W. et al. Polyphenol-gelatin nanoparticles as reductant and stabilizer for one-step synthesis of gold nanoparticles and their interfacial behavior. **Rsc advances**, v. 5, n. 34, p. 26496–26503, 2015.

KALE, R. N.; BAJAJ, A. N. Ultraviolet spectrophotometric method for determination of gelatin crosslinking in the presence of amino groups. **Journal of young pharmacists**, v. 2, n. 1, p. 90–94, jan. 2010.

KANOKPANONT, S. et al. An innovative bi-layered wound dressing made of silk and gelatin for accelerated wound healing. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 141–153, out. 2012.

KIKANI, B. A.; PANDEY, S.; SINGH, S. P. Immobilization of the α -amylase of bacillus amyloliquifaciens tswk1-1 for the improved biocatalytic properties and solvent tolerance. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 5, p. 567–577, maio 2013.

LI, C.; MU, C.; LIN, W. Novel hemocompatible nanocomposite hydrogels crosslinked with methacrylated gelatin. **Rsc advances**, v. 6, n. 49, p. 43663–43671, 2016.

LI, J. et al. Spontaneous and efficient adsorption of lysozyme from aqueous solutions by naturally polyanion gel beads. **Materials science and engineering: c**, v. 76, p. 130–138, jul. 2017.

LI, X. D. et al. Preparation of cross-linked glucoamylase aggregates immobilization by using dextrin and xanthan gum as protecting agents. **Catalysts**, v. 6, n. 6, p. 77, 25 maio 2016.

LI, Y. ET AL. Sodium alginate–gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity. **Journal of membrane science**, v. 375, n. 1–2, p. 304–312, jun. 2011.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**. são paulo: edgard blücher, 2005.

LIN, J. et al. Physico-mechanical properties of gelatin films modified with lysine, arginine and histidine. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 947–952, mar. 2018.

LIU, L. H. et al. Enzyme immobilized on nanoporous carbon derived from metal-organic framework: a new support for biodiesel synthesis. **Chemoschem**, v. 10, n. 7, p. 1364–1369, 10 abr. 2017.

LIU, X.; MA, P. X. Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. **biomaterials**, v. 30, n. 25, p. 4094–4103, set. 2009.

LIU, Y. et al. Skin collagen fiber-based radar absorbing materials. **Chinese science bulletin**, v. 56, n. 2, p. 202–208, jan. 2011.

LOPRESTO, C. G. et al. Enzymatic transesterification of waste vegetable oil to produce biodiesel. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 121, p. 229–235, nov. 2015.

MAJI, K. et al. Preparation and evaluation of gelatin-chitosan-nanobioglass 3d porous scaffold for bone tissue engineering. **International journal of biomaterials**, v. 2016, p. 1–14, 2016.

MALLAMACE, F. et al. The role of water in protein's behavior: the two dynamical crossovers studied by nmr and ftir techniques. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 13, p. 33–37, 2015.

MARKETS AND MARKETS. **Industrial enzymes market by type (amylases, cellulases, proteases, lipases, and phytases), application (food & beverages, cleaning agents, and animal feed), source (microorganism, plant, and animal), and region - global forecast to 2022**, 2016. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/market-reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>> Acesso em: mai. 2016.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, maio 2007.

MENDES, A. A. et al. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. **Quim. nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–796, 798–802, nov. 2004.

MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. **Bioresource technology**, v. 115, p. 126–135, jul. 2012.

MILLÁS, A. L. G. **Instalação da tecnologia de electrospinning para a produção e caracterização de nanofibras de celulose incorporadas com óleos naturais**. dissertação—campinas: unicamp, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MILLER, L. M.; BOURASSA, M. W.; SMITH, R. J. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. **Biochimica et biophysica acta (bba) - biomembranes**, v. 1828, n. 10, p. 2339–2346, out. 2013.

MINGANYU ET AL. Facile fabrication of 3d porous hybrid sphere by co-immobilization of multi-enzyme directly from cell lysates as an efficient and recyclable biocatalyst for asymmetric reduction with coenzyme regeneration in situ. **International journal of biological macromolecules**, maio 2017.

MOGHARABI, M. et al. Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & biotechnological equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 4 mar. 2015.

MORGANTI, P. et al. Chitin nanofibrils for biomimetic products: nanoparticles and nanocomposite chitosan films in health care. in: **Marine biomaterials: characterization, isolation and applications**. boca raton, fla.: crc press, 2013. p. 817.

MORSY, R. et al. Developing and physicochemical evaluation of cross-linked electrospun gelatin–glycerol nanofibrous membranes for medical applications. **Journal of molecular structure**, v. 1135, p. 222–227, maio 2017.

MUKHERJEE, I.; ROSOLEN, M. Thermal transitions of gelatin evaluated using dsc sample pans of various seal integrities. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 114, n. 3, p. 1161–1166, 1 dez. 2013.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Magnetic macromolecular cross linked enzyme aggregates (cleas) of glucoamylase. **Enzyme and microbial technology**, v. 83, p. 78–87, fev. 2016.

NISHA S; ARUN KARTHICK S; GOBI N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical science review and letters**, p. 148–155, 2012.

OLIVEIRA, A. P. A. et al. Production and catalytic properties of amylases from *lichtheimia ramosa* and *thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The scientific world journal**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

PAN, T. et al. 3D bioplotting of gelatin/alginate scaffolds for tissue engineering: influence of crosslinking degree and pore architecture on physicochemical properties. **Journal of materials science & technology**, v. 32, n. 9, p. 889–900, set. 2016.

PANG, Z. et al. Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. **food hydrocolloids**, v. 35, p. 484–493, mar. 2014.

PARK, D. et al. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. **process biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 53–61, jan. 2005.

PASCOAL, A. M.; MITIDIARI, S.; FERNANDES, K. F. Immobilisation of α -amylase from *aspergillus niger* onto polyaniline. **food and bioproducts processing**, v. 89, n. 4, p. 300–306, out. 2011.

PATEL, S. et al. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1888–1897, fev. 2018.

PAULA, A. V. et al. Comparação do desempenho da lipase de *candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química nova**, v. 31, n. 1, p. 35–40, 2008.

PEÑA, C. et al. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. **Bioresource technology**, v. 101, n. 17, p. 6836–6842, set. 2010.

PENG, H. T.; MARTINEAU, L.; SHEK, P. N. Hydrogel–elastomer composite biomaterials: 1. preparation of interpenetrating polymer networks and in vitro characterization of swelling stability and mechanical properties. **Journal of materials science: materials in medicine**, v. 18, n. 6, p. 975–986, 19 maio 2007.

PEREIRA, S. E.; FERNANDES, K. F.; ULHOA, C. J. Immobilization of *cryptococcus flavus* α -amylase on glass tubes and its application in starch hydrolysis: α -amylase from *c. flavus* has been immobilized and used for starch hydrolysis. **starch - stärke**, v. 69, n. 3–4, p. 1600189, mar. 2017.

PIAO, Y.; CHEN, B. Synthesis and mechanical properties of double cross-linked gelatin-graphene oxide hydrogels. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 791–798, ago. 2017.

POURSAMAR, S. A. et al. Potential application of gelatin scaffolds prepared through *in situ* gas foaming in skin tissue engineering. **International journal of polymeric materials and polymeric biomaterials**, v. 65, n. 6, p. 315–322, 12 abr. 2016.

QIAO, C. et al. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. **Food chemistry**, v. 235, p. 45–50, nov. 2017.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 11, n. 2, p. 369–375, abr. 2010.

ROCHA, J. R. et al. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. **Food chemistry**, v. 95, n. 1, p. 77–82, mar. 2006.

ROMDHANE, I. B.B. et al. Application of a chitosan-immobilized talaromyces thermophilus lipase to a batch biodiesel production from waste frying oils. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 1986–2002, dez. 2013.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. **enzyme and microbial technology**, v. 34, n. 1, p. 26–32, jan. 2004.

RUEDA, N. et al. Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. **the chemical record**, v. 16, n. 3, p. 1436–1455, jun. 2016.

SAARAI, A. et al. On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatine hydrogels. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 18, p. 152–166, fev. 2013.

SALERNO, A. et al. Hybrid gelatin-based porous materials with a tunable multiscale morphology for tissue engineering and drug delivery. **European polymer journal**, v. 99, p. 230–239, fev. 2018.

SAMAL, S. K. et al. Multilayered magnetic gelatin membrane scaffolds. **Acs applied materials & interfaces**, v. 7, n. 41, p. 23098–23109, 21 out. 2015.

SANTOS, B. L. **imobilização de lipase por diferentes técnicas para obtenção de catalisadores estáveis**. dissertação—botucatu: universidade estadual paulista, instituto de biociências de botucatu, 2014.

SANTOS, J. P. et al. Crosslinking agents effect on gelatins from carp and tilapia skins and in their biopolymeric films. **Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects**, v. 539, p. 184–191, fev. 2018.

SARKER, B. et al. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. **Journal of materials chemistry b**, v. 2, n. 11, p. 1470, 2014.

SHARMA, M.; SHARMA, V.; MAJUMDAR, D. K. Entrapment of α -amylase in agar beads for biocatalysis of macromolecular substrate. **International scholarly research notices**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

SHARMA, S. et al. Gallic acid-based alkyl esters synthesis in a water-free system by celite-bound lipase of *b acillus licheniformis* scd11501. **Biotechnology progress**, v. 31, n. 3, p. 715–723, maio 2015.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. soc. rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 27 mar. 2013.

SHEN, Q. et al. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. **Process biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1565–1571, ago. 2011.

SHUKLA, R. J.; SINGH, S. P. Structural and catalytic properties of immobilized α -amylase from *laceyella sacchari* tsi-2. **International journal of biological macromolecules**, v. 85, p. 208–216, abr. 2016.

SINGH, S. et al. Multi-scale carbon micro/nanofibers-based adsorbents for protein immobilization. **Materials science and engineering: c**, v. 38, p. 46–54, maio 2014.

SINGH, V.; KUMAR, P. Carboxymethyl tamarind gum–silica nanohybrids for effective immobilization of amylase. **journal of molecular catalysis b: enzymatic**, v. 70, n. 1–2, p. 67–73, jun. 2011.

SINGH, V.; SINGH, D. Polyvinyl alcohol–silica nanohybrids: an efficient carrier matrix for amylase immobilization. **process biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 96–102, jan. 2013.

SISSON, K. ET AL. Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 7, p. 1675–1680, 13 jul. 2009.

SOHRABI, N.; RASOULI, N.; TORKZADEH, M. Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe_3O_4 nanoparticles. **Chemical engineering journal**, v. 240, p. 426–433, mar. 2014.

SOUZA, PAULA MONTEIRO DE; MAGALHÃES, PÉROLA DE OLIVEIRA E. Application of microbial α -amylase in industry - a review. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850–861, 2010.

SWARNALATHA, V.; ALURI ESTHER, R.; 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, dez. 2013.

TALEKAR, S. et al. a Tri-enzyme magnetic nanobiocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. **chemical engineering journal**, v. 325, p. 80–90, out. 2017.

TAN, I. S.; LEE, K. T. Immobilization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* on κ -carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue. **Bioresource technology**, v. 184, p. 386–394, maio 2015.

TAVANO, O. L. et al. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. characterization of the immobilized enzyme. **process biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1054–1058, jul. 2013.

TONGNUANCHAN, P. et al. Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: physical, structural and thermal properties. **Food hydrocolloids**, v. 48, p. 248–259, jun. 2015.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência rural**, v. 42, n. 7, p. 1327–1332, jul. 2012.

TÜMTÜRK, H. Covalent immobilization of α -amylase onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(styrene -2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres and the effect of Ca^{2+} ions on the enzyme activity. **food chemistry**, v. 68, n. 3, p. 259–266, 15 fev. 2000.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). **report no. 58**. gelatin. . 1979.

UYGUN, M. ET AL. Immobilization of amyloglucosidase onto macroporous cryogels for continuous glucose production from starch. **Journal of biomaterials science, polymer edition**, v. 26, n. 16, p. 1112–1125, 2 nov. 2015.

VAIDYA, S. ET AL. Amylases: a prospective enzyme in the field of biotechnology. **Journal of applied bioscience**, p. 1–18, 2015.

VARGHESE, J. S.; CHELLAPPA, N.; FATHIMA, N. N. Gelatin–carrageenan hydrogels: role of pore size distribution on drug delivery process. **Colloids and surfaces b: biointerfaces**, v. 113, p. 346–351, jan. 2014.

VENGADARAMANA A. Industrial important microbial alpha-amylase on starch-converting process. **Scholars academic journal of pharmacy**, p. 209–221, 2013.

VOO, W. P. et al. Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile. **Rsc advances**, v. 5, n. 46, p. 36687–36695, 2015.

WU, C. et al. Active biocatalysts based on candida rugosa lipase immobilized in vesicular silica. **Process biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 953–959, jun. 2012.

WU, X. et al. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1167–1177, mar. 2010.

XING, Q. et al. Increasing mechanical strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, maio 2015.

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, dez. 2016.

YAKIMETS, I. et al. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12577–12585, dez. 2005.

YAZGAN, i. et al. Modification of chitosan-bead support materials with l-lysine and l-asparagine for α -amylase immobilization. **bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 3, p. 423–434, mar. 2018.

YOU, Y. et al. The retention and drainage behavior of cross-linked gelatin with glutaraldehyde in a papermaking system. **Bioresources**, v. 11, n. 3, 26 mai. 2016.

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

APÊNDICE A – Artigo científico

APLICAÇÃO POTENCIAL DE SCAFFOLD DE GELATINA RETICULADA NA IMOBILIZAÇÃO DE AMILASE

E. G. FROTA^{1*}, J. S. PICCIN^{1,2}, L. M. COLLA^{1,2}

¹Universidade de Passo Fundo, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

²Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia de Alimentos

*e-mail: elioniogfrota@hotmail.com

RESUMO - Neste estudo, utilizou-se um método para produção de scaffolds de gelatina reticulada com glutaraldeído para aplicação na imobilização da enzima α -amilase. Foram aplicadas duas técnicas para a imobilização, oclusão e adsorção, e realizada a reticulação com quatro concentrações de glutaraldeído, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%, e três tempos de contato, 2h, 3h e 4h. O comportamento da enzima foi avaliado pelo método de Miller (1959). Através dos resultados obtidos, verificou-se que o scaffold de gelatina reticulada é uma boa opção de suporte sendo o método de oclusão o mais satisfatório para a imobilização com concentração de 0,25% de glutaraldeído e 3h de reticulação do suporte.

INTRODUÇÃO

A gelatina é uma proteína natural derivada da hidrólise do colágeno que tem apresentado excelentes características para a concepção de biomateriais compatíveis como suportes para células e enzimas (SAMAL et al., 2015). Devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade, a gelatina já é

amplamente utilizada em aplicações farmacêuticas e médicas (SANTORO et al., 2014) sendo um material considerado como um excipiente seguro (GRAS) pela agência americana Food and Drug Administration, não havendo evidências que demonstrem perigo no uso pelo público como alimento ou ingrediente alimentar (FDA, 2017).

A gelatina também possui uma notável capacidade de formação de espuma utilizada pela indústria alimentar para melhorar a elasticidade e a textura dos alimentos (POURSAMAR et al., 2015). Tais características tornam a gelatina uma alternativa atraente para a produção de scaffolds, estruturas porosas que têm sido empregadas na engenharia de tecidos para aplicações em medicina regenerativa.

Vários métodos, incluindo liofilização, eletrospinning, fundição solvente/lixiviação salina, emulsão (HIPE) e formação por gás têm sido utilizados para gerar scaffolds porosos. Esses materiais devem possuir poros homogêneos, com formato regular, interconectados entre si e com propriedades mecânicas adequadas (BARBETTA et al., 2006; DHEGHANI; ANNABI, 2011).

Diferentes materiais têm propriedades para formar um scaffold estável. Materiais com propriedades tensoativas adequadas geralmente possuem uma capacidade de formação de espuma desejável (POURSAMAR et al., 2016a). No entanto, tais materiais podem apresentar baixa estabilidade mecânica que pode ser superada por meio de reticulação, melhorando a estabilidade térmica e mecânica do biopolímero (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012).

Diferentes agentes de reticulação têm sido utilizados para estabilização de

suportes de gelatina, dentre os quais o glutaraldeído, um dos agentes de reticulação mais relatados no campo biomédico devido à sua eficácia demonstrada, apesar de ser conhecido por provocar citotoxicidade (AZAMI et al., 2010; SPEIT et al., 2008).

A biocompatibilidade de materiais colagênicos reticulados com GTA pode ser melhorada pela redução da concentração de soluções de GTA (BIGI et al., 2008; POURSAMAR et al., 2016b).

Gelatina reticulada também tem sido citada como suporte na imobilização de enzimas para aplicações biotecnológicas. A imobilização enzimática neste tipo de material pode ocorrer através da interação covalente da molécula de enzima com os grupos amino livres na gelatina (BEZERRA et al., 2015). Um dos principais problemas enfrentados na imobilização de enzimas utilizando esse suporte é sua reduzida porosidade que pode acarretar problemas difusionais oriundos de impedimento estérico, ocasionado pela estrutura compacta do suporte, com consequente perda de eficiência da reação hidrolítica (JAISWAL et al., 2012).

Deste modo, a utilização de um suporte com porosidade elevada pode ser uma estratégia promissora para obter imobilizados mais eficientes, havendo poucas investigações sobre a aplicação de scaffolds como suporte para a obtenção de

enzimas imobilizadas. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um scaffold de gelatina reticulada para aplicação na imobilização de enzimática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da imobilização foi utilizada a enzima α -amilase (EC 3.2.1.1), Liquozyme® Supra 2.2X cedida pela Novozymes®, que foi imobilizada em gelatina tipo B (índice de Bloom 220) (Biomica Ind. e Com. de Prod. Ltda.) por meio de reticulação com glutaraldeído (Dinâmica Ltda.). Todos os reagentes utilizados no processo de imobilização e ensaios posteriores foram de pureza analítica PA.

Preparo do scaffold de gelatina

Os scaffolds de gelatina foram preparados de acordo com a metodologia de formação por gás descrita por Poursamar et al. (2016) com modificações em que uma solução aquosa de gelatina a 20% m/v foi preparada por dissolução da quantidade apropriada de gelatina em tampão fosfato pH 5,5 a 50 ° C. A solução de gelatina foi então aerada em agitador mecânico tipo turrax (Tecnal, Turratec TE-102) a 14.000

rpm por 10 minutos. Posteriormente a solução aerada foi moldada, até uma altura de 5 mm, em placas de vidro previamente resfriadas que foram transferidas para um congelador (-20 ° C) durante 5 min até sua completa solidificação. As amostras solidificadas foram então removidas dos moldes e cortadas em 1,5 mm de aresta.

Métodos de Imobilização

Oclusão: na imobilização por oclusão, após a aeração da solução de gelatina, 1 mL de enzima foi adicionado à gelatina sob agitação até sua homogeneização na solução. O imobilizado obtido com tamanho de partícula de 1,5 x 1,5 x 5 mm foi reticulado por imersão em solução de glutaraldeído nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1% em períodos que variaram de 2h, 3h e 4h. Em seguida as amostras foram triplamente lavadas com solução tampão e armazenadas a 4 °C.

Adsorção: na abordagem por adsorção, os scaffolds previamente preparados e cortados foram reticulados em soluções de glutaraldeído nas concentrações, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1% por de 2h, 3h e 4h. Decorridos os tempos de reticulação, as amostras foram triplamente lavadas com solução tampão,

para a remoção do reticulante residual e colocadas em contato com 1 mL da enzima por um período de 1h sob agitação. Após o tempo de contato as amostras foram novamente lavadas com o intuito de remover o biocatalisador não adsorvido à superfície do suporte.

Ensaio de Atividade Enzimática

A atividade enzimática dos imobilizados foi determinada pelo método de Miller (1959) que se baseia na quantificação de açúcares redutores liberados durante a reação de hidrólise enzimática utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A determinação da atividade enzimática foi realizada através da incubação das amostras em solução de amido 1%, como substrato, por 30 min a 50°C. A reação foi paralisada com adição de 5 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e aquecimento a 100 °C por 10 min. Então 1 mL do hidrolisado foi posto para reagir com 1 mL de DNS durante 5 minutos a 100 °C, sendo posteriormente resfriado por 10 min. A alíquota foi avolumada para 10 mL e a leitura realizada em 546 nm.

As unidades de atividade amilolítica (U) foram expressas com base em uma curva padrão de glicose traçada através do mesmo método de DNS. Uma unidade (U) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para

liberar 1 µmol de açúcares redutores (estimados como glicose) por minuto sob condições padrão de pH e temperatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

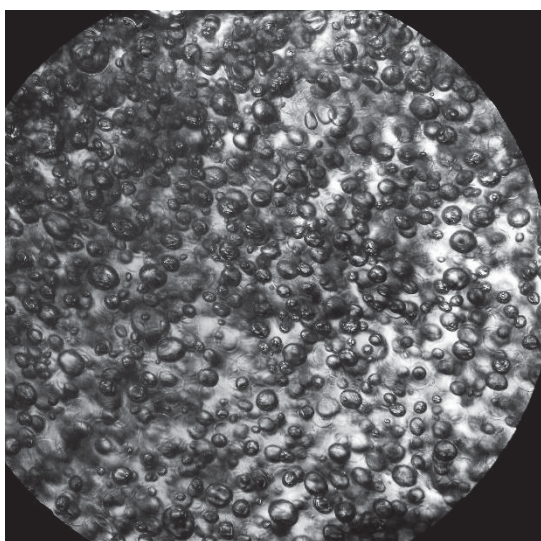
O processo de formação de espuma de gás utiliza a nucleação e o crescimento de bolhas de gás (fase interna) dispersas em todo um polímero (fase contínua). As bolhas de gás podem ser geradas *in situ* quer através de uma reação química ou pela adição de um gás inerte à fase de polímero a baixa ou alta pressão (BARBETTA et al., 2009; 2010).

A Figura 1 apresenta o efeito da rotação através da incorporação de gás na matriz polimérica por agitação mecânica em alta velocidade obtendo um suporte poroso, onde pode ser observada uma dispersão de ar relativamente homogênea.

Uma maior porosidade na matriz para imobilização, pode, em muitos casos, ter um impacto positivo no comportamento enzimático, já que em substratos muito compactos a difusão do substrato dentro da partícula de suporte pode ser mais lenta, conseqüentemente as enzimas no núcleo da partícula não receberão a mesma concentração de substrato que a enzima próxima à superfície da partícula (DWEVEDI, A., 2016; RODRIGUES et al., 2013).

De acordo com Gómez-Guillén et al. (2011) a gelatina pode ser processada utilizando o método de formação por gás, em estruturas porosas sem a necessidade de surfactantes e agentes espumantes adicionais. No entanto, mostrou-se que a reticulação é um elemento importante na produção de scaffolds de gelatina através da técnica de formação por gás *in situ* e é crítica na preservação da estrutura porosa do scaffold. (POURSAMAR et al., 2015).

Figura 1: Micrografia óptica (X100) mostrando aspecto da aeração do scaffold



Farris et al. (2010) relatam que o glutaraldeído é, de longe, a molécula de reticulação mais utilizada devido ao seu baixo custo e excelente eficiência na estabilização de materiais colagenosos permitindo alcançar uma clara melhora das propriedades mecânicas, térmicas, de

resistência à água com citotoxicidade reduzida quando utilizado em concentrações muito baixas.

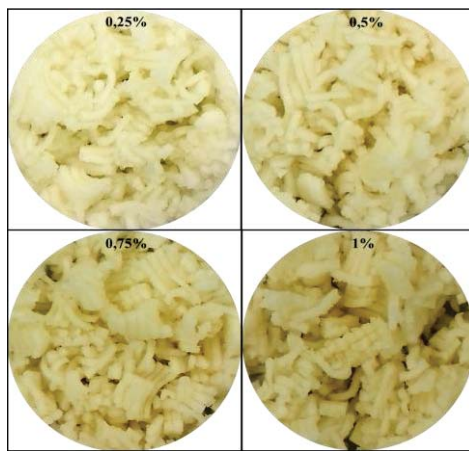
Através dos experimentos realizados, observou-se que com o aumento da concentração as partículas apresentaram maior rigidez e aumento do ponto de fusão, tornando-as resistentes a temperaturas maiores que 30°C. Isso ocorre porque o glutaraldeído conduz uma reação química de reticulação com a gelatina reduzindo drasticamente a solubilidade em água dos filmes de colágeno. (CHAIBI et al., 2015)

A reticulação ocorre através da formação de bases de Schiff com os grupos ϵ -amino não protonados da lisina e da hidroxilisina e os grupos amino do aminoácido N-terminal, o que dá uma coloração levemente amarelada no polímero (Figura 2) (FARRIS; SONG; HUANG, 2010).

O glutaraldeído tem sido utilizado como agente de reticulação, bem como agente de acoplamento enzimático. No caso da imobilização de enzimas em suporte de gelatina, a reação com o glutaraldeído envolve o aprisionamento físico e a ligação covalente (KHARKRANG; AMBASHT, 2013), de modo que o glutaraldeído é utilizado como o agente que liga a enzima com a gelatina (KUMAR et al., 2005).

As figuras 3 e 4 mostram o comportamento da enzima α -amilase imobilizada em scaffold de gelatina considerando sua reticulação em concentrações crescentes de glutaraldeído sob três diferentes tempos de reticulação.

Figura 2: Aspecto do scaffold submetido a reticulação.

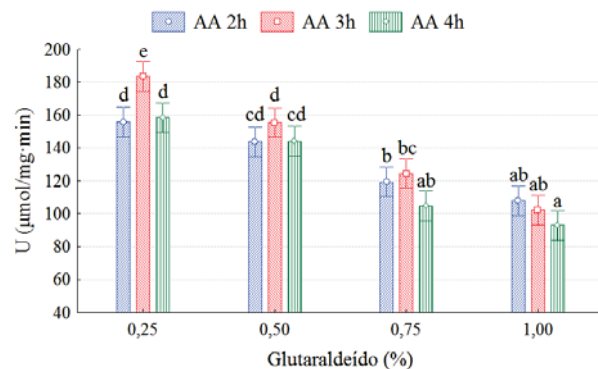


Observa-se na figura 3, correspondente à enzima imobilizada por oclusão na matriz polimérica, que conforme a concentração de reticulante aumenta, reduz-se significativamente ($p < 0,05$) a atividade do biocatalisador.

Resultados semelhantes foram encontrados por Li et al. (2016) que compararam o decréscimo da atividade de glicoamilase, reticulada na forma de agregados de enzimas reticuladas (CLEA) em uma gama de concentrações de glutaraldeído de 0,2% a 9% (v/v) para determinar a melhor condição. Em uma concentração de 0,5% (v/v) foi obtido um rendimento de atividade máximo de cerca

de 76%. Em contrapartida numa concentração de 9% de glutaraldeído a atividade da enzima imobilizada diminuiu acentuadamente, de modo que a maior parte da atividade (~80%) foi perdida devido a uma demasiada reticulação e a enzima perdeu a flexibilidade mínima necessária para a sua atividade.

Figura 3: Comportamento de α -amilase imobilizada por oclusão



Legenda: AA – α -amilase (2h, 3h e 4 horas). Letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média \pm DP).

Por sua vez Chen et al. (2013) estudando o efeito da concentração de glutaraldeído na atividade enzimática de β -galactosidase imobilizada em esferas de quitosana, observaram que quando a concentração da solução de glutaraldeído foi 0,3%, a atividade atingiu o máximo. Subsequentemente, à medida que a concentração da solução de glutaraldeído aumentou, a atividade enzimática diminuiu gradualmente, pois, quando a concentração de glutaraldeído era excessiva, as moléculas

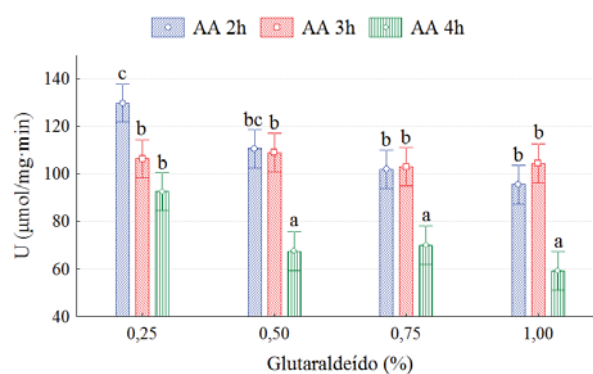
de enzima formaram ligações em múltiplos pontos com o suporte, constituindo obstáculos estruturais espaciais que podem inativar a enzima.

Ao aumento do grau de reticulação entre o suporte e o biocatalisador observado pelos autores supracitados apregoa-se também o comportamento da enzima perante os diferentes períodos de reticulação em que a condição de três horas de reticulação foi a mais satisfatória. Atribui-se o comportamento das condições de duas e quatro horas a uma reticulação insuficiente da enzima no primeiro caso e ao excesso de reticulação, no segundo, já que uma reticulação excessiva pode induzir a alterações nas atividades catalíticas da proteína através da penetração em sua estrutura interna reagindo com resíduos amino, podendo comprometer os sítios ativos da enzima (FARRIS; SONG; HUANG, 2010).

Observa-se claramente esse efeito na figura 4 onde na condição de quatro horas houve perda acentuada da atividade catalítica. Neste caso as enzimas foram imobilizadas por adsorção à superfície do suporte, sendo ancoradas pela cadeia do glutaraldeído. Neste caso o biocatalisador fica muito mais suscetível a ação do reticulante, pois, diferente da oclusão onde

as moléculas de gelatina podem desenvolver um papel de proteção, na adsorção há contato mais direto entre o glutaraldeído e a enzima. Além disso, a enzima pode sofrer lixiviação da matriz sendo perdida para o meio.

Figura 4: Comportamento de α -amilase imobilizada por adsorção



Legenda: AA – α -amilase (2h, 3h e 4 horas). Letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média \pm DP).

Bigi et al. (2001) estudando a influência da concentração de glutaraldeído na estabilidade de filmes de gelatina observaram que um grau de reticulação de cerca de 85%, obtido utilizando 0,25% de reticulante. Os dados sugerem que a utilização de glutaraldeído em baixa concentração é suficiente para uma reticulação eficiente do suporte e evitar a toxicidade, permitindo modular as propriedades físico-químicas dos filmes de gelatina, a fim de obter materiais estáveis

com uma ampla gama de possíveis aplicações biomédicas.

A escolha da razão enzima-glutaraldeído, bem como a sua concentração final, é crítica porque a insolubilização da enzima deve resultar numa distorção mínima da sua estrutura de modo a reter a atividade catalítica (FARRIS; SONG; HUANG, 2010).

CONCLUSÃO

O método de scaffold de gelatina reticulada com glutaraldeído mostrou-se promissor na imobilização de α -amilase. Ambas as técnicas de imobilização utilizadas mostraram melhores resultados de atividade enzimática com concentrações de 0,25% de glutaraldeído divergindo, porém, quanto ao melhor tempo de reticulação que foram de 3h e 2h para oclusão e adsorção, respectivamente.

REFERÊNCIAS


- AZAMI, M.; RABIEE, M.; MOZTARZADEH, F. (2010), Glutaraldehyde crosslinked gelatin/hydroxyapatite nanocomposite scaffold, engineered via compound techniques, **Polym. Compos.** 31 2112–2120.
- BARBETTA, A.; GUMIERO, A.; PECCI, R.; BEDINI, R.; DENTINI, M. (2009) Gas-in-liquid foam templating as a method for the production of highly porous scaffolds. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 3188-3192.
- BARBETTA, A.; MASSIMI, M.; DEVIRGILIIS, L. C.; DENTINI, M. (2006) Enzymatic Cross-Linking versus Radical Polymerization in the Preparation of Gelatin PolyHIPEs and Their Performance as Scaffolds in the Culture of Hepatocytes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3059-3068.
- BARBETTA, A.; RIZZITELLI, G.; BEDINI, R.; PECCI, R.; DENTINI, M. (2010) Porous gelatin hydrogels by gas-in-liquid foam templating. **Soft Matter**, v. 6, p. 1785-1792.
- BEZERRA, C. S.; LEMOS, C. M. G. de F.; SOUSA, M. de; GONÇALVES, L. R. B. (2015) Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132.
- BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N. (2001) Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, p. 763-768.
- CHAIBI, S.; BENACHOUR, D.; MERBAH, M.; CAGIAO M. E.

- CALLEJA F. J. B. (2015) The role of crosslinking on the physical properties of gelatin based films. **Colloid Polym Sci**, v. 293, p. 2741–2752.
- CHEN, H. et al. (2013) Advance Journal of Food Science and Technology. The Effect of Glutaraldehyde Cross-Linking on the Enzyme Activity of Immobilized β -Galactosidase on Chitosan Bead. **Biomaterials**, v. 5, n. 7, p. 932–935.
- DEHGHANI, F.; ANNABI, N. (2011) Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 661–666.
- DWEVEDI, A. (2016) Basics of Enzyme Immobilization. In: DWEVEDI, A. (Ed.). Enzyme Immobilization. **Cham: Springer International Publishing**. p. 21–44.
- FARRIS, S.; SONG, J.; HUANG, Q. (2010) Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 998–1003.
- FDA, Food and Drug Administration (1975). **Report n. 58. Gelatin**, U.S. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/Ingre>>
- dients
PackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261307.htm > Acesso em: 26/07/2017.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review, **Food Hydrocoll.** v. 25, p. 1813–1827.
- JAISWAL, N. et al. (2012) α -Amylase immobilization on gelatin: Optimization of process variables. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 161–167.
- KHARKRANG, K.; AMBASHT, P. K. (2013) Immobilization of α -amylase from pennisetum typhoides inside gelatin beads and its characterization. **Journal of proteins and proteomics**, v. 4(3), p. 183-189.
- KUMAR, S., KANSAL, A.; KAYASTHA, A.M. (2005) Immobilization of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease on gelatin and its characterization. **Orient. Pharm. Exp. Med.** 5, 43-47.
- LI, X.-D. et al. Preparation of Cross-Linked Glucoamylase Aggregates Immobilization by Using Dextrin and

- Xanthan Gum as Protecting Agents. **Catalysts**, v. 6, n. 6, p. 77, 25 mai. 2016.
- MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: **Possibilities, advantages, applications. Bioresource Technology**, v. 115, p. 126–135, jul. 2012.
- MILLER, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428.
- POURSAMAR, S. A.; HATAMI, J.; LEHNER, A. N.; SILVA, C. L. da, FERREIRA, F. C.; A.P.M. Antunes. (2015) Gelatin porous scaffolds fabricated using a modified gas foaming technique: Characterisation and cytotoxicity assessment. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 63–70.
- POURSAMAR, S. A.; HATAMI, J.; LEHNER, A. N.; SILVA, C. L. da, FERREIRA, F. C.; A.P.M. Antunes. (2016a) Potential application of gelatin scaffolds prepared through *in situ* gas foaming in skin tissue engineering. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, vol. 65, no. 6, p. 315–322.
- POURSAMAR, S. A.; LEHNER, A. N., AZAMI, M.; EBRAHIMI-BAROUGH, S.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; ANTUNES, A. P. M. (2016b), The effects of crosslinkers on physical, mechanical, and cytotoxic properties of gelatin sponge prepared via in-situ gas foaming method as a tissue engineering scaffold. **Materials Science and Engineering C**, v. 63, p. 1–9.
- RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.
- SAMAL, S. K. et al. (2015) Multilayered Magnetic Gelatin Membrane Scaffolds. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 41, p. 23098–23109.
- SANTORO, M.; TATARA, A. M.; MIKOS, A. G. (2014) Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 210–218.
- SPEIT, G.; NEUSS, S.; SCHUTZ, P.; FROHLER-KELLER, M.; SCHMID, O. (2008), The genotoxic potential of glutaraldehyde in mammalian cells in vitro in comparison with formaldehyde, **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** v. 649, p. 146–154.

ANEXO A – Ficha Técnica da α -amilase

Ficha de Informação do Produto



1 de 2

Válido a partir de 2015-09-21

Liquozyme® Supra 2.2X

Neste produto a atividade enzimática chave é fornecida por endoamilase que hidrolisa ligações (1,4)-alfa-D-glicosídeo em polissacarídeos amídicos

CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	alfa-amilase
Atividade declarada	300 KNU/g
Cor	Âmbar
Apresentação	Líquido
Densidade de aproximadamente (g/ml)	1,25
Viscosidade (cPs)	1-25
<i>A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.</i>	

ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Alpha-amylase unit KNU	300		/g
pH a 25°C	4,5	6,5	
Contagem total de viáveis	-	50000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E. Coli	Não detectado		/25 g
Salmonella	Não detectado		/25 g
Metais pesados		Máx 30	mg/kg
Chumbo		Máx 5	mg/kg
Arsênico		Máx 3	mg/kg
Cádmio		Máx 0.5	mg/kg
Mercurio		Máx 0.5	mg/kg

O método analítico da enzima está disponível no Portal do Cliente (Customer Centre) ou com o seu representante de vendas.

COMPOSIÇÃO

Conservantes	Sorbato de potássio
Estabilizantes	Cloreto de sódio Sacarose

INFORMAÇÃO SOBRE ALERGIA

Alergênic	Substância contida ¹	Alergênic	Substância contida ¹
Aipo	não	Moluscos	não
Cereais contendo glúten ²	não	Mostarda	não
Crustáceos	não	Nozes ³	não
Ovo	não	Amendoim	não
Peixe	não	Gergelim	não
Tremoço	não	Soja	não
Leite (incluindo lactose)	não	Dióxido de enxofre/sulfitos, mais que 10 mg por kg ou l	não

¹Definição de substâncias de acordo com o Regulamento da EU 1169/11, conforme alteração. A lista cobre os alérgenos mencionados no 21 USC 301 (US) e GB 7718-2011 (China).

²Isto é, trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, kamut

³Isto é, amêndoa, avelã, noz, castanha de caju, noz-pecã, castanha do Pará, pistache, macadâmia e noz de Queensland

STATUS GM

Este produto não é um OGM.

O produto enzimático é produzido por fermentação de um microrganismo que não está presente no produto final. O organismo de produção e a eficácia da enzima são melhoradas por meio da biotecnologia moderna.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

A embalagem deve ser mantida intacta, seca e ao abrigo da luz. Siga as recomendações e use o produto antes da data de validade expirar para evitar a necessidade de uma dosagem maior.

Melhor utilizar antes de: A data de validade encontra-se no certificado de análise ou na embalagem do produto.

O produto oferece desempenho ideal se armazenado a 0–10 °C/32–50 °F e usado antes da data de validade. Se armazenado a até 25 °C/77 °F, o produto deve ser usado dentro de 3 meses após a entrega.

O produto pode ser transportado à temperatura ambiente. Após a entrega, o produto deve ser armazenado conforme a recomendação.

PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E MANUSEIO

Enzimas são proteínas. A inalação de poeira ou aerossóis pode induzir sensibilização e causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Algumas enzimas podem irritar a pele, os olhos e as membranas mucosas em caso de contato prolongado. Veja a FISPQ ou o Manual de Segurança para mais informações sobre como manusear o produto com segurança e o que fazer em caso de derramamento.

Liquozyme[®] Supra 2.2X

CONFORMIDADE

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Os certificados Kosher e Halal encontram-se disponíveis no Customer Center ou com o representante de vendas.

CERTIFICAÇÕES

A Novozymes é signatária do Pacto Global das Nações Unidas, da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica e reportamos o nosso desempenho de sustentabilidade através da Global Reporting Initiative (GRI). Ver todos os nossos compromissos no âmbito da sustentabilidade em www.novozymes.com.



SEGURANÇA ALIMENTAR

A Novozymes conduziu uma análise de risco e preparou um plano APPCC descrevendo os pontos críticos de controle (PCCs). O plano APPCC é respaldado por um amplo programa de pré-requisitos implementado nas de Boas Práticas de Fabricação da Novozymes. O produto é fabricado de acordo com o plano APPCC da Novozymes, as BPF e outros requisitos do Sistema de Gestão de Qualidade Novozymes.

O produto está em conformidade com os requisitos de pureza relacionados à micotoxinas recomendados pelo JECFA FAO/OMS e FCC.

O produto é produzido em conformidade com a certificação FSSC 22000.



EMBALAGEM

O produto está disponível em diferentes tipos de embalagem. Entre em contato com o representante de vendas para mais informações.

Novozymes Latin America Ltda.
Rua professor Francisco Ribeiro 683
CEP 83707-660 - Araucária -
Paraná
Brazil

Tel. +55 41 641 1000
Fax +55 41 643 1443

Para mais informações, ou endereços de nossos escritórios, visite: www.novozymes.com

A legislação, a regulamentação e/ou os direitos de terceiros podem impedir os clientes de importar, utilizar, processar e/ou revender os produtos aqui mencionados de determinada maneira. Sem um acordo em separado e por escrito entre o cliente e a Novozymes com essa finalidade, este documento não se constitui em uma representação ou garantia de qualquer espécie e está sujeito a alterações sem aviso prévio.

ANEXO B – Ficha Técnica da glicoamilase ou amiloglicosidase

Ficha de Informação do Produto



1 de 2

Válido a partir de 2015-09-21

AMG®

300 L

Este produto e atividade enzimática chave é fornecido por glicoamilase, que hidrolisa ligações (1,4)- e (1,4)-alfa-D-glicose nas extremidades não-redutoras de polissacarídeos.

CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	Glicoamilase (glucano 1,4-alfa-glicosidase)
Atividade declarada	300 AGU/ml
Cor	Marron claro a escuro
Apresentação	Líquido
Densidade de aproximadamente (g/ml)	1,16
Viscosidade (cP)	10-40

A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicador da atividade enzimática.

INFORMAÇÃO SOBRE ALERGIA

Alergênicos	Substância contida	Alergênicos	Substância contida
Algas	não	Moluscos	não
Cereais contendo glúten*	não	Moluscos	não
Crustáceos	não	Soja**	não
Ovos	não	Amendoim	não
Peixe	não	Castanhas	não
Trigo**	não	Baço	não
Leite (incluindo lactose)	não	Celulose de microbactérias, mais que 10 mg por kg de l	não

*Definição de substâncias de acordo com o Regulamento da EU 1169/11, conforme abreviação. A lista cobre os alérgenos mencionados no 21 USC 301 (US) e GB 7718-2011 (China).

**Não é, trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, kamut

***Não é, amêndoas, aveia, noz, castanha de caju, noz-pecã, castanha do Pará, pistache, macadâmia e noz de Queensland

** Se não há nível de glúten, isto é, < 20ppm (Regulamento UE 41/2009)

ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Amiloglicosidase unit AGU	300		U/ml
pH a 25°C	3,5	4,5	
Contagem total de vírus	-	50000	U/g
Bactéria Coliforme	-	30	U/g
E.Coli	não detectado		U/g
Salmonella	não detectado		U/g
Íons pesados		Máx: 30	mg/g
Chumbo		Máx: 5	mg/g
Arsenio		Máx: 3	mg/g
Cádmio		Máx: 0,5	mg/g
Mercúrio		Máx: 0,5	mg/g

O método analítico da enzima está disponível no Portal do Cliente (Customer Centre) ou com o seu representante de vendas.

COMPOSIÇÃO

Conservantes	Sorbato de potássio
Estabilizantes	Éterato de sódio D-glicosiltransferase

STATUS GM

Este produto não é um OGM.

O produto enzimático é produzido por fermentação de um microrganismo que não está presente no produto final. O organismo de produção não é modificado usando uma biotecnologia moderna.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

A embalagem deve ser mantida intacta, seca e ao abrigo da luz. Siga as recomendações e use o produto antes da data de validade expirar para evitar a necessidade de uma dosagem maior.

Melhor utilizar antes de: A data de validade encontra-se no certificado de análise ou na embalagem do produto.

O produto oferece desempenho ideal se armazenado a 0-10 °C/32-50 °F e usado antes da data de validade. Se armazenado a até 25 °C/77 °F, o produto deve ser usado dentro de 3 meses após a entrega.

O produto pode ser transportado à temperatura ambiente. Após a entrega, o produto deve ser armazenado conforme a recomendação.

© Novozymes A/S

AMG® 300 L

PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E MANUSEIO

Enzimas são proteínas. A inalação de poeira ou aerossóis pode incluir sensibilização e causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Algumas enzimas podem irritar a pele, os olhos e as membranas mucosas em caso de contato prolongado. Veja a FDSQ ou o Manual de Segurança para mais informações sobre como manusear o produto com segurança e o que fazer em caso de contaminação.

CONFORMIDADE

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Istito FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (ECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Os certificados Koehler e Halal encontram-se disponíveis no Customer Center ou com o representante de vendas.

CERTIFICAÇÕES

A Novozymes é signatária do Pacto Global das Nações Unidas, da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica e reportamos o nosso desempenho de sustentabilidade através da Global Reporting Initiative (GRI). Ver todos os nossos compromissos no âmbito da sustentabilidade em www.novozymes.com.



SEGURANÇA ALIMENTAR

A Novozymes conduziu uma análise de risco e preparou um plano APPCC descrevendo os pontos críticos de controle (PCC). O plano APPCC é requisitado por um amplo programa de pré-requisitos implementado nas Boas Práticas de Fabricação da Novozymes.

O produto é fabricado de acordo com o plano APPCC da Novozymes, as BPF e outros requisitos do Sistema de Gestão de Qualidade Novozymes.

O produto está em conformidade com os requisitos de pureza relacionados à micotoxinas recomendados pelo IECQ, FADDIRUS e FCC.



EMBALAGEM

O produto está disponível em diferentes tipos de embalagem. Entre em contato com o representante de vendas para mais informações.

Novozymes Latin America Ltda.
Rua Professor Manoel Ribeyra 883
CEP 81372-900 - Jandaia -
Paraná
Brasil

Tel. +55 41 601 1000
Fax +55 41 601 1043

Para mais informações, ou endereço de nossos escritórios, visite www.novozymes.com

A legislação, a regulamentação e/ou os direitos de terceiros podem impedir os clientes de importar, utilizar, processar ou revender os produtos aqui mencionados de determinada maneira. Sem um acordo em separado e por escrito entre o cliente e a Novozymes com essa finalidade, este documento não se constitui em uma representação ou garantia de qualquer espécie e está sujeito a alterações sem aviso prévio.

© Novozymes A/S