

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Amilases encapsuladas em sílicas híbridas: avaliação  
em testes de sacarificação de amido.**

**José Rodrigo Fernandez Caresani**

TESE DE DOUTORADO

**Porto Alegre, RS**

**2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Amilases encapsuladas em sílicas híbridas: avaliação  
em testes de sacarificação de amido.**

**José Rodrigo Fernandez Caresani**

Defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

**Orientador:**

**Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos**

**Porto Alegre, RS**

**2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Defesa de Tese de Doutorado “**Amilases encapsuladas em sílicas híbridas: avaliação em testes de sacarificação de amido**” elaborada por JOSÉ RODRIGO FERNANDEZ CARESANI, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

---

Dr. Arthur Alaím Bernardes

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Suzana Frighetto Ferrarini

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Lígia Damasceno Ferreira Marczak

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador João Henrique Zimnoch dos Santos pelos ensinamentos, paciência e persistência ao longo destes anos como meu orientador. Um exemplo de dedicação e paixão pela vida acadêmica.

Agradeço aos colegas do laboratório da UFRGS (ex:k-106) que estiveram ao meu lado e com os quais eu pude contar em momentos de dificuldade.

Aos professores e funcionários da UFRGS e PPGEQ que sempre me atenderam de forma cordial e dentro das normas acadêmicas de excelência.

Ao CNPM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) em especial o LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron).

Ao CNPQ por subsidiar as atividades acadêmicas realizadas neste doutorado.

## Resumo

A sacarificação de amido usando enzimas amilases demanda o estudo de métodos de imobilização que gerem sistemas com propriedades promissoras e que aumentem a estabilidade operacional destes processos. As enzimas  $\alpha$ -amilase obtidas de *Bacillus subtilis* e *Aspergillus oryzae*,  $\beta$ -amilase obtida de cevada foram encapsuladas em matrizes de sílica-gel via rota ácida usando o processo sol-gel, visando avaliar o desempenho destes sistemas encapsulados. A atividade catalítica dos sistemas encapsulados (açúcares redutores na faixa de 0-30,5  $\mu\text{mol/mL}$ ) foram comparados com os sistemas homogêneos (açúcares redutores entre 11,7-33,7  $\mu\text{mol/mL}$ ). Em uma segunda etapa foram usados diversos organosilanos como modificadores com o intuito de analisar os seus efeitos na atividade biocatalítica e nas propriedades estruturais das enzimas encapsuladas resultantes. Os sistemas obtidos foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Refletância Total Atenuada (ATR), adsorção/dessorção de nitrogênio (método BET e BJH), Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS). Os produtos obtidos da hidrólise de amido (sacarificação) foram analisados pelo método 3,5-Ácido Dinitrosalicílico (DNS) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Os sistemas homogêneos das  $\alpha$ -amilases atingiram um máximo de concentração de açúcares redutores de 31,7  $\mu\text{mol/mL}$  (*Bacillus subtilis*) e 33,7  $\mu\text{mol/mL}$  (*Aspergillus oryzae*) versus 25,5 e 30,5  $\mu\text{mol/mL}$  dos sistemas encapsulados em sílica sem organosilanos, além dos 28,6 e 29,6  $\mu\text{mol/mL}$  dos sistemas contendo organosilanos respectivamente. A  $\beta$ -amilase apresentou um máximo de concentração de 25,2  $\mu\text{mol/mL}$  no sistema homogêneo versus 20,4 (sem organosilanos) e 28,9  $\mu\text{mol/mL}$  (com organosilano). Os efeitos dos organosilanos foram diversos na estrutura e na atividade biocatalítica dos sistemas encapsulados. O ambiente confinado em que a enzima encapsulada opera parece favorecer a geração de glicose em detrimento da maltose.

**Palavras-chave:** sol-gel;  $\alpha$ -amilase;  $\beta$ -amilase; hidrólise enzimática, organosilanos.

## Abstract

Starch saccharification using amylase enzymes demands the study of immobilization methods that generate systems with promising properties and that increase the operational stability of these processes. The  $\alpha$ -amylase enzymes obtained from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae*,  $\beta$ -amylase obtained from barley were encapsulated in silica gel matrices through the acid route using the sol-gel process, in order to evaluate the performance of these encapsulated systems. The catalytic activity of the encapsulated systems (reducing sugars in the range of 0-30.5  $\mu\text{mol/mL}$ ) were compared with the homogeneous systems (reducing sugars between 11.7-33.7  $\mu\text{mol/mL}$ ). In a second stage, several organosilanes were used as modifiers in order to analyze their effects on the biocatalytic activity and the structural properties of the resulting encapsulated enzymes. The systems obtained were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Attenuated Total Reflectance (ATR), nitrogen adsorption/desorption (BET and BJH method), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Small-angle X-ray scattering (SAXS). The products obtained from the starch hydrolysis (saccharification) were analyzed by the 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) method and by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The homogeneous systems of  $\alpha$ -amylases reached a maximum concentration of reducing sugars of 31.7  $\mu\text{mol/mL}$  (*Bacillus subtilis*) and 33.7  $\mu\text{mol/mL}$  (*Aspergillus oryzae*) versus 25.5 and 30.5  $\mu\text{mol/mL}$  of the systems encapsulated in silica without organosilanes, in addition to 28.6 and 29.6  $\mu\text{mol/mL}$  of systems containing organosilanes respectively.  $\beta$ -amylase showed a maximum concentration of 25.2  $\mu\text{mol/mL}$  in the homogeneous system versus 20.4 (without organosilanes) and 28.9  $\mu\text{mol/mL}$  (with organosilane). The effects of organosilanes were diverse in the structure and biocatalytic activity of the encapsulated systems. The confined environment in which the encapsulated enzyme operates seems to favor the generation of glucose to the detriment of maltose.

**Keywords:** sol-gel;  $\alpha$ -amylase;  $\beta$ -amylase; enzymatic hydrolyze, organosilane.

## SUMÁRIO

	Pag.
RESUMO .....	I
ABSTRACT .....	II
Sumário .....	III
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE TABELAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	X
INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
1.1 Carboidratos .....	5
1.2 Amido .....	6
1.3 Enzimas .....	7
1.4 Classificação das enzimas .....	9
1.5 Amilases .....	10
1.6 Imobilização de enzimas .....	12
1.7 Método Sol-gel no encapsulamento de enzimas .....	19
1.8 Imobilização usando materiais híbridos .....	20
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS .....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24

CAPÍTULO 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	25
3.1 Metodologia geral .....	25
3.2 Materiais utilizados .....	27
3.3 Sistemas homogêneos.....	29
3.4 Parâmetros operacionais.....	30
3.5 Sistemas heterogêneos.....	31
3.6 Encapsulamento das enzimas via sol-gel.....	31
3.7 Uso de organosilanos na síntese de sílicas híbridas.....	33
3.8 Caracterização dos suportes catalíticos.....	35
3.8.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e Refletância Total Atenuada (ATR).....	35
3.8.2 Análise de Porosidade por adsorção de nitrogênio.....	35
3.8.3 Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS).....	36
3.8.4 Microscopia eletrônica de varredura acoplada espectroscopia de emissão de raios X por dispersão de energia (SEM-EDX).....	36
3.9 Determinação dos açúcares redutores via método DNS.....	37
3.10 Confeção das curvas de calibração.....	39
3.11 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	41
 CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	 43
4.1 Estudos preliminares .....	43
4.2 Tempo de adição .....	43
4.3 Avaliação da hidrólise enzimática – testes iniciais.....	44
4.4 Efeito do pH na atividade enzimática .....	47
4.5 Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	49
4.6 Efeito dos organosilanos na atividade biocatalítica das enzimas encapsuladas ..	50
4.7 Caracterização das enzimas encapsuladas .....	53

4.7.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e reflectância total atenuada (ATR).....	53
4.7.2 Avaliação da Porosidade dos xerogéis.....	58
4.7.3 Porosidade dos xerogéis com organosilanos.....	61
4.7.4 Avaliação do tamanho e formato das partículas (SAXS).....	65
4.7.5 Microscopia eletrônica de varredura acoplada espectroscopia de emissão de raios X por dispersão de energia (SEM-EDX).....	66
4.8 Teores de glicose e maltose obtidos (HPLC).....	67
4.9 Efeito do organosilano na concentração de Glicose e Maltose.....	71
4.10 Estudos futuros.....	74
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXOS.....	86
Anexo A. Método DNS (3,5-Ácido Dinitrosalicílico).....	86

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> No item a) são exibidos a quantidade de publicações dos últimos 10 anos usando o termo “Supported Enzymes”, no item b) são exibidos a quantidade de publicações dos últimos 10 anos usando o termo “Supported Amylases” ambas realizadas no Scopus.....	2
<b>Figura 2.</b> Estrutura da amilose, polímero linear composto por D-glicoses unidas em $\alpha$ -(1-4).....	6
<b>Figura 3.</b> Estrutura da amilopectina, polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em $\alpha$ -(1-4) e $\alpha$ -(1-6).....	7
<b>Figura 4.</b> Estrutura da $\alpha$ -amilase.....	11
<b>Figura 5.</b> Estrutura da $\beta$ -amilase.....	11
<b>Figura 6.</b> Principais estratégias de imobilização de enzimas.....	13
<b>Figura 7.</b> Metodologia geral usada na imobilização, testes e caracterização dos produtos obtidos.....	26
<b>Figura 8.</b> Procedimento experimental usado para encapsular amilases com organosilanos.....	33
<b>Figura 9.</b> Organosilanos usados no sol-gel. a) alquil-organosilano, b) amino-organosilano, c) mercaptano-organosilano.....	34
<b>Figura 10.</b> Metodologia DNS usada para estimar açúcares redutores.....	39
<b>Figura 11.</b> Tubos de ensaio após a reação DNS (antes da diluição) usados na confecção de uma curva de calibração. A direita temos tubos associados a resultados das sacarificações.....	40
<b>Figura 12.</b> Curva de calibração de glicose obtida pelo método DNS.....	41
<b>Figura 13.</b> Concentrações de açúcares redutores obtidos de sistemas homogêneos e encapsulados. $\alpha$ AB = $\alpha$ -amilase bacteriana; $\alpha$ AF = $\alpha$ -amilase fúngica e $\beta$ A = $\beta$ -amilase.....	46

<b>Figura 14.</b> Comparação dos espectros da $\alpha$ -amilase bacteriana encapsulada ( $\alpha$ AB_250), branco (sílica-gel) e enzima $\alpha$ -amilase bacteriana liofilizada (homogênea).....	54
<b>Figura 15.</b> Espectro FT-IR contendo Trimetóxi(octadecil)silano.....	57
<b>Figura 16.</b> Isotermas obtidas das enzimas encapsuladas e da sílica gel.....	60
<b>Figura 17.</b> Correlação entre a área específica e açúcares redutores de enzimas encapsuladas com organosilano contendo alquil.....	63
<b>Figura 18.</b> Isoterma do Tipo II obtida a partir do encapsulamento da $\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> ) com o organosilano [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetóxisilano.....	64
<b>Figura 19.</b> Estruturas granulares visualizadas via SEM-EDX. Imagem obtida a partir da amostra $\alpha$ AB_2.5.....	66
<b>Figura 20.</b> Estruturas planares visualizadas via SEM-EDX. Imagem obtida a partir da amostra $\alpha$ AF_2.5.....	67
<b>Figura 21.</b> Razão glicose/maltose obtidas dos mostos oriundos dos sistemas homogêneos e encapsulados das enzimas $\alpha$ -amilase bacteriana ( $\alpha$ AB), $\alpha$ -amilase fúngica ( $\alpha$ AF) e $\beta$ -amilase ( $\beta$ A).....	70
<b>Figura A.</b> Oxidação da glicose onde o grupo carbonila se torna carboxila.. ..	86

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação internacional das enzimas. ....	9
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros operacionais ótimos sobre $\alpha$ -amilases e $\beta$ -amilase.....	12
<b>Tabela 3.</b> Exemplos de pesquisas acerca de imobilização de enzimas ou microrganismos.....	15
<b>Tabela 4.</b> Exemplos de pesquisas acerca de imobilização de enzimas ou microrganismos em materiais híbridos.....	21
<b>Tabela 5.</b> Reagentes usados na execução dos experimentos.....	27
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros das enzimas $\alpha$ -amilase (bacteriana e fúngica) e $\beta$ -amilase usados nos sistemas homogêneos.....	30
<b>Tabela 7.</b> Simbologia usada para identificar as enzimas encapsuladas.....	32
<b>Tabela 8.</b> Condições reacionais dos testes de sacarificação usando enzimas encapsuladas com organosilanos.....	34
<b>Tabela 9.</b> Reagentes usados para elaborar 100 mL de solução DNS.....	37
<b>Tabela 10.</b> Volumes usados nos tubos de ensaios para a reação DNS.....	38
<b>Tabela 11.</b> Sistemas com diferentes tempos de adição da enzima.....	44
<b>Tabela 12.</b> Resultados obtidos das sacarificações homogêneas e heterogêneas em pHs únicos.....	45
<b>Tabela 13.</b> Resultados das sacarificações com pH iniciais e diferenciados.....	48
<b>Tabela 14.</b> Efeito da temperatura na hidrólise enzimática em sistemas homogêneos e heterogêneos.....	49
<b>Tabela 15.</b> Resultados dos testes de sacarificação (teste DNS) usando sílicas híbridas (amilases encapsuladas com organosilanos). ....	51
<b>Tabela 16.</b> Bandas do espectro FT-IR das amostras contendo $\alpha$ -amilase bacteriana.....	55
<b>Tabela 17.</b> Propriedades de porosidade dos sistemas encapsulados.....	59

<b>Tabela 18.</b> Resultado da análise de porosidade obtida a partir do encapsulamento de amilases usando organosilanos no sol-gel.....	62
<b>Tabela 19.</b> Resultados obtidos de SAXS.....	65
<b>Tabela 20.</b> Concentrações estimadas de glicose e maltose obtidas por HPLC dos sistemas homogêneos.....	68
<b>Tabela 21.</b> Concentrações estimadas de glicose e maltose obtidas por HPLC dos sistemas heterogêneos.....	69
<b>Tabela 22.</b> Concentrações de glicose e maltose obtidas por HPLC dos sistemas contendo organosilanos.....	72

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

<b>ATR</b>	Refletância Total Atenuada.
<b>BET</b>	Brunauer, Emmett, Teller
<b>BJH</b>	Barret, Joyner e Halenda
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNS</b>	3,5-Ácido Dinitrosalicílico
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>SAXS</b>	Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo
<b>SEM-EDX</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura Acoplada Espectroscopia de Emissão de Raios X por Dispersão de Energia.

## INTRODUÇÃO

A maioria das enzimas consistem em proteínas, portanto trata-se de heteropolímeros formados por aminoácidos, cuja sequência é determinada por um fragmento do DNA denominado gene. As enzimas consistem em cadeias polipeptídicas e adotam configurações espaciais peculiares: as interações entre aminoácidos adjacentes podem levar a arranjos espaciais do tipo  $\alpha$ -hélice ou do tipo  $\beta$ . Além disso, o ambiente pode interferir nesta configuração característica que é a responsável pela sua atividade biocatalítica.

As enzimas são as responsáveis de forma direta ou indireta por praticamente todas as reações bioquímicas de relevância industrial. O aumento da escala e da velocidade de produção são fatores que tornam seu estudo relevantes. Por exemplo, podemos citar a produção de cerveja, que pode ser realizada através de puro malte, ou seja, usando unicamente as enzimas (amilases) existentes nestes grãos pré-germinados. Porém a competitividade no mercado torna estratégica a produção e uso das amilases nas plantas industriais com a finalidade de diminuir custos e tornar a indústria mais competitiva.

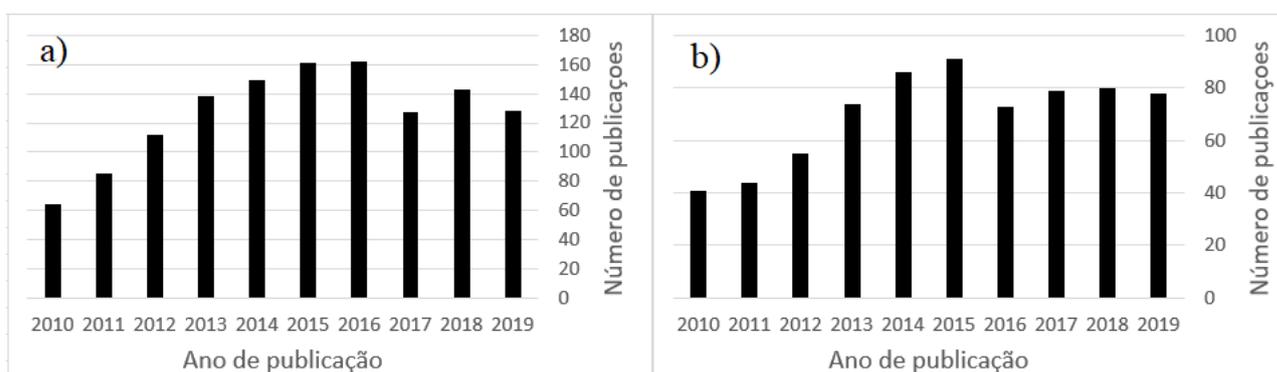
Existe uma grande diversidade de enzimas na natureza, porém as usadas de forma relevante na indústria são algumas, entre elas, as denominadas amilases, ou seja, a família de enzimas com a capacidade de agir no substrato amido.

A sacarificação de amido consiste no processo de hidrólise no qual o amido (polissacarídeo) é convertido em açúcares fermentáveis (monossacarídeos e dissacarídeos majoritariamente). Pode ser realizada por via química (uso de ácidos em alta concentração), porém o uso de enzimas se tornou o método mais vantajoso: as enzimas, por serem mais seletivas, permitem obter um produto mais padronizados: o encaixe entre enzima e substrato é muito peculiar, o que torna a reação bioquímica promovida singular.

As amilases são, de longe, as enzimas mais importantes para a indústria, sendo a  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase as mais utilizadas. Essas enzimas podem ser obtidas de diversas fontes: bactérias, fungos e vegetais. Com a finalidade de estabilizar os sistemas operacionais enzimáticos e diminuir os processos de inibição das enzimas, processos de imobilização das enzimas apresentam-se como uma potencial alternativa. Pesquisar as enzimas responsáveis pela sacarificação do amido em açúcares menores, entre eles os açúcares redutores, leva à necessidade de avaliar as possíveis vantagens que podem ser obtidas pelos métodos de imobilização destas enzimas.

A imobilização de enzimas pode gerar um ambiente favorável para a atividade enzimática. A série de compostos que podem competir com sítios ativos ou inibi-los (como ocorre dentro das células) são minimizados, razão pela qual a imobilização de enzimas é considerada uma alternativa mais atraente que a imobilização de células: a interação entre o substrato e a enzima estrategicamente imobilizada pode gerar sistemas biocatalíticos com atividade superior aos homogêneos e com características diferenciadas.

Através de pesquisa usando as palavras chaves “Supported Enzymes” e “Supported Amylases” na base de dados científica Scopus é possível visualizar o número de publicações associadas ao tema desta Tese de doutorado. A Figura 1 apresenta dois exemplos comparativos.



**Figura 1.** No item a) são exibidos a quantidade de publicações dos últimos 10 anos usando o termo “Supported Enzymes”, no item b) são exibidos a quantidade de publicações dos últimos 10 anos usando o termo “Supported Amylases” ambas realizadas no Scopus. Disponível em <http://scopus.com>. Acessada em 26/3/2020.

De acordo com a Figura 1, em ambos os casos, podemos observar um padrão semelhante, um crescimento das publicações atingindo seu ápice no meio da década (162 e 91, respectivamente para enzimas suportadas e amilases suportadas) e depois uma sutil queda nos últimos três anos (mantendo valores acima de 127 e 79), estes números representam um aumento de cerca de 50 % em relação à quantidade existente há 10 anos (64 e 41), o que sugere a relevância dessa temática. Portanto, nos últimos dez anos, podemos afirmar que houve um crescimento das publicações associadas ao uso de métodos de imobilização de enzimas no geral e das amilases também.

O Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz do Brasil. A cadeia produtora de arroz gera subprodutos dentre os quais a quirera e o farelo de arroz, os quais são usados na composição de rações para animais ou para obtenção de óleo de arroz. Esses produtos podem passar por um processo bioquímico e gerar outros produtos de maior valor agregado.

Outros cereais também são produzidos de forma significativa no Rio Grande do Sul, entre eles o trigo, o milho e a cevada. Portanto, o desenvolvimento de uma indústria enzimática que use estas fontes amiláceas como substrato é estratégico para a economia do Estado.

Existem diversos métodos de imobilização de enzimas descritos na literatura científica. Neste trabalho foi usado o método de encapsulamento de enzimas em matrizes de sílica através de processo sol-gel hidrolítico com catálise ácida. Nos processos de encapsulamento, a enzima fica aprisionada em um suporte, ficando com um espaço físico restrito. No caso da síntese sol-gel, utilizando alcóxidos de silício, uma rede de sílica vai se formando a partir da hidrólise e condensação de alcóxidos metálicos.

A versatilidade da síntese sol-gel está associada aos tipos e proporções dos precursores usados na reação, nas condições reacionais, tempo e forma de adição do elemento a ser encapsulado além da possibilidade do uso de modificadores, com os quais pretende-se gerar géis com estruturas diferenciadas sem inibir a enzima encapsulada.

Além da escolha de um método de imobilização, outro ponto relevante diz respeito à origem dessas enzimas: bacteriana, fúngica ou vegetal. As enzimas são macromoléculas cuja função biológica depende de sua estrutura enovelada peculiar, a qual pode ser abalada durante o processo de imobilização ou pelos modificadores usados. O fato do

amido ser uma macromolécula torna o processo de imobilização um desafio, pois problemas difusionais são associadas a grandes moléculas, o que torna o estudo de modificadores um fator importante na pesquisa para obter as melhores características estruturais sem inibir a enzima.

O escopo da presente tese tem a peculiaridade de investigar comparativamente três amilases de origens distintas, a saber: bacteriana, fúngica e vegetal, em suas formas livres e encapsuladas em matrizes de sílica funcionalizadas com organosilanos ou não. O capítulo 1 traz uma revisão bibliográfica que aborda o substrato e as enzimas usadas nesta pesquisa, depois trata dos métodos de imobilização com ênfase no método sol-gel usado para sintetizar enzimas híbridas com presença de organosilanos. O capítulo 2 apresenta os objetivos da tese. O capítulo 3 apresenta a metodologia geral, os materiais utilizados, as faixas dos parâmetros usados, diferencia os sistemas homogêneos dos heterogêneos, apresenta o método de determinação de açúcares redutores, estabelece a metodologia de encapsulamento das enzimas via sol-gel sem e com a presença de organosilanos (híbridos), descreve as técnicas de caracterização das enzimas encapsuladas e por último narra o uso de cromatografia para estimar as concentrações de glicose e maltose. No capítulo 4 são exibidos os resultados e discussões, apresenta-se a precisão da curva de calibração associada ao método DNS, a relação do tempo de adição da enzima na síntese sol-gel com a atividade biocatalítica, a avaliação dos ensaios enzimáticos iniciais (sílicas não híbridas) depois são analisados os efeitos dos organosilanos (sílicas híbridas), os resultados das caracterizações são discutidos, os teores de glicose e maltose obtidos por cromatografia são analisados e são propostos estudos futuros. Finalmente, o último capítulo apresenta as principais conclusões e a tese oriunda da presente pesquisa.

## CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica vai apresentar os conceitos estruturais de carboidratos e amido. Na sequência serão apresentadas as principais enzimas amilolíticas e o conceito de processo sol-gel. Por último são apresentados exemplos de sílicas híbridas obtidas com adição de organosilanos na síntese sol-gel.

### 1.1. CARBOIDRATOS

Os carboidratos são um grupo grande e diverso de compostos orgânicos, que incluem os açúcares e os amidos, constituídos principalmente de átomos de C, H, e O (pode haver outros elementos, tais como N, P e S). Os carboidratos simples são usados na síntese de aminoácidos e gorduras ou substâncias similares, que são usadas para construir estruturas e fornecer uma fonte emergencial de energia. Os carboidratos macromoleculares atuam como reserva de alimentos. Os carboidratos podem ser classificados em três grupos principais, com base no tamanho: (i) monossacarídeos, (ii) dissacarídeos e (iii) polissacarídeos (TORTORA *et al.*, 2005).

Os monossacarídeos, ou açúcares simples, consistem de uma única unidade de poli-hidroxi-aldeído ou cetona. O monossacarídeo mais abundante na natureza possui seis átomos de carbono: D-glicose. Os dissacarídeos são formados por duas unidades de monossacarídeos. A sacarose ou açúcar de cana é o representante típico desta classe. (LEHNINGER, 2006).

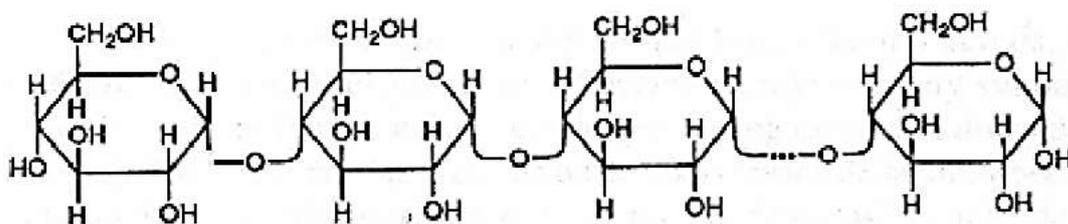
A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre sob forma de polissacarídeos: polímeros de média à alta massa molecular ( $MM > 20.000$  Da). Os polissacarídeos diferem uns dos outros na identidade das unidades de monossacarídeos

repetidas, no comprimento das cadeias, nos tipos de ligação unindo as unidades e no grau de ramificação. Por exemplo, os homopolissacarídeos contêm somente uma única espécie monomérica, enquanto os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes. Alguns homopolissacarídeos, como o amido e o glicogênio, servem como formas de armazenamento utilizados como combustíveis (LEHNINGER, 2014).

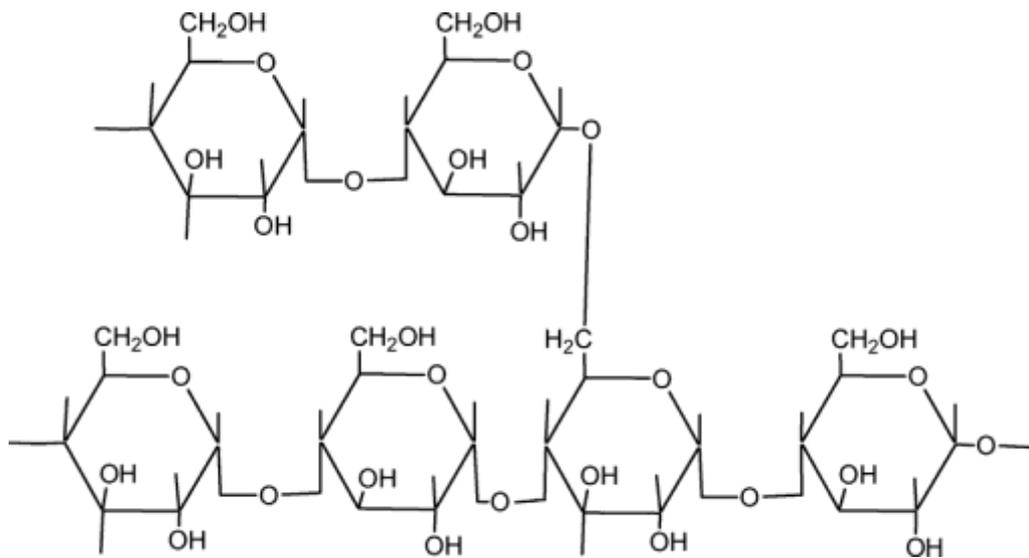
Os polissacarídeos de armazenamento mais importante são o amido nas células vegetais e o glicogênio nas células animais. Estes dois polissacarídeos ocorrem intracelularmente como grandes agregados ou grânulos. A maioria das células vegetais tem a capacidade de sintetizar o amido, porém, ele é especialmente abundante nos tubérculos, como as batatas, e nas sementes, como o grão de milho (LEHNINGER, 2006).

## 1.2 AMIDO

O amido é um carboidrato composto de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina; polímeros formados por unidades  $\alpha$ -D-Glicose, que ocorrem nas células das plantas, normalmente sob forma de grânulos de amido no citosol. Os tipos de amido podem ser distinguidos uns dos outros pelo grau de ramificação da cadeia. A amilose é um polímero linear de glicose, com todos os resíduos ligados por ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). A amilopectina é um polímero de cadeia ramificada, com as ramificações iniciando-se nas ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) ao longo da cadeia com ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (CAMPBELL, 2000). A Figura 2 apresenta a fórmula estrutural da amilose e a Figura 3, da amilopectina.



**Figura 2.** Estrutura da amilose, polímero linear composto por D-glicoses unidas em  $\alpha$ -(1-4). Fonte: MARTINEZ (2005).



**Figura 3.** Estrutura da amilopectina, polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em  $\alpha$ -(1-4) e  $\alpha$ -(1-6). Fonte: HASSAN *et al* (2018).

No início do século XIX, o químico alemão Kirchhooff descobriu que fervendo o amido em meio ácido e posteriormente neutralizando-o era obtida uma mistura de açúcares. Também percebeu que a proteína do glúten da cevada era capaz de liquefazer o amido em açúcar. Hoje em dia, essas reações podem ser classificadas como hidrólise de amido pela via ácida e enzimática, respectivamente.

### 1.3 ENZIMAS

Nas células vivas, as enzimas servem de catalisadores biológicos. Cada enzima atua em uma substância específica, chamada de substrato da enzima, e catalisa somente um tipo de reação específica. A biocatálise explora a versatilidade das enzimas ao catalisar uma variedade de processos na produção de novos compostos ou compostos naturais (BETANCOR & LUCKARIFT, 2008). Embora a molécula enzimática como um todo seja necessária para o papel catalítico, a ligação com o substrato dá-se apenas em uma região pequena e bem definida da enzima, denominada sítio ativo (ou centro ativo) da enzima. O sítio ativo constitui uma cavidade com forma bem definida, revestida por cadeias laterais de aminoácidos, algumas das quais ajudam a ligar o substrato e outras que participam diretamente da catálise (MARZZOCO & TORRES, 2007).

Para reações enzimáticas, a elevação da temperatura além de certo valor (a denominada temperatura ótima), reduz drasticamente a velocidade de reação. A taxa de reação reduzida acima da temperatura ótima se deve à desnaturação da enzima: a perda de sua estrutura tridimensional (configuração terciária) característica (TORTORA *et al.*, 2005).

As enzimas têm um pH (ou uma faixa de pH) ótimo no qual a atividade catalítica é máxima. Acima ou abaixo desse pH, a atividade decresce. As cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo podem funcionar como ácidos ou bases fracas em funções críticas que dependem da manutenção de certo estado de ionização (LEHNINGER, 2006), portanto, sua dependência do pH do meio.

No sítio ativo das enzimas, onde moléculas de água talvez não estejam disponíveis como doadores ou aceptores de prótons, a catálise ácido-básica geral torna-se crucial. Algumas cadeias laterais de aminoácidos podem assumir o papel de agentes doadores a aceptores de prótons, proporcionando um aumento de velocidade da ordem de  $10^2$  a  $10^5$ . Esse tipo de catálise ocorre na grande maioria das enzimas (LEHNINGER, 2006).

Somente quando a concentração do substrato está extremamente alta, a velocidade máxima da atividade enzimática pode ser alcançada. Sob condições de alta concentração de substrato, a enzima é dita estar em saturação, ou seja, seu sítio ativo está sempre ocupado por moléculas de substrato ou produto. Nessa condição, um aumento adicional na concentração do substrato não irá afetar a velocidade de reação porque todos os sítios ativos já estão em uso (TORTORA *et al.*, 2005).

Um inibidor, conforme o nome indica, é uma substância que interfere na ação de uma enzima, tornando mais lenta a velocidade de reação. Um inibidor reversível pode ligar-se à enzima e subseqüentemente ser liberado, deixando-a em sua condição original. Um inibidor irreversível reage com a enzima produzindo uma proteína que deixa de ser enzimaticamente ativa, de forma que a enzima original não pode ser regenerada (CAMPBELL, 2000). Os inibidores protéicos da  $\alpha$ -amilase são amplamente distribuídos em plantas, principalmente em cereais (trigo e cevada) e feijão (UDANI, 2009).

Muitas enzimas necessitam da associação com outras moléculas ou íons para exercer seu papel catalítico. Esses componentes da reação enzimática são genericamente chamados de cofatores. Os cofatores podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas, não protéicas, de complexidade variada, que recebem o nome de coenzimas. Algumas

enzimas aceitam vários íons metálicos bivalentes como ativadores, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$  (BORZANI *et al.*, 2001). O cofator sempre é uma molécula inorgânica.

#### 1.4 CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

Pelas regras oficiais da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), a classificação e nomenclatura das enzimas foi dividida em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam. Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses. A Tabela 1 apresenta a classificação oriunda de um acordo internacional.

**Tabela 1.** Classificação internacional das enzimas. Fonte: Adaptada de LEHNINGER (2014).

Classe n°	Nome da classe	Tipo de reação catalisada/exemplos
1	Oxidoredutases	Catalisam reações de oxidação-redução. Ex: desidrogenase, oxi-dases e peroxidases.
2	Transferases	Reações de transferência de grupos funcionais. Ex: transaminases, quinases e transcetilases.
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água).Ex. lipases, fosfatases e <b>amilases</b> .
4	Liases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas. Ex: aldolase, fumarase e carbo-xilase.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas. Ex: racemases, epimerases emutases.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares.

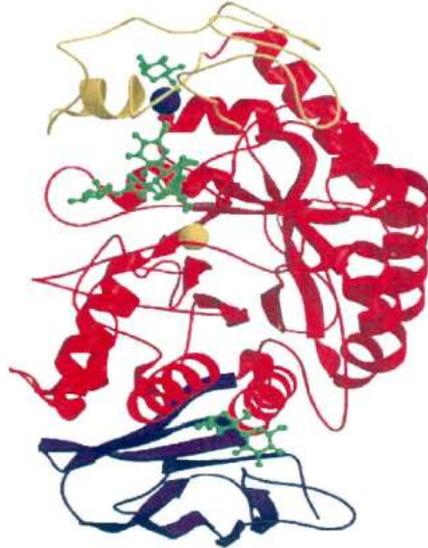
Esta nomenclatura oficial é, na prática, muitas vezes não usada, em favor de nomes mais simples ou que se tornaram clássicos. Na nomenclatura usual, o nome é dado indicando o substrato, seguido de um outro termo terminado em *ase* que especifica o tipo de reação que a enzima catalisa (MARZZOCO & TORRES, 2007). Por exemplo, as amilases são as enzimas que degradam o substrato amido.

## 1.5 AMILASES

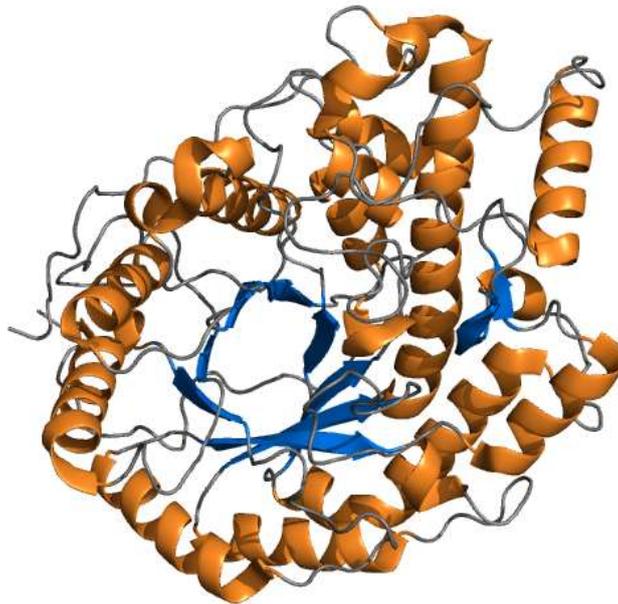
Amilases são enzimas de grande importância para aplicações industriais. Por exemplo, as amilases representaram mais de 32% da participação no mercado global de enzimas cervejeiras em 2017 (AHUJA & RAWAT, 2018).

Muitos animais, inclusive os seres humanos, produzem enzimas amilases, que podem quebrar as ligações entre as moléculas de glicose (TORTORA *et al.*, 2005). Duas enzimas conhecidas como  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilase atacam ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). A  $\alpha$ -amilase é uma endoglicosidase, que pode hidrolisar uma ligação glicosídica em qualquer lugar ao longo da cadeia para produzir glicose e maltose. A  $\beta$ -amilase é uma exoglicosidase que cliva a partir do final não-redutor do polímero gerando maltose (CAMPBELL, 2000).

As amilases estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas utilizadas nas indústrias de amido. Hoje em dia, elas são aplicadas em vários segmentos industriais, como em indústrias de alimentos, de detergentes, indústrias têxteis e de papéis, com maior aplicação na indústria de amido. Neste sentido, as amilases microbianas substituíram completamente a hidrólise química na indústria de processo de goma (GUPTA *et al.*, 2003). As Figuras 4 e 5 apresentam a estrutura da  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase.



**Figura 4.** Estrutura da  $\alpha$ -amilase. O domínio A é mostrado em vermelho, o domínio B em amarelo e o domínio C em roxo. No centro catalítico, o íon cálcio é simbolizado como uma esfera azul e o íon cloreto como uma esfera amarela. A estrutura verde está ligada ao local ativo e aos locais de ligação da superfície. Fonte: QIAN *et al.* (1995).



**Figura 5.** Estrutura da  $\beta$ -amilase. Os três domínios são diferenciados em cores. Nota-se a ausência dos íons cálcio e cloros, uma das diferenças com a  $\alpha$ -amilase. Fonte: PEDIA.com (2016). O domínio A constitui a estrutura do núcleo, o domínio B constitui as fitas antiparalelas e o domínio C contém fitas  $\beta$ .

A Tabela 2 apresenta uma serie de parâmetros operacionais sobre  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilase para garantir maior atividade enzimática.

**Tabela 2.** Parâmetros operacionais ótimos sobre  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilase. Fonte: BEZERRA (2002); TSCHOPE (2001).

	<b>Bacteriana (<i>B. subtilis</i>)</b>	<b>Fúngica (<i>A. oryzae</i>)</b>	<b>Malte</b>
Tipo de amilase	$\alpha$ -amilase	$\alpha$ -amilase	$\beta$ -amilase
pH ótimo	5,0-7,0	4,8-5,8	5,0-5,5
pH estabilidade	4,8-8,5	5,5-8,5	4,5-8,0
T ótima	60-70 °C	45-55 °C	40-50 °C
T inativação	>90 °C	> 60°C	>55 °C

A faixa de pH na qual a enzima bacteriana age com eficiência é maior que as enzimas de origem fúngica e vegetal, as quais catalisam melhor as reações bioquímicas em faixas de pH menores e meios mais ácidos. As temperaturas de estabilidade e de inativação da enzima bacteriana são superiores, o que lhe confere uma maior termoestabilidade em temperaturas altas.

Portanto os parâmetros operacionais das amilases de diferente origem são distintos em sua forma livre (homogênea). Isso gera a necessidade de desvendar como estas amilases irão se comportar quando passarem por um método de imobilização.

## 1.6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A modificação do estado de uma enzima através de sua imobilização sobre uma superfície de suporte é uma das possíveis formas de aumentar a sua atividade e estabilidade enzimática. Essa abordagem permite ampliar consideravelmente a aplicação da enzima na tecnologia de síntese orgânica, biotecnologia, indústria alimentícia, medicina, etc. (PETROV, 2012).

As enzimas são muito sensíveis, de forma que sua imobilização requer uma metodologia adequada para a conservação ou eventualmente melhoria das suas

propriedades, tais como estabilidade e atividade, aumentando assim, a possibilidade de reutilização (CATERINA *et al.*, 2013).

A maioria das técnicas de imobilização de enzimas pode ser enquadrada em: ligação com o suporte, ligação-cruzada (reticulada) e confinamento/encapsulamento. A ligação com o suporte pode ser física ou química (ligação covalente), a ligação-cruzada demanda um composto bifuncional e no confinamento/encapsulamento o catalisador fica circundado por algum tipo de matriz estrutural.

A Figura 6 ilustra os diversos métodos potencialmente empregados na imobilização de enzimas.



**Figura 6.** Principais estratégias de imobilização de enzimas. Fonte: HWANG & GU (2013).

De acordo com a Figura 6, a ligação com o suporte pode ser física (via ligações hidrofóbicas e por forças de Van der Waals), iônica ou por ligação covalente. A ligação física é considerada muito fraca para manter a enzima fixada ao suporte em processos industriais. A ligação covalente é mais forte e a ligação iônica mais forte ainda (HANEFELD & VEUM, 2006). A ligação-cruzada (*cross-linked*) consiste na imobilização de enzimas como agregados de enzimas reticulados, onde a reticulação ocorre pelo uso de um reagente bifuncional.

A atividade das enzimas imobilizadas para aplicações de longo prazo depende, em grande parte, da natureza do suporte, pois esse atua como um mediador eficaz da transferência de elétrons nas reações enzimáticas (SINGH *et al.*, 2013). A Tabela 3 ilustra alguns exemplos de abordagens na imobilização de enzimas descrito na literatura.

**Tabela 3.** Exemplos de pesquisas acerca de imobilização de enzimas ou microrganismos. Fonte: Diversos.

<b>Método</b>	<b>Suporte/modificador/estabilizante/surfactante</b>	<b>Comentários</b>	<b>Referência</b>
Ligação com o suporte	Tecido acrílico de amidrazona usado como suporte.	Tecido acrílico de amidrazona foi aplicado como suporte imobilizador da $\alpha$ -amilase	AL-NAJADA, A.R.; ALMULAIKY, Y.Q.; ALDHAHRI, M. (2019)
Ligação com o suporte	Imobilização usando quitosana como suporte.	Amilase oriunda de bactéria ( <i>Bacillus thuringiensis</i> ) imobilizada em quitosana.	ZUSFAHAIR; NINGSH, D.R.; KARTIKA, D.; FATONI A.; ZULIANA, A.L. (2017).
Ligação cruzada (cross-linked)	Imobilização de $\alpha$ -amilase em uma matriz de quitosana.	A imobilização da $\alpha$ -amilase com quitosana pode aumentar a estabilidade térmica dessa enzima.	YANDRI; SUHARTATI, T.; SATRIA, H.; WIDYASMARA, A.; SUTOPO, H. (2020).

Reticulação ( <i>cross-linking</i> ) com glutaraldeído	PAni-PVA (polianilina- álcool polivinílico)	Os filmes de PAni-PVA-Amilase poderiam ser usados para 30 ciclos mantendo 60 % da atividade da enzima livre, durante seu armazenamento em temperatura ambiente. Esta propriedade poderia ser explorada em processos biotecnológicos contínuos.	SINGH, S.; SAIKIA, J. P.; BURAGOHAİN, A. K. (2013)
Ligação com nanopartículas funcionalizadas	Nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionalizadas com amino-silanos e quitosana usadas como suporte para imobilização de $\beta$ -galactosidase.	Comparadas com a enzima livre, o sistema que continha aminosilanos apresentou atividade residual de 154%, 138% e 125%. Quando funcionalizada com quitosana apresentou atividade de 129%.	KRIŽNIK, L; VASIĆ, K; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. (2018)
Impregnação	Material fotoativado (Tiol-eno)	O $K_m$ da enzima livre e imobilizada apresentou diferença, provavelmente devido a limitações difusionais, efeitos estéricos e da força iônica.	CAKMAKCI, E.; DANIS, O.; DEMIR, S.; MULA ZIM, Y.; KAHRAMAN, M.V. (2013)
Encapsulamento	Imobilização em matriz de alginato.	Reutilização e afinidade aprimoradas de amilases imobilizadas na matriz de alginato.	ZUSFAHAİR; NINGSIH, D.R.; KARTIKA, D.;

			KURNIASIH, M.; NOFIANI, R.; FATONI, A. (2020)
Encapsulamento	Estruturas metal-orgânicas (MOFs) foram investigadas como suportes de imobilização enzimática.	A imobilização usando MOFs incrementa a estabilidade térmica e permite reutilização das enzimas.	DROUT, R.J.; ROBINSON, L.; FARHA, O.K. (2019)
Encapsulamento	Uma estrutura gerada usando acetato de zinco e 2-metilimidazol origina o Combi-MOF (um tipo de capsula).	Estudos de parâmetros cinéticos verificaram um aumento da taxa de hidrólise do amido ( $V_{max}$ ) do Combi-MOF após a co-imobilização. Além disso, o Combi-MOF foi reciclado no modo batelada que reteve até 52% da atividade residual após cinco ciclos sucessivos de reutilização. Além disso, o combi-MOF exibiu extraordinária estabilidade de armazenamento até 24 dias.	SALGAONKAR, M.; NADAR, S.S.; RATHOD, V.K. (2018)
Sol-Gel	Síntese de alumina via sol-gel.	Proteção de enzimas (anidrase carbônica, fosfatase ácida e peroxidase de rábano silvestre) da fotodegradação através da alumina sintetizada pelo método sol-gel.	SHAPOVALOVA, O. E. ; LEVY, D. ; AVNIR, D. ;

			VINOGRADOV, V.V. (2016)
Multivariado	PANIG-AMY (glutaraldeído modificado com polianilina)	A imobilização da $\alpha$ -amilase em PANIG resultou em uma forma de enzima mais estável. A estabilidade adquirida é resultado da proteção conferida à estrutura tridimensional, o que reforça a conformação da enzima, presumivelmente por meio de ligações multisítios com a PANIG.	PASCOAL, A. M.; MITIDIERI S.; FERNANDES, K. F. (2011).
Sol-gel	Carvão ativado e sílica	$\alpha$ -amilase imobilizada em carbono-sílica, contendo 25 % de SiO <sub>2</sub> (em peso), revelou uma atividade catalítica no processo de hidrólise de amido superior àquela da enzima em solução aquosa.	PETROV, A. L.; ERANKIN, S. V.; PETROV, L. A.; SHISHMAKOV, A. B. (2012)

De acordo com a Tabela 3, a imobilização de enzimas continua sendo alvo de investigações científicas. Uma grande variedade de técnicas e tipos de suportes é exibido na referida tabela. Uso de partículas magnéticas, utilização de matrizes orgânicas, funcionalização de superfície, síntese de materiais híbridos compõem um vasto universo em exploração ainda.

Entre os suportes usados a sílica consiste em um dos materiais mais versáteis que existe: sua superfície amorfa e a grande variedade de tamanhos, formas e texturas que pode gerar este material permitem inúmeras possibilidades. Uma das rotas de obtenção de sílicas consiste no método sol-gel, já citado na Tabela 3 e a seguir discutido.

## **1.7 MÉTODO SOL-GEL NO ENCAPSULAMENTO DE ENZIMAS**

O processo sol-gel representa uma ferramenta versátil no encapsulamento de enzimas. Esse envolve essencialmente duas reações: hidrólise e condensação, mais comumente, de alcóxidos metálicos (LEVY & ZAYAT, 2015). Suspensões coloidais (“*sols*”) que são subsequentemente convertidas em gel viscoso e daí para materiais sólidos. (WRIGHT & SOMMERDIJK, 2001). O princípio químico por trás do processo sol-gel de materiais à base de sílica é a transformação de espécies contendo Si-OR e Si-OH em compostos com ligações siloxano por reações de condensação. Para obter um gel estável, o número de ligações de siloxano (Si-O-Si) tem de ser maximizado e conseqüentemente o número de grupos silanol (Si-OH) e alcóxido (Si-OR) tem de ser minimizado. Os precursores mais comuns são soluções aquosas de silicatos e alcóxidos de silício, Si-(OR)<sub>4</sub>, principalmente tetrametilortosilicato (TMOS) e tetraetilortosilicato (TEOS) (LEVY & ZAYAT, 2015). O Esquema 1 apresenta as reações mencionadas.



**Esquema 1.** As etapas que ocorrem durante um processo sol-gel usando alcóxido Si-(OR)<sub>4</sub>: (1) Hidrólise de um grupo alcóxido, (2) Condensação de duas espécies -OH e (3) Condensação mista de um grupo -OH e espécies contendo grupos alcóxidos.

Ao encapsular enzimas usando a técnica sol-gel, é necessário levar em consideração alguns aspectos, como evitar dificultar/bloquear o sitio ativo (centro do catalisador) da enzima encapsulada (LEHNINGER, 2018), evitar a desnaturação de enzimas devido a condições experimentais (pH, temperatura, etc.) ou dificultar a difusão do substrato através da matriz encapsulante.

A perda biocatalítica durante o processo sol-gel pode ocorrer devido à desnaturação das enzimas ao interagir com os reagentes da síntese, em especial o álcool usado (álcool isopropílico tem um potencial de desnaturação menor que o etanol), o TEOS e o ácido usado (HCl, neste caso) também podem desnaturar as enzimas (HODGSON *et al.*, 2004). Uma adição tardia da enzima na síntese sol-gel é estratégica para evitar o contato com grandes concentrações destes compostos.

## 1.8 IMOBILIZAÇÃO USANDO MATERIAIS HÍBRIDOS

A Tabela 4 apresenta algumas aplicações de materiais híbridos.

**Tabela 4.** Exemplos de pesquisas acerca de imobilização de enzimas ou microrganismos em materiais híbridos. Fonte: Diversos.

<b>Método</b>	<b>Suporte/modificador/estabilizante/surfactante</b>	<b>Comentários</b>	<b>Referência</b>
Sol-gel	Encapsulamento de enzima usando sol-gel.	Encapsulamento enzimático eficiente dentro de folhas de sílica sol-gel preparadas por poli-L-lisina como catalisador.	KATSUYA, K.; SUNGHO, L.; FUKUE, N. (2020).
Sol-gel	Filmes de polímero de epóxi-sílica híbridos foram preparados pelo método sol-gel.	Lipase de <i>Candida rugosa</i> foi imobilizada covalentemente em filmes híbridos de polímero epóxi-sílica.	YUCE-DURŞUN. B.; CIGIL, A.B.; DONGEZ, D.; KAHRAMAN, M.V.; OGAN, A.; DEMIR, S. (2016).
Sol-gel	Silanos	Bioimpressão e encapsulamento de Lipase usando sol-gel e alquil-silanos de diferente tamanho como precursores.	YANG, J.; LIU, L.; CAO, X. (2010).
Sol-gel	Dialcoxi-silano	Encapsulamento de Lipase usando sol-gel e diferentes distribuições de dialcoxi-silano.	WEISER, D.; BOROS, Z.; HORNYÁNSZKY, G.; TÓTH, A.; POPPE, L. (2012).

Sol-gel	Goma carboximetil-tamarindo como catalizador sol-gel.	Nano-híbridos de goma-sílica carboximetil-tamarindo para imobilização eficaz da amilase	SINGH, V. & KUMAR, P. (2011)
Sol-gel	Hibrido de alginato e sílica	Síntese de hidrogel híbrido alginato-sílica para conversão biocatalítica por $\beta$ -glucosidase em microrreator	ONBAS, R. & YESIL-CELIK TAS, O. (2018).
Sol-gel	Hibrido de quitosana/siloxano	Um polímero híbrido derivado de siloxano e quitosana foi obtido pela técnica sol-gel O suporte híbrido foi quimicamente modificado com epícloridrina e utilizado para imobilizar lipase.	SILVA, G. S.; OLIVEIRA, P. C.; GIORDANI, D. S.; CASTRO, H. F. DE. (2011).
Sol-gel e outros.	Híbridos de polissacarídeos e sílicas.	Uso de biosilicas para diversas aplicações.	SINGH, V.; SRIVASTAVA, P.; SINGH, A.; SINGH, A.; MALVIYA, T. (2016).

Os exemplos exibidos na Tabela 4 demonstra que o sol-gel é uma técnica que pode ser diversificada, diversas modificações podem ser realizadas na síntese tradicional gerando materiais híbridos. Apesar de vários avanços ainda existem restrições que precisam ser superadas. Um dos problemas mais frequentes no encapsulamento de amilases em soluções de gel é a difusão de compostos orgânicos (substrato) na matriz de confinamento gerada. De fato, pode-se considerar esse problema intrínseco aos catalisadores imobilizados (suportados). Limitações da imobilização de amilases na matriz de sílica podem estar associadas ao grande tamanho e formato do próprio substrato, que deve migrar pelos poros até os centros ativos.

Por outro lado, o processo sol-gel dispõe de uma versatilidade e variabilidade de condições de síntese que lhe garante uma diversidade de materiais dotados de características distintas, decorrentes das condições experimentais empregadas. Ao analisar diversos artigos publicados, aparentemente um estudo sistemático do efeito da natureza da rota empregada no tocante ao encapsulamento das enzimas amilases obtidas de diversas fontes (bacteriana, fúngica e vegetal) com o uso sistemático de silanos como modificador ainda não foi realizado.

Surgiu-nos, dessa forma, alguns questionamentos: a natureza da enzima apresenta um comportamento distinto quando imobilizada? O uso de sistemas híbridos geradas a partir da funcionalização da sílica gerada por processo sol-gel permitiria o desenvolvimento de enzimas encapsuladas com reduzida limitação difusional? A funcionalização da superfície externa a partir do desenvolvimento de materiais híbridos facilitaria a difusão dos substratos? A hipótese da presente tese é que os ajustes das condições de síntese do processo sol-gel o que inclui o uso de organosilanos como agentes de funcionalização permitem desenvolver catalisadores enzimáticos encapsulados ativos na hidrólise de materiais amiláceos.

## **CAPÍTULO 2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar as potencialidade e limitações dos organosilanos como modificador no encapsulamento de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase via processo sol-gel, ativas na hidrólise de amido.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

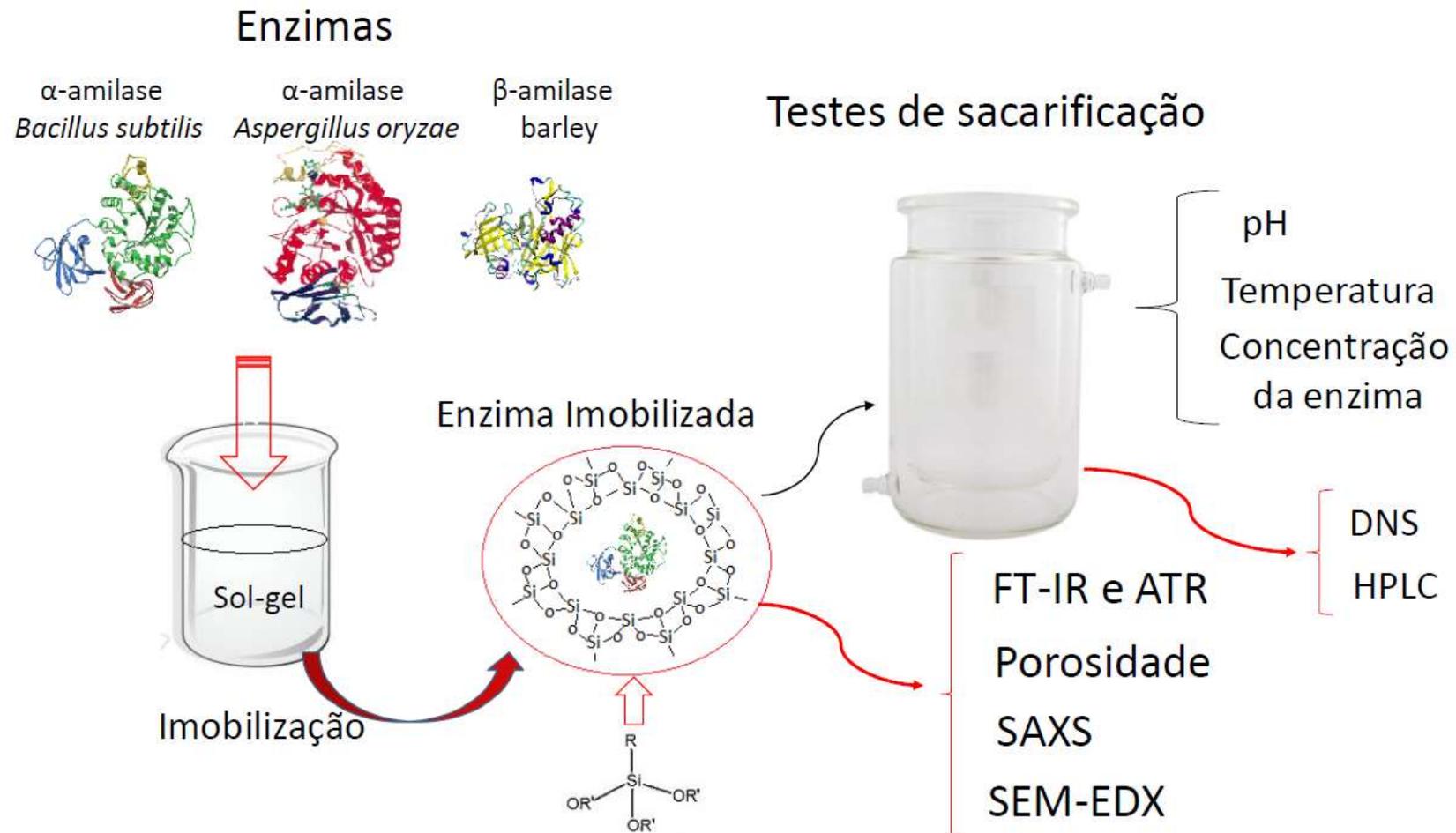
- Avaliar o efeito da natureza das enzimas nas características estruturais dos xerogeis obtidos e sua correlação com a atividade enzimática.
- Correlacionar a rota de encapsulamento da enzima com a atividade biocatalítica.
- Testar organosilanos como modificadores, analisando as mudanças estruturais e a atividade biocatalítica obtida através destas sílicas híbridas.
- Verificar se o encapsulamento sol-gel e/ou o uso de organosilanos altera a clivagem das amilases gerando proporções alteradas de glicose e maltose.

## **CAPÍTULO 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **3.1 METODOLOGIA GERAL**

Neste item da tese será descrita a metodologia de uma forma geral para uma posterior elucidação de cada etapa/técnica nos itens subsequentes. A Figura 7 apresenta de uma forma geral as etapas e técnicas da pesquisa desenvolvida.

**Figura 7.** Metodologia geral usada na imobilização, testes e caracterização dos produtos obtidos.



As amilases passaram por um processo de imobilização de forma individual (não houve encapsulamento concomitante), a enzima resultante ficava encapsulada numa rede de sílica gerada durante o sol-gel que em uma primeira etapa era sintetizada sem a presença de organosilanos e depois com os organosilanos que serão apresentados. A enzima encapsulada era usada em testes de sacarificação realizadas em um reator de vidro onde se ajustava o pH, controlava a temperatura e se testavam 3 concentrações enzimáticas. As caracterizações estão associadas as partículas geradas durante o encapsulamento (infravermelho, porosidade, SAXS e microscopia) ou ao mosto obtido da sacarificação (DNS e cromatografia).

### 3.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes e enzimas usadas nessa tese foram obtidos comercialmente em diferentes empresas e de diversas marcas. A Tabela 5 apresenta os reagentes usados durante a execução dos experimentos.

**Tabela 5.** Reagentes usados na execução dos experimentos.

Reagente	Finalidade	Pureza/atividade	Marca
Acetato de sódio	Tampão (controle de pH)	Teor mínimo de 99%	Dinâmica
Amido solúvel	Substrato da sacarificação.	99%	Dinâmica
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> ).	Os íons Ca <sup>+</sup> estabilizam as enzimas amilases.	-	Nuclear
Fenol	Usado na preparação da solução DNS.	Teor mínimo de 99%	Dinâmica
Tartarato de sódio e potássio	Usado na preparação da solução DNS.	Teor mínimo de 99%	Dinâmica
Metabissulfito de sódio	Usado na preparação da solução DNS.	Teor mínimo de 97%	NEON

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Ácido dinitrosalicílico (DNS).	Usado na preparação da solução DNS.	Teor mínimo de 98%	Sigma-Aldrich
Ácido cítrico	Usado na preparação da solução citrato-fosfato.	Teor mínimo de 99,5%	NEON
Ácido acético	Usado para ajustar pH.	Maior que 99 %	NEON
Ácido clorídrico	Usado na síntese sol-gel.	97%	Synth
Fosfato de sódio bibásico	Usado na preparação da solução citrato-fosfato.	Teor mínimo de 98%	NEON
$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	Enzima usada na hidrolise do amido.	Atividade=55,6 U/mg	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	Enzima usada na hidrolise do amido.	Atividade maior que 800 FAU/g	Sigma-Aldrich
$\beta$ -amilase (cevada)	Enzima usada na hidrolise do amido.	53 U/mg proteína	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio (NaOH)	Diversos fins.	Mínimo de 99%	Vetec
Álcool isopropílico	Precursor sol-gel	Mínimo de 99,5%	Dinâmica
TEOS (tetraetilortosilicato)	Precursor sol-gel	Mínimo de 98%	Sigma-Aldrich
KBr	Infravermelho	Acima dos 99%	-
Padrão Glicose	HPLC	Acima dos 99%	Sigma-Aldrich
Padrão Maltose	HPLC	Acima dos 99%	Sigma-Aldrich

C1 (Trietóximetilsilano)	Silano/Modificador sol-gel	99%	Sigma- Aldrich
C8 (N-octilrietóxisilano)	Silano/Modificador sol-gel	-	Dow Corning
C18 (Trimetóxi(octadecil)silano)	Silano/Modificador sol-gel	≥ 85%	TCI
(3-aminopropil)rietóxisilano	Silano/Modificador sol-gel	99%	Sigma- Aldrich
1-(3-Trimetóxisilil)propil]urea	Silano/Modificador sol-gel	99%	Sigma- Aldrich
[3-(2-aminoetilamino)propil]trimetóxi silano	Silano/Modificador sol-gel	> 80%	Sigma- Aldrich
N1 – (3-Trimetóxisililpropil)diétilenetríamína	Silano/Modificador sol-gel	-	-
(3-Mercaptopropil)Trimetóxisilano	Silano/Modificador sol-gel	-	-

- Informação não disponível.

### 3.3 SISTEMAS HOMOGÊNEOS

Para as reações de hidrólise de amido foi usado um reator de vidro com camisa externa acoplada a um banho termostaticado com bomba (circulação). A agitação foi constante e idêntica em todas as reações.

A enzima refrigerada foi diluída em uma solução *buffer* (tampão + CaCl<sub>2</sub>) também refrigerada, buscando evitar a perda catalítica por choque térmico. Esta enzima diluída passou por um aquecimento gradual até seu uso.

A suspensão foi elaborada diluindo-se 0,0025 mol de acetato de sódio, 0,0005 mol de CaCl<sub>2</sub> e 1 g de amido em um volume reacional de 100 mL, usando água deionizada. Após, a suspensão passou por um ajuste de pH, sendo utilizado ácido acético, NaOH ou bicarbonato de sódio para ajustar o pH.

Todas as reações foram realizadas por 60 minutos e, após sua interrupção, eram retiradas as alíquotas de 0,5 mL. Estas eram imediatamente aquecidas em um banho com água a 100°C por 5 minutos com a finalidade de interromper a atividade da enzima, depois resfriadas para conservar as amostras até a análise dos açúcares redutores (método DNS descrito no anexo A).

### 3.4 PARÂMETROS OPERACIONAIS

Houve uma série de testes buscando avaliar o efeito da concentração da enzima. A Tabela 6 apresenta os dados dos sistemas homogêneos usados.

**Tabela 6.** Parâmetros das enzimas  $\alpha$ -amilase (bacteriana e fúngica) e  $\beta$ -amilase usados nos sistemas homogêneos.

Enzima	Estado Físico	Quantidade	T (°C)	pH
$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	Sólido	0,5 -5 mg	60-70	5,00-7,00
$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	Líquido	0,5 -5 mg.	45-55	4,30-6,30
$\beta$ -amilase (cevada)	Sólido	0,5 -5mg	50-60	4,25-6,25

Uma vez definido estes intervalos de dados procedeu-se à realização dos processos homogêneos e posteriormente os heterogêneos, nas quais foi avaliada a atividade das enzimas na conversão de amido em açúcares redutores com os parâmetros delimitados na Tabela 6.

### 3.5 SISTEMAS HETEROGENEOS

Nas sacarificações usando enzimas encapsuladas, a suspensão era preparada da mesma forma que nos sistemas homogêneos (já descrito), a enzima encapsulada sempre consistiu em um sistema submetido à geleificação no dia anterior. A descrição da síntese sol-gel está no item 3.5 “Encapsulamento das enzimas via sol-gel” do presente trabalho.

O que diferenciava o sistema heterogêneo do homogêneo era a massa de seu sistema, o qual devia ser cuidadosamente medida, subentendia-se que toda a enzima adicionada à síntese estava presente no sol-gel resultante.

### 3.6 ENCAPSULAMENTO DAS ENZIMAS VIA SOL-GEL

As proporções dos reagentes precursores do sol-gel usadas no processo de encapsulamento das enzimas foram obtidas por síntese e posterior avaliação da atividade biocatalítica. A avaliação inicial consistia em analisar a conversão em açúcares redutores pelo método DNS.

No processo sol-gel aquoso via rota ácida foi usado como precursor TEOS (tetraetilortosilicato) e álcool isopropílico. Uma solução de HCl (0,01 M) que age como catalisador, também foi adicionado água no sistema e solução buffer (tampão com íons  $\text{Ca}^{2+}$ ). A agitação usada foi magnética (“peixinho”) e constante em todas as geleificações.

No momento do acréscimo da enzima no sol-gel em andamento foram adicionados 2 mL de solução tampão e, na sequência, a solução da enzima. O objetivo foi tamponar o meio reacional e evitar a desnaturação devido ao choque de pH que o sol-gel em andamento poderia provocar (rota ácida). Foi avaliado também o efeito do tempo da adição da enzima. Era obtido um gel-úmido que passava por uma secagem em estufa.

A preparação das enzimas encapsuladas via sol-gel consistiu em adicionar a um Becker de 25 mL: 5 mL de TEOS, 3 mL de álcool isopropílico, 20 mL de água deionizada, 1 mL de ácido clorídrico HCl (0,01 N), 0,35 mL de solução tampão (solução de acetato de sódio com  $\text{CaCl}_2$ ) e por último a solução de enzima, a qual era adicionada após 3 horas de geleificação. O processo sol-gel era interrompido após 30 minutos da adição da enzima.

A quantidade de enzima adicionada na síntese sol-gel sempre superou a quantidade de enzima necessária para cada batelada, variando de 2,5 mg a 250 mg. Isto permitia que fosse possível realizar algumas sacarificações usando uma única síntese, era possível realizar uma triplicata e sobrava enzima encapsulada para armazenar e servir de amostra para as caracterizações.

Para uma identificação clara dos xerogeis obtidos, um código foi adotado para identificar as enzimas encapsuladas, onde as letras  $\alpha$ AB significam  $\alpha$ -amilase bacteriana,  $\alpha$ AF significa  $\alpha$ -amilase fúngica e  $\beta$ A significa  $\beta$ -amilase. Os números representam a quantidade de enzima adicionada na síntese sol-gel. A Tabela 7 apresenta os códigos empregados.

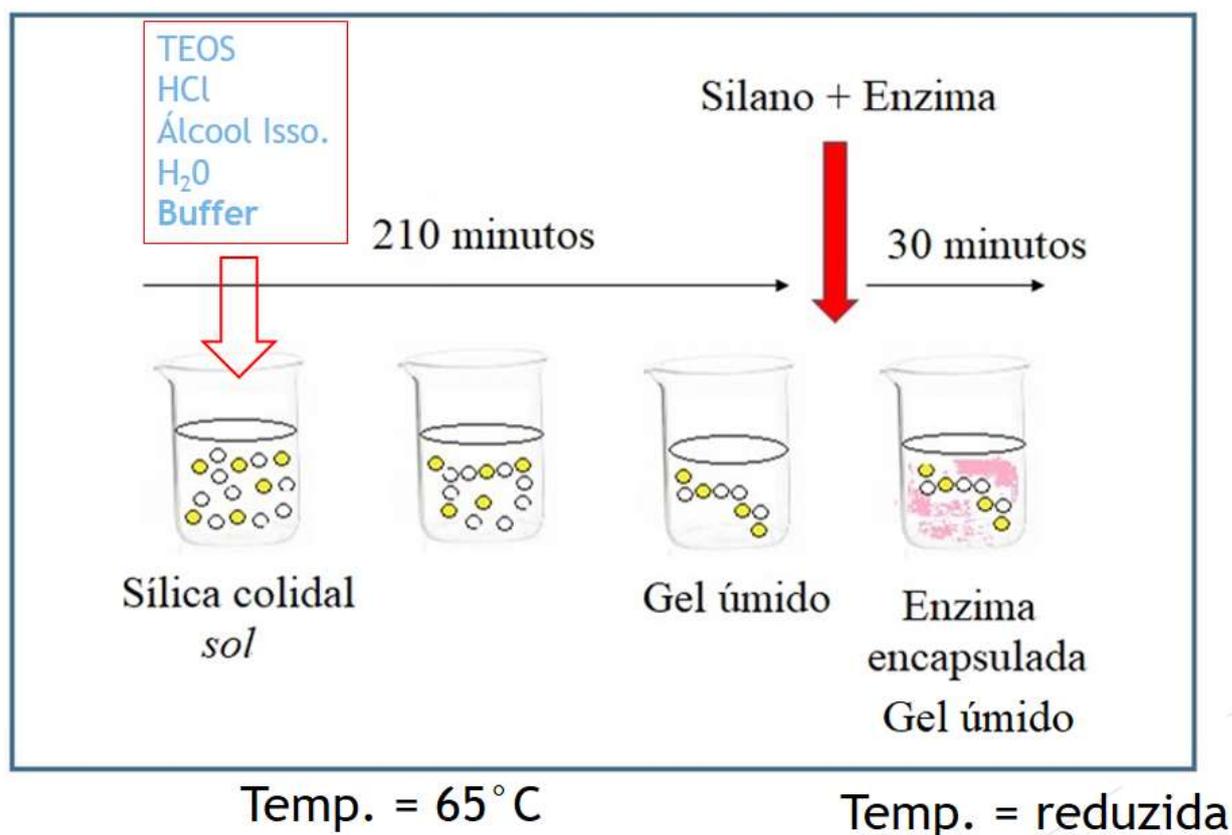
**Tabela 7.** Simbologia usada para identificar as enzimas encapsuladas.

<b>Símbolo</b>	<b>Enzima encapsulada</b>	<b>Quantidade encapsulada (mg)</b>	<b>Quantidade usada na hidrolise (mg)</b>
Branco	Nenhuma	0	-
$\alpha$ AB_2.5	$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	2,5	0,5
$\alpha$ AB_10	$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	10	2
$\alpha$ AB_25	$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	25	5
$\alpha$ AB_250*	$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	250	-
$\alpha$ AF_2.5	$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	2,5	0,5
$\alpha$ AF_10	$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	10	2
$\alpha$ AF_25	$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	25	5
$\alpha$ AF_250*	$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	250	-
$\beta$ A_2.5	$\beta$ -amilase (cevada)	2,5	0,5
$\beta$ A_10	$\beta$ -amilase (cevada)	10	2
$\beta$ A_25	$\beta$ -amilase (cevada)	25	5
$\beta$ A_250*	$\beta$ -amilase (cevada)	250	-

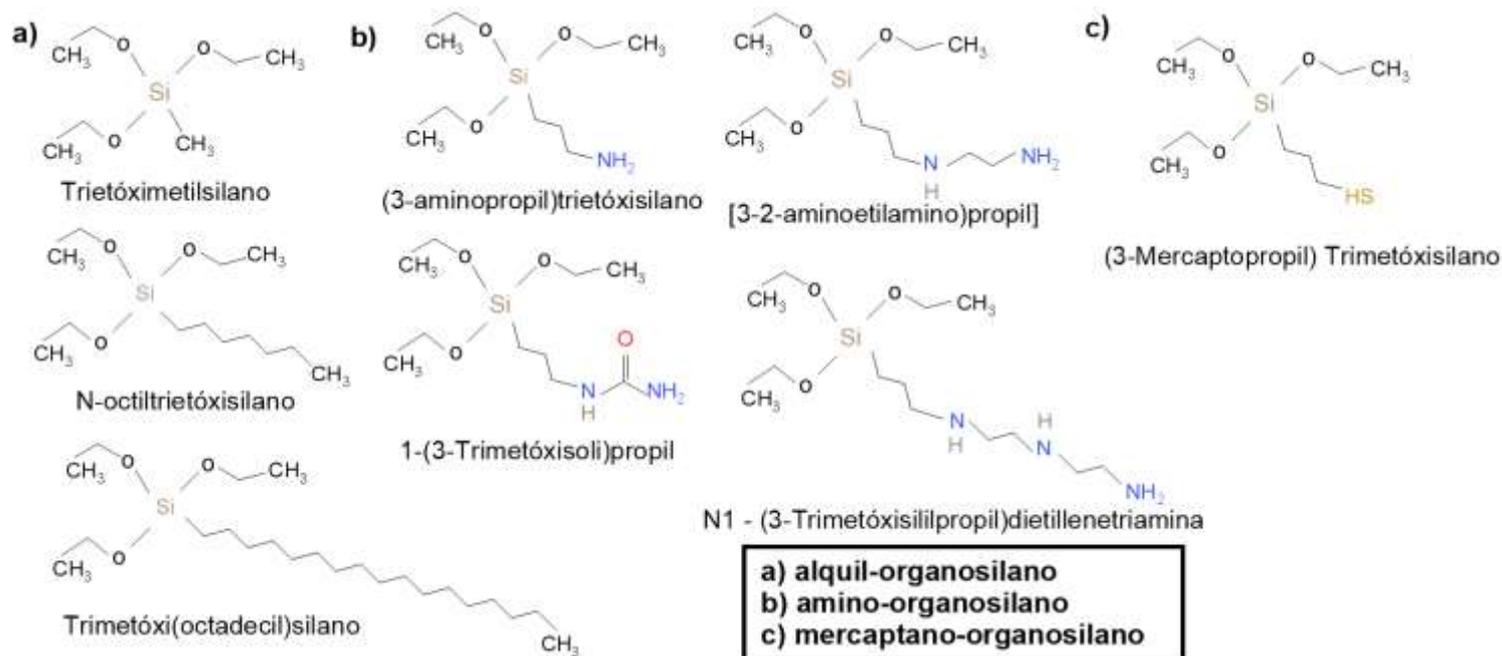
\*Sintetizado unicamente para as caracterizações (não usado nas sacarificações).

### 3.7 USO DE ORGANOSILANOS NA SÍNTESE DE SÍLICAS HÍBRIDAS

As sínteses sol-gel nas quais organosilanos foram adicionados é quase idêntica a metodologia já descrita, com a diferença da adição do organosilano instantes antes da enzima, como o tempo de adição da enzima e do organosilano é muito próximo ocorre uma forte interação entre a enzima, o organosilano e a *sol* que está prestes a virar *gel*. A Figura 8 apresenta uma representação da síntese sol-gel empregada.



**Figura 8.** Procedimento experimental usado para encapsular amilases com organosilanos. A Figura 9 apresenta os organosilanos usados.



**Figura 9.** Organosilanos usados no sol-gel. a) alquil-organosilano, b) amino-organosilano, c) mercaptano-organosilano.

A quantidade molar adicionada no sol-gel foi idêntica para todos os silanos ( $n = 5,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) e as condições experimentais para os testes de sacarificação usando as amilases encapsuladas com presença de organosilanos são exibidos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Condições reacionais dos testes de sacarificação usando enzimas encapsuladas com organosilanos.

Enzima	pH	Temperatura (°C)
$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	6,0	65
$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	5,3	50
$\beta$ -amilase (cevada)	5,3	45

Quantidade de enzima = 25 mg.

Foi usada uma quantidade fixa de amilases de 25 mg para cada síntese sol-gel. A análise dos resultados (mais adiante) demonstrará a conveniência de usar estes parâmetros nos testes de sacarificação, as sínteses contendo organosilanos representa uma segunda etapa deste trabalho acadêmico.

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES CATALÍTICOS

As técnicas de caracterização foram usadas para elucidar as peculiaridades obtidas nos xerogéis resultantes. As análises de infravermelho foram empregadas para avaliar as possíveis diferenças no comportamento das ligações químicas decorrentes do encapsulamento incluindo as diferenças oriundas da adição de organosilanos. A análise de porosidade dos xerogéis foi usada para avaliar as características de difusão do amido, além de correlacionar características estruturais com atividade enzimática, a análise de FT-IR do encapsulamento contendo C18 ajuda na caracterização das estruturais associadas a difusão também. A análise do tamanho e formato das partículas usando SAXS forneceu dados estruturais importantes. A microscopia eletrônica revela informações relevantes da superfície dos xerogéis.

#### 3.8.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) E REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR).

Os espectros de absorção molecular no infravermelho dos suportes foram analisados usando o espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300 com um detector DLaTGS (*standard deuterated L-alaninedopedtriglycine sulfato*), usando o intervalo de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Uma pequena quantidade da amostra, poucos mg foram misturados com KBr seco. O sólido foi pastilhado sob pressão resultando nas pastilhas usadas na análise.

Algumas amostras (sem organosilanos) foram analisadas por ATR (Refletância Total Atenuada) de forma semelhante ao FT-IR porém sem a necessidade de confeccionar as pastilhas KBr, neste caso a amostra macerada é analisada diretamente. Um aparelho Alpha-P (Bruker) foi usado para esta finalidade.

#### 3.8.2 ANÁLISE DE POROSIDADE POR ADSORÇÃO DE NITROGÊNIO

A caracterização da área específica ( $S_{\text{BET}}$ ), tamanho ( $D_{\text{PBJH}}$ ) e volume ( $D_{\text{PBJH}}$ ) dos poros para as enzimas encapsuladas foram feitas a partir das isotermas de adsorção-dessorção do nitrogênio a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Utilizou-se aproximadamente 100 - 200 mg de amostra

seca. As amostras foram previamente degaseificadas a 110 °C durante 18 horas sob vácuo no equipamento MicromeriticsVacPrep 061. As isotermas de adsorção física de nitrogênio por amostra foram realizadas no equipamento MicromeriticsTriStar II 3020, no intervalo de pressão parcial de  $0,01 < P.P_0^{-1} < 0,25$ . A área específica ( $S_{BET}$ ) foi calculada pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), enquanto o tamanho e volume de poro através da isoterma de dessorção pelo método de Barret-Joyner-Halenda (BJH).

### **3.8.3 Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS).**

As amostras foram analisadas por espalhamento de raios X no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas,) usando um comprimento de onda de 0,1448 nm. Usando um detector CCD, o feixe incidente de raios X foi identificado em duas distâncias amostra-detector (1548,8 mm e 2245,7 mm) para aumentar a magnitude do vetor de espalhamento,  $q \left( q = \left( \frac{4\pi}{\lambda} \right) \sin \theta \right)$ , onde  $2\theta$  é o ângulo de espalhamento. As amostras foram dispostas diretamente num porta-amostra fechado com duas fitas de Kapton<sup>®</sup> e as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

A intensidade foi corrigida considerando a correta intensidade do raio incidente, a absorção da amostra e a subtração do branco. Os dados de baixo e alto ângulo foram unidos mediante o software Mathematic<sup>®</sup> para gerar um arquivo integrado de cada amostra. As análises dos dados foram realizadas usando a rotina de avaliação Irena (ILAVSKY & JEMIAN, 2009; ILAVSKY *et al*, 2013; ILAVSKY *et al*, 2018) implementada no programa IgorPro (WaveMetrics, Portland, USA) (KILNE, 2006).

### **3.8.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADA ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE RAIOS X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (SEM-EDX)**

Experimentos de SEM-EDX foram realizados em um equipamento IVO-MEV-10 disponível no Centro de Microscopia e Microanálise localizado no campus do vale da UFRGS. As amostras foram inicialmente fixadas numa fita de carbono e, em seguida, revestidas com carbono por meio de técnicas de pulverização convencionais usando ouro.

### 3.9 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES VIA MÉTODO DNS.

Os açúcares redutores foram determinados pela metodologia DNS, desenvolvida por MILLER (1959). O preparo da solução DNS foi adaptado de “Protocolos e Métodos de Análise em Laboratório de Biotecnologia Agroalimentar e de Saúde Humana” (SPEROTTO *et al*, 2014). Os reagentes e as respectivas quantidades estão descritas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Reagentes usados para elaborar 100 mL de solução DNS.

Reagente	Quantidade (g)
Hidróxido de sódio	1,2
Tartarato de sódio e potássio	20,4
Metabissulfito de sódio	0,552
Fenol	0,252
DNS	0,708

Além da solução DNS foi necessária o uso de uma solução tampão citrato-fosfato para um tratamento prévio das alíquotas obtidas dos processos de bateladas enzimáticas e da solução glicose usada como padrão na construção da curva de calibração.

Para preparar a solução tampão de citrato-fosfato 0,05 M (pH 6,0) foi usado o seguinte procedimento: em uma proveta de 50 mL, foram adicionados 13,4 mL de ácido cítrico 0,05 M e o volume completado com fosfato de sódio bibásico 0,05 M. O pH foi ajustado (pH=6,0) com uma solução de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e a solução estocada a 4°C.

A solução padrão de glicose usada no método DNS foi preparada na concentração de 25 µmol/mL.

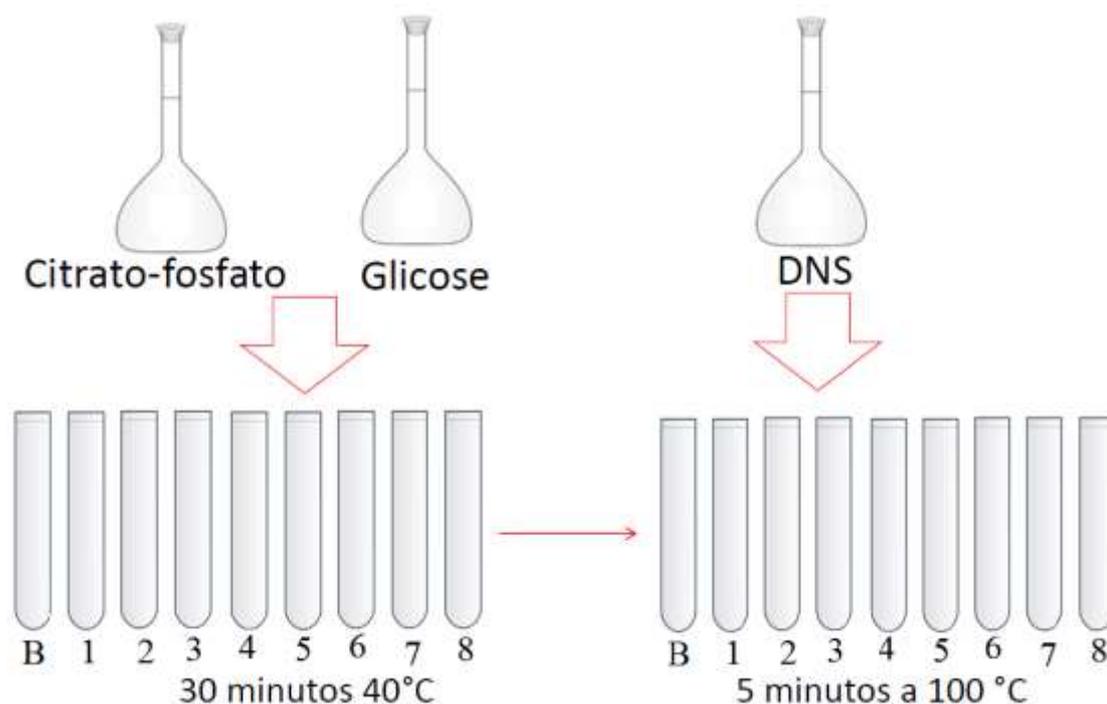
A solução DNS foi usada para reagir com a solução padrão de glicose e com as alíquotas obtidas após as reações. Para isso, as alíquotas da solução padrão de glicose e as alíquotas obtidas nas sacarificações eram transferidas para tubos de ensaio de 15 mL. Todas as amostras eram tratadas com a solução citrato-fosfato por 30 minutos a 40°C e

depois era adicionado o DNS, o qual reagia a 100°C por 5 minutos. Uma vez realizada a reação, procedeu-se à diluição dos tubos até 15 mL. A Tabela 10 apresenta as quantidades empregadas na elaboração destas soluções.

**Tabela 10.** Volumes usados nos tubos de ensaios para a reação DNS.

<b>Tubo</b>	<b>Volume solução padrão (mL)</b>	<b>Volume de água (mL)</b>	<b>Tampão citrato-fosfato</b>	<b>DNS (mL)</b>	<b>Volume de diluição de água mL (após reação DNS)</b>
B	0	1	1	1	12
1	0,1	0,9	1	1	12
2	0,2	0,8	1	1	12
3	0,3	0,7	1	1	12
4	0,4	0,6	1	1	12
5	0,5	0,5	1	1	12
6	0,6	0,4	1	1	12
7	0,7	0,3	1	1	12
8	0,8	0,2	1	1	12

A Figura 10 apresenta de uma forma visual a metodologia usada para a confecção das curvas de calibração.

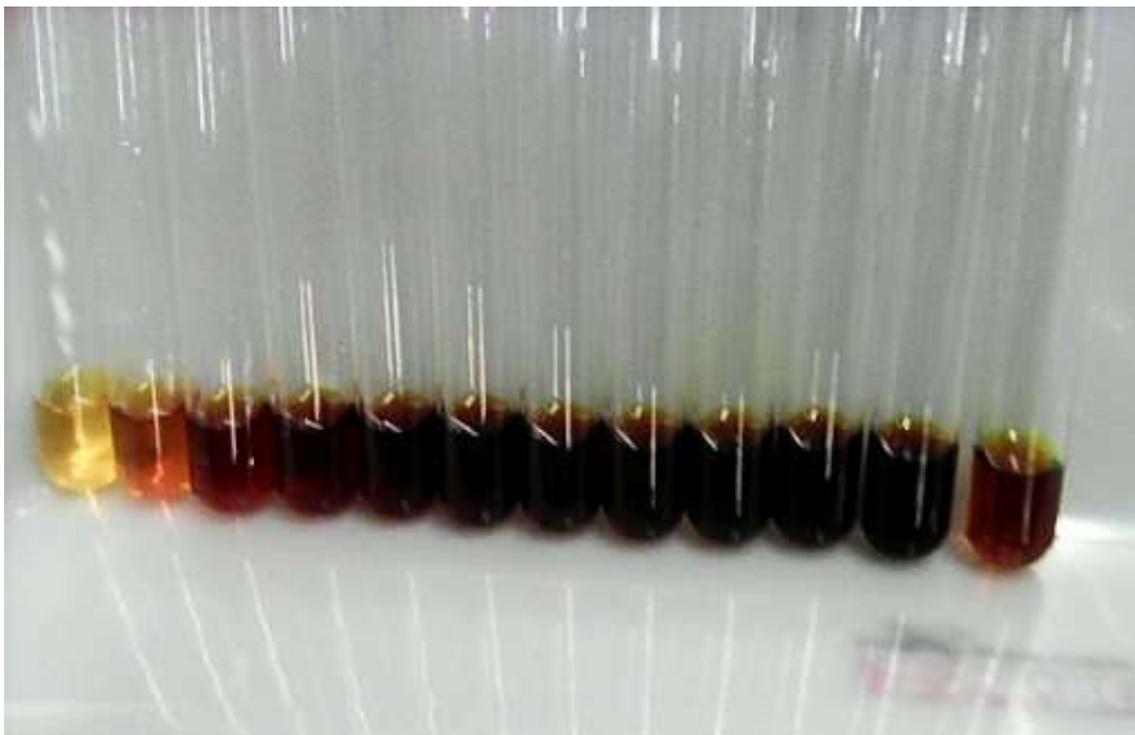


**Figura 10.** Metodologia DNS usada para estimar açúcares redutores.

Nas alíquotas obtidas da sacarificação foi adicionado 0,5 mL de água para completar 1 mL. O restante do tratamento é idêntico aos demais tubos. O volume de diluição foi adicionado após a reação dos açúcares redutores com a solução DNS. Após a homogeneização, os tubos eram levados ao espectrofotômetro UV-visível para leitura da absorbância em 540 nm e confecção das curvas de calibração.

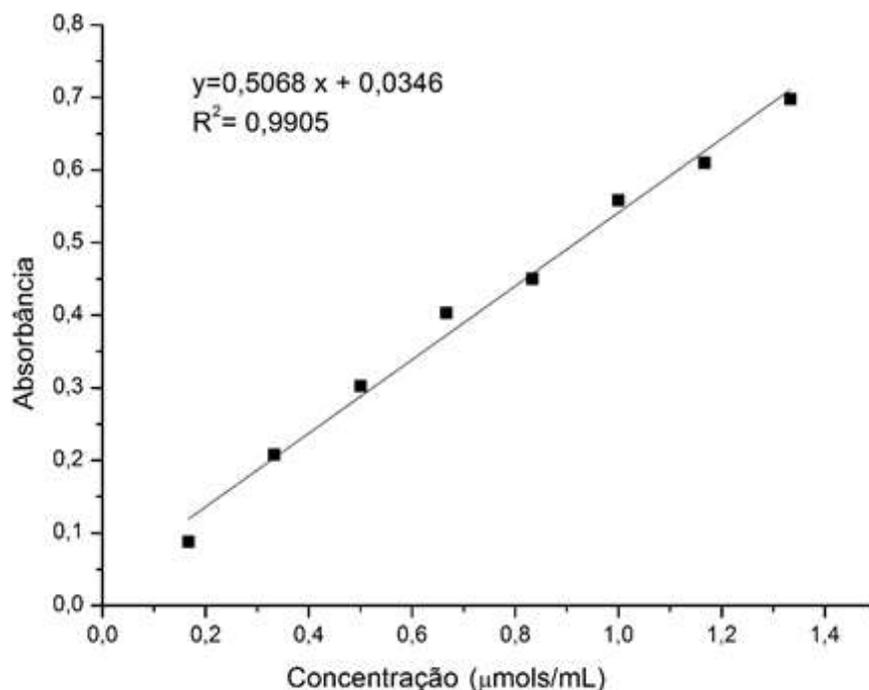
### 3.10 CONFECÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A determinação de açúcares redutores foi realizada usando o método 3,5 ácido dinitrosalisílico, nesta metodologia uma reação colorimétrica ocorre, as cores obtidas nos tubos de ensaio após a reação variam de amarelo (branco), caramelo (baixas concentrações de açúcares redutores) a caramelo escuro (altas concentrações). A Figura 11 apresenta uma das reações realizadas que inclui os tubos usados na confecção da curva de calibração.



**Figura 11.** Tubos de ensaio após a reação DNS (antes da diluição) usados na confecção de uma curva de calibração. A direita temos tubos associados a resultados das sacarificações.

A metodologia DNS é sensível às possíveis modificações que ocorram nas soluções usadas: a solução citrato-fosfato é sensível ao calor e mudanças de pH e a solução DNS é sensível ao calor e luz. Portanto, optou-se sempre por confeccionar uma curva de calibração para cada uma das análises dos mostos obtidos. Em alguns casos, por economia de tempo, as alíquotas obtidas das sacarificações eram congeladas para uma posterior análise DNS. A Figura 12 apresenta uma das diversas curvas de calibração obtidas.



**Figura 12.** Curva de calibração de glicose obtida pelo método DNS.

A alta linearidade entre 0,2 µmol/mL e 1,4 µmol/mL obtida ( $R^2$  acima de 0,99) demonstra uma boa precisão empregada na presente tese.

### 3.11 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Do processo de sacarificação do amido foram obtidos mostos posteriormente analisados por HPLC visando avaliar as concentrações e proporções de glicose e maltose obtidas. Foram usadas duas colunas cromatográficas diferentes, a primeira coluna foi usada para obter os resultados da Tabela 20 e 21, ou seja, os sistemas homogêneos e encapsulamento sem organosilanos, a seguir a descrição do HPLC mencionado.

A análise cromatográfica foi realizada utilizando o sistema HPLC Dionex Ultimate 3000 equipado com Detector de Índice de Refracção (RID). A coluna utilizada foi uma BioRad Aminex® HPX-87H (300 x 7,8 mm x 9 µm) a uma temperatura de 60 °C. A fase móvel consistiu em ácido sulfúrico 0,001 M em modo isocrático a um caudal de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 20 µL e o tempo de análise foi de 16 minutos.

Os resultados obtidos na Tabela 22, ou seja, os dados associados ao uso de organosilanos no encapsulamento, foram alcançados usando-se outra coluna cromatográfica. A seguir a descrição associada a mencionada análise. A quantificação da

maltose e da glicose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento foi um Ultimate 3000 Dionex e detector de índice de refração (RID) Shodex RI-101. A separação por HPLC foi realizada em uma coluna Luna® Omega Sugar (150 mm × 4,6 mm × 3 µm) a 40 ° C, com uma fase móvel isocrática de CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O 75:25, mantida a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. As soluções de amostra foram filtradas em filtros de membrana de 0,45 µm e o volume de injeção foi de 20 µL. A temperatura do RID foi mantida a 40 ° C.

As amostras analisadas consistiram em alíquotas retiradas de uma porção previamente congeladas dos mostos hidrolisados obtidos, eles passaram por um processo de filtração após o descongelamento, foram diluídos por um fator de diluição 3.

## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 ESTUDOS PRELIMINARES**

Ao iniciar os estudos da atividade biocatalítica das enzimas usadas nas reações de hidrólise de amido, uma das primeiras atividades foi determinar a concentração de açúcares redutores resultantes dos sistemas homogêneos, executados em uma faixa de temperaturas, pHs e concentrações de enzima que abrangessem as condições ótimas relatadas na literatura e usados na execução dos primeiros experimentos.

A comparação de sistemas homogêneos versus sistemas encapsulados e sistemas encapsulados com organosilanos permite avaliar a atividade biocatalítica da enzima em sua forma livre, encapsulada sem influência dos organosilanos e seu comportamento em uma sílica modificada.

### **4.2 TEMPO DE ADIÇÃO**

A adição da solução tampão na síntese sol-gel foi essencial para um encapsulamento bem-sucedido: uma reação sem sua presença recai em uma síntese muito rápida. A adição de enzimas em um meio reacional com alta concentração de álcool isopropílico, TEOS ou HCl residual provoca a desnaturação da enzima. Se o tempo de geleificação é estendido, o processo de evaporação dos compostos desnaturantes excedentes é muito maior. Portanto, o aumento do tempo de geleificação provocado pela adição da solução tampão foi essencial para obter enzimas encapsuladas com atividade biocatalítica.

Após alguns testes iniciais foi usado como tempo padrão de adição 3 horas, ou seja, após iniciar a reação se aguardou 3 horas para proceder com a adição da enzima, e mais 30 minutos para finalizar o sol-gel, gerando-se um gel úmido que posteriormente passa por um processo de secagem em estufa.

O efeito do tempo da adição da enzima em sua atividade é ilustrado na Tabela 11 a qual apresenta os resultados das sacarificações usando  $\alpha$ -amilase encapsulada para diferentes tempos de adição.

**Tabela 11.** Sistemas com diferentes tempos de adição da enzima.

Enzima	Tempo de adição (horas)	Conversão ( $\mu$ moles/mL)Hetero
$\alpha$ -amilase	1	Traços*
<i>(Bacillus subtilis)</i>	2	19,9
	3	27,4

Quantidade de enzima=5mg, temperatura 65 °C, pH=6,0.

\*Baixa conversão, quase nula.

Analisando os resultados da Tabela 11 pode-se concluir que após três horas de geleificação, o meio reacional do sol-gel adquiriu níveis baixos de compostos desnaturantes das enzimas. Uma análise de dados, que serão apresentados no decorrer do documento, demonstra que a conversão obtida se aproxima do sistema homogêneo após 3 horas de geleificação. A total geleificação do sol-gel ocorre antes das quatro horas, por isso o tempo máximo de adição foi 3 horas, o que representa um estágio avançado da geleificação no momento da adição da enzima. O tempo de adição dos organosilanos foi quase o mesmo que a enzima, sendo adicionado primeiro o organosilano e depois a enzima.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA – TESTES INICIAIS.

Nos processos realizados em bateladas usou-se uma temperatura média de 65°C para a enzima  $\alpha$ -amilase bacteriana (*Bacillus subtilis*). Sua adição ocorreu no início da

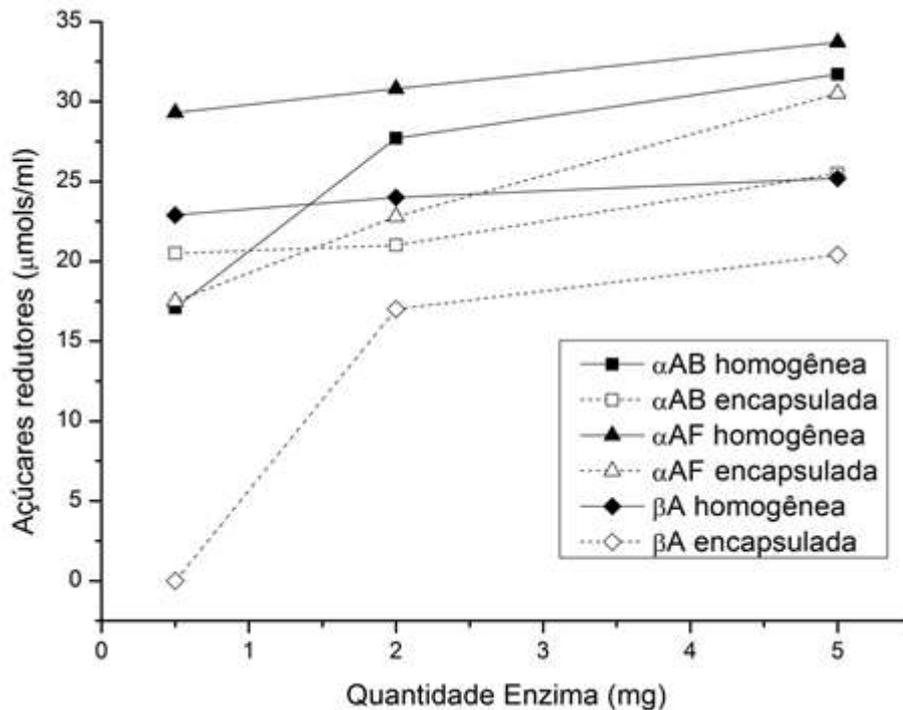
reação, pois nesta temperatura de reação (65°C), o processo de liquefação do amido ocorre de uma forma eficiente.

Já as enzimas  $\alpha$ -amilase (*Aspergillus oryzae*) e  $\beta$ -amilase (cevada) têm uma temperatura de operação inferior (50°C e 45°C, respectivamente) o que torna necessária uma etapa prévia de liquefação do amido. Por isso, as reações executadas em bateladas destas duas enzimas foram realizadas após o aquecimento do meio reacional (suspensão) a 70°C por 15 minutos e posterior resfriamento. Uma vez atingida a temperatura de operação, a enzima era adicionada.

A Tabela 12 e Figura 13 apresentam os resultados obtidos a partir das reações homogêneas e heterogêneas usando diversas concentrações. As temperaturas e pHs ótimos foram utilizados de forma compatível com a literatura consultada.

**Tabela 12.** Resultados obtidos das sacarificações homogêneas e heterogêneas em pHs únicos.

Enzima	Quantidade (mg)	Temperatura (°C)	pH	Conversão ( $\mu$ mol/mL) Homo	Conversão ( $\mu$ mol/mL)Hetero
$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	0,5	65	6,00	17,1	20,5
	2	65	6,00	27,7	21,0
	5	65	6,00	31,7	25,5
$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	0,5	50	5,30	29,3	17,5
	2	50	5,30	30,8	22,8
	5	50	5,30	33,7	30,5
$\beta$ -amilase (cevada)	0,5	45	5,25	22,9	Baixa conversão
	2	45	5,25	24,0	17,0
	5	45	5,25	25,2	20,4



**Figura 13.** Concentrações de açúcares redutores obtidos de sistemas homogêneos e encapsulados.  $\alpha$ AB =  $\alpha$ -amilase bacteriana;  $\alpha$ AF =  $\alpha$ -amilase fúngica e  $\beta$ A =  $\beta$ -amilase.

Antes de iniciar a análise da atividade enzimática é importante lembrar que as concentrações mássicas usadas nas três enzimas estudadas foram as mesmas. No entanto, isso não representa uma equivalência molar entre as enzimas, pois se trata de enzimas diferentes, cada uma delas obtidas por um processo distinto, inclusive o estado físico de duas delas ( $\alpha$ -amilase bacteriana e  $\beta$ -amilase) é liofilizado enquanto a  $\alpha$ -amilase fúngica usada foi adquirida comercialmente em solução aquosa.

De acordo com a Tabela 12, constata-se que das três enzimas usadas, a  $\alpha$ -amilase bacteriana (*Bacillus subtilis*) e  $\alpha$ -amilase fúngica (*Aspergillus oryzae*) apresentaram conversões máximas bem próximas uma da outra, acima dos 30  $\mu\text{mols/mL}$  nos sistemas homogêneos. A  $\beta$ -amilase (cevada) apresentou valores de conversão inferiores, abaixo dos 30  $\mu\text{mols/mL}$ .

As conversões do amido em açúcares redutores obtidos a partir dos diversos sistemas homogêneos estudados em diferentes concentrações enzimáticas mostram que a enzima  $\alpha$ -amilase bacteriana (*Bacillus subtilis*) apresentou conversão em açúcares redutores crescente de acordo com a quantidade de enzima usada, o que representa uma correlação positiva.

Já as enzimas  $\alpha$ -amilase (*Aspergillus oryzae*) e  $\beta$ -amilase (cevada) também apresentaram uma correlação positiva com a quantidade de enzima usada nos sistemas homogêneos, porém de uma forma muito mais sutil: a enzima de origem fúngica variou de 29,3 a 33,7  $\mu\text{mol/mL}$  e a  $\beta$ -amilase de 22,9 a 25,2  $\mu\text{mol/mL}$ .

Portanto, sobre os sistemas homogêneos apresentados na Tabela 12, nota-se que os sistemas contendo a  $\alpha$ -amilase bacteriana (*Bacillus subtilis*) apresentaram maior sensibilidade na faixa de concentrações usadas. Já a  $\alpha$ -amilase fúngica (*Aspergillus oryzae*) e  $\beta$ -amilase (cevada) apresentaram valores bem próximos, o que demonstra menor suscetibilidade ao variar o parâmetro concentração de enzima.

De uma forma geral, os sistemas homogêneos apresentaram maior conversão que seus respectivos sistemas heterogêneos, com uma única exceção: o sistema contendo 0,5 mg de enzima encapsulada da  $\alpha$ -amilase bacteriana foi superior ao respectivo sistema homogêneo.

Entretanto, as diferenças entre sistemas homogêneos e heterogêneos foram relativamente pequenas em diversos casos. A diferença percentual média da  $\alpha$ -amilase bacteriana foi 21,3%,  $\alpha$ -amilase fúngica 25% e  $\beta$ -amilase 24% (sem considerar o sistema nulo). Uma queda de atividade biocatalítica é sempre esperada devido ao processo de imobilização, tendo em vista eventos comumente encontrados na catalise heterogênea, tais como: efeito estérico desempenhado pela superfície, redução da acessibilidade aos centros catalíticos, dificuldades de difusibilidade, entre outros. O sistema da  $\beta$ -amilase foi o único que apresentou atividade zero para as sacarificações executadas com 0,5 mg de enzima.

Como as concentrações usando 2 e 5 mg em cada sacarificação apresentaram resultados nitidamente melhores que os sistemas contendo 0,5 mg, optou-se por não os testar na próxima etapa a ser apresentada (item 4.4).

#### **4.4 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Depois de realizar os processos de bateladas enzimáticas nos pHs iniciais de acordo com a literatura consultada, foram avaliados diferentes valores de pHs. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos com a variação de pH.

**Tabela 13.** Resultados das sacarificações com pH iniciais e diferenciados.

Enzima	Quantidade (mg)	pH	T (°C)	Conversão (μmols/mL) Homo	Conversão (μmols/mL) Hetero
$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	<b>2</b>	<b>6,0</b>	<b>65</b>	<b>27,7</b>	<b>21,0*</b>
	2	7,0	65	25,1	18,2
	2	5,0	65	23,7	18,4
	<b>5</b>	<b>6,0</b>	<b>65</b>	<b>31,7</b>	<b>25,5*</b>
	5	7,0	65	26,0	20,9
	5	5,0	65	23,2	13,6
$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	<b>2</b>	<b>5,3</b>	<b>50</b>	<b>30,8</b>	<b>22,8*</b>
	2	6,3	50	28,3	22,1
	2	4,3	50	11,7	14,5
	<b>5</b>	<b>5,3</b>	<b>50</b>	<b>33,7</b>	<b>30,5*</b>
	5	6,3	50	30,6	30,8
	5	4,3	50	14,2	15,1
$\beta$ -amilase (cevada)	<b>2</b>	<b>5,25</b>	<b>45</b>	<b>24,0</b>	<b>17,0*</b>
	2	6,25	45	18,8	14,5
	2	4,25	45	14,4	0
	<b>5</b>	<b>5,25</b>	<b>45</b>	<b>25,2</b>	<b>20,4*</b>
	5	6,25	45	25,1	21,9
	5	4,25	45	13,7	9,4

\*Médias já apresentadas (parâmetros ótimos de acordo com a literatura).

Analisando os sistemas homogêneos, nota-se que os sistemas com pHs supostamente ótimos de acordo com a literatura, realmente são os que de uma forma geral apresentaram maior conversão de açúcares redutores. Porém, em alguns casos, a conversão foi bem próxima de outros valores de pH, como é o caso da  $\beta$ -amilase (cevada), quando analisado os resultados obtidos a pH 6,25 e 5 mg de enzima.

A conversão em açúcares redutores em pHs mais ácidos parece afetar bastante a atividade biocatalítica da  $\alpha$ -amilase fúngica (*Aspergillus oryzae*) e  $\beta$ -amilase. Este efeito de pHs ácidos é mais sutil na  $\alpha$ -amilase bacteriana. Já os sistemas encapsulados, de uma forma geral, apresentaram conversão em açúcares redutores bem próximas em mais de um pH: no caso da  $\alpha$ -amilase bacteriana (*Bacillus subtilis*) nos três pHs analisados; no

caso da  $\alpha$ -amilase fúngica (*Aspergillus oryzae*) em dois pHs (6,3 e 5,3) e no caso da  $\beta$ -amilase (cevada) em dois pHs também (6,25 e 5,25).

A atividade da enzima  $\beta$ -amilase (cevada) no pH 4,25 é bastante baixa, o que sugere que as enzimas encapsuladas têm uma tendência a apresentar melhor desempenho em pHs superiores: a faixa de atividade ótima de uma enzima encapsulada parece estar deslocada para valores mais elevados. Esta tendência está de acordo com VLAD-OROS *et al* (2007) que constataram uma elevação nos valores de pHs ótimos de 5,6 (enzima livre) para 6,0 (enzima encapsulada) para o encapsulamento de  $\alpha$ -amilase via sol-gel.

#### 4.5 EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Portanto para prosseguir foram usados os pHs que haviam apresentados alta atividade catalítica. Algumas sacarificações foram realizadas em temperaturas superiores para avaliar o desempenho das enzimas na hidrólise de amido em temperaturas acima das sacarificações anteriores. A Tabela 14 apresenta os resultados.

**Tabela 14.** Efeito da temperatura na hidrólise enzimática em sistemas homogêneos e heterogêneos.

Enzima	Quantidade	pH	Temp. °C	Conversão ( $\mu$ moles/mL) Homo	Conversão ( $\mu$ moles/mL)Hetero
$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	<b>0,5 mg</b>	<b>6,0</b>	<b>65</b>	<b>17,1</b>	<b>20,5*</b>
	0,5 mg	6,0	70	19,8	15,5
	<b>5 mg</b>	<b>6,0</b>	<b>65</b>	<b>31,7</b>	<b>25,5*</b>
	5 mg	6,0	70	23,3	20,6
	5 mg	6,0	75	22,4	19,2
$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	<b>0,5 mg</b>	<b>5,3</b>	<b>50</b>	<b>29,3</b>	<b>17,5*</b>
	0,5 mg	5,3	55	16,2	18,9
	<b>5 mg</b>	<b>5,3</b>	<b>50</b>	<b>33,7</b>	<b>30,5*</b>
	5 mg	5,3	55	27,2	27,7
(cevada)	<b>2 mg</b>	<b>5,25</b>	<b>45</b>	<b>24</b>	<b>17,0*</b>
	2 mg	5,25	50	28,4	17,0
	<b>5 mg</b>	<b>5,25</b>	<b>45</b>	<b>25,2</b>	<b>20,4*</b>

	5 mg	5,25	55	28,5	20,8
--	------	------	----	------	------

\*Médias já apresentadas.

Os sistemas homogêneos apresentaram um comportamento diferenciado frente ao aumento da temperatura: alguns sistemas aumentaram sua atividade e outros diminuíram.

O mesmo comportamento diferenciado ocorreu com os sistemas heterogêneos. Os resultados dos sistemas contendo  $\alpha$ -amilase bacteriana encapsulada diferem daqueles relatados por KONSOUA & LIAKOPOULOU-KYRIADES (2006), que constataram que ao aumentar a temperatura de reação de 50°C para 70°C ocorreu um aumento da conversão da hidrólise de amido para a  $\alpha$ -amilase bacteriana encapsulada via sol-gel. Esta comparação divergente demonstra que a temperatura ótima da  $\alpha$ -amilase certamente está acima dos 50°C, em ambos os casos a temperatura inferior citada representa menos atividade biocatalítica.

Após avaliar os efeitos de concentração enzimática, pH e temperatura, além do tempo de adição da enzima na síntese sol-gel, a pesquisa realizada neste doutorado prosseguiu através do uso de organosilanos na síntese sol-gel, o que resultou em sílicas híbridas.

#### **4.6 EFEITO DOS ORGANOSILANOS NA ATIVIDADE BIOCATALITICA DAS ENZIMAS ENCAPSULADAS**

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos dos testes DNS usando organosilanos no encapsulamento de enzimas pelo processo sol-gel. Para fins de comparação, o sistema sem organosilano foi adicionado. A maior concentração enzimática foi a usada (5 mg/batelada).

**Tabela 15.** Resultados dos testes de sacarificação (teste DNS) usando sílicas híbridas (amilases encapsuladas com organosilanos).

Organosilano	Açúcares redutores (µmol/mL)		
	$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	$\beta$ -amilase Cevada
Nenhum	25,5	30,5	20,4
C1 (Trietóximetilsilano)	25,4	29,6	28,9
C8 (N-octiltrietóxisilano)	21,8	26,5	24,4
C18 (Trimetóxi(octadecil)silano)	17,8	-	-
(3-aminopropil)trietóxisilano	23,6	6,1	19,1
1-(3-Trimetóxisilil)propil]urea	24,9	27,6	28,9
[3-(2-aminoetilamino)propil]trimetóxisilano	20,4	11,5	-
N1 – (3-Trimetóxisililpropil)dietiltenetriamina	28,6	-	-
(3-Mercaptopropil) Trimetóxisilano	23,7	26,5	-

**Condições:** pH 6 e 65°C ( $\alpha$ -amilase bacteriana); pH 5,3 e 50°C ( $\alpha$ -amilase fúngica), pH 5,25 e 45°C ( $\beta$ -amilase).

A análise comparativa exposta na Tabela 15 correlaciona o teor de açúcares redutores obtidos do encapsulamento sem adição de organosilanos com os sistemas híbridos. Para fins comparativos, o sistema constituído de sílica (sem funcionalização por organosilanos) foi incluída.

De uma forma geral, a  $\alpha$ -amilase fúngica (*Aspergillus oryzae*) proporciona resultados aleatórios, apresenta valores próximo ao valor de referência de 30,5 µmol/mL (sem organosilano) e valores inferiores no teor de açúcares sugerindo algum tipo de inibição ou desnaturação.

A  $\alpha$ -amilase bacteriana (*Bacillus subtilis*) apresentou valores um pouco abaixo do valor de referência de 25,5 µmol/mL (uma única exceção acima disso). Neste caso, os organosilanos parecem não incrementar a atividade de uma forma contundente, porem tampouco parecem exibir efeitos de inibição.

Portanto, podemos afirmar que os organosilanos podem gerar um efeito diferenciado entre estas enzimas de mesma classe, porém de distinta origem, o que reforça a necessidade de comparar diversas enzimas nos estudos de biocatálise.

Das três enzimas analisadas, a  $\beta$ -amilase foi a que teve, de uma forma geral, um incremento da atividade biocatalítica: acima dos 20,4  $\mu\text{mol/mL}$  (sem organosilanos). Uma das possíveis explicações pode estar associada aos efeitos de difusão das enzimas na matriz de sílica. De acordo com outros estudos, a  $\alpha$ -amilase é maior em tamanho que a  $\beta$ -amilase. Segundo a literatura, a caracterização do malte de milho mostrou que a  $\alpha$  e  $\beta$  amilase tinham peso molecular de 67,4 e 47,5 kDa, respectivamente (BIAZUS *et al*, 2009).

Não se pode negligenciar diferenças estruturais entre as cadeias peptídicas  $\alpha$  e  $\beta$  amilase (PAULING, *et al* 1951). A hélice  $\alpha$  possui uma forma de bastonete, que é estabilizada por pontes de hidrogênio entre os aglomerados NH e CO da cadeia principal, representados como fitas torcidas ou varas. A estrutura  $\beta$  difere muito da hélice  $\alpha$ : é composta por duas ou mais cadeias peptídicas, com a faixa  $\beta$  quase totalmente distendida em vez de enrolada firmemente: uma folha  $\beta$  é formada pela união de dois ou mais filamentos  $\beta$  por pontes de hidrogênio (BERG *et al*, 2014). Esta diferença estrutural pode deixar os sítios ativos expostos de forma diferente: os sítios da  $\beta$ -amilase, uma enzima mais estendida, pode facilitar o encaixe necessário entre substrato e enzima.

Uma importante correlação parece existir entre o tamanho do alquil-organosilano (C1, C8 ou C18) usado e os açúcares redutores obtidos. No caso da  $\alpha$ -amilase bacteriana existe uma linearidade alta entre os três dados obtido ( $r^2 = 0,9949$ ). Quanto maior o tamanho da molécula (cadeia) do organosilano, menor foi a conversão em açúcares redutores. Isso contraria alguns resultados relatados na literatura científica obtidos no encapsulamento de outras enzimas: a bioimpressão<sup>1</sup> e o aumento do comprimento da cadeia de grupos alquil proporcionaram aumento da hidrofobicidade, o que melhorou significativamente a atividade específica (substrato mg por unidade de tempo) e a atividade total da lipase imobilizada (JIANGKE *et al*, 2010). Estudos de raios-X mostraram que a estrutura da lipase é misturada, reunindo  $\alpha$  hélices e estruturas beta (VAN *et al*, 2001) e o tamanho estimado do peso molecular foi de 31 kDa usando SDS-

---

<sup>1</sup> Bioimpressão pode ser definida como uma técnica na qual um polímero reticulado se forma em torno de uma molécula biológica.

Page (KUMAR *et al*, 2005). Portanto, representa uma enzima com características estruturais intermediárias e menor quando comparada às amilases.

O sistema contendo (3-Mercaptopropil)trimetóxisilano apresentou valores ligeiramente inferiores aos obtidos em ausência de organosilanos, resultado análogo ao uso dos alquil-organosilanos e amino-organosilanos. Esse comportamento é consistente com a imobilização da celulase com a funcionalidade 3-metacriloxi-propiltrimetoxisilano (MPTMS) relatada na literatura (ADHIKARI *et al*, 2017). Talvez, nesse estudo, o papel do organosilano fosse trabalhar como espaçador, ajustando o local do catalisador para mais longe da superfície de sílica formada, o que, por sua vez, facilitaria a acessibilidade do substrato aos centros catalíticos.

A fim de entender melhor o comportamento comparativo observado entre os três sistemas encapsulados, as enzimas suportadas foram caracterizadas por um conjunto de técnicas analíticas complementares, a fim de extrair potenciais efeitos estruturais e de textura nas enzimas encapsuladas resultantes.

## **4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS ENCAPSULADAS**

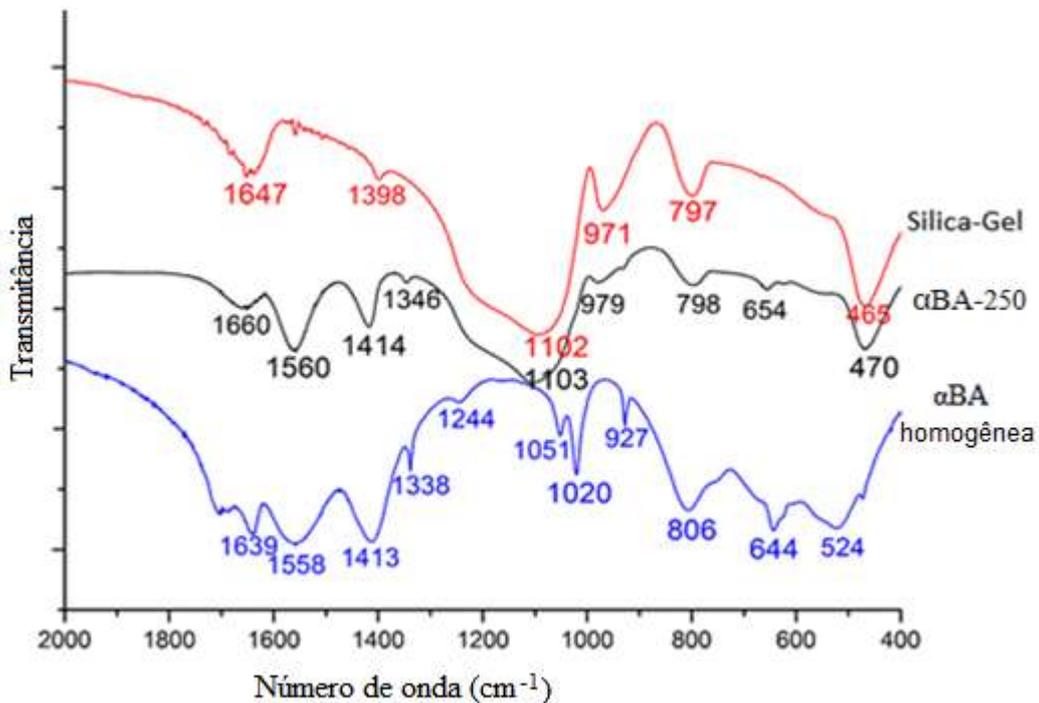
### **4.7.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) E REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR).**

Houve a comparação dos espectros obtidos pelas amilases encapsuladas (sem organosilanos) com a sílica-gel sintetizada sem amilases, a grande semelhança entre os espectros demonstra que a concentração das enzimas encapsuladas era muito baixa para ser detectado pelo FT-IR, isso era previsível pois as enzimas se caracterizam por altíssima atividade, portanto baixo teor no encapsulamento para obter atividade relevante.

Para uma melhor elucidação das bandas provenientes da análise espectral de infravermelho, enzimas homogêneas e encapsuladas foram usadas para confeccionar pastilhas de KBr. A análise dos espectros de infravermelho obtidos das enzimas liofilizadas demonstrou que os picos obtidos das enzimas homogêneas não aparecem nos espectros das enzimas encapsuladas. Isto confirma que o espectro infravermelho das enzimas encapsuladas usadas nas sacarificações não apresentou sensibilidade nas concentrações de reações de hidrólise.

Diante disso optou-se por realizar uma síntese contendo uma quantidade de enzima superior, originando as enzimas encapsuladas:  $\alpha$ AB\_250,  $\alpha$ AF\_250 e  $\beta$ A\_250 nas quais foi usado 250 mg de enzima na síntese sol-gel (estas enzimas não foram usadas nas sacarificações).

Foram empregadas as enzimas em estado liofilizado  $\alpha$ -amilase bacteriana e  $\beta$ -amilase, os quais foram usados em comparação com o branco e as respectivas enzimas encapsuladas ( $\alpha$ AB\_250 e  $\beta$ A\_250). A Figura 14 apresenta a análise de picos realizadas no intuito de analisar a enzima  $\alpha$ -amilase bacteriana.



**Figura 14.** Comparação dos espectros da  $\alpha$ -amilase bacteriana encapsulada ( $\alpha$ AB\_250), branco (sílica-gel) e enzima  $\alpha$ -amilase bacteriana liofilizada (homogênea). Pastilha: KBr. Os picos mais intensos foram analisados e reunidos na Tabela 16, contendo suas respectivas atribuições na análise FT-IR.

**Tabela 16.** Bandas do espectro FT-IR das amostras contendo  $\alpha$ -amilase bacteriana. Atribuições baseadas em PAVIA *et al.* (2010); SILVESTEIRN *et al.* (2006); FU *et al.* (1994); BRINKER & SCHERER, 1990; COLTHUP, 1990; VANSANT *et al.*, 1995; NAKAMOTO, 1997; SAIKIA & PARTHASARATHY, 2010.

	Sílica	Homog.	$\alpha$ BA_250	Atribuições
Bandas associadas as enzimas ou resíduos.	-	1558	1560	Deformação N-H e estiramento C-N presentes nas amostras contendo enzimas encapsuladas ou homogêneas (puras).
	-	1338	1346	Estiramento da ligação C-N das amidas terciárias ou deformação N-H. Novamente ligações associadas aos aminoácidos que compõem as enzimas, portanto ausentes na sílica-gel pura.
	-	644	654	Deformação angular fora do plano N-H. Novamente uma banda associada as ligações dos aminoácidos, portanto ausente na sílica-gel pura.
Bandas associadas a estrutura da sílica-gel	1102	-	1103	Estiramento assimétrico Si-O. Se trata de uma banda característica da sílica formada durante o encapsulamento, portanto ausente na enzima homogênea (pura).
	971	-	979	Deformação angular Si-O-Si. Novamente um abanda associada unicamente as amostras que contém sílica.
	465	-	470	Deformação Si-O-Si. Banda característica de amostras contendo sílica.
	1647	1639	1660	Vibrações angulares de H <sub>2</sub> O residual nas amostras contendo sílica e/ou deformação angular fora do plano N-H presentes nas amostras contendo enzima.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Região de sobreposição de bandas	1398	1413	1414	Deformação C-H, estas ligações podem estar presentes na sílica-gel como resíduos dos precursores usados durante a síntese sol-gel ou presentes na estrutura das enzimas que consistem em compostos orgânicos.
	797	806	798	Estiramento simétrico Si-O e deformação angular simétrica N-H. Se trata de uma região de sobreposição de bandas oriundas da sílica e da enzima.

A análise da Tabela 16 foi dividida em 3 partes buscando identificar os picos associados a enzima, a sílica e zonas de sobreposição.

Sobre os picos associados a enzima podemos citar o localizado em  $1346\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha\text{BA}_{250}$ ) associado ao estiramento da ligação C-N das amidas terciárias ou deformação N-H, o qual aparenta sofrer uma interação relevante, sugerindo a interação entre enzima e a estrutura de sílica pode ocorrer por esse grupo. A interação dos grupos amina com a matriz de sílica também pode ser constatada ao analisar o pico  $654\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha\text{BA}_{250}$ ), esta banda é atribuída à deformação angular N-H fora do plano.

O segundo grupo está associado a estrutura de sílica, portanto ausentes no FT-IR elaborado a partir da amostra de  $\alpha$ -amilase homogênea, são picos importantes para entender o espectro obtido, porém não revelam nenhuma interação clara entre a sílica e a enzima.

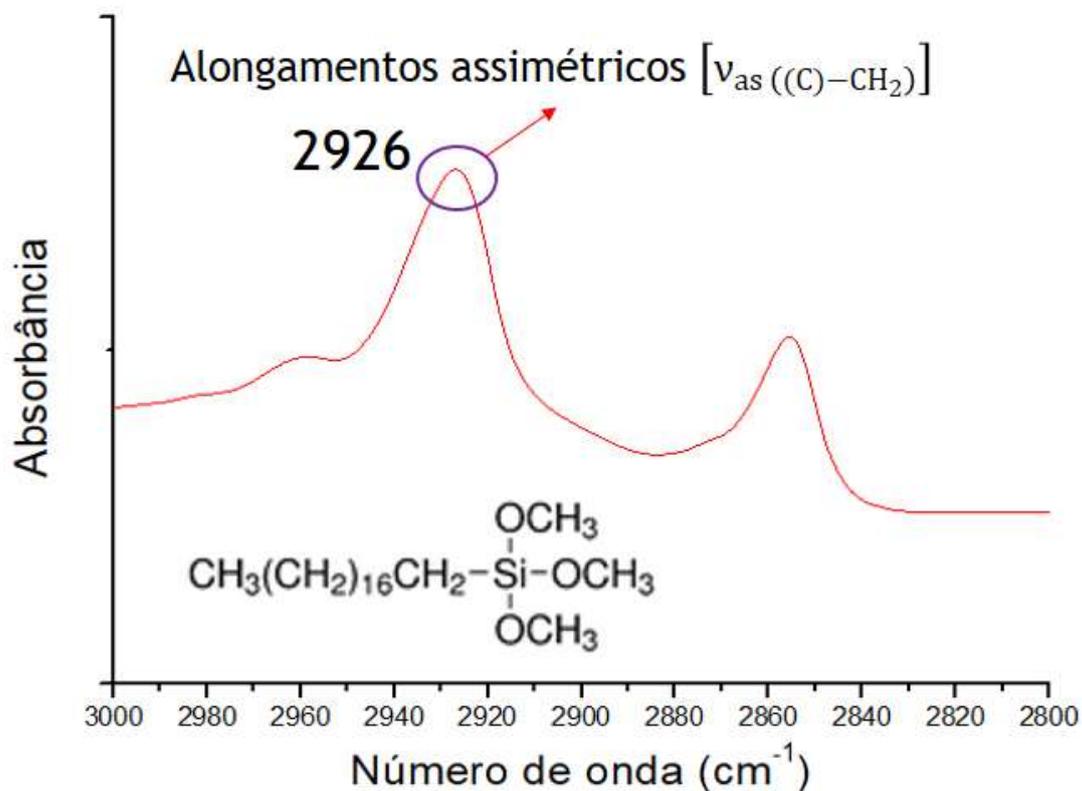
No terceiro grupo estão os picos de sobreposição, um deles está localizado em  $1660\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha\text{BA}_{250}$ ), que apresentou maior diferença em relação a enzima homogênea, esta região do espectro sofre o efeito das vibrações angulares  $\text{H}_2\text{O}$  e/ou deformação angular fora do plano N-H, atribuições semelhantes foram realizadas por PAVIA *et al.* (2010) em grupos amina.

Vale ressaltar que o pequeno pico detectado no espectro de sílica em  $1398\text{ cm}^{-1}$  (deformação C-H) se deve a grupos residuais do TEOS que podem permanecer na estrutura de sílica de acordo com NASSOR *et al.* (2011).

Os sistemas foram analisados comparativamente entre modos de transmissão e reflexão. No modo de transmissão FT-IR as amostras são analisadas pelo feixe incidente que penetra na amostra, no modo ATR apenas a superfície da amostra é analisada, a comparação das intensidades da banda entre os dois modos pode fornecer alguma visão sobre a distribuição dos componentes nos grãos de partículas.

A análise dos espectros da amostra  $\alpha$ BA\_250 com um pico localizado em  $1554\text{ cm}^{-1}$  (ATR) demonstrou uma diferença relevante entre os picos normalizados obtidos no FT-IR e ATR. Além de uma diferença de  $6\text{ cm}^{-1}$  obtido nestes dois modos, os referidos picos tiveram suas áreas calculadas e comparadas com o maior pico do espectro ( $1102\text{ cm}^{-1}$ ), isso levou a valores relativos de 10,33 e 17,17% (modo ATR e FT-IR respectivamente). Este pico está associado a enzima, portanto uma diferença neste pico sugere uma distribuição diferenciada da enzima.

Existe uma faixa de particular interesse que pode ser analisada por FT-IR que representa uma importante informação sobre o estado físico da sílica. Trata-se da faixa  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ , a Figura 15 apresenta um espectro FT-IR do sistema encapsulado híbrido contendo C18.



**Figura 15.** Espectro FT-IR contendo Trimetóxi(octadecil)silano (C18).

Analisando a Figura 15 é possível identificar picos na amostra contendo Trimetóxi(octadecil)silano, estes picos estão associados a cadeia alquil, atribuídos a alongamentos assimétricos [ $\nu_{as}((C)-CH_2)$ ] e modo simétrico [ $\nu_s(C)-CH_2$ ] respectivamente em  $2926\text{ cm}^{-1}$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$  (FIDALGO *et al.*, 2013). Faz sentido que a amostra contendo o maior grupo alquil seja a única a apresentar os picos de forma clara, pois é a que possui maior quantidade de ligações C-CH<sub>2</sub>.

Os modelos de posição de estado cristalino consideram que a cadeia alquil assume uma orientação estendida *trans* diferente da orientação aleatória associada ao estado líquido. Neste caso, os  $\nu_s(CH_2)$ ,  $\nu_{as}(CH_2)$  e  $\nu_{as}(CH_3)$  são usados como referência devido a sobreposição mínima de bandas. De acordo com SNYDER *et al.* 1986 a posição das frequências de picos oriundas do ambiente intermolecular das cadeias alquil demonstram o seguinte: a posição do pico associada ao modo  $\nu_{as}(CH_2)$  da cadeia cristalina de polimetileno ( $2920\text{ cm}^{-1}$ ) é  $8\text{ cm}^{-1}$  menor que o modo de estado líquido ( $2928\text{ cm}^{-1}$ ).

Considerando que o FT-IR gerado a partir da amostra contendo C18 apresenta um pico em  $2926\text{ cm}^{-1}$ , esta comparação leva a crer que o estado predominante no encapsulamento das amilases neste trabalho é o líquido. Esta característica pode ser considerada vantajosa devido ao fato de facilitar a difusão de reagentes e produtos na matriz de sílica durante os testes de sacarificação.

#### 4.7.2 AVALIAÇÃO DA POROSIDADE DOS XEROGÉIS

Foram avaliadas as propriedades de porosidade das três enzimas encapsuladas nas três concentrações usadas, totalizando 9 sistemas encapsulados (sem organosilanos) além da síntese realizada na ausência de enzima (branco). As amostras contendo organosilanos serão apresentadas depois A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 17.** Propriedades de porosidade dos sistemas encapsulados.

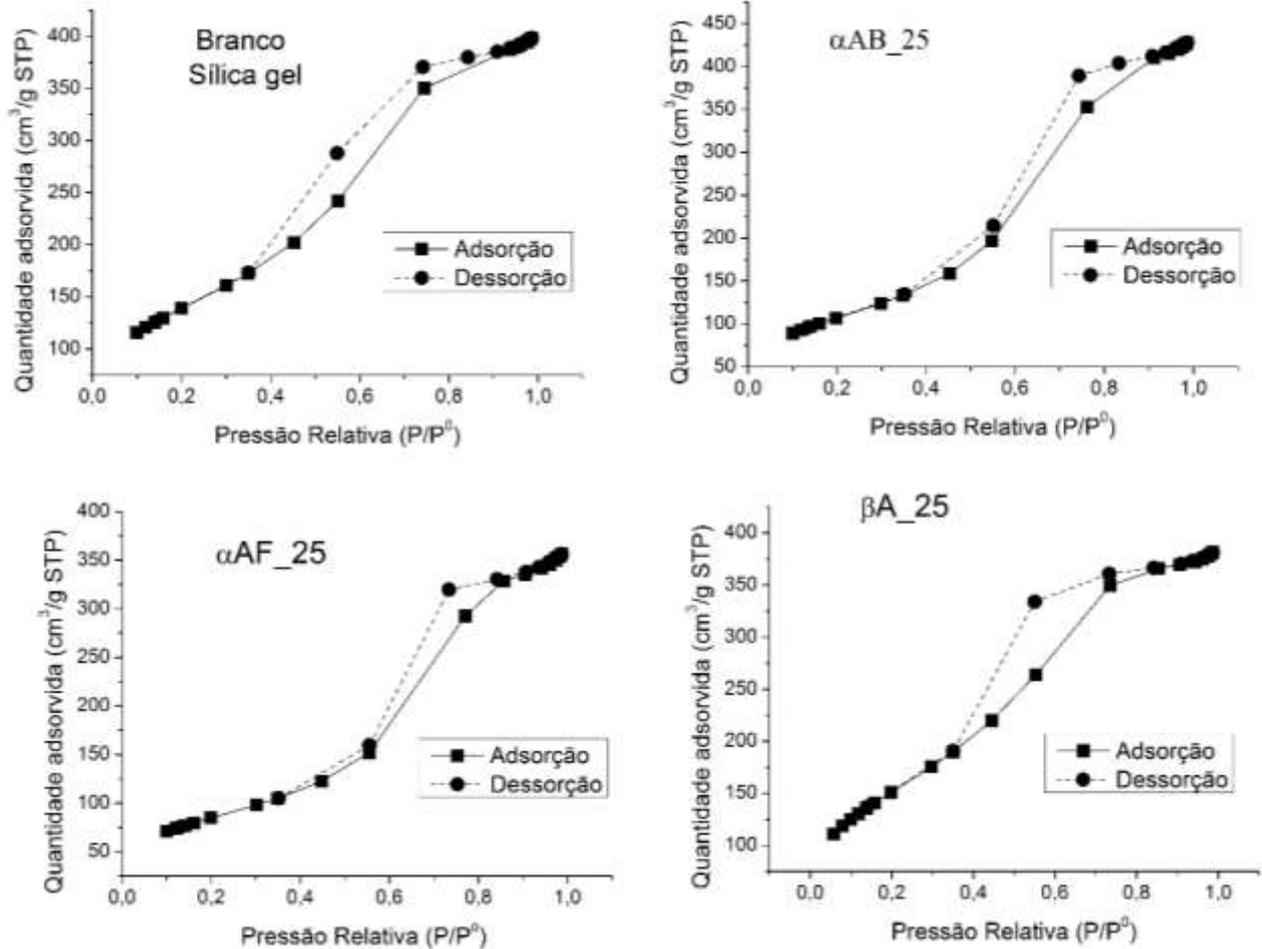
<b>Símbolo</b>	<b>S<sub>BET</sub></b> (m <sup>2</sup> /g)	<b>P<sub>v</sub></b> (cm <sup>3</sup> /g)	<b>P<sub>d</sub></b> (Å)
Branco	508	0,65	36,6
αAB_2.5	474	0,64	36,7
αAB_10	139	0,46	89,6
αAB_25	391	0,67	45,2
αAF_2.5	337	0,47	32,8
αAF_10	456	0,52	31,6
αAF_25	310	0,56	48,8
βA_2.5	538	0,60	32,2
βA_10	437	0,81	50,9
βA_25	554	0,63	32,0

**S<sub>BET</sub>** (área específica), **P<sub>v</sub>** (volume de poros) e **P<sub>d</sub>** (diâmetro de poros).

Todas as enzimas encapsuladas apresentaram uma alta área específica, a maioria acima dos 300 m<sup>2</sup>/g. De uma forma geral, a síntese sem a presença de enzima (branco) apresenta maior área específica (508 m<sup>2</sup>/g) com duas exceções: o sistema βA\_2.5 e βA\_25 os quais apresentaram área específica superior (538 e 554 m<sup>2</sup>/g). Portanto, é plausível supor que a presença de enzima no processo sol-gel reduz a área específica de uma forma geral.

O volume de poro parece sofrer variações independentes da concentração da enzima, apresentando valores na faixa de 0,46-0,81 cm<sup>3</sup>/g. O diâmetro de poro parece sofrer variações aleatórias também, seus valores variam na faixa de 32,0-89,6 Å.

As isotermas de adsorção/dessorção foram plotadas e analisadas, a Figura 16 apresenta as isotermas plotadas.



**Figura 16.** Isothermas obtidas das enzimas encapsuladas e da sílica gel.

Todas as isothermas plotadas e analisadas podem ser classificadas como isothermas do Tipo IV, consiste no modelo de isoterma onde ocorre o fenômeno da histerese. Nas isothermas dos tipos IV são observados dois ramos distintos. O inferior mostra a quantidade de gás adsorvida com o aumento da pressão relativa, enquanto que o ramo superior representa a quantidade de gás dessorvida no processo inverso. Esses dois tipos de isothermas são característicos de sólidos mesoporosos e macroporosos, nos quais o processo de evaporação é diferente do processo de condensação. Os diferentes caminhos caracterizam uma histerese entre os processos de adsorção e dessorção. O mesmo tipo de isoterma foi obtida por SOUZA *et al.* (2012), o qual trabalhou com o encapsulamento de enzimas lipases em gels hidrofóbicos.

### **4.7.3 POROSIDADE DOS XEROGÉIS COM ORGANOSILANOS**

A Tabela 18 apresenta os resultados da porosidade obtida a partir da análise de adsorção/dessorção de nitrogênio para os sistemas contendo organosilanos. Os resultados dos sistemas encapsulados sem organosilanos foi incluído com finalidade de comparação.

**Tabela 18.** Resultado da análise de porosidade obtida a partir do encapsulamento de amilases usando organosilanos no sol-gel.

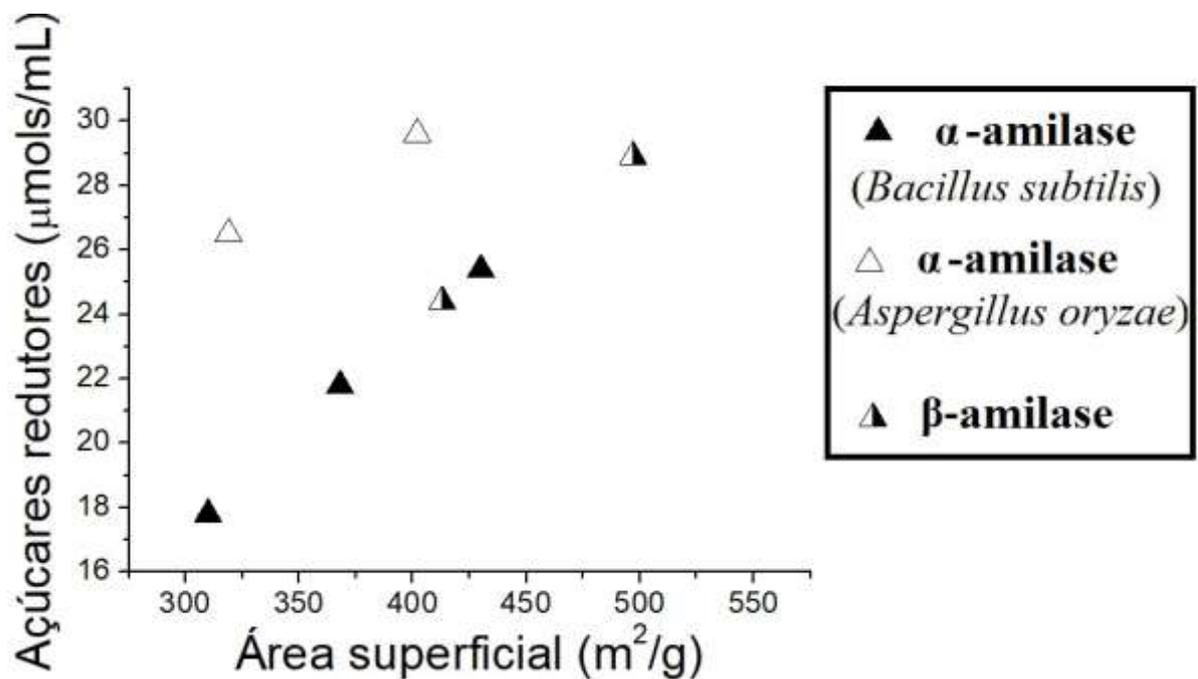
Organosilano	$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )			$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )			$\beta$ -amilase		
	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	P <sub>v</sub> (cm <sup>3</sup> /g)	P <sub>d</sub> (Å)	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	P <sub>v</sub> (cm <sup>3</sup> /g)	P <sub>d</sub> (Å)	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	P <sub>v</sub> (cm <sup>3</sup> /g)	P <sub>d</sub> (Å)
<b>Síntese sol-gel sem organosilano</b>	<b>391</b>	<b>0,67</b>	<b>45,2</b>	<b>310</b>	<b>0,56</b>	<b>48,8</b>	<b>554</b>	<b>0,63</b>	<b>32</b>
<b>C1 (Trietóximetilsilano)</b>	430	0,701	58,1	402	0,054	53,5	497	0,575	43,3
<b>C8 (N-octiltriétoxisilano)</b>	368	0,536	55,1	319	0,061	53,0	413	0,303	51,3
<b>C18 (Trimetóxi(octadecil)silano)</b>	310	0,577	70,2	-	-	-	-	-	-
<b>(3-aminopropil)triétoxisilano</b>	350	0,524	50,4	343	0,123	60,4	246	0,102	110,2
<b>1-(3-Trimetóxisilil)propil]urea</b>	314	0,205	48,7	454	0,427	33,4	422	0,395	40,6
<b>[3-(2-aminoetilamino)propil]trimetóxisilano</b>	266	0,270	96	315	0,134	98	-	-	-
<b>N1 – (3-Trimetóxisililpropil)dietilnetriamina</b>	232	0,572	119,1	-	-	-	-	-	-
<b>(3-Mercaptopropil) Trimetóxisilano</b>	164	0,0125	38,9	290	0,063	89	-	-	-

S<sub>BET</sub> (área específica), P<sub>v</sub> (volume de poros) e P<sub>d</sub> (diâmetro de poros).

Considerando os dados apresentados na Tabela 19, pode-se notar que o uso de organosilanos causou uma diminuição na área específica na maioria dos sistemas, se comparado à imobilização das amilases encapsulada sem organosilano. Alguns sistemas exibiram um ligeiro incremento na área de superfície.

O volume de poros também diminuiu na maioria das amostras. O diâmetro dos poros aumentou significativamente na maioria dos casos. Portanto, em geral, os organosilanos reduziram a área específica e o volume de poros, além de promover um aumento relevante no tamanho médio dos poros.

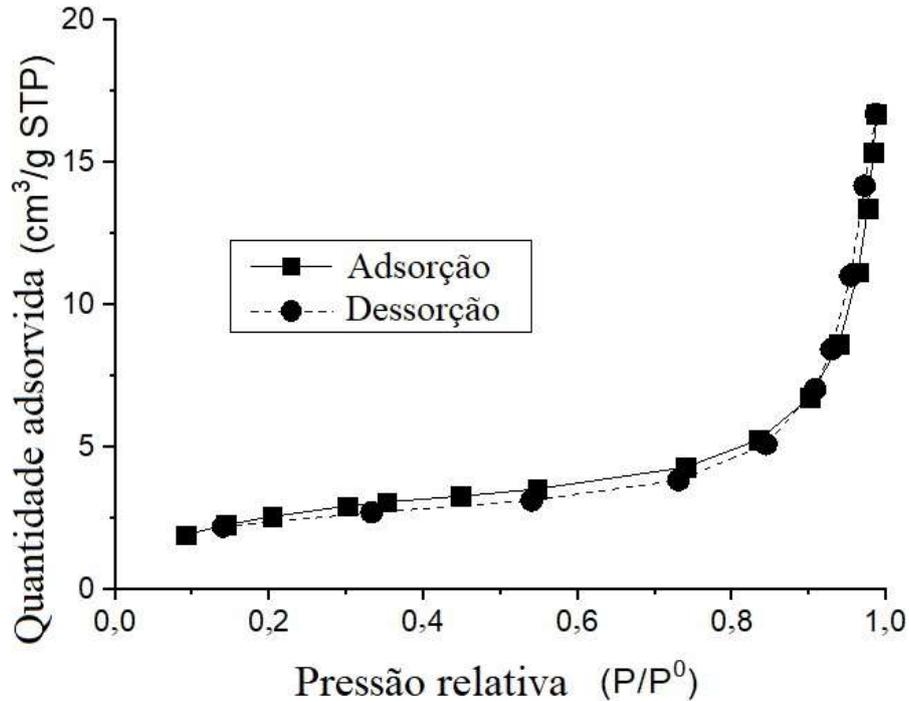
Uma forte correlação de Spearman foi observada no caso da área específica e os açúcares redutores das três amilases investigadas no caso dos organosilanos modificados com alquil (Figura 17).



**Figura 17.** Correlação entre a área específica e açúcares redutores de enzimas encapsuladas com organosilano contendo alquil.

A correlação positiva entre os açúcares redutores e a área específica é evidente nas três enzimas dos sistemas alquil exibidos na Figura 17. Porém isso não ocorre com os sistemas contendo grupos funcionais amina e mercaptano. O que leva a crer que a atividade biocatalítica não depende apenas das propriedades de textura, mas também da interação dos grupos funcionais dos organosilanos e os sítios catalíticos da enzima encapsulada.

As análises de adsorção/dessorção de nitrogênio realizadas a partir dos sistemas contendo organosilanos geraram isothermas do tipo IV, ou seja, as mesmas já obtidas nas sínteses sol-gel sem organosilanos com uma única exceção, o encapsulamento da  $\alpha$ -amilase bacteriana com [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetóxisilano apresentou uma isoterma do Tipo II (Figura 18).



**Figura 18.** Isotherma do Tipo II obtida a partir do encapsulamento da  $\alpha$ -amilase (*Bacillus subtilis*) com o organosilano [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetóxisilano.

A pesar da isoterma apresentada na Figura 18 consistir em um único caso nesta pesquisa, trata-se de um resultado bastante relevante, a isoterma do Tipo II é característica do adsorvente não poroso ou macroporoso (SING, 1982), isso reforça que os organosilanos no tipo de síntese sol-gel realizada neste doutorado diminuem a porosidade dos xerogéis, porém aumentam o tamanho de poro.

Portanto a comparação de dados de porosidade e atividade biocatalítica demonstra claramente que os grupos funcionais dos organosilanos conseguem alterar de forma relevante a sílica reticulada gerada durante o encapsulamento e afetam a atividade biocatalítica.

#### 4.7.4 AVALIAÇÃO DO TAMANHO E FORMATO DAS PARTÍCULAS (SAXS)

Os sistemas sintetizados sem organosilanos resultaram em curvas fitadas no IgorPRO que apresentaram três níveis de tratamento. A Tabela 19 apresenta os resultados.

**Tabela 19.** Resultados obtidos de SAXS.

	<b>Rg1</b> <b>(nm)</b>	<b>P2</b>	<b>Rg2</b> <b>(nm)</b>	<b>P3</b>
Branco (Sílica gel)	0,99	3,72	3,62	3,29
$\alpha$ AB_2.5	1,00	3,89	3,57	3,21
$\alpha$ AB_10	0,84	3,92	5,44	3,33
$\alpha$ AB_25	1,10	4,00	3,41	3,36
$\alpha$ AF_2.5	0,85	4,00	3,18	3,41
$\alpha$ AF_10	0,85	4,00	3,21	3,43
$\alpha$ AF_25	1,01	4,00	3,57	3,26
$\beta$ A_2.5	0,95	3,04	3,86	3,31
$\beta$ A_10	1,17	4,00	3,63	2,77
$\beta$ A_25	0,98	3,07	3,87	3,39

**Rg1** = Raio de giro nível 1; **Rg2** = Raio de giro nível 2; **P1** = coeficiente 1; **P2** = coeficiente 2.

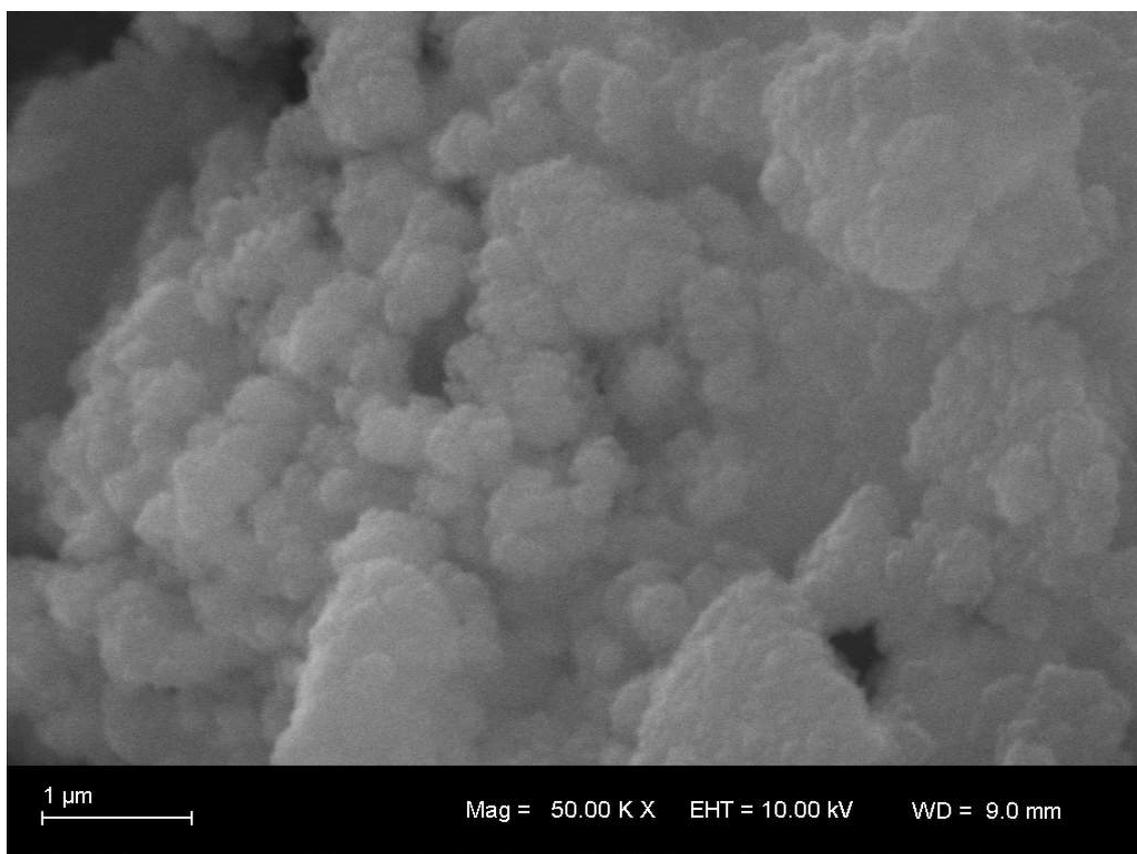
As estimativas obtidas pelo SAXS do tamanho da partícula primária (Rg1) das enzimas encapsuladas parece oscilar em torno do valor da sílica gel pura (branco) que apresentou o valor de 0,99 nm. A aparente aleatoriedade destes valores leva a crer que a adição da enzima não afeta o tamanho da partícula primária. Algo parecido ocorre com o tamanho da partícula secundária. Os valores parecem oscilar de forma aleatória em torno do valor obtido da sílica gel pura (Rg2=3,62 nm). Portanto o tamanho das partículas parece não ser afetado pela quantidade de enzima adicionada ao processo sol-gel.

A maioria dos coeficientes obtidos (p2 e p3) possuem valores acima de três, em alguns casos 4, estes altos valores permitem deduzir que se trata de estruturas relativamente compactas.

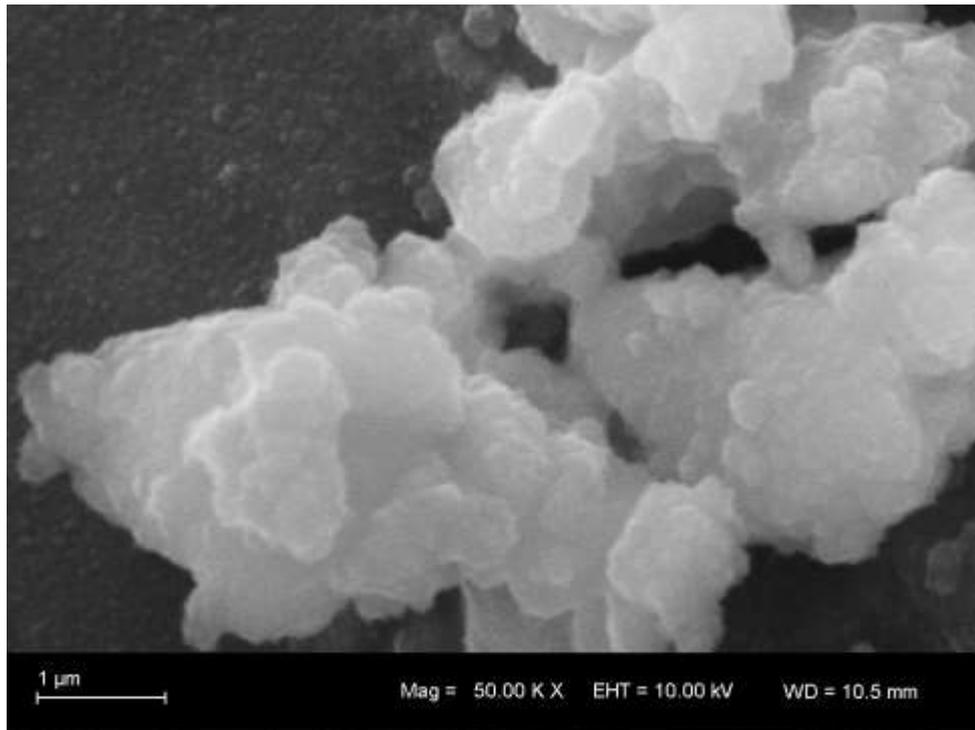
#### 4.7.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADA ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE RAIOS X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (SEM-EDX)

Todos os xerogeis obtidos foram submetidos à microscopia (SEM-EDX). Foram realizadas inspeções visuais e análise quantitativa das amostras.

A análise visual das imagens obtidas permite identificar estruturas com duas características, uma mais granular lembrando estruturas esféricas e outras mais planares. A Figura 19 e 20 apresentam imagens das amostras  $\alpha$ AB\_2.5 e  $\alpha$ AF\_2.5 respectivamente.



**Figura 19.** Estruturas granulares visualizadas via SEM-EDX. Imagem obtida a partir da amostra  $\alpha$ AB\_2.5.



**Figura 20.** Estruturas planares visualizadas via SEM-EDX. Imagem obtida a partir da amostra  $\alpha$ AF\_2.5.

A estrutura predominante encontrada nas amostras foi a visualizada na Figura 19, o que nos remete a uma sugestão de porosidade superficial, o que é coerente com as isotermas do tipo IV obtidas, diferenciada por meso- e macroporos. Estes atributos poderiam explicar as altas atividades catalíticas obtidas das enzimas encapsuladas.

A análise quantitativa foi realizada a partir das médias da amostra com bases nos dados obtidos pelo detector EDX. Cabe salientar que a única fonte de silício é o TEOS, já o carbono possui duas fontes: o TEOS e a enzima. Portanto razões C/Si podem ser usadas como parâmetro. Aparentemente as razões C/Si obtidas não demonstraram correlação com a quantidade de enzima adicionada, talvez se deva ao fato de se tratar de uma técnica de superfície, a qual não engloba toda a constituição química da amostra. Optou-se por não exibir estes resultados.

#### **4.8 TEORES DE GLICOSE E MALTOSE OBTIDOS (HPLC)**

O método DNS não discrimina a glicose da maltose, pelo fato de ambos serem açúcares redutores, portanto ambos reagem com o 3,5-ácido dinitrosalicílico. Já o HPLC

permite avaliar as concentrações destes açúcares de forma separada, o que ajuda a discernir com maior resolução o processo de sacarificação do amido.

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos a partir da separação de compostos usando HPLC dos sistemas homogêneos usando 5 mg e pHs diferenciados das enzimas estudadas, a Tabela 21 apresenta os valores dos sistemas heterogêneos.

**Tabela 20.** Concentrações estimadas de glicose e maltose obtidas por HPLC dos sistemas homogêneos.

Enzima	pH	T (°C)	Homogêneo		Relação Glicose/maltose
			Glicose (mg/L)	Maltose (mg/L)	
<b><math>\alpha</math>-amilase (<i>Bacillus subtilis</i>)</b>	<b>6,0</b>	<b>65</b>	<b>1245</b>	<b>3031</b>	0,41
	7,0	65	544	1593	0,34
	5,0	65	537	1607	0,33
<b><math>\alpha</math>-amilase (<i>Aspergillus oryzae</i>)</b>	<b>5,3</b>	<b>50</b>	<b>408</b>	<b>5501</b>	0,074
	6,3	50	291	5339	0,054
	4,3	50	67	2502	0,026
<b><math>\beta</math>-amilase (cevada)</b>	<b>5,25</b>	<b>45</b>	<b>69</b>	<b>5011</b>	0,013
	6,25	45	140	7467	0,019
	4,25	45	46	5669	0,008

Quantidade de 5 mg de enzima usada nas sacarificações.

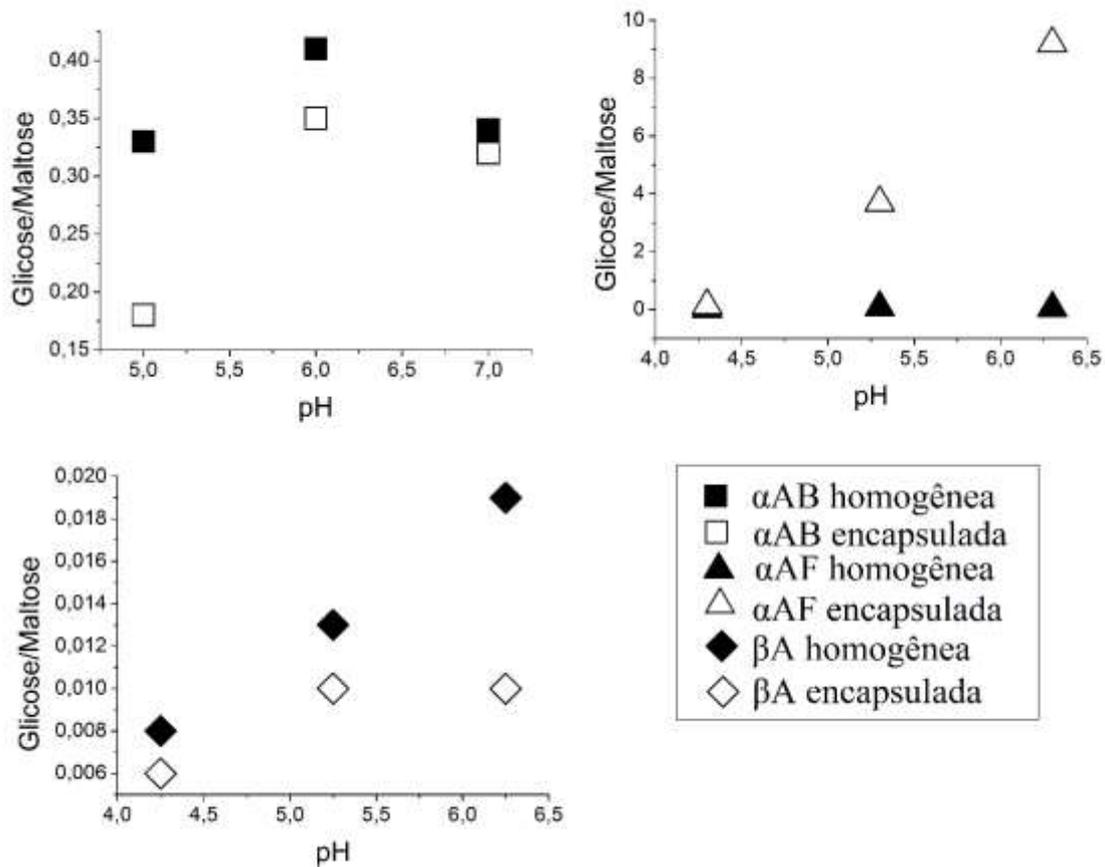
Os resultados da Tabela 20 demonstram que o pH usado nas sacarificações afeta os valores das concentrações de glicose e maltose dos sistemas homogêneos. Porém a relação glicose/maltose permaneceu próxima nas respectivas enzimas.

**Tabela 21.** Concentrações estimadas de glicose e maltose obtidas por HPLC dos sistemas heterogêneos.

Enzima	pH	T (°C)	Heterogêneo		Relação Glicose/maltose
			Glicose (mg/L)	Maltose (mg/L)	
<b><math>\alpha</math>-amilase (<i>Bacillus subtilis</i>)</b>	<b>6,0</b>	<b>65</b>	<b>386</b>	<b>1105</b>	0,35
	7,0	65	367	1140	0,32
	5,0	65	276	1534	0,18
<b><math>\alpha</math>-amilase (<i>Aspergillus oryzae</i>)</b>	<b>5,3</b>	<b>50</b>	<b>85,4</b>	<b>22,8</b>	3,7
	6,3	50	157	17	9,2
	4,3	50	290	2116	0,14
<b><math>\beta</math>-amilase (cevada)</b>	<b>5,25</b>	<b>45</b>	<b>21,7</b>	<b>1817</b>	0,01
	6,25	45	83,7	8279	0,010
	4,25	45	21,2	3494	0,006

Quantidade de 5 mg de enzima usada no teste de sacarificação.

A Figura 21 apresenta a relação glicose/maltose obtidas das sacarificações dos sistemas homogêneos e heterogêneos das três enzimas usadas, consistem nos dados da Tabela 20 e 21 apresentados de uma forma gráfica.



**Figura 21.** Razão glicose/maltose obtidas dos mostos oriundos dos sistemas homogêneos e encapsulados das enzimas  $\alpha$ -amilase bacteriana ( $\alpha$ AB),  $\alpha$ -amilase fúngica ( $\alpha$ AF) e  $\beta$ -amilase ( $\beta$ A).

Analisando os sistemas homogêneos nota-se que as três enzimas usadas geram uma concentração superior de maltose em relação à glicose.

Nos sistemas homogêneos da  $\alpha$ -amilase bacteriana a concentração de glicose ficou na faixa de 537-1245 mg/L e a maltose permaneceu na faixa de 1593-3031 mg/L. Os diferentes pHs usados durante os processos de hidrólise afetam as concentrações de glicose e maltose, porém a relação glicose/maltose parece se manter relativamente estável, variando na faixa de 0,33-0,41. Das três enzimas analisadas a  $\alpha$ -amilase bacteriana foi a que apresentou maior concentração de glicose e a menor concentração de maltose.

Nos sistemas homogêneos a  $\alpha$ -amilase fúngica resultou em mostos com concentrações de glicose na faixa de 67- 408 mg/L e para a maltose na faixa de 2502-

5501 mg/L. Os diferentes pHs usados afetaram as concentrações de glicose e maltose. Já a relação glicose/maltose parece se manter relativamente estável, variando na faixa de 0,026-0,074. De uma forma geral, a  $\alpha$ -amilase fúngica apresentou uma concentração de glicose intermediária e uma concentração de maltose alta, com valores próximos a partir do uso da beta-amilase.

A  $\beta$ -amilase foi a que apresentou maiores concentrações de maltose e concentrações de glicose quase nulas, mostrando claramente que seus sistemas homogêneos produzem uma proporção de maltose bem maior em relação à glicose.

As concentrações de glicose e maltose dos sistemas heterogêneos são inferiores aos respectivos sistemas homogêneos com algumas exceções. Os sistemas heterogêneos que usaram  $\alpha$ -amilase bacteriana apresentaram uma proporção superior de maltose em relação à glicose (o que já havia ocorrido nos sistemas homogêneos). A relação destes açúcares ficou em uma faixa de 0,18-0,35, uma relação levemente inferior àquela obtida pelos análogos homogêneos que apresentaram uma relação glicose/maltose na faixa de 0,33-0,41.

Os sistemas heterogêneos usando  $\alpha$ -amilase fúngica apresentaram uma concentração de maltose bem baixa nos pHs 5,3 e 6,3, o que resultou em uma relação glicose/maltose bem diferenciado. Os sistemas heterogêneos nestes pHs apresentaram uma relação de 3,7 e 9,2, relações bem diferentes dos respectivos sistemas homogêneos 0,07 e 0,05. Já a batelada heterogênea usando pH 4,3 apresentou uma relação bem mais similar ao sistema homogêneo. Portanto, os resultados obtidos em diferentes pHs usando  $\alpha$ -amilase fúngica encapsulada demonstraram ser bem diferenciados.

Os sistemas usando  $\beta$ -amilase encapsulada apresentaram uma relação glicose/maltose na faixa de 0,006-0,012, valores próximos aos obtidos dos respectivos sistemas homogêneos que ficaram na faixa de 0,008-0,019, ou seja, glicose quase nula.

### **4.9 EFEITO DO ORGANOSILANO NA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E MALTOSE**

A Tabela 22 apresenta os resultados de HPLC dos sistemas contendo organosilanos.

**Tabela 22.** Concentrações de glicose e maltose obtidas por HPLC dos sistemas contendo organosilanos.

Organosilano	$\alpha$ -amilase ( <i>Bacillus subtilis</i> )			$\alpha$ -amilase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )			$\beta$ -amilase		
	Glicose mg/L	Maltose mg/L	G/M	Glicose mg/L	Maltose mg/L	G/M	Glicose mg/L	Maltose mg/L	G/M
<b>Homogêneo (maior concentração enzimática)</b>	<b>1245</b>	<b>3031</b>	<b>0,41</b>	<b>408</b>	<b>5501</b>	<b>0,074</b>	<b>69</b>	<b>5011</b>	<b>0,014</b>
<b>C1 (Trietóximetilsilano)</b>	879	1329	0,66	578	3833	0,151	31	4875	0,006
<b>C8 (N-octiltrietóxisilano)</b>	991	1104	0,90	599	4064	0,147	165	4937	0,033
<b>C18 (Trimetóxi(octadecil)silano)</b>	1233	884	1,39	-	-	-	-	-	-
<b>(3-aminopropil)trietóxisilano</b>	1453	1113	1,31	389	538	0,723	387	3194	0,121
<b>1-(3-Trimetóxisilil)propil]urea</b>	824	1131	0,73	1103	3992	0,276	603	4807	0,125
<b>[3-(2-aminoetilamino)propil]trimetóxisilano</b>	719	971	0,74	33,4	1214	0,028	-	-	-
<b>N1 – (3-Trimetóxisililpropil)dietilenetriamina</b>	1340	928	1,44	-	-	-	-	-	-
<b>(3-Mercaptopropil) Trimetóxisilano</b>	945	849	1,11	569	3202	0,178	-	-	-

Analisando a Tabela 22 percebe-se que a presença dos silanos diminui a concentração de maltose nos ensaios de sacarificação realizados, a glicose apresentou valores mais aleatórios.

A glicose é um monossacarídeo e a maltose é um dissacarídeo composto pela junção de uma molécula de  $\alpha$ -D-glicose e outra de  $\beta$ -D-glicose unidas por ligação glicosídica. Assim, a glicose é menor que a maltose. Os organossilanos parecem proporcionar um ambiente em que os dissacarídeos são gerados em menor grau, favorecendo os monossacarídeos, provavelmente devido ao efeito estérico.

O uso de organossilanos no encapsulamento da  $\alpha$ -amilase fúngica causou um aumento na concentração de glicose durante a sacarificação na maioria dos casos, com duas exceções: o [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetóxisilano causou uma queda acentuada na concentração de glicose (33,4 mg/L) e (3-aminopropil)trietóxisilano com uma redução sutil na concentração de glicose (389 mg/L). Por outro lado, a concentração de maltose caiu em todos os organossilanos testados.

Aparentemente, a clivagem do amido pela  $\beta$ -amilase durante a sacarificação é afetada pela presença dos organossilanos próximas dos centros catalisadores. O uso de organossilanos favoreceu a geração de glicose em detrimento da geração de maltose, isto é, um aumento na razão Glicose/Maltose.

Correlacionando a razão Glicose/Maltose e os resultados de porosidade, foi possível encontrar uma alta correlação no caso da  $\beta$ -amilase e suas propriedades: área específica ( $r_{Sp} = 0,71$ ,  $p < 0,05$ ), volume de poros ( $r_{Sp} = 0,75$ ,  $p < 0,05$ ) e diâmetro do poro ( $r_{Sp} = 0,93$ ,  $p < 0,05$ ), o que corrobora com a lógica sobre o efeito do tamanho do poro na geração de maltose.

No presente estudo, a adição de organossilanos tende a aumentar a razão Glicose/Maltose. Parece que locais mais confinados (menor área específica e menor volume de poros) afetam os centros catalisadores.

Vale ressaltar que existem processos industriais que buscam maximizar a produção de glicose: maior glicose pode representar maior produção em processos fermentativos. Então, em alguns ramos da indústria bioquímica, a imobilização de amilases que maximizam a proporção de glicose pode ser atraente.

#### **4.10 ESTUDOS FUTUROS**

Existem muitas pesquisas complementares a esta tese de doutorado que podem ser realizadas, uma delas seria a seleção dos sistemas com maior atividade e a análise de sua reutilização, o que não se realizou devido à grande abrangência deste estudo inicial.

Conhecer a estabilidade da atividade biocatalítica é fundamental para avaliar a possibilidade do uso de sistemas contínuos, o que representaria uma provável aplicação industrial.

Diversas dúvidas estão associadas a interação entre os grupos funcionais contidos nos organosilanos e as amilases analisadas, em especial os que contém o grupo amina, análises laboratoriais que permitam verificar a nível molecular estas interações seriam esclarecedoras.

A aplicação destas enzimas encapsuladas na conversão bioquímica de produtos amiláceos, em especial os subprodutos da cadeia orizícola, gerando produtos de maior valor agregado seria de grande valia para a economia do Rio Grande do Sul.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver uma síntese sol-gel que encapsule enzimas sem representar perda biocatalítica relevante das três amilases estudadas.

O desempenho de vários sistemas encapsulados ficou próximo dos sistemas homogêneos, o que aumenta a possibilidade de sua aplicação industrial, o aperfeiçoamento desta técnica pode levar a patentes e aplicação nos subprodutos na cadeia orizícola do Rio Grande do Sul.

A  $\beta$ -amilase encapsulada (sem organosilanos) apresentou conversão de amido em açúcares redutores inferiores a seus respectivos sistemas homogêneos, o que demonstra que se trata de uma enzima mais suscetível à desativação quando submetida ao processo de encapsulamento via sol-gel hidrolítico ácido. Entretanto foi a enzima que apresentou maior ampliação de desempenho biocatalítico ao se usarem os organosilanos como modificador, atingindo valores próximos do homogêneo.

A  $\alpha$ -amilase (*Bacillus subtilis*) e  $\alpha$ -amilase (*Aspergillus oryzae*) encapsuladas apresentaram menores conversões que os sistemas homogêneos, porém a queda de atividade foi mais sutil. Portanto, são enzimas mais robustas e resistem melhor ao processo de encapsulamento via sol-gel. Porém estas enzimas parecem não aumentar sua atividade biocatalítica de forma clara ou relevante ao se usarem organosilanos como modificador no sol-gel.

A faixa de pH ótimo de uma enzima encapsulada está relativamente deslocada para valores superiores quando comparada às enzimas homogêneas.

De uma forma geral a adição de organosilanos diminui a área específica e o volume de poros, porém aumenta o tamanho médio de poros. As isotermas do tipo II e IV obtidas das enzimas encapsuladas permite deduzir que os poros dominantes são do tipo meso- e macroporos,

As análises FT-IR das sílicas contendo organosilano com orientação aleatória da cadeia alquil associada ao estado líquido predominante, somado ao aumento do tamanho de poros, leva a crer que as propriedades de textura para reações de hidrólise enzimática são promissoras, já que poros maiores em uma sílica com estas características representaria menor possibilidade de ocorrer problemas difusionais.

As proporções de glicose e maltose da enzima encapsulada  $\alpha$ -amilase fúngica é muito diferente do respectivo sistema homogêneo, o que demonstra que o encapsulamento afetou fortemente a forma de agir desta enzima na degradação do amido.

Os grupos funcionais existentes nos organosilanos parecem interagir com os centros catalíticos das amilases, em especial os organosilanos contendo o grupo amina, o uso destes modificadores demanda mais estudos e cautela para reações de sacarificação de amido.

A natureza da amilase parece ser afetada pela adição dos organosilanos. A  $\beta$ -amilase foi o sistema encapsulado que parece ter sido mais afetado na forma como o amido é decomposto: aumentando o açúcar redutor com o uso de organosilano, gerando uma maior proporção de glicose, o ambiente de confinamento com organosilanos favorece a glicose em detrimento da maltose.

De uma forma geral o encapsulamento de amilases pode ser usado para maximizar a relação Glicose/Maltose, o que pode ser estratégico para processos industriais, em especial as fermentações, pois a glicose é o monossacarídeo decomposto de forma mais rápida pelos microrganismos.

O Rio Grande do Sul possui diversas cadeias produtivas associadas a cultura de arroz, cevada, trigo e milho que geram subprodutos com produtos amiláceos que podem ser transformados em compostos de valor agregado maior que o usual.

Em suma, essa tese alega que o encapsulamento de enzimas amilases usando a técnica de sol-gel aliado a funcionalização com organosilanos gera enzimas encapsuladas híbridas estáveis, com elevada atividade biocatalítica capazes de produzir alta relação glicose/maltose.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADHIKARI, B.-R.; SCHRAFT, H.; CHEN, A. A high-performance enzyme entrapment platform facilitated by a cationic polymer for the efficient electrochemical sensing of ethanol. *Analyst*, v.142, pg. 2595, 2017.

AHUJA, K.; RAWAT, A. Brewing Enzymes Market Size By Product (Amylases [Decoction Vessel, Mashing, Fermentation], Proteases [Conditioning Tank], Beta-Glucanases [Decoction Vessel, Mashing, Fermentation], Xylanases [Mashing]) Industry Analysis Report, Regional Outlook, Growth Potential, Price Trend, Competitive Market Share & Forecast, 2018 – 2024. *Food, nutrition and animal Feed*, pg.250, 2018.

AL-NAJADA, A.R.; ALMULAIKY, Y.Q.; ALDHAHRI, M. Immobilization of  $\alpha$ -amylase on activated amidrazone acrylic fabric: a new approach for the enhancement of enzyme stability and reusability. *Scientific Reports*, v.9, 12672, 2019.

BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, v.26, p. 566-572, 2008.

BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R.R.; MARQUEZ, J.E.; FRANCO, T.T.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E.B. Production and characterization of amylases from *Zea mays* malt. *Brazilian archives of biology and technology*, v.52, pg.991-100, 2009.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; ALMEIDA, U. DE; AQUARONE, E. **Biociologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

BEZERRA, R. P.; BORBA, F. K.S.L.; MOREIRA, KEILA A.; LIMA-FILHO, JOSÉ L.; PORTO, ANA LÚCIA F.; CHAVES, ADILSON C. Extração líquido-líquido da amilase produzida pelo *Bacillus Subtilis* no sistema de duas fases aquosas. Universidade Federal do Ceará, 2002.

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

BRINKER, J.C.; SCHERER, G.W. *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. San Diego: Elsevier Science, 1990.

CAKMAKCI, E.; DANIS, O.; DEMIR, S.; MULAZIM, Y.; KAHRAMAN, M.V. Alpha-amylase immobilization on epoxy containing thiol-enephotocurable materials. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.23(2), p.205-10, 2013.

CAMPBELL, M.K.. **Bioquímica**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CATERINA, G.C.M; NETTO, H. E;TOMA, L. H. A. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.85– 86, p.71– 92, 2013.

COLTHUP, N.B. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**. 3 ed. San Diego: Academic, 1990.

DROUT, R.J.; ROBINSON, L.; FARHA, O.K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal-organic frameworks. *Coordination Chemistry Reviews*, v.381, pg.151-160, 2019.

FIDALGO, A.; CIRIMINNA, R.; LOPES, L.; PANDARUS, V.; BÉLAND,F.; ILHARCO, L.M..The sol-gel entrapment of noble metals in hybrid silicas: a molecular insight,*Chemistry Central Journal*, v. 7, pg. 161, 2013.

FU, F.; OLIVEIRA, D.B.; TRUMBLE, W.R.; SARKAR,H.M.; SINGH,B.R. *Applied sepectrsoscopy*, vol.48, 11, 1994.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38, pg.1599-1616, 2003.

HANEFELD, U.; VEUM, L. Carrier enabled catalytic reaction cascades. *Chemical Communications*, v.8, p.825–831, 2006.

HASSAN, B.; SHAHID CHATHA, SH.A.; HUSSAIN, A.I.; ZIA, K.M.; AKHTAR, N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.109, pg.1095-1107, 2018.

HWANG, E. T.; GU, M. B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Engineering in Life Sciences*, v.13, p.49–61, 2013.

HODGSON,R.J.; CHEN,Y.; ZHANG,Z.; TLEUGABULOVA,D.; LONG,H.; ZHAO, X.;ORGAN,M.; BROOK,M.A.; BRENNAN, J.D. Protein-Doped Monolithic Silica Columns for Capillary Liquid Chromatography Prepared by the Sol-Gel Method: Applications to Frontal Affinity Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 10, p.2780-2790, 2004.

ILAVSKY, J.; JEMIAN, P. R. Irena: tool suite for modeling and analysis of small-angle scattering, *Journal of Applied Crystallography*, vol. 42, pg. 347-353, 2009.

ILAVSKY, J.; ZHANG, F.; ALLEN, A. J.; LEVINE, L. E.; JEMIAN, P. R.; LONG, G. G. Ultra-Small-Angle X-ray Scattering Instrument at the Advanced Photon Source: History, Recent Development, and Current Status. *Metallurgical and Materials Transactions A*, vol.44, pg.68-76, 2013.

ILAVSKY, J.; ZHANG, F.; ANDREWS, R.N.; KUZMENKO, I.; JEMIAN, P.R.; LEVINE, L.E.; ALLEN, A.J. Development of combined microstructure and structure characterization facility for in situ and operando studies at the Advanced Photon Source, *Journal Of Applied Crystallography*, vol.51, pg.867-882, 2018.

JIANGKE, Y.; LIYING, L.; XIONGWEN, C. Combination of bioimprinting and silane precursor alkyls improved the activity of sol–gel-encapsulated lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, vol.46, pg.257-261, 2010.

KATSUYA, K.; SUNGHO, L.; FUKUE, N. Efficient enzyme encapsulation inside sol-gel silica sheets prepared by poly-L-lysine as a catalyst. *Journal of Asian Ceramic Societies*, vol. 8, pg.396-406, 2020.

KLINER, S. R. Reduction and analysis of SANS and USANS data using IGOR Pro, *Journal of Applied Crystallography*, vol. 39, pp. 895-900, 2006.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 343–349, 2006.

KRIŽNIK, L.; VASIĆ, K.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Hyper-activation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles. *Journal of Cleaner Production*, v.179, pg. 225-234, 2018.

KUMAR, S.; KUKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S.S.; GUPTA, REENA. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, v.41, pp.38-44, 2005.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

LEVY, D.; ZAYAT, M. **The Sol-gel Handbook: Synthesis, characterization and applications**. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2015.

MARTINEZ, G, J. F. **Utilización de  $\alpha$ -amilasas en la formulación de detergentes industriales**. Granada, setembro de 2005. Tesis doctoral de la Universidad de Granada. Departamento de Ingeniería Química. 2005.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p.426, 1959.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 5 ed. New York: John Wiley, 1997.

NASSOR, E. C. O.; ÁVILA, L.R.; SANTOS P., P.F.; CIUFFI, K.J.; CALEFI, P.S.; NASSAR, E.J. Influence of the hydrolysis and condensation time on the preparation of hybrid materials. *Materials Research*, v.14, p.1-6, 2011.

ONBAS, R. & YESIL-CELIKTAS, O. Synthesis of alginate-silica hybrid hydrogel for biocatalytic conversion by  $\beta$ -glucosidase in microreactor. *Engineering in Life Sciences*, v.19, pg. 37-46, 2019.

PAULING, L.; COREY, R.B; BRANSON, H.R. The Structure of Proteins: Two Hydrogen -Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *PNAS*, 37, pg.205–211, 1951.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; Van, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4ª ed. Cengage Learning, 2010.

PASCOAL, A. M.; MITIDIERI, S.; FERNANDES, K. F. Immobilisation of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* onto polyaniline. *Food and bioproducts processing*, v.89, p.300–306, 2011.

QIAN, M.; HASER, R., PAYAN F. Carbohydrate binding sites in a pancreatic alpha-amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1 Å resolution. *Protein Science*, v.4, p.747-755, 1995.

PEDIA.COM. 2016. Disponível em: <<http://pediaa.com/difference-between-alpha-and-beta-amylase/>> Acesso em: 24 nov. 2016.

PETROV, A. L.; ERANKIN, S. V.; PETROV, L. A.; SHISHMAKOV, A. B. Sol-Gel Synthesis of an Organic-Inorganic Composite for Preparation of an Active Carrier of  $\alpha$ -Amylase. *Glass Physics and Chemistry*, v.38(1), p.105-108, 2012.

SAIKIA, B.J.; PARTHASARATHY, G. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Characterization of Kaolinite from Assam and Meghalaya, Northeastern India. *Journal of Modern Physics*, v.1, p.206-210, 2010.

SALGAONKAR, M.; NADAR, S.S.; RATHOD, V.K. Combi-metal organic framework (Combi-MOF) of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase for one pot starch hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.113, pg.464-475, 2018.

SHAPOVALOVA, O. E. ; LEVY, D. ; AVNIR, D. ; VINOGRADOV, V.V. Protection of enzymes from photodegradation by entrapment within alumina. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, pg.731-736, 2016.

SILVA, G. S.; OLIVEIRA, P. C.; GIORDANI, D. S.; CASTRO, H. F. de. Chitosan/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and performance as a support for immobilizing enzyme. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.22, pg.1407-1417, 2011.

SILVESTEIRN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.I. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed. LTC, 2006.

SINGH, S.; SAIKIA, J. P.; BURAGOHAİN, A.K. A Novel reusable PAni-PVA-Amylase film: Activity and analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.106, pg.46– 50, 2013.

SING, K.S.W. REPORTING PHYSISORPTION DATA FOR GAS/SOLID SYSTEMS. *Pure & Applied Chemistry*, v.54, pg.2201-2218, 1982.

SINGH, V. & KUMAR, P. Carboxymethyl tamarind gum–silica nanohybrids for effective immobilization of amylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 70, pg 67-73, 2011.

SINGH, V.; SRIVASTAVA, P.; SINGH, A.; SINGH, A.; MALVIYA, T. Polysaccharide-Silica Hybrids: Design and Applications. *Polymer Reviews*, v.56, pg.113-136, 2016.

SNYDER, R. G.; MARONCELLI, M.; STRAUSS, H. L.; HALLMARK, V. M. Temperature and phase behavior of infrared intensities: the poly(methylene) chain. *The Journal of Physical Chemistry*, v.90, pg.5623-5630, 1986.

SPEROTTO, R.A. (Org.). **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. ed. 1, Lajeado: Univates, 2014.

SOUZA, R.L.; RESENDE, W.C.; BARÃO, C.E.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F.; SANTOS, O.A.A.; FRICKS, A.T.; FIGUEREIDO, R.T.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol–gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.84, pg.152-159, 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª ed. São Paulo: Artmed, 2005.

TSCHOPE, EGON CARLOS. **Micro cervejarias e Cervejarias: A Historia, a Arte e a Tecnologia**. 1. ed. Sao Paulo: Aden, 2001.

UDANI, J. K. et al. Lowering the glycemic index of white bread using a white bean extract. *Nutrition Journal*, v.8, n. 52, pg. 1-5, 2009.

VANSANT, E.F.; VAN DER, V.P.; VRANCKEN, K.C. **Studies in surface science and catalyst. Characterization and chemical modification of the silica surface.** v.92, Amsterdam: Elsevier, 1995.

VAN P. G.; EGGERT J. K.E.; DIJKSTRA, B.W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *Journal of Molecular Biology*, v.309, pg.215-226, 2001.

VLAD-OROS, B.; DRAGOMIRESCU, M.; PREDA, G.; PETER, F.; CHIRIAC, A. Characterization of silica-based biomaterials containing microbial amylases. *Revue Roumaine de Chimie*; v.52(11); p.1083-1087, 2007.

WEISER, D.; BOROS, Z.; HORNYÁNSZKY, G.; TÓTH, A.; POPPE, L. Disubstituted dialkoxysilane precursors in binary and ternary sol-gel systems for lipase immobilization. *Process Biochemistry*, v.47, pg. 428-434, 2012.

WRIGHT, J.D.; SOMMERDIJK, N.A.J.M. **Sol-gel Materials Chemistry and applications.** New York: CRC, 2001.

YANDRI; SUHARTATI, T.; SATRIA, H.; WIDYASMARA, A.; SUTOPO, H. Increasing Stability of  $\alpha$ -amylase Obtained from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by Immobilization with Chitosan. *Mediterranean Journal of Chemistry*, v.10, pg.155-161, 2020.

YANG, J.; LIU, L.; CAO, X. Combination of bioimprinting and silane precursor alkyls improved the activity of sol-gel-encapsulated lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, v.46, pg. 257-261, 2010.

YUCE-DURSUN, B.; CIGIL, A.B.; DONGEZ, D.; KAHRAMAN, M.V.; OGAN, A.; DEMIR, S. Preparation and characterization of sol-gel hybrid coating films for

covalent immobilization of lipase enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.127, pg. 18-25, 2016.

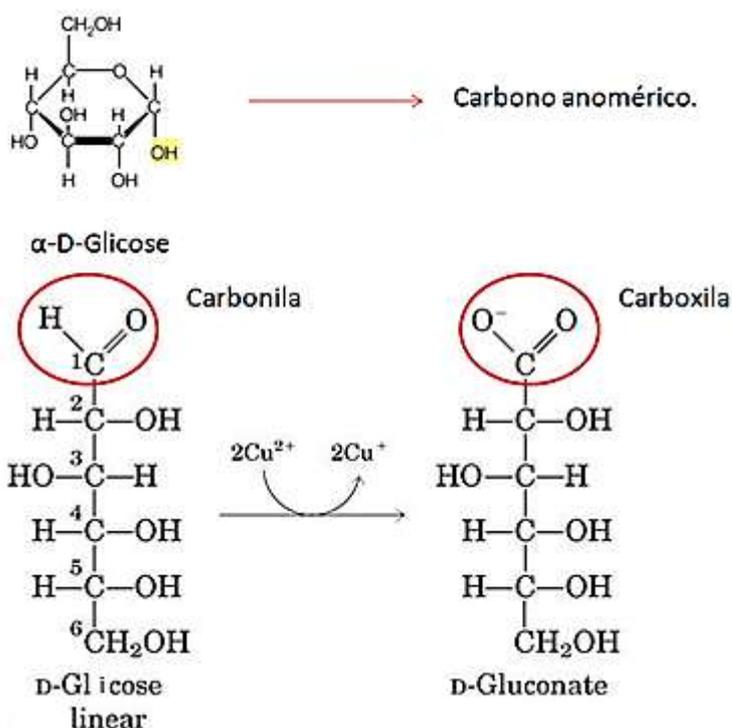
ZUSFAHAIR; NINGSH, D.R.; KARTIKA, D., ZULIANA, A.L *Bacillus thuringiensis* HCB6 Amylase Immobilization by Chitosan Beads. *IOP Conferences Series: Materials Science and Engineering*, vol.172, 2017.

ZUSFAHAIR; NINGSIH, D.R.; KARTIKA, D.; KURNIASIH, M.; NOFIANI, R.; FATONI, A. Improved reuse and affinity of enzyme using immobilized amylase on alginate matrix. *Journal of Physics: Conference Series*, pg.1494, 2020.

## ANEXO A

## MÉTODO DNS (3,5-ÁCIDO DINITROSALICÍLICO)

Açúcares, como a glicose e frutose, podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves, o carbono anomérico<sup>2</sup> da glicose (assinalado na Figura 5) não pode ser oxidado na forma de anel, mas, como está em equilíbrio com a forma linear, existe a possibilidade de oxidá-lo. A Figura A apresenta o conceito de poder redutor da glicose usando cobre como agente oxidante.



**Figura A.** Oxidação da glicose onde o grupo carbonila se torna carboxila.

O método DNS usado para determinar a concentração de açúcares redutores foi consolidado por MILLER em 1959 o qual realizou um estudo extenso. MILLER, em seu trabalho, usava uma solução contendo 3,5-ácido dinitrosalicílico, um composto que pode ser reduzido pela glicose a um composto nitroamino análogo, aromático que absorve

<sup>2</sup> O carbono anomérico é aquele carbono que passa a ser quiral ou assimétrico (faz 4 ligações diferentes) depois de ocorrer a ciclização da molécula.

fortemente a luz, sendo possível, assim, estabelecer uma relação direta entre a medida colorimétrica e a quantidade de açúcares redutores.

A reação entre o 3,5-ácido dinitrosalicílico e açúcares redutores permite a confecção de curvas de calibração usando o valor da absorção no comprimento de onda de 540 nm determinado através de técnicas espectrofotométricas.