

DAVID SPRESSÃO DE LIMA JUNIOR

Imobilização de glucoamilase fúngica comercial em suportes obtidos por manufatura aditiva e aplicação na hidrólise do amido em reator de tanque agitado operado em batelada

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Daniela Alonso Bocchini

Coorientadora: Prof.^a Dr^a Ariela Veloso de Paula

Araraquara

2024

L732i

Lima Junior, David Spressão de

Imobilização de glucoamilase fúngica comercial em suportes obtidos por manufatura aditiva e aplicação na hidrólise do amido em reator de tanque agitado operado em batelada / David Spressão de Lima Junior. -- , 2024
135 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara,

Orientadora: Daniela Alonso Bocchini

Coorientadora: Ariela Veloso de Paula

1. Amilases. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Manufatura aditiva. 4. Planejamento experimental. 5. Hidrólise. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

As glucoamilases são enzimas de grande importância industrial, com destaque para os processos de produção de bebidas alcoólicas e de xaropes de glicose e frutose. Nesse sentido, levando-se em consideração a relevância industrial e de mercado das glucoamilases, juntamente com o alto valor agregado associado a enzimas, de maneira geral, o presente trabalho tem como impacto potencial contribuir para o avanço nos estudos de imobilização enzimática bem como oferecer soluções práticas para elevar a eficiência e a sustentabilidade de processos enzimáticos por meio do *design* de suportes inovadores utilizando-se a tecnologia de manufatura aditiva.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Glucoamylases are enzymes of significant industrial importance, particularly in the production of alcoholic beverages and glucose and fructose syrups. In light of the industrial and market significance of glucoamylases, coupled with the considerable added value associated with enzymes in general, this work has the potential to contribute to advancements in enzyme immobilization studies and offer practical solutions to enhance the efficiency and sustainability of enzymatic processes through the design of innovative supports using additive manufacturing technology.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Imobilização de glucoamilase fúngica comercial em suportes obtidos por manufatura aditiva e aplicação na hidrólise do amido em reator de tanque agitado operado em batelada"

AUTOR: DAVID SPRESSÃO DE LIMA JÚNIOR

ORIENTADORA: DANIELA ALONSO BOCCHINI

COORDINADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 DANIELA ALONSO BOCCHINI
Data: 25/10/2024 07:57:04-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dra. DANIELA ALONSO BOCCHINI (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Prof. Dr. JÚLIO CÉSAR DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Escola de Engenharia de Lorena - USP - Lorena

Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dra. JULIANA CRISTINA BASSAN (Participação Virtual)
Faculdade de Tecnologia Profa. Édi Salvi Lima / FATEC - Barretos

Araraquara, 04 de outubro de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: David Spressão de Lima Junior

Nome em citações bibliográficas: LIMA JUNIOR, D. S.; LIMA JR, D. S.

Endereço de acesso ao currículo Lattes: lattes.cnpq.br/2622722366127237

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Bioquímica e Química Orgânica. Unesp – Campus de Araraquara. Jardim Quitandinha. 14800900 – Araraquara, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2020 – Atual: Doutorado em andamento em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Imobilização de glucoamilase fúngica em suportes obtidos por manufatura aditiva e aplicação na hidrólise do amido em reatores enzimáticos.

Orientadora: Daniela Alonso Bocchini

Coorientadora: Ariela Veloso de Paula

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2018 – 2020: Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp SF 021: Estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido.

Orientadora: Daniela Alonso Bocchini

Coorientadora: Heloiza Ferreira Alves do Prado

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2013 – 2017: Graduação em Engenharia Biotecnológica

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico e biomassa unicelular a partir da formulação e cultivo de *Sporidiobolus pararosesus* utilizando-se resíduos agroindustriais.

Orientador: Pedro Oliva Neto

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2021 - 2021

Docência no Ensino Superior: fundamentos e práticas pedagógicas. (Carga horária: 30h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2019 - 2019

Ecologia Microbiana: diversidade genética e funcional de fungos. (Carga horária: 8h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2019 - 2019

Redação de Patentes, Além dos Guias + Oficinas Práticas. (Carga horária: 12h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2017 - 2017

Inovações para Saúde, Indústria e Meio Ambiente. (Carga horária: 12h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016 - 2016

Fundamentos da Produção de Cerveja. (Carga horária: 4h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016 - 2016

Fotografia forense. (Carga horária: 4h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2014 - 2014

Autocad - Conceitos básicos e aplicações na Área Ambiental. (Carga horária: 60h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

Shinya, Thais Yumi ; Elsner, Victor Henrique Pereira ; De Lima Júnior, David Spressão ; De Barros Ranke, Fabiane Fernanda ; Escaramboni, Bruna ; Da Paixão Melo, Weilan Gomes ; Núñez, Eutimio Gustavo Fernández ; De Oliva Neto, Pedro . Bioprocess development with special yeasts for cassava bagasse enrichment nutritional to use in animal feed. ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 290, p. 115338, 2022

Livros e capítulos

de Cassia Pereira, J. ; Bocchini, D. A. ; Gomes, E. ; da Silva, R. ; Gomes, J. E. G. ; Sanches, R. D. O. ; Lima Jr, D. S. ; Pereira, W. E. S. ; Silva, G. O. ; Nascimento, C. E. O. . Microbial plant material degrading enzymes: catalysis and application. In: Inamuddin; Tariq Altalhi; Arwa Alrooqi. (Org.). Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science Natural Materials-Based Green Composites 2 : Biomass. 1ed.: Elsevier, 2023, v., p. 79-120.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

Lima Jr, D. S.; Elsner, V. H. P. ; Ornela, P. H. O. ; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras em meio contendo bagaço de cana. In: VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015, Rio Claro. Anais do VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015.

Elsner, V. H. P. ; Lima Jr, D. S. ; Ornela, P. H. O. ; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras para incremento proteico do bagaço de cana. In: VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015, Rio Claro. Anais do VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015.

Shinya, T. Y. ; Lima Junior, D. S. ; Elsner, V. H. P. ; Ornela, P. H. O. ; Moraes, F. T. ; Oliva Neto, P. . Avaliação da produção de xilanase por levedura utilizando bagaço de cana como substrato. In: II Workshop de Bioenergia - UNESP, 2014, Rio Claro - SP. Anais do II Workshop de Bioenergia, 2014.

Apresentações de trabalho

Lima Junior, D. S.; Sessak, I. ; De Paula, A. V. ; Bocchini, D. A. . Immobilization of fungal glucoamylase on carrier obtained by additive manufacturing. 2023. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Do Nascimento, J.F.C. ; Lima Junior, D. S. ; Remonato, D. ; Oliveira, J.V. ; Barbosa, L.B. ; De Paula, A. V. . Avaliação do impacto da razão molar na esterificação enzimática de ésteres de cinamato de geranila. 2023. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Lima Junior, D. S.; Alves-Prado, H. F. ; Bocchini, D. A. . Studies of amylase production by the endophytic fungi Paecilomyces sp. SF 021. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Lima Junior, D. S.; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Avaliação da produção de enzimas por *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1 usando palha de cana e soro de leite. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Lima Jr, D. S.; Elsner, V. H. P. ; Ornela, P. H. O. ; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras em meio contendo bagaço de cana. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Elsner, V. H. P. ; Lima Jr, D. S. ; Ornela, P. H. O. ; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras para incremento proteico. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Shinya, T. Y. ; Elsner, V. H. P. ; Lima Jr, D. S. ; Moraes, F. T. ; Nunez, E. G. F. ; Oliva Neto, P. . Produção de enzimas lignocelulolíticas por *Rhodotorula mucilaginosa*: Um novo bioprocessamento utilizando bagaço de cana em cultivo submerso. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Shinya, T. Y. ; Lima Jr, D. S. ; Elsner, V. H. P. ; Ornela, P. H. O. ; Moraes, F. T. ; Oliva Neto, P. . Avaliação da produção de xilanase por levedura utilizando bagaço de cana como substrato. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Demais produções técnicas

Lima Junior, D. S.. Avaliador dos painéis apresentados durante o XXXV Congresso de Iniciação Científica do Instituto de Química de Araraquara. 2023.

Lima Junior, D. S.. Avaliador dos painéis apresentados durante o XXXIV Congresso de Iniciação Científica do Instituto de Química de Araraquara. 2022.

Lima Junior, D. S.. Avaliador dos painéis apresentados durante o XXXII Congresso de Iniciação Científica do Instituto de Química de Araraquara. 2020.

Participação em bancas

BAPTISTA NETO, A.; LIMA JR, D. S.; REMONATTO, D.. Participação em banca de Izabela Barbosa. Síntese e caracterização da lipase de *Rhizopus oryzae* para a produção de lipídios estruturados. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista.

Sousa Brito, C. A. R; LIMA JUNIOR, D. S.; SHINYA, THAIS YUMI. Participação em banca de Alisson de Sousa Rodrigues. Quantificação de *Aspergillus* em grãos de arroz comprados em comércios e adquiridos de produtores locais em Campo Maior - PI. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Piauí.

Sousa Brito, C. A. R; LIMA JUNIOR, D. S.; SHINYA, THAIS YUMI. Participação em banca de Janaira do Nascimento Gomes. Monitoramento do curso da água em três locais da comunidade América - PI. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Piauí.

DE PAULA, A. V.; CERRI, M. O.; LIMA JUNIOR, D. S.. Participação em banca de Bárbara Fernandes Izidoro. Impressão 3D: estudo das principais técnicas e da sua aplicação na imobilização enzimática. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista.

Participação em eventos

15 SLACAN – Simpósio Latino-Americano de Ciências de Alimento e Nutrição. 2023.

IX Simpósio de Microbiologia Aplicada. 2019. (Simpósio).

I Workshop do Departamento de Biotecnologia: Inovações para Saúde, Indústria e Meio Ambiente. 2017. (Oficina).

XXIX Congresso de Iniciação Científica - UNESP. 2017. (Congresso).

Workshop: Inovações em Bioprocessos. 2016. (Exposição).

XIII EEBBA (Encontro de Engenharia Biotecnológica e Biociências de Assis). 2016. (Encontro).

VII Simpósio de Microbiologia Aplicada. 2015. (Simpósio).

SUPERVISÃO CIENTÍFICA

Iniciação científica:

Ilana Sessak. Imobilização de glucoamilase em poliácido láctico (PLA). Início: 2022. Iniciação científica (Graduando em Bacharelado em Química) - Instituto de Química - UNESP/Araraquara.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
à minha mãe e à minha família por todo o amor, incentivo, ajuda e apoio e
aos meus amigos pela convivência e apoio ao longo de minha trajetória acadêmica*

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes seis longos anos de Pós-graduação, acredito que o principal aprendizado que tive foi o de que é praticamente impossível passar por esse período sozinho e sem o apoio de pessoas queridas e importantes. E eu tive a sorte de, ao longo desta jornada, conhecer e encontrar pessoas maravilhosas as quais, cada uma em sua particularidade, me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço, primeiramente, a minha família, por todo o apoio emocional e financeiro e por acreditarem nos meus objetivos juntos comigo ao longo de todo o período da Graduação e Pós Graduação. Em especial à minha mãe, Ângela Eliza, por nunca ter soltado minha mão ao longo de todos estes anos. Muito obrigado por tudo e por serem meu porto seguro.

Agradeço a Prof^a Dr^a Daniela Alonso Bocchini por ter me aceito em seu laboratório e em seu grupo de pesquisa. Muito obrigado pelos anos de orientação, ensinamentos, conselhos e amizade, indispensáveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço a Prof^a Dr^a Ariela Veloso de Paula pela sua indispensável co-orientação. Muito obrigado por todos os ensinamentos, conselhos, amizade e paciência, sem os quais não seria possível concluir este trabalho.

Agradeço a banca examinadora por ter aceito avaliar o trabalho e pela disponibilidade.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado e me acompanharam ao longo de toda a trajetória acadêmica: Cintia Marcelo de

Oliveira, Pedro Henrique Lopes Cardoso e Khalil Nogueira Nicolau. Obrigado por todo o apoio, suporte, conversas, desabafos e, principalmente, por não permitirem que eu desistisse frente aos momentos difíceis.

Agradeço aos amigos que a cidade de Araraquara me presenteou ao longo destes anos, os quais eu levarei para sempre em meu coração. Em especial, a minha grande amiga e que me proporcionou memórias inesquecíveis, Giulliana. Muito obrigado por tudo. Por todas as conversas, desabafos, risadas e momentos especiais! *“Tamo junto ou não tamo?”* Obrigado!

Agradeço aos amigos e parceiros que a Pós Graduação me presenteou e que me ajudaram em diferentes momentos: Fauller, Jonatas, Bia, Gabi, Naiara, Will, Fábio, Bruno, Lucas, João, Dani G. Dani R. Lélis, Helô e Cecília.

Agradeço aos meus queridos e inesquecíveis companheiros de laboratório: Ilana e Mateus. Muito obrigado por toda a ajuda e pelos momentos de descontração.

Agradeço a todos os membros do grupo de pesquisa ENZITAG, por terem me acolhido e me ajudado em diversos momentos.

Agradeço aos amigos que estiveram perto, ainda que alguns longe em presença, ao longo dessa trajetória: Seda, Tatu, Caçula, Tânia, Fabi, Nathalia O., Fernanda O., Letícia O., Cristina Z. Guilherme Arthur, Vinicius C., Fernanda P., Luciana B., Thais G., Nathalia B. Cuca, Mari, Mano Vini, Victor E.

Agradeço a Livia F., que entrou na minha vida recentemente, mas foi de grande importância durante a reta final do Doutorado. Muito obrigado.

Agradeço a minha terapeuta Ludmila A. por ter me acompanhado ao longo dos pouco mais de 4 anos do Doutorado e me ajudado a manter o mínimo de saúde mental durante todo o processo.

Agradeço aos meus amigos de quatro patas que já não estão mais neste plano, mas que foram muito importantes ao longo de toda essa jornada e grandes companheiros: Meg, Léia e Luke.

Agradeço ao Prof Dr Murilo Daniel de Melo Innocentini pela parceria e por ter cedido, gentilmente, as amostras de geopolímero necessárias para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof Dr Julián Paul Martinez Galan pelas valiosas colaborações.

Agradeço a Dr^a Daniela Remonato e ao Prof Dr Hamilton Cabral por terem aceitado o convite para avaliarem o trabalho durante o Exame de Geral de Qualificação e por suas considerações e sugestões para o trabalho.

Agradeço as técnicas e aos técnicos de laboratório do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Ana Lúcia, Adriana, Ivan, Mateus e Flávio por não medirem esforços durante os momentos que precisei de ajuda e pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço ao Instituto de Química de Araraquara, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e a Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Araraquara, juntamente com todos os seus funcionários, pela estrutura, oportunidade e serviços prestados.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e todos seus docentes pelos 11 anos de formação e ensino público, gratuito e de qualidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado e minha eterna gratidão.

*“...And then one day you find ten years have got behind you
No one told you when to run, you missed the starting gun.”*

Pink Floyd – Time

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar a imobilização covalente de glucoamilase fúngica comercial em suportes obtidos por manufatura aditiva e posterior aplicação dos derivados na hidrólise do amido em reatores enzimáticos. Suportes de poli-ácido láctico (PLA) e de geopolímero, inéditos no contexto das glucoamilases, foram utilizados na imobilização da enzima. Os suportes de PLA foram funcionalizados com grupamentos amino a partir de dois diferentes agentes, separadamente: hexametilenodiamina (HMDA) e etilenodiamina (EDA). Os suportes de geopolímero foram funcionalizados com 3-aminopropil trietoxisilano (APTES). Foram avaliados a influência do pH de imobilização e do carregamento enzimático (fixado em 10 e 200 mg de proteína/g de suporte) e os derivados foram caracterizados físico-quimicamente. Planejamentos experimentais do tipo DCCR foram empregados visando a determinação do pH e da temperatura ótimos da enzima solúvel e dos derivados. O pH ótimo determinado para a enzima em sua forma solúvel (4,93) não sofreu alteração após a imobilização em suportes de geopolímero, enquanto que a imobilização em suportes de PLA funcionalizados com EDA contribuiu para uma ligeira alteração (pH 5,5). Por outro lado, a temperatura ótima de atividade manteve-se a mesma para a enzima solúvel e após a imobilização em suportes de PLA (50 °C) enquanto que a imobilização em suportes de geopolímero contribuiu para uma ligeira alteração deste valor para 55,5 °C). A imobilização em suportes de geopolímero contribuiu para uma elevação da estabilidade e do tempo de meia-vida frente ao seu pH ótimo de atividade ($K_d = 0,01 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 101,93 \text{ h}$), o mesmo não tendo sido observado após a imobilização em suportes de PLA ($K_d = 0,11 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 6,59 \text{ h}$), enquanto que a estabilidade frente às temperaturas ótimas de ambos os derivados obtidos (PLA e geopolímero) foi inferior à demonstrada pela enzima em sua forma solúvel ($K_{d\text{PLA}} = 1,36 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2\text{PLA}} = 0,51 \text{ h}$; $K_{d\text{Geop.}} = 1,77 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2\text{Geop.}} = 0,40 \text{ h}$). Os derivados foram utilizados por cinco ciclos de hidrólise em reatores de tanque agitado, com destaque para as conversões próximas às máximas obtidas pelo uso dos derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de PLA em seis horas de reação (93,44%) e em 24 horas para os derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de geopolímero (91,55%). Os resultados obtidos demonstram o potencial de aplicação dos suportes de PLA e de geopolímero para a imobilização de

glucoamilase, fornecendo opções promissoras para a hidrólise do amido em reatores enzimáticos, facilitando o reuso de biocatalisadores. Esta característica é inatingível com as enzimas em sua forma solúvel, além de contribuir para a sustentabilidade e eficiência dos processos enzimáticos industriais.

Palavras chave: *amilases, enzimas imobilizadas; manufatura aditiva; planejamento experimental; hidrólise*

ABSTRACT

This study aimed to covalently immobilize commercial fungal glucoamylase onto supports obtained through additive manufacturing, and subsequently apply the derivatives to starch hydrolysis in enzymatic reactors. Poly-lactic acid (PLA) and geopolymer supports, novel in the context of glucoamylases, were used for enzyme immobilization. PLA supports were functionalized with amino groups using two different agents, separately: hexamethylenediamine (HMDA) and ethylenediamine (EDA). Geopolymer supports were functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). The influence of immobilization pH and enzyme loading, fixed at 10 and 200 mg protein/g support, was evaluated, and the derivatives were physicochemically characterized. DCCR experimental designs were employed to determine the optimal pH and temperature of the soluble enzyme and derivatives. The optimal pH determined for the enzyme in its soluble form (4.93) did not change after immobilization on geopolymer supports, while immobilization on PLA supports functionalized with EDA contributed to a slight change (pH 5.5). On the other hand, the optimal activity temperature remained the same for the soluble enzyme and after immobilization on PLA supports (50 °C), while immobilization on geopolymer supports contributed to a slight change in this value to 55.5 °C. Immobilization on geopolymer supports contributed to an increase in stability and half-life at its optimal pH ($K_d = 0.01 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2} = 101.93 \text{ h}$), which was not observed after immobilization on PLA supports ($K_d = 0.11 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2} = 6.59 \text{ h}$), while stability at the optimal temperatures of both derivatives obtained (PLA and geopolymer) was lower than that demonstrated by the enzyme in its soluble form ($K_{d\text{PLA}} = 1.36 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2\text{PLA}} = 0.51 \text{ h}$; $K_{d\text{Geop.}} = 1.77 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2\text{Geop.}} = 0.40 \text{ h}$). The derivatives were used for five hydrolysis cycles in stirred-tank reactors, with emphasis on conversions close to the maximum obtained using the derivatives obtained from immobilization on PLA supports in six hours of reaction (93.44%) and in 24 hours for the derivatives obtained from immobilization on geopolymer supports (91.55%). The results obtained demonstrate the potential application of PLA and geopolymer supports for the immobilization of glucoamylase, providing promising options for starch hydrolysis in enzymatic reactors, facilitating the reuse of biocatalysts. This characteristic is unattainable with enzymes in their soluble form, and also contributes to the sustainability and efficiency of industrial enzymatic processes.

Keywords: *amylase, immobilized enzymes; additive manufacturing; experimental design; hydrolysis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais do amido. a) amilose; b) ponto de ramificação da amilopectina; c) agrupamento entre amilose e amilopectina nos grânulos de amido.....	31
Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.	32
Figura 3. Mecanismos de reação dos diferentes tipos de amilases. A) mecanismo inversor de configuração anomérica B) mecanismo retentor de configuração anomérica.....	37
Figura 4. Métodos físicos e químicos empregados na imobilização de enzimas.	42
Figura 5. Suportes de PLA projetados em CAD para imobilização de glucoamilase comercial.....	56
Figura 6. Suportes de geopolímero utilizados para imobilização de glucoamilase comercial.....	60
Figura 7. Mecanismo de reação de aminólise envolvido na incorporação dos grupamentos amina nos suportes de PLA.....	72
Figura 8. Alteração da cor do suporte após etapa de ativação com glutaraldeído. a) sem exposição ao reagente b) após exposição.	73
Figura 9. Espectrometria em infravermelho do suporte de PLA (a), do suporte após a funcionalização, (b) do suporte funcionalizado e ativado, (c), do derivado de PLA (d) e da enzima solúvel (e).	80
Figura 10. Espectrometria em infravermelho do suporte de geopolímero (a), do suporte após a funcionalização, (b) do suporte funcionalizado e ativado, (c), do derivado de geopolímero (d).	82
Figura 11. Superfícies de resposta obtidas para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da glucoamilase solúvel (A) e dos derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase em suportes de PLA (B).	90
Figura 12. Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no delineamento de composto central rotacional	

(DCCR), para a máxima atividade de glucoamilase solúvel(A) e derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase em suportes de PLA (B).	91
Figura 13. Superfície de resposta obtida para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.....	96
Figura 14. Perfil dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no delineamento de composto central rotacional (DCCR), para a máxima atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.....	97
Figura 15. Estabilidade operacional dos derivados obtidos através da imobilização covalente de glucoamilase em suportes de PLA. *100%: 9,18 U/g.....	105
Figura 16. Estabilidade operacional dos derivados obtidos através da imobilização covalente de glucoamilase em suportes de geopolímero *100%: 7,22 U/g.....	106
Figura 17. Hidrólise enzimática do amido e conversão em glicose por meio da ação de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA.....	108
Figura 18. Hidrólise enzimática do amido e conversão em glicose por meio da ação de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de geopolímero	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização.	45
Tabela 2. Exemplos de enzimas imobilizadas em suportes obtidos por manufatura aditiva.	49
Tabela 3. Valores reais e codificados das variáveis utilizadas nos delineamentos de composto central rotacional.	64
Tabela 4. Influência do agente funcionalizante e do pH de imobilização, na presença (ST) e na ausência (SNT) de NaBH ₄ na imobilização de glucoamilase em suportes de PLA.	68
Tabela 5. Análise de Variância (ANOVA) para os valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização dos derivados em função do agente funcionalizante, adição de NaBH ₄ e pH de imobilização.	70
Tabela 6. Avaliação da influência do pH na imobilização de glucoamilase em suportes de geopolímero.	75
Tabela 7. Influência do carregamento enzimático de suportes de PLA sob a atividade enzimática e o rendimento de imobilização da glucoamilase.	77
Tabela 8. Influência do carregamento enzimático de suportes de geopolímero sob a atividade enzimática e o rendimento de imobilização da glucoamilase.	78
Tabela 9. Matriz do planejamento experimental (DCCR) e resultados experimentais e previstos para a atividade de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA em função do pH e da temperatura.	84
Tabela 10. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase solúvel.	85

Tabela 11. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de PLA.	86
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase solúvel.	88
Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de PLA.	89
Tabela 14. Matriz do planejamento experimental (DCCR) e resultados experimentais e previstos para a atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.	92
Tabela 15. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.	93
Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero	95
Tabela 17. Constantes de desativação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da enzima solúvel e imobilizada em suportes de PLA e geopolímero.	100
Tabela 18. Constantes de desativação enzimática pelo efeito do pH ótimo de atividade (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da enzima solúvel e imobilizada em suportes de PLA e geopolímero.....	102

Sumário

1. Introdução	25
2. Revisão bibliográfica	30
2.1. Amido	30
2.2. Amilases	32
2.2.1. Mecanismo de ação das glucoamilases	35
2.2.2. Estrutura das glucoamilases	37
2.3. Aplicação industrial das glucoamilases	38
2.4. Métodos e suportes utilizados para imobilização enzimática	42
2.4.1. Imobilização de enzimas utilizando-se suportes obtidos por manufatura aditiva	48
3. Objetivos	54
4. Material e métodos	55
4.1. Materiais	55
4.2. Imobilização da glucoamilase comercial em suportes impressos de PLA 55	
4.2.1. Design dos suportes 3D de PLA	55
4.2.2. Funcionalização dos suportes de PLA	56
4.2.3. Ativação dos suportes de PLA	57
4.2.4. Imobilização em suportes de PLA	57
4.3. Imobilização da glucoamilase comercial em suportes impressos de geopolímero	58
4.3.1. Impressão dos suportes de geopolímero	58
4.3.2. Troca iônica	60
4.3.3. Funcionalização e ativação dos suportes de geopolímero	61
4.3.4. Imobilização em suportes de geopolímero	61
4.4. Avaliação da influência do carregamento enzimático na imobilização de glucoamilase	61
4.5. Determinação da atividade de glucoamilase	62
4.6. Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford ..	63
4.7. Caracterização físico química da enzima solúvel e dos derivados obtidos	63
4.7.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática	63
4.7.2. Estabilidade ao pH e temperatura	64
4.8. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	65
4.9. Ensaios de estabilidade operacional dos derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de PLA e em suportes de geopolímero	66

4.10. Hidrólise enzimática do amido em reatores enzimáticos de tanque agitado operando em batelada	66
5. Resultados e discussão	68
5.1. Imobilização de glucoamilase em suportes de PLA e em suportes de geopolímero.....	68
5.2. Influência do carregamento enzimático na imobilização de glucoamilase	76
5.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier dos suportes de PLA e de geopolímero	79
5.4. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA	83
5.5. Estabilidade pH e temperatura	99
5.5.1. Estabilidade frente a temperatura da glucoamilase solúvel e dos derivados de PLA e geopolímero	99
5.6. Estabilidade operacional das glucoamilases imobilizadas em suportes de PLA.....	104
5.7. Hidrólise enzimática do amido utilizando glucoamilase imobilizada em suportes de PLA.....	108
6. Conclusões	114
7. Referências	115

1. Introdução

A aplicação industrial de enzimas microbianas tem crescido notavelmente nas últimas décadas, e, paralelamente, os avanços no campo da Microbiologia Industrial e da Engenharia Bioquímica favoreceram a expansão das possibilidades de aplicação destes biocatalisadores (ARBIGE *et al.*, 2019; JEMLI *et al.*, 2016). Como consequência, tem-se observado uma diminuição progressiva na utilização industrial de catalisadores químicos que, além de apresentarem custo elevado, frequentemente requerem condições severas de reação como altas temperatura e pressão, envolvendo processos que resultam em maior consumo de energia e geração de subprodutos indesejáveis, com grande impacto negativo sobre o meio ambiente (SINDHU *et al.*, 2017). Nesse sentido, o uso de enzimas como biocatalisadores industriais apresenta algumas vantagens tanto sob o ponto de vista econômico, visto que atuam sob condições moderadas de pH, temperatura e pressão, quanto em relação às questões ambientais, pois são biodegradáveis e apresentam elevada especificidade ao substrato sem a geração de subprodutos ou produtos tóxicos ao ambiente (JEMLI *et al.*, 2016).

As amilases, enzimas que realizam a degradação do amido, ocupam um lugar de destaque na indústria, sobretudo no setor alimentício o qual depende amplamente destas biomoléculas para a produção de bebidas alcoólicas, pães e xaropes com alto teor de açúcares (KUMAR *et al.*, 2023; SAINI *et al.*, 2017). Além disso, as amilases também são empregadas nas indústrias têxtil, de papel, de detergente e, mais recentemente, têm sido estudadas para a aplicação na sacarificação de subprodutos amiláceos visando a obtenção de etanol de segunda geração (KUMAR *et al.*, 2023; KUMAR; CHAKRAVARTY, 2018).

Devido à sua complexidade estrutural, caracterizada por apresentar diferentes pontos de clivagem ao longo de sua molécula, o amido é hidrolisado por diferentes tipos de amilases, que são classificadas quanto ao seu local de ação em: endoamilases, exoamilases e amilases desramificantes, liberando diversos produtos de interesse industrial tais como a glicose e derivados de malto e ciclodextrina (POLIZELI *et al.*, 2016).

Uma das enzimas mais antigas e amplamente utilizada na indústria de alimentos é a glucoamilase (1,4- α -D-glucoanoglucohidrolase, EC 3.2.1.3), cuja principal aplicação é a sacarificação do amido ou dextrinas em glicose, um produto essencial para inúmeros processos de fermentação em uma grande variedade de indústrias de alimentos e bebidas. Também conhecida como amiloglicosidase, a glucoamilase é uma exoamilase, produzida principalmente por fungos, responsável pela hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 a partir de uma extremidade não redutora da molécula do amido. Mais recentemente, o potencial das glucoamilases para sacarificar matérias primas amiláceas tem sido estudado a fim de se empregar a glicose resultante na produção de etanol biológico (KUMAR *et al.*, 2023). O interesse neste biocombustível tem crescido consideravelmente nas últimas décadas como uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, justificada tanto pela possibilidade de depleção destas reservas quanto pela questão ambiental (LI *et al.*, 2022; XU; WANG, 2017). Nesse sentido, o setor sucroalcooleiro brasileiro, tradicionalmente dominado pela cana-de-açúcar, tem experimentado uma diversificação significativa nos últimos anos. As usinas flexíveis, que são aquelas de cana-de-açúcar adequadas para produzir etanol de milho no período da entressafra da cana, têm se multiplicado, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do país, o que

tem contribuído para o crescimento da produção de etanol de milho (ZIERO *et al.*, 2021). Segundo dados divulgados pela UNICA (Associação Brasileira da Indústria de Cana-de-Açúcar) em outubro de 2024, a produção quinzenal de etanol de milho representou 16,31% do biocombustível fabricado no Centro-Sul, atingindo 327,43 milhões de litros. Além disso, no acumulado desde o início da safra 2024/2025, a produção de etanol de milho atingiu 4,13 bilhões de litros, representando um avanço de 27,35% na comparação com igual período do ano de 2023 (UNICA, 2024).

Apesar das vantagens do uso de enzimas em substituição aos catalisadores químicos em processos industriais, sua aplicação industrial exige uma boa relação custo/efetividade, a fim de se justificar sua competitividade em termos econômicos. Uma importante limitação para a aplicação das enzimas em escala industrial é a manutenção de sua estabilidade e atividade catalítica ao longo do processo, juntamente com a inviabilidade de reuso destas quando na forma solúvel (ARBIGE *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a imobilização de enzimas tem se mostrado uma estratégia interessante, sendo definida como a associação física ou química de uma enzima a um suporte ou uma matriz sólida, insolúvel em água e inerte, através de diferentes técnicas como adsorção, ligação covalente, confinamento ou afinidade. A imobilização, pelas ligações estabelecidas entre suporte e enzima, pode proteger significativamente a configuração da proteína de modo a reter ao máximo a atividade e estabilidade enzimáticas (ZHANG *et al.*, 2015). Além disso, pode possibilitar o reuso dos biocatalisadores, contribuindo para a redução dos custos associados às etapas de produção e, quando necessário, purificação da enzima bem como de separação do produto. A imobilização de

enzimas também influencia na simplificação das etapas de *downstream*, bastando a simples adição ou remoção da enzima imobilizada do meio reacional para a interrupção rápida e precisa das reações enzimáticas, permitindo assim um maior controle do processo juntamente com a possibilidade de otimização do *design* de reatores (BASSO; SERBAN, 2019).

A escolha do suporte ao qual a enzima será imobilizada representa uma etapa importante para que o processo de imobilização ocorra, sendo necessário que a interação com o suporte garanta que a atividade catalítica seja mantida em um nível satisfatório. Desta forma, o suporte deve atender a alguns requisitos como insolubilidade nas condições reacionais e alta afinidade pela enzima, estabilidade térmica e química, presença de grupos funcionais reativos, fácil disponibilidade e, além disso, ser preferencialmente de baixo custo (ZDARTA *et al.*, 2018).

A impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva, tem se popularizado nas últimas décadas, contribuindo para o avanço em diversas áreas da ciência (HASSAN *et al.*, 2024). Essa tecnologia consiste na criação de objetos tridimensionais a partir de um modelo digital, e, por meio da adição sucessiva de material, camada por camada, obtêm-se o objeto desejado (REMONATTO *et al.*, 2023; SHAO *et al.*, 2022). A flexibilidade e a precisão da impressão 3D têm aberto novas possibilidades para a produção de matérias e objetos personalizados, incluindo suportes para imobilização de enzimas (DOS SANTOS *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2020; REMONATTO *et al.*, 2023; SHAO *et al.*, 2022, 2024). Com a popularização desta técnica, nota-se uma crescente tendência do seu uso para se produzir suportes enzimáticos personalizados quanto a dimensão e porosidade. Além disso, a impressão 3D permite a

utilização de uma ampla variedade de materiais como biopolímeros, metais e cerâmicas, possibilitando a criação de suportes com diferentes propriedades (REMONATTO *et al.*, 2023).

Nesse sentido, o presente trabalho propõe a utilização de manufatura aditiva (impressão 3D) para obtenção de dois diferentes suportes enzimáticos (PLA e geopolímero) para a imobilização de glucoamilases.

O poliácido lático (PLA), um biopolímero biodegradável e *eco-friendly*, destaca-se como uma opção promissora para a imobilização de enzimas. Suas propriedades, como a biocompatibilidade, a possibilidade de ser processado por manufatura aditiva (impressão 3D), e seu custo relativamente baixo, o tornam um material atrativo para a produção de suportes para a imobilização de enzimas. (FARAH *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017).

Os geopolímeros, por sua vez, apresentam elevada porosidade e composição semelhante à das zeólitas (materiais frequentemente empregados na imobilização de enzimas), o que os torna materiais promissores para esta finalidade. Essa característica, combinada com a possibilidade de serem aplicados à impressão 3D, visando a obtenção de suportes personalizados, confere aos geopolímeros uma grande versatilidade. Além disso, a composição química dos geopolímeros pode ser ajustada para otimizar suas propriedades mecânicas, térmicas e químicas, tornando-os materiais adequados para diversas aplicações em biotecnologia. (FRANCHIN *et al.*, 2017).

Diferentes técnicas e suportes têm sido utilizados para a imobilização de amilases, no entanto, o uso de PLA e geopolímero para a imobilização de glucoamilases não tem sido citado na literatura, justificando assim a importância e relevância do presente trabalho.

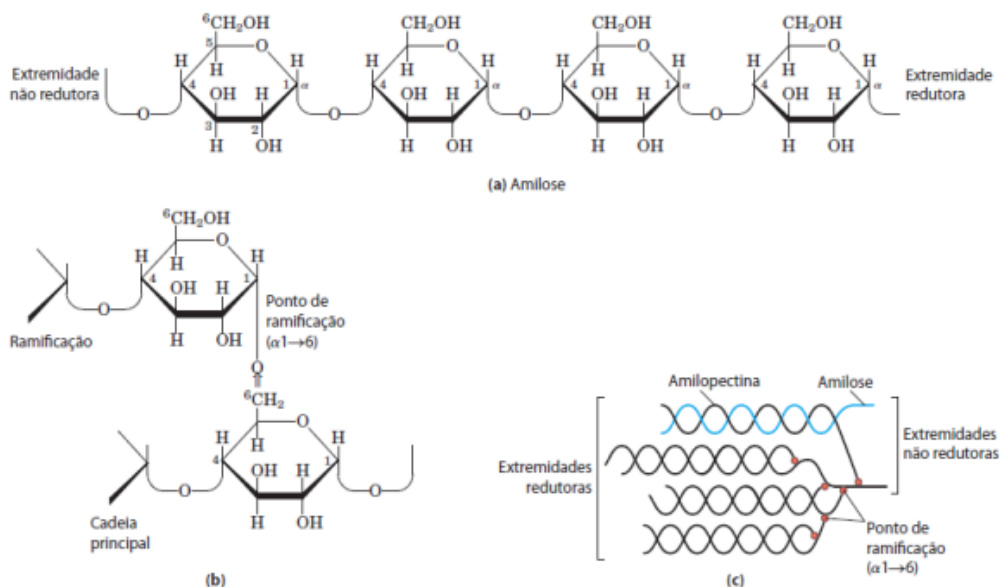
2. Revisão bibliográfica

2.1. Amido

O amido, principal fonte de reserva energética dos vegetais, desempenha um papel crucial na alimentação humana constituindo uma importante fonte de carboidratos encontrada em grãos, cereais, leguminosas, tubérculos e raízes (BERTOFT, 2017). Mais recentemente, o amido tem sido valorizado como fonte de fibras dietéticas, especialmente sob a forma de amido resistente, que por não ser digerido no intestino delgado chega intacto ao intestino grosso, onde pode ser fermentado por microrganismos, promovendo diversos benefícios à saúde humana tais como: ação prebiótica, estimulando o crescimento de bactérias benéficas ao intestino; controle glicêmico e de peso; e saúde cardiovascular, originando ácidos graxos de cadeia curta que podem contribuir para a redução dos níveis de colesterol e melhora da saúde cardiovascular (ZHUANG *et al.*, 2024).

Constituído por unidades monoméricas de glicose, o amido é organizado sob a forma de dois diferentes polímeros: amilose e amilopectina (AI; JANE, 2018) (Figura 1). A amilose constitui a região amorfa do grão de amido e trata-se de um polímero majoritariamente linear, no qual os resíduos de glicose encontram-se unidos por ligações glicosídicas α -1,4, enquanto a amilopectina, responsável pela região de lamela cristalina do grão de amido, é um polímero altamente ramificado, apresentando ramificação a cada 25-30 resíduos de glicose ao longo de sua porção linear (AI; JANE, 2018; BERTOFT, 2017).

Figura 1. Fórmulas estruturais do amido. a) amilose; b) ponto de ramificação da amilopectina; c) agrupamento entre amilose e amilopectina nos grânulos de amido.



Fonte: Nelson e Cox, 2014.

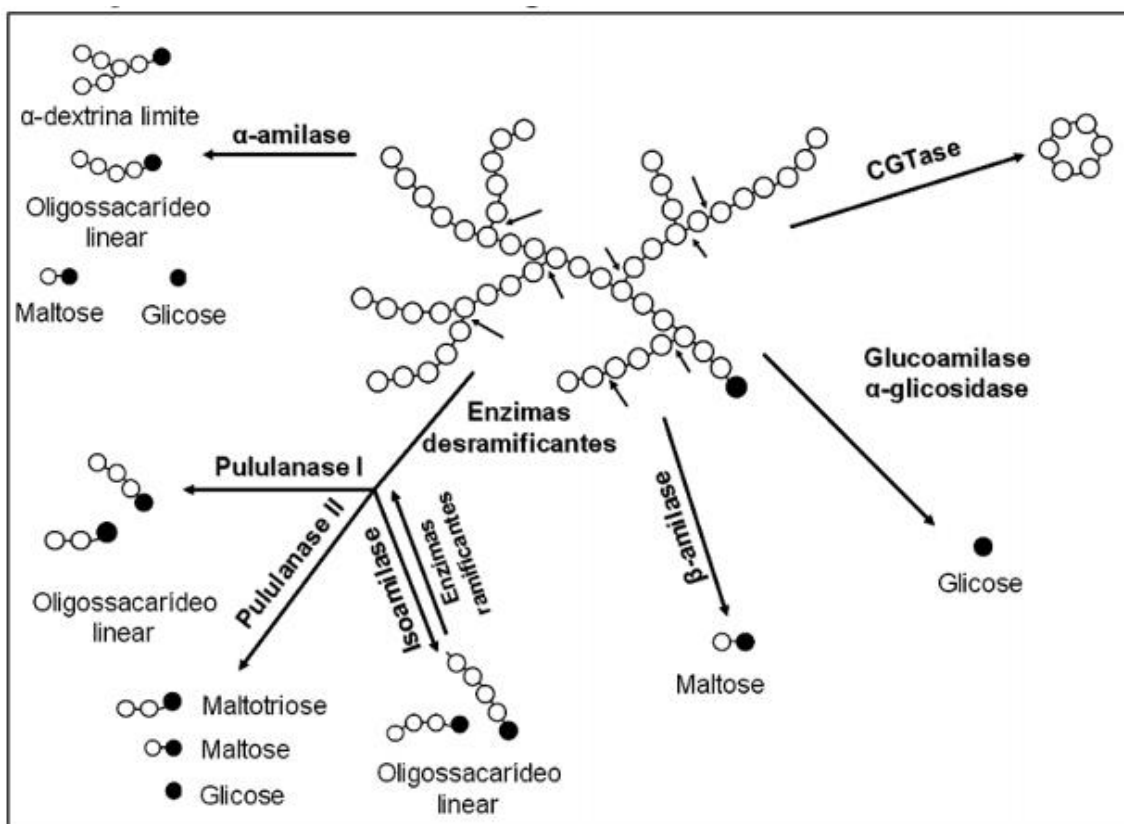
Amidos de diferentes fontes vegetais apresentam propriedades funcionais variadas que são frequentemente exploradas pela indústria alimentícia e que podem ser ampliadas por meio de modificações estruturais. Nesse sentido, o amido é frequentemente utilizado como espessante, gelificante, estabilizante, emulsificante, substituto de gordura, encapsulante e anti-tumecente, devido às transformações que ocorrem durante os processos de gelatinização, gelificação e retrogradação (Al; JANE, 2018).

Além disso, o amido apresenta em sua estrutura pontos de clivagem distintos, os quais são alvos da ação de diferentes enzimas, as amilases, responsáveis por liberar uma variedade de produtos a partir de sua hidrólise.

2.2. Amilases

As amilases são enzimas que realizam a clivagem das ligações glicosídicas da molécula do amido, sendo classificadas de acordo com o local em que atuam em: endoamilases, exoamilases e amilases desramificantes (Figura 2) (MOLLER; SVENSSON, 2016).

Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.



Fonte: BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002

As α-amilases (EC 3.2.1.1) são classificadas como endoamilases e atuam hidrolisando as ligações glicosídicas α-1,4 internas da amilose, amilopectina, ciclodextrina, glicogênio e maltotriose, liberando como produtos maltose, maltotriose, glicose e dextrinas limite (SURIYA *et al.*, 2016). Estão presentes na saliva humana, sob a forma de ptilina, onde apresentam pH ótimo

de atividade entre 6 e 7, além de também serem encontradas no pâncreas, onde hidrolisam as ligações α -1,4 de oligo e polissacarídeos liberando moléculas de glicose livre (KUMAR; CHAKRAVARTY, 2018), podendo ainda serem produzidas por microrganismos como bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Aspergillus* (PANDEY *et al.*, 2000). Industrialmente, as α -amilases são frequentemente aplicadas nos processos de produção de cervejas, na liquefação do amido e na produção de biocombustíveis (PEREIRA *et al.*, 2023).

As isoamilases (EC 3.2.1.68), pululanase I (EC 3.2.1.41) e pululanase II (EC 3.2.1.1/41) constituem o grupo das amilases desramificantes. As isoamilases hidrolisam as ligações α -1,6 da amilopectina e de dextrinas ramificadas produzindo maltotriose e maltooligossacarídeos. A pululanase I age hidrolisando as ligações α -1,6 da pululana, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e que não pode ser degradado por α - ou β -amilase, liberando maltose e oligossacarídeos lineares. As pululanases II, além de atuarem nas ligações glicosídicas α -1,6 da pululana, também atuam nas ligações α -1,4 do amido, liberando glicose, maltose, maltotriose e outros oligossacarídeos lineares (MOHANAN; SATYANARAYANA, 2019). Industrialmente, as amilases desramificantes costumam atuar em conjunto com as glucoamilases e β -amilases a fim de contribuir para que maiores níveis de hidrólise do amido sejam atingidos (PEREIRA *et al.*, 2023).

As ciclodextrina glicosiltransferases (EC 2.4.1.19), enzimas classificadas como transferases e que são caracterizadas por serem as únicas capazes de converter o amido em uma mistura de açúcares não redutores, as ciclodextrina, embora também sejam capazes de produzirem açúcares e dextrinas lineares (MOLLER; SVENSSON, 2016; SURIYA *et al.*, 2016). Industrialmente, essas

enzimas são utilizadas para produzirem ciclodextrinas, moléculas utilizadas como transportadoras de sabor em diversos produtos alimentícios, como café, gelatina e chá, redução de odores e sabores indesejáveis e prevenir o escurecimento enzimático dos alimentos, além de serem empregadas em fármacos para protegerem os princípios ativos da luz, oxigênio, calor e volatilidade (PEREIRA *et al.*, 2023).

O grupo das exoamilases é composto pelas β -amilases (EC 3.2.1.2) e pelas glucoamilases (EC 3.2.1.3). As β -amilases são enzimas que atuam na penúltima ligação glicosídica α -1,4, a partir de uma extremidade não redutora do amido, liberando maltose. Neste caso há ainda a inversão da configuração anomérica da maltose, que é liberada na configuração β . Esta enzima é incapaz de hidrolisar ligações α -1,6 de substratos ramificados. Produzidas por plantas como trigo, soja e batata doce e por bactérias como as do gênero *Bacillus*, as β -amilases são aplicadas no processo de produção de cerveja e nas etapas de processamento do amido em indústrias alimentícias (PEREIRA *et al.*, 2023).

Por fim, as glucoamilases (EC 3.2.1.3), também conhecidas como amiloglicosidases, são classificadas como exoamilases por catalisarem a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 a partir de uma extremidade não redutora da molécula do amido, liberando glicose, e, em menores velocidades, também atuam hidrolisando as ligações α -1,6, produzindo glicose (PANDEY *et al.*, 2000; SURIYA *et al.*, 2016). São produzidas principalmente por fungos filamentosos e por leveduras, com destaque para os gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*. Industrialmente, as glucoamilase são frequentemente aplicadas em processos enzimáticos para a produção de xaropes de glicose e frutose, na

produção de etanol e também possuem aplicação nas indústrias farmacêuticas e têxteis (KUMAR *et al.*, 2023).

2.2.1. Mecanismo de ação das glucoamilases

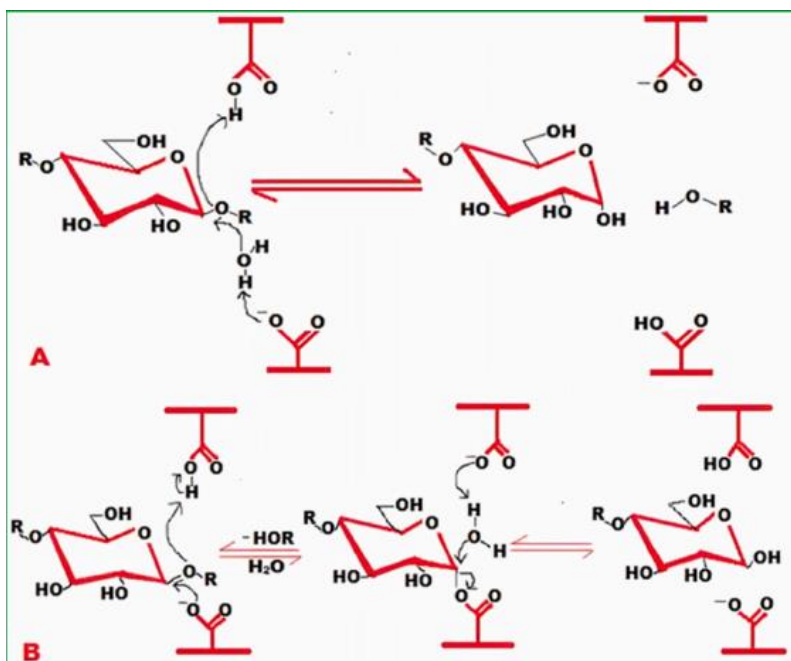
Dependendo do seu mecanismo de ação, as amilases, assim como outras classes de enzimas glicosídeo hidrolases (GH), podem ser classificadas de duas diferentes maneiras: retentoras ou inversoras. Após a reação de catálise, a configuração anomérica é restaurada via o mecanismo de retenção ou então pode ser alterada para a configuração invertida através do mecanismo inversor (JANECEK; SVENSSON, 2022; MONDAL *et al.*, 2022; TANIGUCHI, 1991).

Segundo Koshland (1953), quase todas as GH realizam a catálise de seus substratos de maneira retentora ou invertida (KOSHLAND JR, 1953; MONDAL *et al.*, 2022) (Figura 3). O mecanismo inversor é caracterizado por apresentar apenas uma etapa catalítica na qual uma molécula de água, que se encontra ligada ao substrato, promove um ataque nucleofílico ao carbono anomérico de oligo ou polissacarídeo, realizando a transferência de dois elétrons. A base catalítica por sua vez, remove um próton da molécula de água enquanto o ácido catalítico transfere um próton para o oxigênio glicosídico, o que resulta na quebra da ligação glicosídica e na inversão da configuração estereoquímica do carbono anomérico que sofreu o ataque nucleofílico. De maneira geral, os resíduos de ácido e base catalíticos apresentam grupos carboxilato, como o ácido aspártico ou o ácido glutâmico, que retornam a seus estados iniciais antes do início de outro ciclo de catálise (KOSHLAND JR, 1953; MONDAL *et al.*, 2022; PAYNE *et al.*, 2015).

Por outro lado, os mecanismos de retenção envolvem duas etapas subsequentes: glicosilação e retenção da estereoquímica. Durante a etapa de glicosilação ocorre um ataque nucleofílico no carbono anomérico do substrato juntamente com a transferência simultânea de um próton para o oxigênio glicosídico, levando à formação de um intermediário glicosil-enzima juntamente com a quebra da ligação glicosídica. A etapa seguinte é caracterizada pela participação de uma molécula de água que, no sítio ativo da enzima, atua como um nucleófilo atacando o carbono anomérico da estrutura intermediária, rompendo a ligação e transferindo o próton para a base catalítica. Essa reação resulta na inversão da configuração estereoquímica do carbono anomérico (KOSHLAND JR, 1953; MONDAL *et al.*, 2019, 2022; PAYNE *et al.*, 2015).

O mecanismo de catálise das glucoamilases é explicado pelo modelo de inversão da configuração anomérica descrito anteriormente (MONDAL *et al.*, 2022) e representado na Figura 3A.

Figura 3. Mecanismos de reação dos diferentes tipos de amilases. A) mecanismo inversor de configuração anomérica B) mecanismo retentor de configuração anomérica.



Fonte: Mondal et. al, 2022.

2.2.2. Estrutura das glucoamilases

A glucoamilase de *Aspergillus niger* possui uma estrutura modular composta por um domínio catalítico e um domínio de ligação à carboidratos (CBM), interligados por uma ligação altamente glicosilada (LEMOS *et al.*, 2003).

Seu domínio catalítico, caracterizado pela presença de dois resíduos de ácidos glutâmicos, Glu 203 e Glu 424, os quais atuam como ácido e base gerais, respectivamente, cria um microambiente para a clivagem das ligações glicosídicas presentes na molécula do amido e, a associação deste domínio ao CBM, confere à enzima elevada especificidade, permitindo a interação com o substrato seguida da conversão em glicose (LEE; PAETZEL, 2011).

O domínio de ligação das glucoamilases, conhecido como CBM, desempenha um papel crucial na interação dessas enzimas com substratos poliméricos, como o amido. O CBM, que geralmente é encontrado ligado ao domínio catalítico, facilita a adesão da enzima ao substrato, aumentando o tempo de contato e a concentração relativa do substrato em torno do sítio ativo. Isso é especialmente importante em processos industriais, onde a eficiência na degradação do amido pode impactar significativamente a viabilidade econômica da produção de bioenergia e outros produtos derivados (CORNETT *et al.*, 2003).

Estudos estruturais recentes revelaram que a orientação relativa entre o CBM e o domínio catalítico das glucoamilases pode ser flexível, permitindo que esses domínios adotem diferentes conformações independentemente da ligação de ligantes (ROTH *et al.*, 2018), sugerindo que o CBM pode atuar aumentando a probabilidade de interação com o substrato e, conseqüentemente, a eficiência da reação catalítica. Além disso, a presença de múltiplos sítios de ligação no CBM pode permitir uma interação mais eficaz com diferentes formas de amido, refletindo a diversidade funcional das glucoamilases em ambientes naturais e industriais (CORNETT *et al.*, 2003; KUMAR; CHAKRAVARTY, 2018; ROTH *et al.*, 2018).

2.3. Aplicação industrial das glucoamilases

A glucoamilase é uma das enzimas mais antigas e mais utilizadas na indústria de alimentos, cuja principal aplicação é a sacarificação do amido ou de dextrinas em glicose, um produto essencial para inúmeros processos de fermentação em uma grande variedade de indústrias de alimentos e bebidas (KUMAR *et al.*, 2023). São frequentemente empregadas no processo de

produção do xarope rico em frutose (HFS), um adoçante utilizado como substituto do açúcar que, por apresentar alta solubilidade, não sofrer cristalização e, sobretudo, possuir doçura igual ou superior à sacarose (a depender da concentração), tem sido preferido pelas indústrias de alimentos e bebidas (JENSEN *et al.*, 2018; PARKER *et al.*, 2010; VUILLEUMIER, 1993; WHITE *et al.*, 2014). O maior produtor e consumidor deste produto são os Estados Unidos, onde o HFS é produzido a partir do amido de milho e é conhecido como xarope de milho rico em frutose (HFCS)(PARKER *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2018; VUILLEUMIER, 1993; WALKER *et al.*, 2014).

Convencionalmente, a produção industrial de HFS abrange três grande processos: a) **liquefação**, processo no qual ocorre a hidrólise do amido em oligômeros por meio de tratamento ácido (ácido clorídrico) e/ou com tratamento enzimático empregando-se a enzima α -amilase; b) **sacarificação**, processo em que os oligômeros obtidos na etapa de liquefação são submetidos à hidrólise enzimática e, por meio da ação da enzima glucoamilase são hidrolisados em glicose (CRABB; MITCHINSON, 1997; PAZUR; ANDO, 1959; SINGH *et al.*, 2018); e c) **isomerização**, processo em que ocorre a isomerização da glicose obtida na etapa anterior em frutose, por ação da enzima glicose isomerase (CRABB; MITCHINSON, 1997; MARSHALL; KOOI, 1957; MONDAL *et al.*, 2022).

A conversão enzimática do amido em xarope de frutose ocorre sob diferentes condições: a sacarificação costuma ser realizada sob temperaturas entre 40 e 60 °C e pH entre 4,5 e 6, enquanto a isomerização ocorre entre 60 e 80 °C e pH entre 6 e 9 (HOBBS, 2009), requerendo, portanto, dois reatores diferentes.

Mais recentemente, o potencial das glucoamilases para sacarificar matérias primas amiláceas tem sido estudado com a finalidade de empregar a glicose resultante na produção de bioetanol (GUMEL *et al.*, 2018). O interesse neste biocombustível tem crescido consideravelmente nas últimas décadas como uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, justificada tanto pela possibilidade de depleção destas reservas quanto pela questão ambiental. Embora a prioridade na produção global futura de etanol esteja focada na tecnologia do processamento lignocelulósico, essa ainda se encontra em aprimoramento, não tendo sido demonstrada comercialmente em larga escala. Além das matérias-primas à base de açúcar (melaço, cana-de-açúcar, beterraba), aquelas à base de amido (milho, trigo, triticales, batata, arroz) ainda hoje predominam no nível industrial e, até o momento, são economicamente favoráveis em comparação com a lignocelulose, justificando as pesquisas envolvendo as amilases neste contexto (XU; WANG, 2017).

O uso industrial de enzimas, incluindo as amilases, tem crescido notavelmente nas últimas décadas, atendendo à progressiva demanda por diversos produtos em diferentes áreas, bem como ao apelo por tecnologias ambientalmente sustentáveis (GUISAN *et al.*, 2022). Como consequência, observa-se uma progressiva substituição do uso de catalisadores químicos pelas enzimas (catalisadores biológicos), visto que estas apresentam diversas vantagens tais como atuação sob condições moderadas de pH, temperatura e pressão, serem biodegradáveis e apresentarem elevada especificidade aos seus substratos e, conseqüentemente, não gerarem subprodutos ou produtos tóxicos ao ambiente (JEMLI *et al.*, 2016).

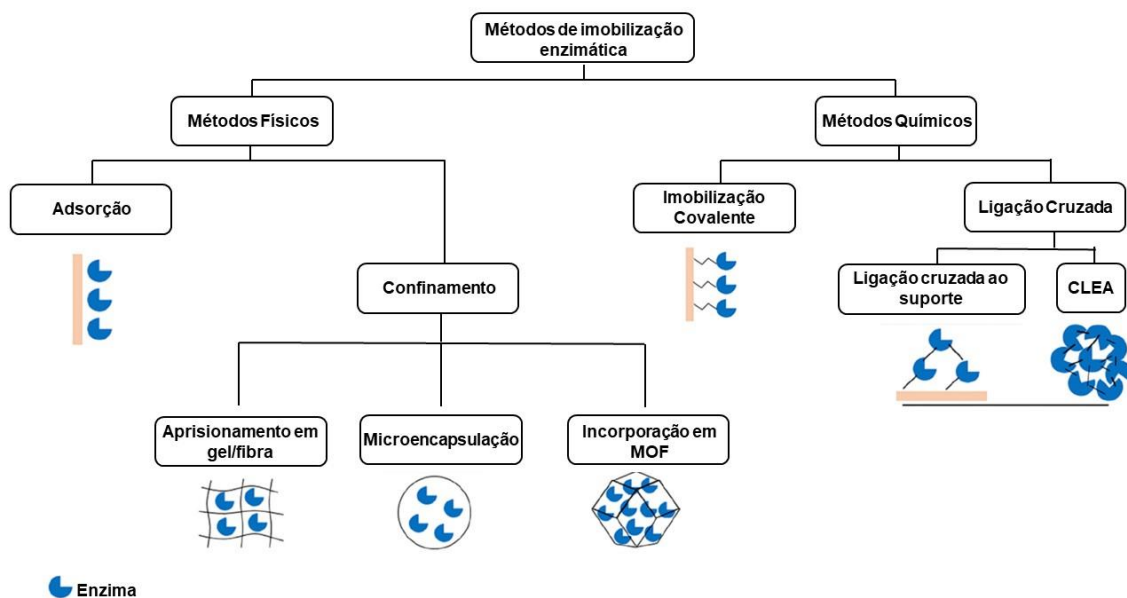
Apesar das diferentes vantagens apresentadas pela substituição do uso industrial de catalisadores químicos pelos de origem biológica, a aplicação industrial das enzimas ainda apresenta algumas limitações importantes (GUISAN *et al.*, 2022). As enzimas microbianas, que representam a maior parte das aplicadas industrialmente, são frequentemente produzidas em conjunto com outras proteínas, cuja presença pode ser indesejável para o processo em termos da diminuição da atividade volumétrica final. Nestes casos, protocolos de purificação podem ser necessários, elevando os custos finais do processo (BARBOSA *et al.*, 2015). Além disso, o fato de as enzimas serem solúveis nos meios reacionais acaba por dificultar a sua separação do produto e impossibilita o seu reuso em mais de uma reação enzimática, o que também onera o processo. (GUISAN *et al.*, 2022).

Nesse contexto, com o objetivo de solucionar os problemas relacionados à estabilidade das enzimas em processos industriais, a engenharia enzimática apresenta algumas diferentes e interessantes estratégias: a) uso de técnicas de biologia molecular através de evolução dirigida e mutagênese dirigida ao local apresentaram estabilizações interessantes (EMRUZI *et al.*, 2018; FRASER *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2019; MINGUES *et al.*, 2020); b) modificação química de enzimas solúveis como a PEGuilação de enzimas solúveis (FANG *et al.*, 2018; REICHERT; BORCHARD, 2016; ZHAO *et al.*, 2017); c) aplicação de técnicas de imobilização enzimática utilizando-se diferentes suportes e protocolos que podem contribuir para o aumento da estabilidade de enzimas (LIU *et al.*, 2021; WAHAB *et al.*, 2020) d) modificação química de enzimas imobilizadas, como a PEGuilação controlada (BILAL *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019; MONAJATI *et al.*, 2019; SEMENYUK *et al.*, 2019).

2.4. Métodos e suportes utilizados para imobilização enzimática

A depender do tipo de interação existente entre as enzimas e os suportes, os métodos de imobilização podem ser classificados em métodos físicos ou em métodos químicos. Por não estabelecerem interações covalentes entre as enzimas e os suportes, os métodos de imobilização realizados por adsorção e aprisionamento são classificados como métodos físicos, enquanto os métodos de imobilização por ligação covalente e ligação cruzada/reticulação são denominados métodos químicos (LIU *et al.*, 2018). Os diferentes métodos de imobilização enzimática existentes estão representados na Figura 4.

Figura 4. Métodos físicos e químicos empregados na imobilização de enzimas.



Fonte: Liu, Chen e Chi, 2018 (adaptado).

O método de adsorção é o mais simples, no qual as enzimas são adsorvidas na superfície dos suportes por meio de interações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas. É um método de fácil execução e de baixo custo, visto que nenhum agente de acoplamento ou etapas de modificação são necessários para a imobilização (BASSO; SERBAN, 2019).

Por outro lado, as interações estabelecidas entre as enzimas e os suportes são fracas ficando suscetíveis às mudanças de pH, temperatura e força iônica, resultando na baixa estabilidade de enzimas imobilizadas por estes métodos. Neste tipo de imobilização materiais como resinas de troca catiônica e aniônica, carvão ativado, sílica gel, vidro de poro controlado e cerâmica são comumente empregados como suportes (ADHIKARI; PRAMANIK, 2019; LIU *et al.*, 2018; SOUZA, 2016).

Os métodos envolvendo o encapsulamento ou o aprisionamento de enzimas envolvem a oclusão destas em rede poliméricas de baixo custo, uma interessante estratégia para evitar a agregação enzimática. Estas são retidas em redes as quais permitem a passagem apenas dos substratos e dos produtos, o que contribui para a diminuição da lixiviação enzimática, melhorando sua estabilidade e protegendo-a contra possíveis inibidores. A principal vantagem deste método é a preservação da conformação tridimensional da enzima, o que resulta em altas atividades catalíticas. Porém, uma desvantagem deste método são os problemas relacionados à difusão limitada do substrato. Materiais como quitosana, alginato de cálcio, colágeno, poli(acrilamida), ágar, álcool polivinílico e poliuretano são frequentemente utilizados para a obtenção de redes poliméricas

para a execução deste método (ADHIKARI; PRAMANIK, 2019; LIU *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2019).

A reticulação de enzimas – CLEA(Cross-linked enzyme aggregation) é uma técnica que envolve a formação de agregados enzimáticos induzida por agentes precipitante, seguida da formação de ligações cruzada entres as moléculas por meio do uso de agentes bifuncionais. Nessa abordagem, os sítios ativos encontram-se protegidos, preservando assim suas atividades catalíticas. Há ainda a possibilidade de reticulação enzimática às matrizes de suportes por meio de ligações covalentes, visando uma melhora em sua reutilização e estabilidade (LIU *et al.*, 2018).

Por fim, as enzimas podem ser ligadas covalentemente aos suportes através de reações químicas estabelecidas entre os resíduos de aminoácidos presentes em suas cadeias laterais tais como, lisina, cisteína, ácidos aspártico e glutâmico, e grupos funcionais presentes no suporte. Além disso, alguns grupos funcionais são favoráveis à formação das ligações covalentes, como é o caso dos grupos funcionais amino, carboxílico, imidazol, indolil e hidroxil fenólico. Métodos de imobilização covalente são caracterizados por apresentarem estabilidade e evitarem o desprendimento das enzimas do suporte. (ADHIKARI; PRAMANIK, 2019; LIU *et al.*, 2018; SOUZA, 2016).

A Tabela 1 apresenta os principais métodos de imobilização enzimática bem como suas vantagens e desvantagens (ZUCCA; SANJUST, 2014).

Para uma imobilização bem-sucedida é necessário considerar a compatibilidade entre o método de imobilização, o material do suporte escolhido e a enzima. A escolha desses fatores deve levar em conta a preservação da

atividade enzimática, a estabilidade do biocatalisador e as características da aplicação desejada (BASSO; SERBAN, 2019).

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização.

Método de Imobilização	Vantagens	Desvantagens
Encapsulação/Confinamento	<ul style="list-style-type: none"> • Sem modificação química da enzima • Retenção da atividade enzimática 	<ul style="list-style-type: none"> • Lixiviação da enzima • Problemas de transferência de massa
Ligação cruzada	<ul style="list-style-type: none"> • Sem necessidade de suporte • Estabilização da enzima • Minimização de lixiviação do catalisador 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de modificação massiva da enzima • Problemas de transferência de massa • Procedimento experimental complicado
Adsorção	<ul style="list-style-type: none"> • Sem modificação química da enzima • Fácil e barata de ser realizada 	<ul style="list-style-type: none"> • Lixiviação da enzima • Baixa especificidade de reação
Interação eletrostática	<ul style="list-style-type: none"> • Sem modificação química da enzima • Fácil de ser realizada 	<ul style="list-style-type: none"> • Lixiviação da enzima • Baixa especificidade de reação
Afinidade	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada especificidade de reação 	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de grupos específicos na enzima é crucial • Geralmente caro e complicado de ser realizado
Ligação covalente	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilização da enzima • Minimização da lixiviação da enzima • Ligação forte 	<ul style="list-style-type: none"> • Possível modificação estérica da enzima • Possível diminuição da atividade enzimática • Necessário realizar modificações químicas no suporte • Geralmente irreversível, impossibilitando o reuso do suporte

Fonte: Zucca e Sanjust (2014).

A escolha do material a ser utilizado como suporte para a imobilização de uma enzima deve ser feita avaliando-se alguns critérios: a) solubilidade – é importante que o suporte escolhido seja insolúvel ao meio reacional, a fim de se possibilitar a separação do biocatalisador imobilizado (derivado) do produto e meio reacional; b) presença de grupos funcionais – a existência de grupos funcionais no suporte precisa ser avaliada, bem como sua quantidade e possibilidade de ativação. Em alguns casos, se faz necessário realizar uma etapa de funcionalização do suporte a fim de inserir grupos funcionais que possibilitem a ligação da enzima; c) dimensões e porosidade do suporte – de maneira geral, quanto maior for a área superficial do suporte por unidade de massa, maiores são as probabilidades de a enzima e o substrato entrarem em contato. Assim como, quanto maior a porosidade do material utilizado, maiores as chances de a enzima acessar o material; d) custo e disponibilidade – é importante que a escolha do suporte leve em conta a sua disponibilidade e que, preferencialmente, apresente baixo custo; e) *Environmental friendly* – por fim, é importante levar em conta quais os possíveis impactos ambientais o suporte escolhido pode causar ao ser descartado. Nesse sentido, o uso de materiais biodegradáveis se destaca (HETTIARACHCHY *et al.*, 2018; ZDARTA *et al.*, 2018).

De maneira geral os suportes para imobilização enzimática podem ser classificados em orgânicos, inorgânicos e híbridos (ou compósitos). Entre os suportes orgânicos destacam-se os biopolímeros que, sendo polímeros naturais, não apresentam toxicidade, são biodegradáveis e biocompatíveis, representando, portanto, uma alternativa ao uso de polímeros sintéticos. Além disso, por serem muitas vezes materiais renováveis e de fácil obtenção, como

subprodutos industriais de baixo valor agregado, contribuem para a redução dos custos associados aos processos de imobilização (DATTA *et al.*, 2013; HETTIARACHCHY *et al.*, 2018; ZDARTA *et al.*, 2018).

Diferentes técnicas e suportes têm sido utilizados para a imobilização de glucoamilases, tais como: carbono ativado (ASLAN, Yakup *et al.*, 2020) κ -carragenana (HASSAN *et al.*, 2019), quitosana recoberta com nanopartículas magnéticas e nanofolhas de óxido de grafeno misturada com quitosana recoberta com nanopartículas magnéticas (WANG; JIANG, 2019), espuma mesocelular siliciosa (GEORGE; SUGUNAN, 2021), polianilina (ALMEIDA *et al.*, 2020), glioxil-agarose (TARDIOLI *et al.*, 2011), resina de poliestireno aniônica de base fraca (MUKHERJEE *et al.*, 2013), pó de sabugo de milho (DA COSTA LUCHIARI *et al.*, 2021), entre outros.

Com o avanço da tecnologia e o surgimento de dispositivos personalizados, a técnica de manufatura aditiva – também conhecida como impressão 3D – contribui para a revolução de diversos campos na Ciência, sobretudo pela capacidade de geração mínima de resíduos, que, associado à atual disponibilidade de impressoras de baixo custo, contribui para que o número de possibilidades de aplicação desta tecnologia atinja vários campos de pesquisa tais como energia, aplicações biomédicas, fabricações de equipamentos de laboratório, engenharia de alimentos e bioquímica, sistemas de detecção, entre outros (RINALDI *et al.*, 2021). Nesse sentido, há uma tendência crescente para a utilização da tecnologia de manufatura aditiva na produção de suportes enzimáticos inovadores, visto que trata-se de uma técnica flexível e que pode ser utilizada para se obter suportes personalizados (REMONATTO *et al.*, 2023).

2.4.1. Imobilização de enzimas utilizando-se suportes obtidos por manufatura aditiva

A utilização de manufatura aditiva ou impressão 3D para o *design* de novos suportes enzimáticos tem ganhado grande destaque nos últimos anos, graças a possibilidade de obtenção de peças personalizadas com geometrias e porosidades otimizadas para cada aplicação, ao baixo custo de produção e a possibilidade de confecção em massa de suportes.

Diferentes técnicas podem ser empregadas para a obtenção de suportes impressos por manufatura aditiva (REMONATTO *et al.*, 2023): a) a estereolitografia (SLA) é uma técnica pioneira na área de manufatura aditiva que surgiu no início da década de 80, cujo princípio de funcionamento está na impressão de objetos sólidos, com alta precisão e complexidade, a partir de resinas poliméricas líquidas; b) a técnica de jato aglutinante, criada no início da década de 90 no *Massachusetts Institute of Technology* - MIT e comercializada no ano de 2010, envolve a propagação de uma fina camada de pó na plataforma de impressão, sob a qual um agente aglutinante é depositado nos pontos pré definidos e utiliza uma variedade de materiais como areias, cerâmicas e metais; c) Sinterização Seletiva a *Laser* (SLS) – técnica que utiliza equipamentos robustos de alta resistência para confeccionar objetos tridimensionais empregando a energia térmica emitida pela combinação entre alta temperatura e uma fonte luminosa. Materiais termoplásticos, metais, poliamidas, cerâmicas, nylon e polímeros aglutinantes são frequentemente utilizados; d) Modelagem por Deposição de Material Fundido (FDM) – técnica de manufatura aditiva muito popularizada atualmente por apresentar baixo custo, menor desperdício e,

principalmente, pela facilidade de troca de matérias prima. Seu princípio de funcionamento reside no uso de termoplástico fundido para realizar a extrusão e assim compor cada umas das camadas do objeto. Os materiais PLA, ABS, PET e nylon são os mais utilizados nessa técnica de impressão; e) *Direct Ink Writing* (DIW) – representa um método versátil baseado na extrusão de materiais e que, se comparado às técnicas de estereolitografia e sinterização seletiva a *laser*, representa uma alternativa mais econômica para impressão de materiais cerâmicos, silicone, resina fotossensível, entre outros materiais (SAADI *et al.*, 2022). A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de enzimas imobilizadas em suportes obtidos por manufatura aditiva e suas aplicações.

Tabela 2. Exemplos de enzimas imobilizadas em suportes obtidos por manufatura aditiva.

Enzima	Suporte	Aplicação	Referência
Glicose e lactato oxidases	ABS	Desenvolvimento de sensor para monitoramento dos níveis de glicose e lactato em cérebros de rato em tempo real	(SU <i>et al.</i> , 2016)
Lacase	Matriz de hidrogel – combinação de alginato de sódio, acrilamida e hidroxiapatita	Degradação de composto fenólicos (p-clorofenol) presentes em efluentes industriais	(LIU <i>et al.</i> , 2020)
Peroxidase de raiz de rabanete	Combinação de grafeno com PLA	Desenvolvimento de eletrodo 3D para detecção de peróxido de hidrogênio	(LÓPEZ MARZO <i>et al.</i> , 2020)
Colesterol e colina oxidases	PLA	Desenvolvimento de um microchip enzimático para detecção simultânea de dois biomarcadores cardíacos	(KOUKOUVITI; KOKKINOS, 2021)
Lipase	Geopolímero	Aplicação em biorreatores	(DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Su e colaboradores utilizaram a técnica de manufatura aditiva para a produção de mini reatores, fabricados em ABS (acrilonitrila butadieno estireno), nos quais foram imobilizadas as enzimas glicose oxidase e lactato oxidase a fim de se desenvolver um novo tipo de sensor para monitoramento dos níveis de glicose e de lactato em cérebros de rato, em tempo real. O sistema proposto se mostrou eficiente na detecção destas moléculas, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças neurológicas (SU *et al.*, 2016). O uso de impressão 3D para criação de uma matriz de hidrogel com propriedades mecânicas otimizadas por meio da combinação de alginato de sódio, acrilamida e hidroxiapatita foi relatada Liu e colaboradores. Os suportes obtidos foram utilizados para imobilizar lacase e posterior aplicação na degradação de compostos fenólicos. O estudo contribuiu para o desenvolvimento de uma plataforma de baixo custo e flexível para a imobilização de várias enzimas industriais (LIU *et al.*, 2020). A fabricação de eletrodos de grafeno e PLA, impressos pela tecnologia de FDM, para a imobilização de peroxidase de raiz de rabanete demonstrou boa seletividade e estabilidade a longo prazo, além de oferecer novas possibilidades para a fabricação de biossensores eletroquímicos sob demanda (LÓPEZ MARZO *et al.*, 2020). As enzimas colesterol oxidase e colina oxidase também foram imobilizadas em estruturas de PLA a fim de se desenvolver um *microchip* enzimático para o biossensoriamento eletroquímico multiplexado a partir da produção de uma ferramenta promissora para aplicações diagnósticas e de monitoramento de saúde (KOUKOUVITI; KOKKINOS, 2021).

Além das aplicações voltadas para soluções em saúde e meio ambiente, a impressão 3D também pode ser utilizada para propor suportes que facilitem o reuso de enzimas industriais e sua aplicação em reatores enzimáticos (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

O biopolímero poliácido láctico (PLA) é outra opção interessante e promissora de suporte para imobilização de enzimas. É um material cujas aplicações variam desde a manufatura de embalagens até a fabricação de protótipos ou dispositivos médicos bioabsorvíveis. Devido à alta resistência e termoplasticidade, o PLA pode ser facilmente processado para a obtenção de peças a partir de impressão 3D, as quais podem ser utilizadas para a imobilização de enzimas, proporcionando um aumento da superfície de contato entre o suporte e os catalisadores (SONG *et al.*, 2017).

A modificação de microreatores enzimáticos impressos em 3D utilizando PLA para bioconversão contínua de compostos bioativos foi relatada por Gkantzou e colaboradores (2022). Quitosana foi utilizada para modificar a superfície do PLA e assim imobilizar lacase de *Trametes versicolor* e posterior aplicação em processos de biotransformação de compostos fenólicos (GKANTZOU *et al.*, 2022).

O PLA também foi utilizado para realizar a imobilização de β -galactosidase em suportes impressos 3D para a produção de leite sem lactose. Os derivados foram aplicados em reator alcançando-se 94,2% de hidrólise da lactose, atendendo aos padrões de segurança alimentar e evidenciando a vantagem da utilização de métodos enzimáticos para este fim (SHAO *et al.*, 2024).

Em relação aos geopolímeros, são materiais inorgânicos, aluminossilicatos nanoestruturados ativados por álcalis, de fácil manipulação sob a forma de pastas aquosas e que por apresentarem propriedades de autofixação, podem ser extrudados por meio da técnica de DIW. Os geopolímeros apresentam composição química muito semelhante à das zeólitas, com o diferencial de apresentarem poros intrínsecos maiores que as zeólitas, favorecendo seu uso como suporte para imobilização de enzimas (FRANCHIN *et al.*, 2017).

Zhang e colaboradores (2020) realizaram a imobilização por adsorção “cíclica” de lacase comercial de *Aspergillus oryzae* em membrana compósita de geopolímero visando a remoção de cristal violeta de águas. Os derivados aplicados em modo batelada apresentaram alta eficiência de remoção de cristal violeta (>99%). Além disso os autores destacam algumas vantagens de se utilizar geopolímero como suporte para imobilização de enzimas, tais como: baixo custo, facilidade de preparação, estrutura porosa e boa estabilidade química e porosa, além de ser um material biocompatível (ZHANG *et al.*, 2020).

Suportes de geopolímeros obtidos por meio da técnica de *DIW* foram utilizados para imobilização de lipase comercial de *Candida rugosa*. Para tanto, foi necessária a modificação da estrutura do suporte de modo a possibilitar a ligação covalente da enzima ao material que, após imobilizada, foi utilizada na hidrólise de óleo de cozinha usada como uma passo preliminar para a produção de biodiesel (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Zhao e colaboradores (2024) realizaram a imobilização de anidrase carbônica em uma membrana de geopolímero para captura de CO₂ com eficiência de remoção de CO₂ de 99,90%, evidenciando as vantagens de usar

membranas inorgânicas para esta finalidade devido a sua alta resistência mecânica e ao baixo custo de fabricação (ZHAO *et al.*, 2024)

Embora haja diversos trabalhos que relatem a imobilização de glucoamilases em variados suportes enzimáticos, a literatura atual carece de estudos envolvendo a imobilização dessas enzimas em suportes impressos por manufatura aditiva. Nesse sentido, o presente trabalho propôs a imobilização de glucoamilase comercial de origem fúngica em dois suportes impressos por manufatura aditiva: suportes de PLA, impressos por meio da técnica de Modelagem por Deposição de Material Fundido (FDM) e suportes de geopolímero os quais foram obtidos pela técnica de *Direct Ink Writing* (DIW).

3. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi realizar a imobilização de glucoamilase comercial, de origem fúngica, em suportes de poli ácido láctico (PLA) e de geopolímero, obtidos utilizando-se a tecnologia de manufatura aditiva visando a aplicação dos derivados na hidrólise do amido em reatores enzimáticos operados em regime de batelada.

Os objetivos específicos foram:

- Imobilizar glucoamilase comercial em suportes impressos de PLA, avaliando-se a influência de dois diferentes agentes funcionalizantes (HMDA – Hexametileno diamina; EDA – Etileno diamina), do tratamento com NaBH₄ após as etapas de funcionalização, do pH de imobilização e do carregamento enzimático;
- Imobilizar glucoamilase comercial em suportes impressos de geopolímero, avaliando-se a influência do pH de imobilização e carregamento enzimático utilizados;
- Caracterizar por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) os derivados obtidos;
- Caracterizar os derivados obtidos quanto a pH e temperatura ótimos de atividade e estabilidade;
- Avaliar a estabilidade operacional dos derivados obtidos;
- Aplicar os derivados obtidos a partir da imobilização em ambos os materiais estudados (PLA e geopolímero) na hidrólise do amido, em reator de tanque agitado (batelada).

4. Material e métodos

4.1. Materiais

O filamento de PLA utilizado para impressão 3D dos suportes foram obtidos a partir da empresa 3D Fila. A glucoamilase comercial de *Aspergillus niger* A7095 bem como as soluções de glutaraldeído 25%, etilenodiamina (EDA), reagente de Bradford, APTES (3-aminopropil trietoxisilano), hexametilenodiamina (HMDA), borohidreto de sódio (NaBH₄), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e amido de batata foram adquiridos da Sigma Aldrich. Os reagentes nitrato de amônio (NH₄NO₃) e hexano foram adquiridos da Êxodo. As soluções tampão foram preparadas no momento de execução dos ensaios.

4.2. Imobilização da glucoamilase comercial em suportes impressos de PLA

4.2.1. Design dos suportes 3D de PLA

Os suportes 3D de PLA foram produzidos através da técnica de Modelagem por Deposição de Material Fundido (FDM) utilizando-se impressora 3D (MakerBot Replicator +). Os suportes foram projetados utilizando o *software* AutoCad 2022 (Licença de Estudante, Autodesk, USA) e modelados utilizando o *software* MakerBot Print (versão 4.10.1.2056). Os parâmetros utilizados para impressão dos suportes foram: altura de camada 0,2 mm; temperatura da extrusora 205 °C; distância de retração da extrusora 0,6 mm; velocidade de impressão 150 mm/s. Os suportes foram projetados sob a forma de malha (1 mm) com as seguintes dimensões: diâmetro 15 mm; altura 6 mm; (Figura 5).

Figura 5. Suportes de PLA projetados em CAD para imobilização de glucoamilase comercial.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2. Funcionalização dos suportes de PLA

Foram testados dois agentes funcionalizantes: hexametilenodiamina (HMDA) e etilenodiamina (EDA). A funcionalização com HMDA se deu por meio do contato dos suportes com HMDA solubilizado em álcool isopropílico (1 g de suporte em 5 mL de solução de HMDA 60 mg/mL) por 120 minutos, a 55 °C. Após este período, os suportes foram lavados e mantidos em água destilada, sob agitação em agitador de rolo, por 24 horas e então secos com o auxílio de bomba a vácuo por 5 minutos.

A funcionalização com EDA foi realizada em solução 2 mol/L em álcool isopropílico, por 120 minutos, temperatura ambiente, sob agitação leve em agitador orbital (35 g de suporte em 200 mL de solução de EDA). Após este período, os suportes foram lavados com água destilada e secos com o auxílio de bomba a vácuo por 5 minutos.

A influência da adição de borohidreto de sódio (NaBH₄) (0,057 g/g de suporte), no processo de imobilização da glucoamilase foi avaliada, após a etapa de funcionalização, uma vez que é um agente utilizado para a estabilização de sistemas de imobilização. Os suportes ficaram em contato com a solução contendo borohidreto de sódio por 4 horas, sob agitação leve em agitador orbital, a temperatura ambiente, em sistema aberto, pois há a liberação de gases. A seguir os suportes foram lavados com tampão acetato de sódio (0,1 mol/L, pH 4,5) e água destilada em abundância.

4.2.3. Ativação dos suportes de PLA

Os suportes de PLA contendo os grupamentos amina foram ativados através imersão em solução de glutaraldeído 20%, solubilizado em tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,5 (1 g de suporte em 20 mL de solução), sob agitação em agitador orbital, durante 15 horas. Após este período, os suportes foram lavados com água destilada e secos com o auxílio de bomba a vácuo. Ao final da ativação dos suportes foi realizada a imobilização da glucoamilase.

4.2.4. Imobilização em suportes de PLA

Após a funcionalização e ativação dos suportes obtidos, realizou-se a imobilização da glucoamilase. O carregamento enzimático foi determinado com base em ensaios preliminares de imobilização fixando-o em 200 mg de proteína/g de suporte (250 mg de proteína/ cm³). Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio utilizando-se a proporção de 1 g de suporte ativado para 10 mL de fase líquida, composta por enzima e solução tampão (tampão fosfato para os ensaios em pH 7,0 e tampão carbonato-bicarbonato para os ensaios em pH

10,0, ambos a 0,5 mol/L). A mistura foi mantida por 24 horas sob agitação leve em agitador orbital, a 80 rpm, a temperatura de 25 °C. A seguir, os derivados foram lavados com água e tampão Mc Ilvaine pH 5,5, 0,1 mol/L, secos com auxílio de bomba à vácuo e tiveram suas atividades enzimáticas determinadas. A atividade enzimática e o teor de proteínas foram também determinados no sobrenadante e no líquido de lavagem (itens 4.5 e 4.6, respectivamente). O rendimento da imobilização (R%) foi calculado por meio da relação entre a quantidade total de U de enzima oferecida e a quantidade total de U de enzima presente no sobrenadante após imobilização, de acordo com a Equação 1:

$$R (\%) = \frac{U \text{ total fornecido} - U \text{ total sobrenadante}}{U \text{ total fornecido}} \times 100 \quad (1)$$

4.3. Imobilização da glucoamilase comercial em suportes impressos de geopolímero

4.3.1. Impressão dos suportes de geopolímero

Os suportes de geopolímero foram obtidos por meio de uma parceria internacional firmada entre os pesquisadores: Dr Paolo Colombo (Departamento de Engenharia Industrial da Universidade de Padova – Itália), Dr Murilo Daniel de Mello Innocentini (Universidade de Ribeirão Preto – Brasil), Dr^a Ariela Veloso de Paula (Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP de Araraquara – Brasil) e Dr^a Daniela Alonso Bocchini (Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química (UNESP) – Brasil).

A pasta polimérica foi preparada usando metacaulim (Argical 1200S, Imerys S.A., Paris, França), solução de silicato de sódio (SS2942, Ingessil S.r.L.,

Montorio, Itália), hidróxido de sódio (NaOH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e água destilada. Para obter uma tinta imprimível com propriedades reológicas adequadas, o geopolímero em pó foi utilizado como carga e o polietilenoglicol com um peso molecular médio de 1000 g/mol (PEG 1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado à pasta como agente reológico. O sistema de impressão consistiu numa impressora Delta (Delta Wasp 2040 Turbo, Wasproject, Massa Lombarda, Itália) equipada com uma câmara pressurizada com um parafuso infinito para extrudir a pasta; a tinta foi transferida para uma seringa de 30 mm³ e foi acoplada à impressora. A tinta foi extrudada por *Direct Ink writing* (DIW) através de um bocal com um diâmetro de 840 µm (Nordson Italia S.p.a., Segrate, Itália) no ar e à temperatura ambiente, com velocidade de impressão e fluxo de extrusão pré-determinados.

Os suportes de geopolímero foram impressos sob a forma de malha contendo 20 mm de diâmetro e 9,6 mm de altura. Após o processo de impressão, as amostras foram colocadas em estufa, dentro de uma caixa fechada, onde foram mantidas por 2 dias a 75 °C, até que as reações de polimerização fossem completas. Ao final, os suportes foram secos a 100 °C durante a noite. Antes de serem preparados para a imobilização de glucoamilase, os suportes de geopolímero foram cortados com o auxílio de serra diamantada a fim de se aproveitar melhor o material.

Figura 6. Suportes de geopolímero utilizados para imobilização de glucoamilase comercial.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2. Troca iônica

Os suportes de geopolímero impressos foram submetidos à troca iônica para remoção dos íons Na^+ e K^+ móveis do material, preparando a superfície do geopolímero para a funcionalização com APTES. Para tanto, uma solução de NH_4NO_3 0,1 mol/L foi preparada e a troca iônica foi realizada utilizando-se a proporção de 1 g de geopolímero em 100 mL de solução. As amostras foram imersas na solução e mantidas sob agitação mecânica; a cada 24 horas a solução foi trocada e a troca iônica ocorreu por um total de 4 dias.

4.3.3. Funcionalização e ativação dos suportes de geopolímero

Após a troca iônica, os suportes tiveram suas superfícies revestidas com grupos NH_2 por meio da adição de uma solução de 3% de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) em hexano na proporção de 1 g de geopolímero em 30 mL de solução, por 8 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os suportes foram secos em estufa a $75\text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas. Os suportes foram ativados pela adição de uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (pH 7,5, 0,01 mol/L), na proporção de 1 g de geopolímero em 25 mL de solução, durante 15 horas sob agitação em agitador orbital. Em seguida, foram lavados com água e solução tampão de pH 7,5 para remoção do glutaraldeído em excesso.

4.3.4. Imobilização em suportes de geopolímero

A imobilização de glucoamilase em suportes de geopolímero assim como o cálculo do carregamento enzimático utilizado foram realizados conforme descrito no item 4.2.4. Os cálculos referentes aos carregamentos enzimáticos foram realizados de acordo com quantidade de proteína a ser fornecida (mg) em função do volume de suporte (cm^3).

4.4. Avaliação da influência do carregamento enzimático na imobilização de glucoamilase

A fim de se determinar qual a carga enzimática mais adequada para a imobilização de glucoamilase em cada um dos suportes estudados, realizou-se o estudo do carregamento enzimático no qual foram avaliados os valores: 100, 200, 300 e 400 mg de proteína/ g de suporte, correspondentes a 125, 250, 375 e 500 mg de proteína/ cm^3 , respectivamente. Os ensaios foram realizados sob

condições determinadas previamente: 24 horas de imobilização, pH 10 e adição de NaBH₄ (para os suportes de PLA).

4.5. Determinação da atividade de glucoamilase

Para o desenvolvimento do protocolo a seguir, o amido foi previamente gelatinizado em forno micro-ondas até que a solução ficasse translúcida, garantindo assim a total homogeneização do substrato. A mistura de reação utilizada para se quantificar a atividade de glucoamilase solúvel constituiu-se por 1800 µL de solução de substrato (amido solúvel – Sigma, a 5 g/L em tampão Mc Ilvaine 0,1mol/L, pH 4,93) e 200 µL da enzima comercial, diluída em água destilada. A reação foi mantida a 50 °C, por 10 minutos, e então interrompida em banho de gelo. Os controles foram preparados substituindo a solução de substrato (controle da enzima) e a enzima comercial (controle do substrato) por iguais volumes de água. A quantificação da glicose liberada foi realizada como descrito por Miller (1959) a partir de uma curva analítica de glicose. Para tanto, à 500 µL do hidrolisado foram adicionados 500 µL de reagente DNS. As misturas foram levadas ao banho de ebulição a 100 °C, por 5 minutos, resfriadas em banho de gelo, adicionadas de 4,0 mL de água destilada e homogeneizadas. Os valores de absorbância foram lidos em espectrofotômetro a 540 nm. Como branco utilizado para zerar o aparelho, foi utilizado a mistura de 500 µL de água destilada e 500 µL de DNS, também submetida à fervura e posterior adição de água destilada como descrito acima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio acima citadas. No caso da determinação da atividade dos derivados, a mistura de reação constituiu-se de

1800µL de solução de substrato, 200 µL de tampão Mc Ilvaine 0,1 mol/L, pH 4,93 e suporte contendo a enzima imobilizada

4.6. Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

A determinação do teor de proteínas realizada através do método de Bradford (1976) foi realizada a partir de uma curva analítica construída empregando-se solução padronizada de soroalbumina bovina (0,3 mg/mL). A mistura de reação contendo 50µL de solução enzimática convenientemente diluída e 500µL de reagente de Bradford foi agitada e, após 5 minutos, realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 595 nm. Como branco, substituiu-se a solução enzimática por igual volume de água destilada.

4.7. Caracterização físico química da enzima solúvel e dos derivados obtidos

A glucoamilase comercial, assim como os derivados obtidos, foram caracterizados quanto ao efeito do pH e da temperatura sobre a atividade e (item 4.5) e estabilidade.

4.7.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática

Para a determinação dos valores ótimos de pH e temperatura para a atividade da glucoamilase solúvel e imobilizada empregou-se a técnica estatística de planejamento experimentos. Para tanto foram realizados três diferentes Delineamentos de Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo 2², com pontos axiais e quatro replicações no ponto central (Tabela 3) As variáveis independentes foram o pH (3,5 – 7, 5) e a temperatura (30 – 70 °C) e a variável

resposta foi a atividade enzimática relativa, expressa como porcentagem relativa . Os dados obtidos foram tratados utilizando-se o *software* Statistica 10.

Tabela 3. Valores reais e codificados das variáveis utilizadas nos delineamentos de composto central rotacional.

Variável	Níveis				
	-1.41	-1	0	1	1.41
pH	2.67	3.5	5.5	7.5	8.3
Temperatura (°C)	21.7	30	50	70	78.3

Fonte: Elaborado pelo autor

4.7.2. Estabilidade ao pH e temperatura

A estabilidade dos derivados e da enzima solúvel frente aos respectivos valores de pH ótimos de atividade foi avaliada dosando-se as atividades residuais após 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 12 e 24, 48, 96 e 144 horas de incubação em solução tampão Mc Ilvaine 0,05 mol/L pH 5 (enzima solúvel e derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de geopolímero) e pH 5,5 (enzima solúvel e derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de PLA). Foram calculados os valores dos coeficientes de desativação (k_d) e os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) segundo as equações 2 e 3.

$$\ln \frac{A}{A_0} = -K_d \cdot t \quad (2)$$

Onde: A = atividade enzimática final da enzima (U/mL) e do derivado (U/g); A_0 = atividade enzimática inicial; K_d = constante de desativação (h^{-1}); t = tempo (h).

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (3)$$

Onde: $t_{1/2}$ = tempo de meia vida do biocatalisador; K_d = constante de desativação (h^{-1}).

A estabilidade dos derivados e da enzima solúvel frente aos respectivos valores de temperatura ótimos de atividade foi avaliada dosando-se as atividades residuais após 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 e 240 minutos de incubação a 50 °C (enzima solúvel e derivado obtido a partir da imobilização em suportes de PLA) e 55 °C (enzima solúvel e derivado obtido a partir da imobilização em suportes de geopolímero), em solução tampão (Mc Ilvaine 0,05 mol/L). Os valores de tempo de meia vida e os coeficientes de desativação térmica foram calculados.

4.8. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os suportes de PLA e de geopolímero, bem como os derivados, foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram registrados na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} deresolução, 32 varreduras por ensaio, em modo ATR (Refletância Total Atenuada) em um Espectrofotômetro FTIR - Platinum/BRUKER; equipado com um cristal ATR em ZnSe de alta capacidade para análise de sólidos, pastas e líquidos.

4.9. Ensaio de estabilidade operacional dos derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de PLA e em suportes de geopolímero

A estabilidade operacional dos derivados obtidos foi avaliada determinando-se suas atividades enzimáticas ao longo de 10 ciclos reacionais seguidos. Ao final de cada ciclo, os derivados foram lavados com tampão Mc Ilvaine 0,1 mol/L (valor ótimos de pH para cada derivado), reutilizados e suas atividades residuais foram calculadas.

4.10. Hidrólise enzimática do amido em reatores enzimáticos de tanque agitado operando em batelada

Os ensaios de hidrólise foram realizados em reatores de tanque agitado operando em batelada (4 cm de diâmetro, 6,5 cm de altura, 81,64 mL de volume total) utilizando uma solução de amido de batata a 1% (m/v, base de peso seco) em tampão McIlvaine (0,1 mol/L, pH 5 e 5,5, para hidrólise utilizando derivados de geopolímero e de PLA, respectivamente) a 50 °C (PLA) ou 55 °C (geopolímero) e uma carga enzimática de 37,5 ou 133,33 U/g de substrato para a glucoamilase solúvel e para os derivados, respectivamente, num volume final de reação de 70 mL. Os ensaios foram realizados em duplicata e amostras foram tomadas durante em 0, 6, 12, 24 e 48 h. Após 48 h, os derivados foram removidos, lavados com tampão e depois utilizados numa nova reação de hidrólise com a mesma duração, sob as mesmas condições. Os derivados foram utilizados por um total de cinco ciclos de hidrólise.

4.11. Análise dos produtos de hidrólise do amido por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

O teor de glicose e maltose liberadas através da hidrólise enzimática do amido foi quantificado utilizando um sistema HPLC equipado com um coluna cromatográfica BIO-RAD Aminex HPX-42^a (300 x 7,8 mm) a 80 °C e um detector de índice de refração a 60 °C. Água ultrapura foi utilizada a uma vazão de 0,6 mL/min, como fase móvel e o volume de amostra injetado no sistema foi de 20 µL. Foram construídas curvas analíticas para a quantificação de glicose e maltose utilizando-se padrões analíticos secos com pentóxido de fósforo sob vácuo. A conversão do amido em glicose foi calculada por meio da Equação 4.

$$\delta = \left(\frac{\text{Glicose} \times f}{n} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde: δ = conversão de amido em glicose (%); Glicose = número de moles de glicose; f = fator de hidrólise do amido ($f = 0,9$ mol/mol) e n = número inicial de mols de amido.

5. Resultados e discussão

5.1. Imobilização de glucoamilase em suportes de PLA e em suportes de geopolímero

A fim de se avaliar a influência do agente funcionalizante, do tratamento com NaBH₄ após a etapa de funcionalização e do pH na imobilização de glucoamilase em suportes impressos de PLA, ensaios de imobilização utilizando carga enzimática de 200 mg de proteína/g de suporte (250 mg de proteína/ cm³ de suporte) foram realizados. Os valores de atividade enzimática e seus respectivos valores de rendimento de imobilização estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Influência do agente funcionalizante e do pH de imobilização, na presença (ST) e na ausência (SNT) de NaBH₄ na imobilização de glucoamilase em suportes de PLA.

Agente Funcionalizante	pH de imobilização	Atividade enzimática (U/g)		Rendimento de imobilização (%)	
		SNT	ST	SNT	ST
EDA	7	9,73 ± 0,23 ^a	12,91 ± 0,48 ^a	10,56 ± 2,09 ^a	25,86 ± 10,94 ^a
	10	9,22 ± 0,05 ^a	13,68 ± 0,83 ^a	31,30 ± 4,21 ^b	32,80 ± 0,51 ^a
HMDA	7	9,38 ± 0,00 ^a	11,92 ± 0,04 ^b	24,84 ± 0,00 ^c	16,72 ± 2,32 ^b
	10	9,19 ± 0,47 ^a	12,00 ± 0,20 ^b	40,86 ± 8,00 ^d	36,13 ± 3,23 ^a

* Os valores das médias em uma coluna seguidas da mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os derivados que, após a etapa de funcionalização, passaram por tratamento com NaBH_4 , foram os que apresentaram os maiores valores de atividade enzimática, independente dos valores de pH utilizados durante a imobilização e do agente funcionalizante utilizado. O uso de EDA como agente funcionalizante, seguido da adição de NaBH_4 e posterior imobilização em pH 10 levou à obtenção de derivados com a maior atividade enzimática observada ($13,68 \pm 0.83 \text{ U/g}$) e os maiores rendimentos de imobilização foram obtidos em pH 10, independente do agente funcionalizante utilizado e do tratamento com NaBH_4 .

A fim de se fixar uma condição de imobilização que proporcionasse a maior atividade enzimática, bem como um bom rendimento de imobilização, os dados obtidos foram tratados estatisticamente por meio da realização de uma ANOVA, com nível de significância de 95% (Tabela 5), seguido de pós teste Tukey.

Tabela 5. Análise de Variância (ANOVA) para os valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização dos derivados em função do agente funcionalizante, adição de NaBH₄ e pH de imobilização.

Variáveis	Atividade Enzimática		Rendimento de Imobilização	
	F	valor p	F	Valor p
Ag. Funcionalizante (A)	11,664	1,12 x 10⁻³*	2,278	1,75 x 10 ⁻¹
Borohidreto (B)	211,727	1,72821 x 10⁻⁶*	0,109	7,51 x 10 ⁻¹
pH (C)	0,024	8,80 x 10 ⁻¹	27,918	1,14 x 10⁻³*
A X B	6,573	3,74 x 10 ⁻² *	6,161	4,21 x 10⁻²*
A X C	0,177	6,86 x 10 ⁻¹	0,420	5,38 x 10 ⁻¹
B X C	3,043	1,25 x 10 ⁻¹	0,761	4,12 x 10 ⁻¹
A X B X C	1,291	2,93 x 10 ⁻¹	2,067	1,94 x 10 ⁻¹

*Valores em negrito são estatisticamente significantes ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor

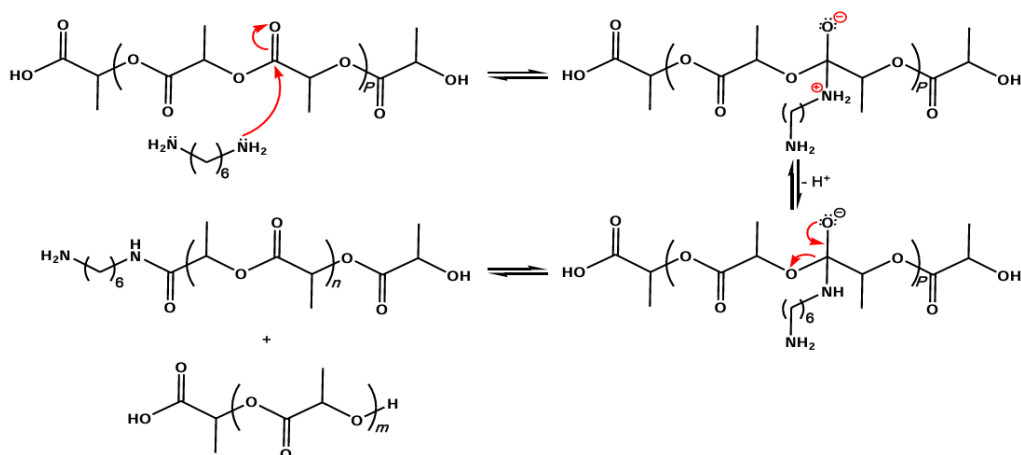
Com base na Tabela 5 é possível observar que o tipo de agente funcionalizante e a adição NaBH₄ são estatisticamente significativos para os valores de atividade enzimática ($p = 1,12 \times 10^{-3}$ e $p = 1,72821 \times 10^{-6}$, respectivamente). Por outro lado, para o rendimento de imobilização foram significativos ($p < 0,05$) apenas o pH de imobilização ($p = 1,14 \times 10^{-3}$) e a interação entre o agente funcionalizante e a adição de NaBH₄ ($p = 4,21 \times 10^{-2}$).

Além disso, o pós teste Tukey indicou que os valores de atividade enzimática dos derivados tratados com NaBH₄ e os valores daqueles que não passaram pelo mesmo tratamento apresentam diferença estatística ao nível de 95% ($p < 0,05$).

A imobilização covalente de enzimas representa uma das técnicas mais interessantes para aplicações industriais, uma vez que estando covalentemente ligadas ao suporte geralmente apresentam uma maior capacidade de reuso devido ao baixo nível de dessorção destas moléculas do suporte. Além disso, há a possibilidade de serem formadas ligações multipontuais entre a enzima e o suporte, o que contribui para uma maior estabilidade dessa ligação (ASLAN, Yakup *et al.*, 2020; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; JESIONOWSKI *et al.*, 2014; SHELDON, 2007).

A Figura 7 apresenta o mecanismo de reação envolvido no processo de incorporação dos grupos amina aos suportes de PLA. A aminólise, como é conhecida, ocorre quando uma amina reage com um éster dando origem a uma amida e um álcool. O mecanismo desta reação envolve algumas etapas: inicialmente, o grupo carbonila do PLA sofre um ataque nucleofílico do agente funcionalizante formando um composto intermediário. Em seguida, o agente funcionalizante se liga ao composto intermediário formando um composto de amida e um álcool como subproduto. A Figura 7 exemplifica o mecanismo de reação para o uso do HMDA, porém a reação utilizando EDA como agente funcionalizante segue o mesmo mecanismo.

Figura 7. Mecanismo de reação de aminólise envolvido na incorporação dos grupamentos amina nos suportes de PLA

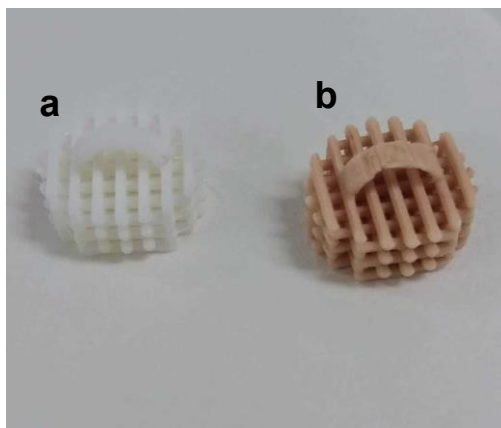


Fonte: ZHU, Y. *et al.*, 2004 (adaptado), *Software ChemDraw*

A etapa seguinte à funcionalização corresponde à etapa de ativação do suporte pelo reagente bifuncional, glutaraldeído. O glutaraldeído atua como um braço espaçador entre a enzima e o suporte funcionalizado, facilitando a ocorrência dessa ligação. A adição de glutaraldeído ao sistema de funcionalização resulta na reação dos grupamentos amino incorporados aos suportes de PLA com um dos grupamentos aldeídos presentes no reagente bifuncional, originando a formação da base de Schiff (R-N=CH-R') (MIGNEALUT *et al.*, 2004) que neste caso poder ser confirmada visualmente pela alteração de cor do suporte de PLA que, inicialmente branco, após o contato com o glutaraldeído assume uma coloração marrom-alaranjada (Figura 8). A mesma alteração de cor após o contato com glutaraldeído, evidenciando a formação da base de Schiff foi observada em suportes de carragenana (HASSAN *et al.*, 2019). Uma vez ativados, há a formação de uma nova base de Schiff, desta vez entre o glutaraldeído e os grupamentos amino presentes na estrutura da enzima.

Figura 8. Alteração da cor do suporte após etapa de ativação com glutaraldeído.

a) sem exposição ao reagente b) após exposição.



Fonte: Elaborada pelo autor.

No entanto, essas ligações são reconhecidamente instáveis (ARULMURUGAN *et al.*, 2010). Guisane colaboradores apresentam algumas maneiras pelas quais tais ligações podem ser estabilizadas, entre as quais está a realização da imobilização covalente multipontual em pH alcalino. Como exposto anteriormente, sob pH 10 os grupamentos amino dos resíduos de lisina presentes na superfície das enzimas encontram-se desprotonados e, conseqüentemente, altamente reativos. Nesse sentido, a imobilização covalente multipontual levará a formação de pelo menos duas bases de Schiff entre dois grupos amina da enzima e dois grupos aldeído do suporte altamente ativado. Embora sejam ligações instáveis, quando em maior quantidade estas são capazes de formar um sistema estável e possibilitar uma ligação irreversível entre a enzima e o suporte. Desta forma, a presença de grupos reativos e estáveis na superfície do suporte favorece não só a imobilização covalente multipontual de uma enzima, mas também possibilita a utilização de valores

elevados de carregamento enzimático (maiores que 100 mg de proteína / g de suporte), porém, com tempo de imobilização entre 10 e 24 horas (GUISAN *et al.*, 2020), justificando assim o tempo de imobilização utilizado no presente trabalho.

O pH de imobilização é um fator importante a ser levado em conta durante o desenvolvimento de um protocolo de imobilização enzimática, uma vez que este influenciando o grau de ionização dos resíduos de aminoácidos presentes na superfície da enzima, impactando diretamente na reatividade com o suporte empregado. Imobilizações do tipo covalente podem ocorrer de duas maneiras, a depender do valor de pH utilizado. Em pH neutro a formação de ligação covalente unipontual entre a enzima e o suporte utilizado é favorecida, envolvendo-se apenas o grupo amino terminal da enzima e o suporte ativado. Por outro lado, ao utilizar-se valores de pH próximos de 10 há a prevalência da formação de múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte ativado, proporcionando uma maior rigidez às moléculas de enzima ligadas ao suporte. Isso se dá graças ao grande número de resíduos do aminoácido lisina presentes na superfície da maioria das enzimas, os quais em valores alcalinos de pH encontram-se desprotonados facilitando a reação com os grupos presentes no suporte (GUISAN *et al.*, 2022)

Desta forma, optou-se por fixar como condição de imobilização das glucoamilases comerciais em suportes de PLA a funcionalização com EDA, seguida do tratamento com NaBH₄, ativação com glutaraldeído e posterior imobilização em pH 10 (tampão carbonato-bicarbonato, 0,5 mol/L) visando uma imobilização covalente multipontual da enzima e derivados com a maior atividade enzimática e rendimento de imobilização possível.

A imobilização covalente de glucoamilase em suportes impressos de geopolímero também foi estudada, em pH 7,0 e 10,0. Para fins de comparação com a imobilização de glucoamilase em suportes de PLA, inicialmente, o carregamento enzimático avaliado foi de 200 mg de proteína/g de suporte. A Tabela 6 apresenta os dados de atividade enzimática dos derivados bem como os dados de rendimento de imobilização.

Tabela 6. Avaliação da influência do pH na imobilização de glucoamilase em suportes de geopolímero.

pH de imobilização	Atividade Enzimática (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
7	13,79 ± 1,55 ^a	62,89 ± 3,56 ^a
10	13,22 ± 2,44 ^a	66,31 ± 3,28 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor.

*Valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização seguidos de mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme apresentado na Tabela 6, não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos valores de atividade enzimática e de rendimento de imobilização com relação ao valor de pH utilizado durante a imobilização. Desta forma, optou-se por realizar a imobilização de glucoamilase em suportes de geopolímero sob pH 10, visando sua imobilização covalente multipontual.

A imobilização de glucoamilase em suportes de geopolímero mostrou-se mais eficiente do que em suportes de PLA, com um aumento de mais de 100% em seu rendimento. Essa superioridade pode ser explicada pela elevada porosidade dos geopolímeros, correspondente a 56,4% de seu volume, oferecendo uma maior área superficial para a interação com a enzima(DOS SANTOS *et al.*, 2021).

A composição química de um geopolímero é similar à das zeólitas, minerais de aluminossilicato microporosos, de origem natural ou sintética (FRANCHIN *et al.*, 2017). As zeólitas são frequentemente utilizadas na imobilização de enzimas para aplicação em industriais de bebidas e de biocombustíveis, de papel, têxtil e de detergentes (AGGARWAL *et al.*, 2021; SOY *et al.*, 2014; VILLA *et al.*, 2022). No entanto, apesar de serem utilizadas como suportes para imobilização de enzimas, o tamanho dos poros presentes em sua estrutura (< 1nm) não favorece a acomodação de moléculas grandes como é o caso das enzimas. Em contraste, os geopolímeros, embora semelhantes às zeólitas em termos de composição, geralmente possuem poros intrínsecos na faixa mesoporosa (1-50 nm), o que facilita a imobilização de enzimas (DOS SANTOS *et al.*, 2021). Isso pode explicar o maior rendimento de imobilização observado no presente trabalho em comparação com os suportes de PLA.

5.2. Influência do carregamento enzimático na imobilização de glucoamilase

De maneira geral, quanto maior for o carregamento enzimático empregado durante a imobilização, maiores são as chances de obter-se derivados enzimáticos com atividade elevada. No entanto, existe um limite para o aumento da atividade enzimática por meio do incremento do carregamento, dada a possibilidade de atingir-se a saturação dos sítio de ligação do suporte (GUISAN *et al.*, 2020).

Portanto, uma vez definidas as condições de imobilização em termos de agente funcionalizante, pH de imobilização e adição de NaBH₄, avaliou-se a influência do carregamento enzimático (Tabela 7).

Tabela 7. Influência do carregamento enzimático de suportes de PLA sob a atividade enzimática e o rendimento de imobilização da glucoamilase.

Carregamento enzimático	Atividade Enzimática (U/g)	Rendimento de Imobilização (%)
100 mg/g (125 mg/cm ³)	8,35 ± 0,64 ^a	21,95 ± 6,86 ^a
200 mg/g (250 mg/cm ³)	11,65 ± 0,49 ^b	31,70 ± 5,37 ^a
300 mg/g (375 mg/cm ³)	13,85 ± 0,78 ^b	32,05 ± 0,49 ^a
400 mg/g (500 mg/cm ³)	13,95 ± 0,07 ^b	39,30 ± 8,77 ^a

*Valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização seguidos de mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A atividade enzimática dos derivados imobilizados variou de 8,35 a 13,95 U/g enquanto o rendimento de imobilização variou entre 21,95% e 39,30%. Verificou-se que, em relação à atividade enzimática dos derivados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os carregamentos de 200, 300 e 400 mg/g. No entanto, houve diferença significativa apenas entre a atividade enzimática dos derivados com carregamento de 100 mg/g em relação aos demais. Os valores de rendimento de imobilização, dentro do intervalo de carregamento analisado, não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, o carregamento enzimático para imobilização de glucoamilase em suportes de PLA foi fixado em 200 mg/g.

A Tabela 8 apresenta os dados obtidos experimentalmente referentes à atividade enzimática e rendimento de imobilização em suportes de geopolímero. A atividade enzimática dos derivados de geopolímero variou de 7,00 a 19,20 U/g enquanto o rendimento de imobilização variou de 46,96% a 66,31%.

Tabela 8. Influência do carregamento enzimático de suportes de geopolímero sob a atividade enzimática e o rendimento de imobilização da glucoamilase.

Carregamento	Atividade Enzimática (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
100 mg/g (125 mg/cm ³)	7,00 ± 1,18 ^a	46,96 ± 5,27 ^a
200 mg/g (250 mg/cm ³)	13,22 ± 2,44 ^{ab}	66,31 ± 3,28 ^{ab}
300 mg/g (375 mg/cm ³)	11,30 ± 1,89 ^a	56,82 ± 2,20 ^{ab}
400 mg/g (500 mg/cm ³)	19,20 ± 2,95 ^b	37,70 ± 5,39 ^{ac}

Fonte: Elaborado pelo autor

*Valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização seguidos de mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

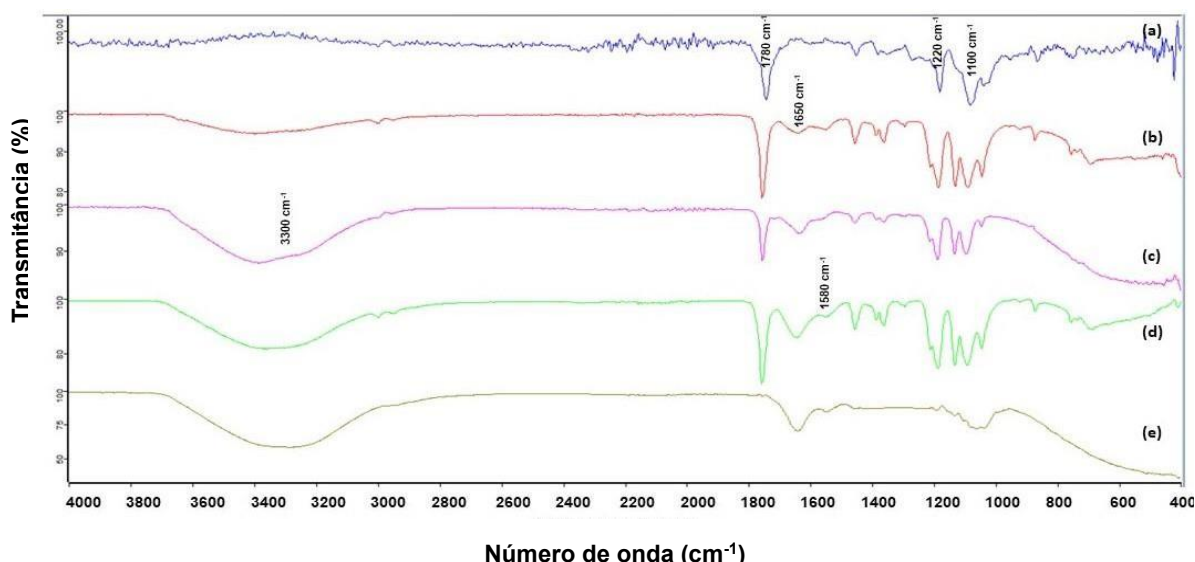
Em relação aos valores de rendimento de imobilização, observa-se que, à medida que o carregamento enzimático aumenta, a porcentagem de rendimento de imobilização também cresce. No entanto, o incremento do carregamento de 200 mg/g para 300 mg/g resultou em uma queda no rendimento observado. Isso sugere que valores de carregamento superiores a 300 mg/g não necessariamente aumentam o rendimento de imobilização, possivelmente porque todos os locais de ligação da enzima no suporte de geopolímero já tenham sido ocupados, tornando ineficaz o aumento adicional do carregamento enzimático.

Com base no exposto, definiu-se o carregamento enzimático para imobilização de glucoamilase em suportes de geopolímero em 200 mg/g, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre os rendimentos de imobilização ao usar 200 e 300 mg/g, ambos resultando nos maiores valores de rendimento de imobilização observados. Além disso, embora o carregamento de 400 mg/g tenha resultado na maior atividade enzimática observada, seria necessário o dobro de enzima para alcançá-la, o que não se justifica, visto que a diferença de atividades observadas não é grande o suficiente para justificar o uso de uma quantidade maior de enzima.

5.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier dos suportes de PLA e de geopolímero

Após as etapas de funcionalização, ativação e imobilização, os suportes de PLA foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A Figura 9 apresenta os espectros obtidos a partir das amostras.

Figura 9. Espectrometria em infravermelho do suporte de PLA (a), do suporte após a funcionalização, (b) do suporte funcionalizado e ativado, (c), do derivado de PLA (d) e da enzima solúvel (e).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro correspondente ao suporte de PLA não modificado (Figura 9A) apresenta bandas em três comprimentos de onda de absorção característicos do material e que também podem ser observados após as etapas de funcionalização e imobilização. A molécula de PLA consiste em um polímero de ácido lático caracterizada pela presença de grupamentos álcool e ácido carboxílico. As bandas formadas em 1100 cm⁻¹ e 1220 cm⁻¹ correspondem a estes grupos, respectivamente, enquanto a banda em 1780 cm⁻¹ corresponde ao éster formado a partir da ligação de moléculas de ácido lático entre si.

A Figura 9B apresenta o espectro correspondente ao PLA funcionalizado. A banda observada em 1650 cm⁻¹ corresponde à amida formada durante a reação de aminólise do PLA. Os espectros apresentados nas Figuras

9C e 9D, correspondentes aos suportes de PLA ativado e imobilizado, respectivamente, que apresentam o aparecimento de uma banda em 3300 cm^{-1} (estiramento N-H) e uma banda fraca em torno de 1650 cm^{-1} (estiramento C=N de ligações imina).

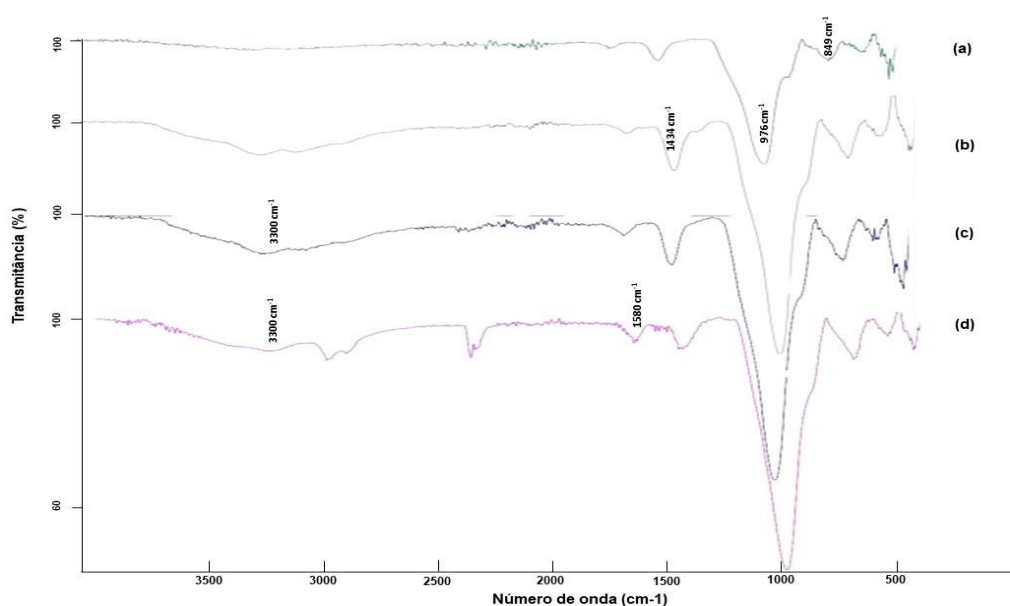
O espectro da glucoamilase imobilizada (Figura 9D) mostrou uma intensificação da banda em 3300 cm^{-1} , atribuível ao aumento da presença de ligações N-H da cadeia peptídica da enzima. Além disso, as regiões amida I e II ($1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$) apresentaram intensidades aumentadas, características da estrutura proteica da enzima imobilizada.

Além disso, o pico observado em 1580 cm^{-1} indica a presença de grupamentos amina no suporte imobilizado, os quais podem ser referentes ao grupamento N-terminal da enzima imobilizada.

Em seu trabalho de imobilização de lipases em suportes de PLA, Li e colaboradores reportam espectros de FTIR similares aos descritos no presente trabalho (Li *et al.*, 2020), contribuindo para a confirmação de que as mudanças observadas nos suportes de PLA, evidenciadas através da análise dos espectros descritos anteriormente, são decorrentes das etapas de imobilização de glucoamilase em suportes de PLA.

A Figura 10 apresenta os espectros de FTIR referentes aos suportes de geopolímero (10A), suporte funcionalizado (10B), suporte ativado (10C) e o derivado obtido após a imobilização da glucoamilase (10D).

Figura 10. Espectrometria em infravermelho do suporte de geopolímero (a), do suporte após a funcionalização, (b) do suporte funcionalizado e ativado, (c), do derivado de geopolímero (d).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os suportes de geopolímero apresentam picos de vibração característicos dos grupos Si-O em 976 cm^{-1} e 849 cm^{-1} (DOS SANTOS *et al.*, 2021). Após a reação com APTES, observa-se a presença de uma banda em 1434 cm^{-1} que pode ser atribuída ao modo de deformação simétrica a CH₃ e CN. Além disso, os grupos siloxanos Si-O (976 cm^{-1} e 849 cm^{-1}) tiveram seus picos alongados devido a presença de APTES na superfície do geopolímero. Os espectros apresentados nas Figuras 10C e 10D, correspondentes aos suportes de geopolímero ativado e imobilizado, respectivamente, e apresentam uma banda

em 3300 cm^{-1} correspondentes à presença de ligações imina, similares às observadas nos espectros obtidos para os suportes de PLA, evidenciando a formação das bases de Schiff .

5.4. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA

A influência do pH e da temperatura sobre as atividades da glucoamilase em sua forma solúvel e imobilizada em suportes de PLA foi avaliada através do uso de planejamentos experimentais do tipo Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 com pontos axiais. Os resultados obtidos experimentalmente bem como os valores preditos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Matriz do planejamento experimental (DCCR) e resultados experimentais e previstos para a atividade de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA em função do pH e da temperatura.

Ensaio	pH (X_1)	Temperatura (°C) (X_2)	Glucoamilase solúvel Ativ. Relativa (%)		Glucoamilase Imobilizada Ativ. Relativa (%)	
			Experimental	Predito (Y_1)	Experimental	Predito (Y_2)
1	(-1) 3.5	(-1) 30	36.7	56.2	46.1	31.9
2	(+1) 7.5	(-1) 30	15.6	13.9	23.2	17.3
3	(-1) 3.5	(+1) 70	18.7	37.5	7.3	6.0
4	(+1) 7.5	(+1) 70	3.9	-2.4	12.2	19.1
5	(0) 5.5	(0) 50	97	98.1	96.5	97.1
6	(0) 5.5	(0) 50	99.5	98.1	95.6	97.1
7	(0) 5.5	(0) 50	96.2	98.1	96.4	97.1
8	(0) 5.5	(0) 50	100*	98.1	100**	97.1
9	(-1.41) 2.67	(0) 50	90.8	67.6	7.4	17.4
10	(+1.41) 8.3	(0) 50	4	9.6	19.8	16.3
11	(0) 5.5	(-1.41) 21.7	35.5	27.1	16.6	29.7
12	(0) 5.5	(+1.41) 78.3	10	2.5	17.7	12.8

Fonte: Elaborado pelo autor

Atividade de glucoamilase expressa em Atividade relativa em relação ao maior valor obtido.

* 12.000 U/mL, ** 10 U/g.

A análise estatística dos resultados obtidos revela que o pH exerceu efeito negativo ($p < 0,05$), em seus termos linear e quadrático, sobre a atividade de glucoamilase solúvel (Tabela 10) enquanto a temperatura exerceu efeito

também negativo na atividade de glucoamilase solúvel, porém apenas seu termo quadrático se mostrou estatisticamente significativo. Nesse sentido, é possível observar que valores mais baixos de pH resultam em melhores respostas dentro do intervalo estudado (DOMINGUES *et al.*, 2022), conforme observados nos ensaios 1 (pH 3.5, 30 °C), 9 (pH 2,67, 50 °C) e nos pontos centrais (pH 5,5, 50 °C).

Tabela 10. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase solúvel

Nome	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p - valor
Média	98.1307	7.89467	12.42999	0.000017
pH (x ₁) (L)	-41.1644	11.19209	-3.67799	0.010355
pH (x ₁) (Q)	-59.8994	12.5722	-4.76443	0.003112
T °C (x ₂) (L)	-17.4109	11.16185	-1.55986	0.169810
T °C (x ₂) (Q)	-83.8059	12.46645	-6.72252	0.000527
x ₁ . x ₂	1.2000	15.78963	0.07600	0.941890

Fonte: Elaborado pelo autor.

Por outro lado, a análise estatística dos resultados obtidos em relação as atividades da glucoamilase imobilizada em suportes de PLA revelou que ambas as variáveis exerceram efeitos negativos apenas em seus termos quadráticos na atividade dos derivados obtidos (Tabela 11). O fato de a influência das variáveis estudadas não terem sido estatisticamente significativas em seus termos lineares não significa, necessariamente, que estas não exercem influência na atividade dos derivados, mas sim que as mudanças observadas na variável resposta não foram significantes o suficiente para afetarem o modelo

matemático. Como pode ser observado nos ensaios 1 (pH 3,5, 30 °C) e nos ensaios de 5 a 8 (pH 5,5, 50 °C), os maiores valores de atividades foram obtidos sob valores baixos de pH e temperatura entre 30 e 50 °C.

Tabela 11. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de PLA.

Nome	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	97.1411	4.920702	19.7413	0.000001
pH (x ₁) (L)	-0.7267	6.975970	-0.1042	0.920430
pH (x ₁) (Q)	-80.7439	7.836195	-10.3040	0.000049
T °C (x ₂) (L)	-12.0542	6.957119	-1.7326	0.133866
T °C (x ₂) (Q)	-76.3195	7.770271	-9.8220	0.000064
x ₁ . x ₂	13.900	9.841588	1.4124	0.207546

Fonte: Elaborado pelo autor.

As alterações de temperatura podem influenciar a estrutura tridimensional das enzimas e, conseqüentemente, sua atividade catalítica. A ausência de efeito do termo linear da temperatura na atividade enzimática pode ser explicada pela tolerância da enzima, solúvel e imobilizada, à faixa de temperatura estudada. Além disso, esperava-se que a glucoamilase imobilizada não fosse significativamente afetada pela temperatura, dado que o objetivo da imobilização é proteger as enzimas contras temperaturas e evitar o desdobramento de sua estrutura terciária. (BENAMIA *et al.*, 2017; REMONATTO *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2012). No entanto, a imobilização covalente em suportes ativadas com glutaraldeído ocorre pela interação deste reagente a extremidade N-terminal das enzimas, o que resulta em possíveis mudanças na ionização da

cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos e na interação com os resíduos básicos da enzima, diminuindo a flexibilidade conformacional e evitando a desnaturação pelo calor (BADOEI-DALFARD *et al.*, 2019; DOMINGUES *et al.*, 2022).

O pH exerceu um impacto mais pronunciado na atividade da glucoamilase solúvel. No entanto, após a imobilização, seu termo linear deixou de exercer efeito estatisticamente significativo na variável resposta. Por conseguinte, o suporte provavelmente contribuiu para proteger a enzima dos efeitos advindos das alterações do pH.

Os modelos matemáticos que descrevem as atividades relativas da glucoamilase solúvel (Y1) e imobilizada (Y2) em função do pH (X1) e da temperatura (X2) foram construídos utilizando-se os coeficientes de regressão e estão descritos nas Eqs 5 e 6, respectivamente:

$$Y_1 = 98.14 - 20.57X_1 - 29.95X_1^2 - 8.73X_2 - 41.90X_2^2 + 0.59X_1X_2 \quad (\text{Eq. 5})$$

$$Y_2 = 97.16 - 0.39X_1 - 40.39X_1^2 - 6.02X_2 - 38.17X_2^2 + 6.95X_1X_2 \quad (\text{Eq. 6})$$

A construção dos modelos matemáticos foi realizada considerando-se os parâmetros estatisticamente significativos e não significativos, respeitando-se o princípio da hereditariedade de efeito forte, que propõe que todos os componentes de ordem inferior de um efeito de modelo sejam incluídos.

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas para avaliar a adequação dos modelos ajustados (Tabelas 12 e 13). O modelo gerado para a atividade de glucoamilase solúvel (Eq. 5) apresentou valor R² igual a 0,92, indicando que 92% da variância da atividade enzimática observada foi explicada pelo modelo. De maneira similar, o modelo para atividade de glucoamilase

imobilizada em suportes de PLA (Eq. 6) apresentou valor R^2 igual a 0,96, explicando 96% da variação da atividade enzimática. Além disso, os valores de F foram de 14,62 e 34,84, respectivamente, sendo superiores ao valor F-crítico (4,39). Esses resultados indicam, portanto, que ambos os modelos descrevem de maneira eficaz a atividade de glucoamilase solúvel e imobilizada em função do pH e da temperatura. Além disso, conforme apresentado pela Tabela 9, é possível notar uma forte correlação entre os valores experimentais e os valores previstos pelos modelos.

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase solúvel.

Nome	SS	df	MS	F	p
pH (x_1) (L)	3372.59	1	3372.59	13.52759	0.010355
pH (x_1) (Q)	5659.34	1	5659.34	22.69979	0.003112
T °C (x_2) (L)	606.32	1	606.62	2.43317	0.169810
T °C (x_2) (Q)	11266.97	1	11266.97	45.19222	0.000527
$x_1 \cdot x_2$	1.44	1	1.44	0.00578	0.941890
Error	1495.87	6	249.31		
Total SS	19723.19	11			

Fonte: Elaborado pelo autor

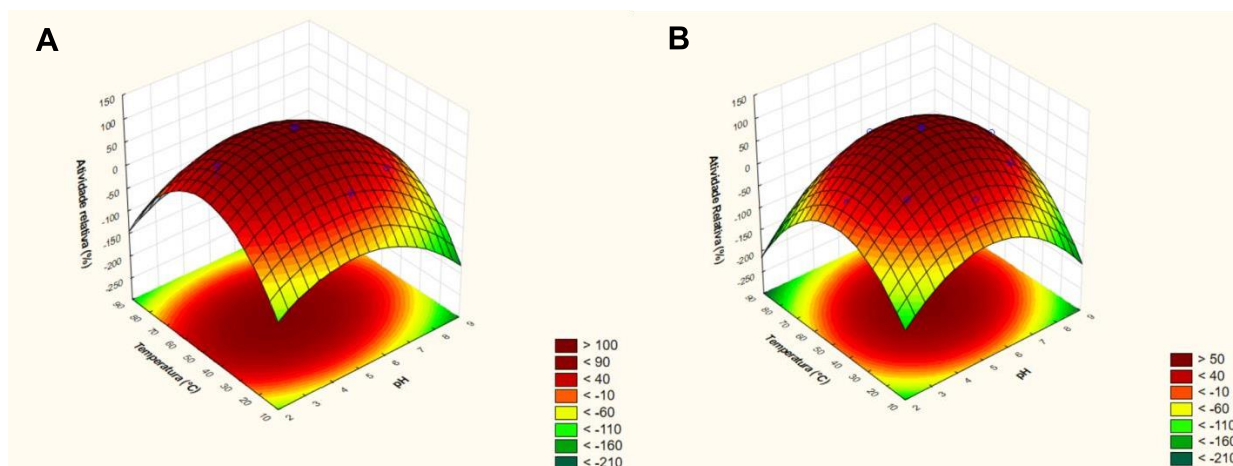
Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de PLA.

Nome	SS	df	MS	F	p
pH (x ₁) (L)	1.05	1	1.05	0.0109	0.920430
pH (x ₁) (Q)	10283.47	1	10283.47	106.1718	0.000049
T °C (x ₂) (L)	290.77	1	290.77	3.0020	0.133866
T °C (x ₂) (Q)	9343.93	1	9343.93	96.4715	0.000064
x ₁ . x ₂	193.21	1	193.21	1.9948	0.207546
Error	581.14	6	96.86		
Total SS	17453.68	11			

Fonte: Elaborada pelo autor

Os modelos foram utilizados para gerar gráficos de superfície de resposta para identificação das faixas ótimas de pH e temperatura de atividade. A Figura 11 apresenta os gráficos de superfície de resposta para a atividade de glucoamilase solúvel (Figura 11A) e imobilizada (Figura 11B). Observou-se que os valores de pH e temperatura mais próximos dos pontos centrais proporcionam os valores de atividade mais elevados tanto para a glucoamilase solúvel como para a imobilizada. Além disso, as superfícies de resposta também confirmaram que os valores de pH e temperatura mais afastados dos pontos centrais tiveram efeito negativo nas atividades, corroborando o efeito negativos dos termos quadráticos das variáveis estudadas.

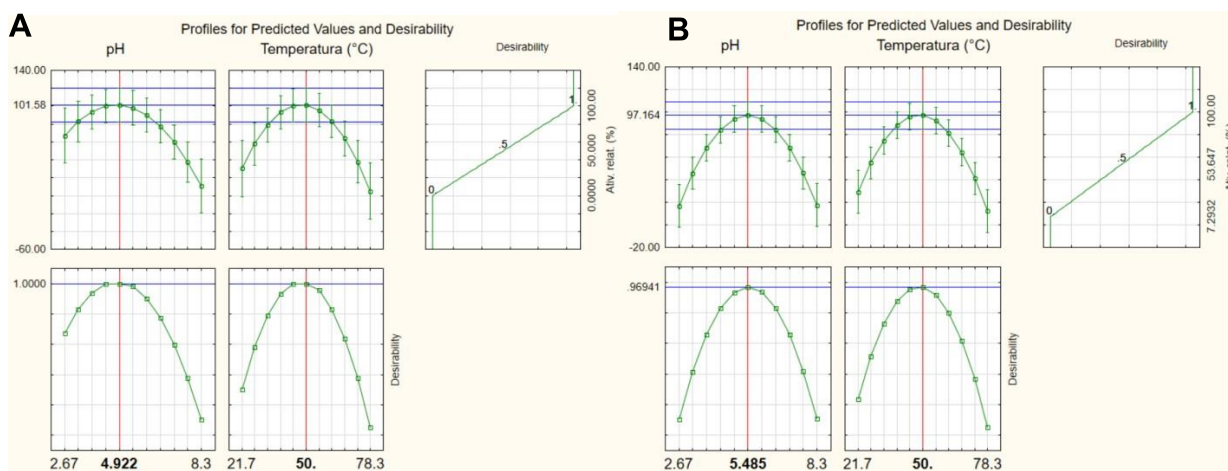
Figura 11. Superfícies de resposta obtidas para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da glucoamilase solúvel (A) e dos derivados obtidos a partir imobilização de glucoamilase em suportes de PLA (B).



Fonte: Elaborado pelo autor, *Software Statistica 10*.

Os modelos foram ainda utilizados para prever os valores ótimos de pH e temperatura utilizando-se a função de desejabilidade do software *Statistica 10*. (Figura 12). A análise revelou que o pH 4,92 e temperatura 50 °C são as condições ideais para se obter a maior atividade de glucoamilase solúvel (Figura 12A). Em relação a glucoamilase imobilizada em suportes de PLA (Figura 12B), as condições ótimas são pH 5,5 e 50 °C. As condições ideais foram utilizadas para realizar a validação das informações obtidas e o modelo previu uma atividade máxima de 12.189 U/mL para a glucoamilase solúvel e 10 U/g para a glucoamilase imobilizada. As atividades experimentais foram, respectivamente, 12.300 ± 39 U/mL e $9,16 \pm 0,76$ U/g.

Figura 12. Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no delineamento de composto central rotacional (DCCR), para a máxima atividade de glucoamilase solúvel(A) e derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase em suportes de PLA (B).



Fonte: Elaborado pelo autor, *Software* Statistica 10.

De maneira similar, a influência do pH e da temperatura sobre a atividade da glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero foi avaliada através do uso de planejamentos experimentais do tipo Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 com pontos axiais. Os resultados obtidos experimentalmente bem como os valores preditos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Matriz do planejamento experimental (DCCR) e resultados experimentais e previstos para a atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.

Ensaio	pH (X ₁)	Temperatura (°C) (X ₂)	Ativ. Relativa (%)	
			Experimental	Predito (Y ₃)
1	(-1) 3.5	(-1) 30	53,41	57,15
2	(+1) 7.5	(-1) 30	54,67	44,67
3	(-1) 3.5	(+1) 70	71,21	83,55
4	(+1) 7.5	(+1) 70	16,41	15,03
5	(0) 5.5	(0) 50	98,00	98,33
6	(0) 5.5	(0) 50	97,00	98,33
7	(0) 5.5	(0) 50	98,50	98,33
8	(0) 5.5	(0) 50	100,00	98,33
9	(-1.41) 2.67	(0) 50	91,29	80,68
10	(+1.41) 8.3	(0) 50	15,78	23,57
11	(0) 5.5	(-1.41) 21.7	44,57	49,79
12	(0) 5.5	(+1.41) 78.3	54,42	47,51

Fonte: Elaborado pelo autor

Atividade de glucoamilase expressa em Atividade relativa em relação ao maior valor obtido.

* 7,92 U/g

A análise estatística dos resultados obtidos revela que, assim como para a glucoamilase solúvel, o pH exerceu efeito negativo ($p < 0,05$), em seus termos linear e quadrático, sobre a atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero (Tabela 15) enquanto a temperatura exerceu efeito também negativo na atividade de glucoamilase solúvel, porém apenas seu termo

quadrático se mostrou estatisticamente significativo. Além disso, no caso da imobilização de glucoamilase em suportes de geopolímero, a interação entre as variáveis pH e temperatura também exerceram efeito negativo significativo sobre a atividade enzimática, o que não havia sido observado nem para a enzima em sua forma solúvel e nem para a enzima imobilizada em suportes de PLA. Desta maneira, observa-se que valores mais baixos de pH resultam em melhores atividades enzimáticas dentro do intervalo estudado (DOMINGUES *et al.*, 2022), conforme observado nos ensaios 1 (pH 3.5, 30 °C), 9 (pH 2,67, 50 °C) e nos pontos centrais (pH 5,5, 50 °C), um comportamento bastante parecido com a enzima em sua forma solúvel.

Tabela 15. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.

Nome	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	98,3281	4,750464	20,69862	0,000001
pH (x ₁) (L)	-40,4933	6,734628	-6,01270	0,000954
pH (x ₁) (Q)	-46,4747	7,565092	-6,14332	0,000852
T °C (x ₂) (L)	-1,6288	6,716428	-0,24251	0,816459
T °C (x ₂) (Q)	-49,9601	7,501448	-6,66006	0,000554
x ₁ . x ₂	-28,0303	9,501105	-2,95022	0,025606

Fonte: Elaborado pelo autor

Assim como observado para os derivados de PLA, observou-se também a ausência de efeito do termo linear da temperatura sobre a atividade enzimática dos derivados de geopolímero, o que pode ser explicada tanto pela tolerância da enzima imobilizada à faixa de temperatura estudada assim como pelas possíveis mudanças na ionização da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos e na interação com os resíduos básicos da enzima, conforme discutido anteriormente.

O modelo matemático que descreve a atividade relativa da glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero (Y_3) em função do pH (X_1) e da temperatura (X_2) foi construído utilizando-se os coeficientes de regressão e está descrito na Eq 7.

$$Y_3 = 98,33 - 20,25X_1 - 23,24X_1^2 - 0,81X_2 - 24,99X_2^2 + 14,01X_1X_2 \quad (\text{Eq. 7})$$

A construção do modelo matemático foi realizada considerando-se os parâmetros estatisticamente significativos e não significativos, respeitando-se o princípio da hereditariedade de efeito forte,

A adequação do modelo ajustado foi avaliada por meio de ANOVA (Tabela 16). O modelo para atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero (Eq. 7) apresentou valor R^2 igual a 0,95, e o valor de F foi de 22,56, superior ao valor F-crítico (4,39). Esses resultados indicam, portanto, que o modelo obtido descreve de maneira eficaz a atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero em função do pH e da temperatura. Além disso, conforme apresentado pela Tabela 14, é possível notar uma forte correlação entre os valores experimentais e os valores previstos pelos modelos.

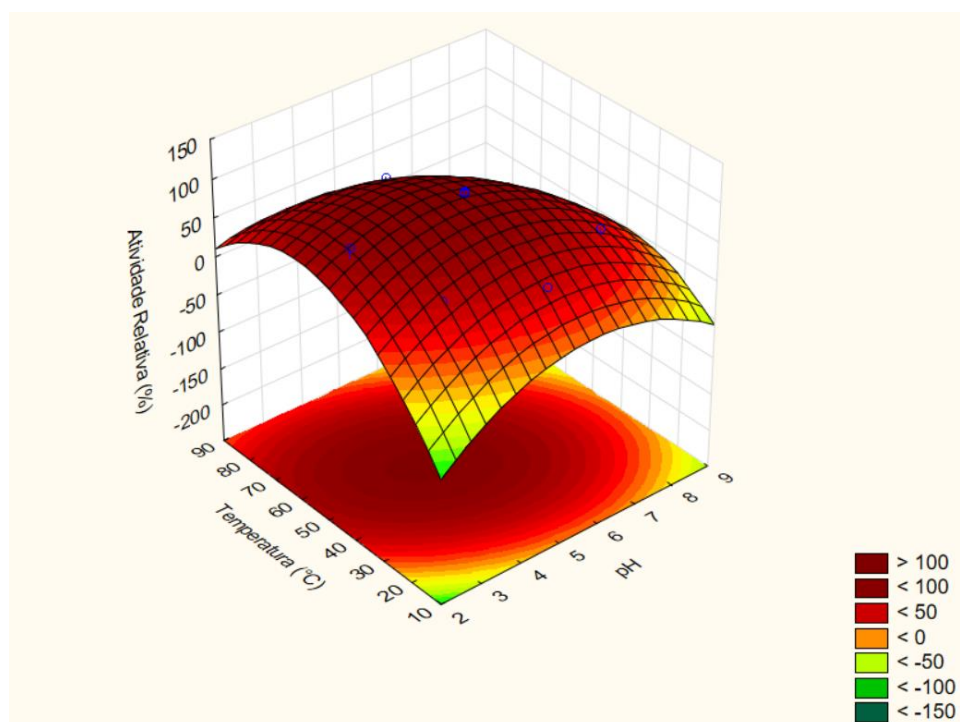
Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero

Nome	SS	df	MS	F	p
pH (x ₁) (L)	3263,53	1	3263,529	36,15257	0,000954
pH (x ₁) (Q)	3406,86	1	3406,857	37,74032	0,000852
T °C (x ₂) (L)	5,31	1	5,309	0,05881	0,816459
T °C (x ₂) (Q)	4004,09	1	4004,094	44,35637	0,000554
x ₁ . x ₂	785,70	1	785,698	8,70377	0,025601
Error	541,63	6	90,271		
Total SS	10723,72	11			

Fonte: Elaborada pelo autor

O modelo obtido foi utilizado para geração dos gráficos de superfície de resposta para identificação das faixas ótimas de pH e temperatura de atividade. A Figura 13 apresenta o gráfico de superfície de resposta para a atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero. Observou-se que os valores de pH e temperatura mais próximos dos pontos centrais proporcionam os valores de atividade mais elevados, similar ao observado tanto para a glucoamilase solúvel como para a imobilizada em suportes de PLA. Além disso, as superfícies de resposta também confirmaram que os valores extremos de pH e temperatura tiveram efeito negativo nas atividades, corroborando o efeito negativos dos termos quadráticos das variáveis estudadas, assim como o observado para a enzima em sua forma solúvel e imobilizada em suportes de PLA.

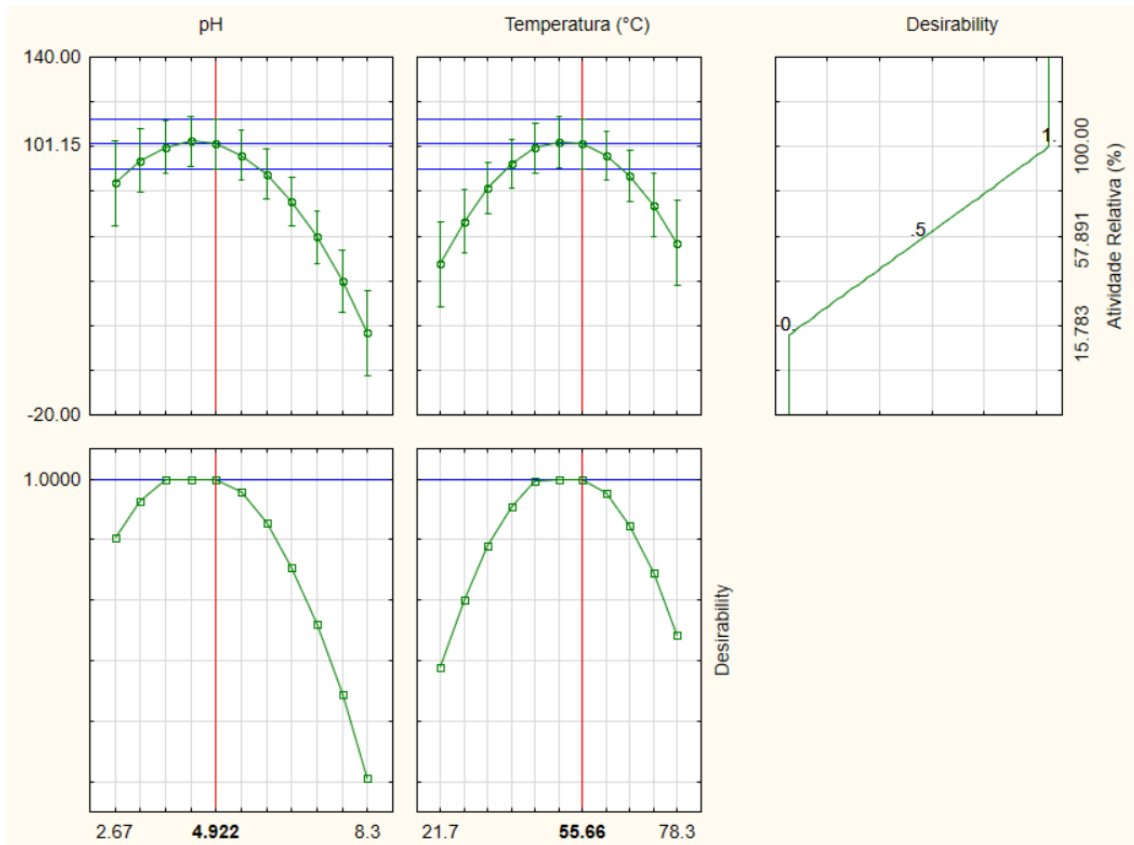
Figura 13. Superfície de resposta obtida para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.



Fonte: Elaborado pelo autor, *Software* Statistica 10.

A função de desejabilidade do software Statistica 10 foi utilizada para prever os valores ótimos de pH e temperatura, a partir do modelo obtido. Os resultados são apresentados na Figura 14. A análise revelou que o pH 4,92 e temperatura 55 °C são as condições ideais para se obter a maior atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero. As condições ideais foram utilizadas para realizar a validação das informações obtidas e o modelo previu uma atividade máxima de 8 U/g para os derivados de geopolímero. A atividade experimental foi $7,22 \pm 0,31$ U/g.

Figura 14. Perfil dos valores previstos/otimizizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no delineamento de composto central rotacional (DCCR), para a máxima atividade de glucoamilase immobilizada em suportes de geopolímero



Fonte: Elaborado pelo autor, *Software Statistica 10*.

As glucoamilases são principalmente utilizadas em reações de sacarificação do amido, um processo que ocorre tipicamente entre 50 e 60 °C e pH entre 4 e 5. A glicose resultante pode então ser aplicada para produção de bebidas, alimentos e até mesmo etanol, através da atividade de leveduras fermentativas (ZHU *et al.*, 2019). Nesse sentido, a imobilização de glucoamilase

em suportes de PLA e em suportes de geopolímero demonstra potencial para aplicações industriais visto que os derivados obtidos apresentam valores de temperatura e pH ótimos de atividade dentro da faixa em que a enzima solúvel costuma ser usada industrialmente.

A literatura atual carece de trabalhos que relatem uso o de PLA e geopolímero como suporte para imobilização de glucoamilase, porém, as condições ideais de pH e temperatura para atividade de glucoamilase solúvel e imobilizada nos dois diferentes suportes (PLA e geopolímero) estão de acordo com as relatadas para glucoamilase fúngicas e outros tipos de suportes utilizados para imobilização (ASLAN, Y. *et al.*, 2020; DA COSTA LUCHIARI *et al.*, 2021; HASSAN *et al.*, 2019; SYED *et al.*, 2016). Aslan e colaboradores (2020) apontam que a imobilização covalente de glucoamilase em suportes de carbono ativado não alterou os valores ótimos de pH e temperatura de atividade, em relação a enzima solúvel (pH 5,5 e 55-60°C) (ASLAN, Y. *et al.*, 2020). Similarmente, Hassan e colaboradores (2019) também não observaram alterações quanto ao pH e temperatura ótimos (pH 5, 60 °C) após a imobilização covalente usando *kappa* carragenana (HASSAN *et al.*, 2019). Da Costa Luchiari e colaboradores (2021) reportam valores ótimos de temperatura e pH de 50 °C e pH 5 para a enzima em sua forma livre, após a imobilização covalente em pó de sabugo de milho o derivado apresentou aumento de 10 °C no valor de temperatura ótima, sem alterações para o valor de pH ótimo (DA COSTA LUCHIARI *et al.*, 2021). Syed e colaboradores (2016) imobilizaram covalentemente glucoamilase de *Neurospora sitophila* em nanopartículas de prata revestidas com fitoquímicos. Não foi observada diferença entre os valores

de pH e temperatura ótimos (pH 5 e 45 °C) após a imobilização (SYED *et al.*, 2016).

5.5. Estabilidade pH e temperatura

A estabilidade de uma enzima frente a temperatura e ao pH é um parâmetro que deve ser avaliado durante sua caracterização, uma vez que estes dados são importantes para se determinar condições de armazenamento e estocagem.

5.5.1. Estabilidade frente a temperatura da glucoamilase solúvel e dos derivados de PLA e geopolímero

A Tabela 17 apresenta as constantes de desativação térmica (K_d) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a enzima em sua forma solúvel e imobilizada nos suportes de PLA e geopolímero sob as respectivas temperaturas ótimas de atividade.

Em sua forma solúvel, a glucoamilase comercial apresentou boa resistência à desnaturação térmica quando incubada sob as temperaturas estudadas (50 e 55 °C), apresentando tempos de meia vida de 4,62 e 1,79 h, respectivamente.

Da Costa Luchiari e colaboradores (2021) relatam a resistência térmica da glucoamilase comercial entre 30 e 50 °C, mantendo-se por até 10 horas mais de 80% de sua atividade inicial. No entanto, a partir de 60 °C a atividade é afetada diretamente. Após duas horas incubada sob temperatura de 60 °C, apenas 40% da atividade inicial é mantida. Porém, após ser incubada sob 70 °C

e 80 °C, a atividade enzimática é praticamente zerada (DA COSTA LUCHIARI *et al.*, 2021), corroboram o resultados obtidos no presente trabalho.

Por outro lado, os derivados de PLA e geopolímero apresentaram menor estabilidade térmica quando comparados à enzima sua forma solúvel, com meias-vida de 0,51 e 0,40 h, respectivamente, com consequente elevação dos valores de suas constantes de desativação térmica (1,36 e 1,77 h⁻¹).

Vaidya e colaboradores imobilizaram glucoamilase comercial em suportes de estrutura metálica orgânica biológica (bio-MOF) e relatam que a imobilização proporcionou o aumento da termoestabilidade da enzima sob três diferentes temperaturas: 55, 65 e 75 °C com alteração nos tempos de meia vida de 35 para 77 minutos (55 °C); 24 para 42 minutos (65 °C) e 17 para 26 minutos (75 °C) (VAIDYA *et al.*, 2020). Outros trabalhos também relatam a melhora na termoestabilidade de glucoamilases após a imobilização (DA COSTA LUCHIARI *et al.*, 2021; NADAR; RATHOD, 2017).

Tabela 17. Constantes de desativação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da enzima solúvel e imobilizada em suportes de PLA e geopolímero.

pH	Temperature (°C)	Soluble glucoamylase		PLA derivative	
		K_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
	50	0.15	4.62	1.36	0.51
5.5		0.07	10.66	0.11	6.59

Fonte: Elaborada pelo autor.

A estabilidade da enzima comercial frente ao pH em sua forma solúvel (pH 5 e 5,5), imobilizada em suportes de PLA (pH 5,5) e imobilizada em suportes de geopolímero (pH 5) foi avaliada e as constantes de desativação enzimática pelo efeito do pH e tempo de meia vida foram calculados (Tabela 18).

A enzima em sua forma solúvel apresentou boa resistência à desnaturação por ação do pH, com meias-vida de 32,85 e 10,66 h, respectivamente.

Porém, de maneira similar ao observado nos experimentos de termoestabilidade, a imobilização das glucoamilases em suportes de PLA não proporcionou uma melhora na estabilidade ao pH estudado, embora a interferência nos valores de K_d e $t_{1/2}$ tenha sido menor em relação ao que foi observado para os valores de termoestabilidade. O tempo de meia vida da enzima solúvel, em pH 5,5, foi 1,6 vezes maior que o observado nos derivados de PLA.

Por outro lado, a imobilização de glucoamilases em suportes de geopolímero contribuiu para que a estabilidade em pH 5, seu pH ótimo de atividade, aumentasse passando de 32,85 para 101,93 h, representando um aumento de 3,10 vezes em seu tempo de meia vida.

Tabela 18. Constantes de desativação enzimática pelo efeito do pH ótimo de atividade (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da enzima solúvel e imobilizada em suportes de PLA e geopolímero.

pH	Enzima Solúvel		Derivado PLA		Derivado Geopolímero	
	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
5	0,02	32,85	-	-	0,01	101,93
5,5	0,07	10,66	0,11	6,59	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora o processo de imobilização tenha como principal objetivo possibilitar o reusode enzimas, este pode proporcionar melhoras na estabilidade do biocatalisador frente alterações de temperatura e/ou de pH. Não foi possível, porém, observar este princípio no presente trabalho com relação a estabilidade à temperatura (para ambos os derivados) e com relação a estabilidade ao pH (para os derivados de PLA). O processo de imobilização pode causar alterações tanto à estrutura quanto ao sítio ativo da enzima, o que pode ser observado através da melhora dos seus valores de atividade e/ou estabilidade como também por meio da inativação da enzima (GUISAN *et al.*, 2020). Acredita-se, portanto, que o processo de imobilização desenvolvido no presente trabalho possa ter afetado a estrutura e/ou o sítio ativo da enzima, contribuindo para uma menor estabilidade térmica, se comparado com a enzima solúvel, sob as condições estudadas.

As glucoamilases apresentam em sua estrutura sítios de glicosilação os quais desempenham um papel crucial em sua estabilidade conformacional (ROTH *et al.*, 2018). Os resíduos de carboidratos encontrados na estrutura das glucoamilases são necessários para a manutenção de sua conformação tridimensional e atuam como uma barreira protetora, impedindo a exposição de regiões hidrofóbicas da cadeia polipeptídica ao solvente (VIHINEN; MANTSALA, 1989). Além disso, os oligossacarídeos podem formar interações de hidrogênio com a cadeia principal e os resíduos de aminoácido da proteína, contribuindo para a estabilização de sua estrutura terciária (SAHA; ZEIKUS, 1989). No entanto, acredita-se que as condições alcalinas empregadas durante do processo de imobilização empregado possam ter contribuído para a indução de alterações conformacionais e a formação de um microambiente capazes de comprometerem a integridade destes oligossacarídeos, alterando-se os padrões de glicosilação da enzima. Conseqüentemente, a perda destes grupos expõe as regiões hidrofóbicas da proteína, promovendo interações intermoleculares indesejáveis, resultando na diminuição significativa da estabilidade enzimática observada (SAHA; ZEIKUS, 1989).

A estabilidade enzimática constitui um dos pilares para a viabilidade econômica e aplicabilidade industrial de biocatalisadores. A perda gradual da atividade enzimática ao longo do tempo, decorrente de fatores intrínsecos e extrínsecos, pode comprometer significativamente o desempenho e a eficiência de determinado processo (HAMID *et al.*, 2022; NDOCHINWA *et al.*, 2024). Nesse sentido, o desenvolvimento de estratégias que visem melhorar a estabilidade dos derivados obtidos no presente trabalho, tais como a ligação de substâncias

químicas ou grupos reacionais à enzima, como a PEGilação (BAIG *et al.*, 2015; DÍAZ-RODRIGUEZ; DAVIS, 2011).

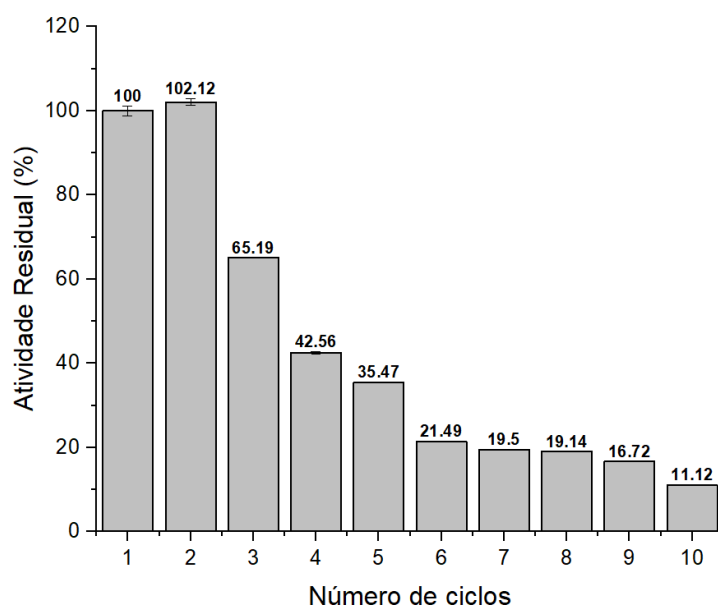
A PEGilação, processo no qual ocorre a conjugação covalente de moléculas de polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrofílico, à superfície proteica, tem se mostrado uma ferramenta interessante para melhorar a estabilidade de diferentes enzimas (DABA *et al.*, 2013; HSIEH; LIN, 2015; KUMAR *et al.*, 2014; QUINTANILLA-GUERRERO *et al.*, 2008). A formação de uma camada de PEG na superfície da enzima ajudaria a manter um microambiente aquoso ao redor da enzima, protegendo-a da desidratação. Além disso a utilização de PEG poderia contribuir para a redução de interações hidrofóbicas entre as moléculas de enzima e atuar como uma barreira física, protegendo-a de agentes desnaturantes como temperaturas e pH extremos (FANG *et al.*, 2018).

5.6. Estabilidade operacional das glucoamilases imobilizadas em suportes de PLA

O objetivo principal da imobilização de enzimas é possibilitar o seu reuso, tornando os processos enzimáticos mais interessante do ponto de vista econômico (BASSO; SERBAN, 2019). Nesse sentido, é importante avaliar a estabilidade operacional dos derivados obtidos, a fim de se verificar por quantos ciclos de reação estes são capazes de manter suas atividades catalíticas.

Portanto, os derivados de PLA tiveram sua estabilidade operacional avaliada durante 10 minutos, por 10 ciclos reacionais, sob temperatura e pH ótimos de reação (50 °C e 5,5, respectivamente), conforme apresenta a Figura 15.

Figura 15. Estabilidade operacional dos derivados obtidos através da imobilização covalente de glucoamilase em suportes de PLA. *100%: 9,18 U/g.

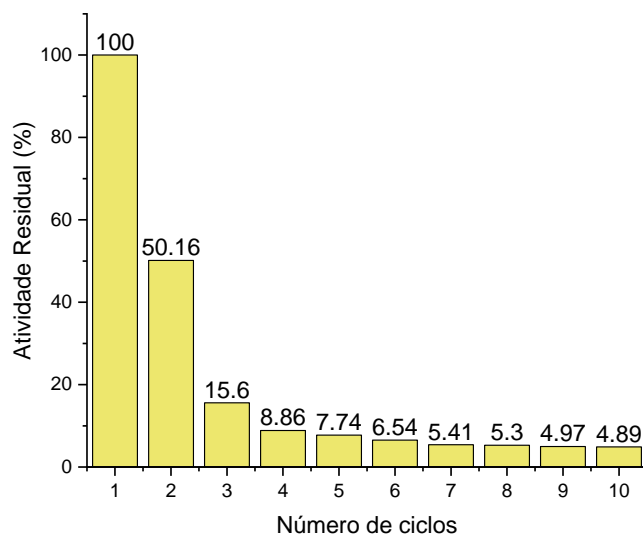


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os derivados foram utilizados por 10 ciclos sucessivos de reação e ao final do 3º ciclo observa-se uma queda para 65,19% em relação a atividade inicial e, ao final do 4º ciclo, uma queda para 42,56%. A partir do 7º ciclo de reação, as atividades dos derivados mantiveram-se abaixo de 20% da inicial.

Os derivados de geopolímeros também tiveram sua estabilidade operacional avaliada durante 10 minutos, sob 55 °C e pH 5 conforme ilustra a Figura 16.

Figura 16. Estabilidade operacional dos derivados obtidos através da imobilização covalente de glucoamilase em suportes de geopolímero *100%: 7,22 U/g.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os derivados de geopolímero foram utilizados 10 ciclos de reação sucessivos. Observa-se que ao final do 2º ciclo de reação houve uma queda de quase 50% na atividade residual, seguida de uma segunda queda, ao final do 3º ciclo (15,6% em relação a atividade inicial). A partir do 4º ciclo de reação, as atividades dos derivados mantiveram-se abaixo de 10% da inicial.

Amirbandeh e colaboradores realizaram a imobilização covalente de glucoamilase em suportes de quitosana funcionalizada revestida com nanopartículas superparamagnéticas. Os autores avaliaram a atividade residual dos derivados sob diferentes valores de pH e temperatura durante os ensaios de reuso. Dentre as condições estudadas, os autores destacam o pH 4,5 e

a temperatura de 60 °C, com atividades residuais de 68% e 69%, respectivamente, após 10 ciclos de reuso (AMIRBANDEH *et al.*, 2017).

Os derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase de *Neurospora sitophila* em nanopartículas verdes também foram avaliados quanto a capacidade de reuso. Os autores relatam a utilização dos derivados por 10 ciclos sob pH 5 e 45 °C, com atividades residuais variando de 88,3% a 70% entre os 2º e 5º ciclos (SYED *et al.*, 2016).

Conforme descrito na literatura, é comum observar queda na atividade enzimática residual do derivado à medida que se aumentam os números de reciclo do mesmo. A queda de atividade residual observada no presente trabalho, assim como nos demais trabalhos envolvendo a imobilização de glucoamilase ou outras enzimas, pode ser explicada por alguns fatores como a exposição recorrente da enzima ao substrato, o que pode ter contribuído para o surgimento de alguma distorção no sítio ativo da enzima com conseqüente perda de atividade. Além disso, existe a possibilidade do possível enfraquecimento da ligação entre a enzima e o suporte (AMIRBANDEH *et al.*, 2017).

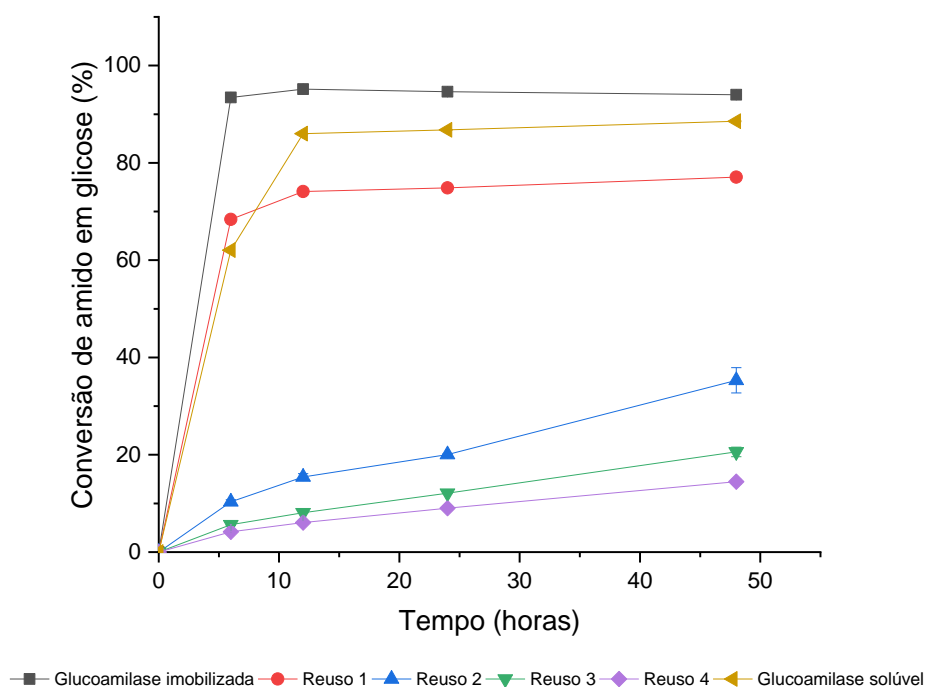
A imobilização de glucoamilase em PLA e geopolímero, embora inovadora e promissora, resultou em uma queda significativa na atividade enzimática após os primeiros ciclos de reuso. Acredita-se que a utilização do pH 10 para a imobilização, visando a formação de ligações covalentes multipontuais, embora tenha contribuído para os maiores valores de rendimento de imobilização (item 5.1), tenha tornado a enzima inativa através de modificações causadas em sua estrutura tridimensional, conforme discutido no item 5.5. Nesse sentido, adequações das condições de imobilização, podem

ajudar a minimizar esses efeitos e contribuir para aumentar a estabilidade operacional da enzima imobilizada.

5.7. Hidrólise enzimática do amido utilizando glucoamilase imobilizada em suportes de PLA

Os derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase em suportes impressos de PLA foram aplicados na hidrólise do amido em reatores de tanque agitado operados em regime de batelada. A Figura 17 apresenta os dados de conversão de amido em glicose ao longo de 48 horas utilizando-se a glucoamilase imobilizada em suportes de PLA e a glucoamilase solúvel para fins de comparação.

Figura 17. Hidrólise enzimática do amido e conversão em glicose por meio da ação de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA



Fonte: Elaborado pelo autor

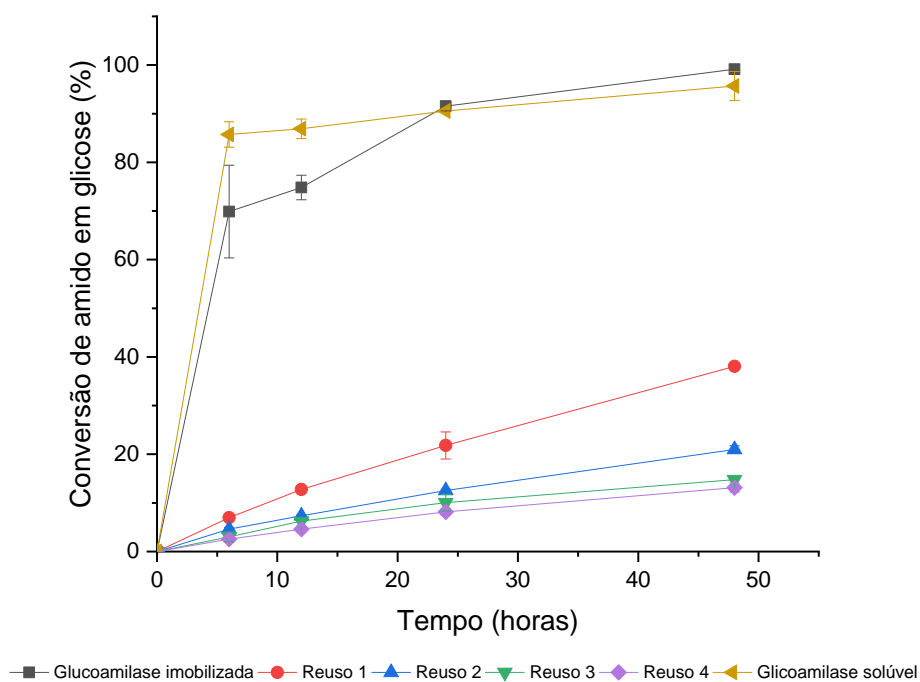
Após 6 horas de reação, a glucoamilase solúvel converteu 62,05% do amido em glicose, atingindo o máximo de conversão (88,56%) ao final de 12 horas de reação.

Por outro lado, os derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase em suportes impressos de PLA foram responsáveis pela conversão de mais de 90% do amido em glicose, durante as 6 primeiras horas de reação, além de terem sido reutilizados por 4 ciclos de reação de hidrólise. Durante o primeiro ciclo de reuso, a glucoamilase imobilizada foi responsável por converter 68,37% do amido em glicose, ao final das 6 primeiras horas de reação, superando a conversão observada pela glucoamilase solúvel no mesmo período. Após o período de 6 horas, as taxas de conversão se mantiveram relativamente constantes até o final das 48 horas de reação, com conversões entre 74,11% e 77,06%.

Além disso, foi atingido 35% de conversão de amido em glicose ao final das 48 horas de reação do segundo ciclo de reuso, seguidos de 20% e 14% ao final do terceiro e quartos ciclos de reutilização, respectivamente.

Os derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase em suportes impressos de geopolímero foram aplicados na hidrólise do amido em reatores de tanque agitado operados em regime de batelada. A Figura 18 apresenta os dados de conversão de amido em glicose ao longo de 48 horas de hidrólise enzimática utilizando-se a glucoamilase solúvel para fins de comparação.

Figura 18. Hidrólise enzimática do amido e conversão em glicose por meio da ação de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de geopolímero



Fonte: Elaborado pelo autor

A conversão de amido em glicose pela ação da glucoamilase solúvel foi maior (85,7% - 6h; 86,9% - 12h; 90,5% - 24h) do que a conversão observada pela ação da glucoamilase imobilizada em geopolímero ao longo das primeiras 24 horas de hidrólise (69,8% - 6h; 74,3% - 12h; 91,5% - 24h). Após este período as taxas de conversão praticamente se igualaram, com 90,5 % de conversão pela glucoamilase solúvel e 91,5 % para a imobilizada. Ao final das 48 horas, a glucoamilase imobilizada superou a enzima solúvel, atingindo 99,1% de conversão de amido em glicose enquanto a glucoamilase solúvel converteu 95,7%.

Assim como os derivados de PLA, foi possível reutilizar os derivados de geopolímero por mais de uma reação de hidrólise em reator de tanque agitado. Observou-se também, uma queda gradual na conversão de amido em glicose a medida que o número de reusos aumentava. Durante o primeiro reuso, a conversão de amido em glicose variou de 6,96% até 38,1%, seguido da conversão máxima de 21% no segundo reuso, 14,8% no terceiro e 13,1% ao final do quarto reuso.

Da Costa Luchiari e colaboradores (2021) realizaram a hidrólise do amido sob condições semelhantes às descritas no presente trabalho e observaram que, após 12 horas de reação, a glucoamilase solúvel converteu 75% do amido em glicose, resultado semelhante e comparável aos obtidos no presente estudo. Além disso, o estudo citado mostrou que 240 U/g de glucoamilase imobilizada em pó de sabugo de milho foi necessário para atingir o mesmo nível de conversão que a enzima em sua forma solúvel (DA COSTA LUCHIARI *et al.*, 2021). É importante destacar que a glucoamilase imobilizada em suportes impressos de PLA (presente trabalho) não apenas excedeu as taxas de conversão da glucoamilase solúvel, como também alcançou tais resultados com uma carga total de 133,33 U/g. Adicionalmente, foi demonstrado que a imobilização em suportes de PLA possibilitou, em comparação com a enzima solúvel, uma conversão mais elevada de amido em glicose dentro de um período de tempo mais curto, além de ter sido reutilizada por mais de um ciclo, mantendo a conversão de amido em glicose similar ao obtido pela sua forma solúvel, por ao menos um reuso.

Frota e colaboradores (2020) relatam a aplicação de α -amilase e glucoamilase co-imobilizadas em alginato como suporte e utilizando-se glutaraldeído como agente de reticulação. Em seu estudo, os autores observaram um declínio gradual na conversão do amido em glicose para ambas as estratégias utilizadas, um fenômeno que é consistente com as observações apresentadas no presente trabalho e em outros trabalhos envolvendo a imobilização de amilases (AKHOND *et al.*, 2016; FROTA *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2017; YAZGAN *et al.*, 2017).

Os estudos de hidrólise enzimática conduzidos em reator de tanque agitado forneceram dados importantes e ideias para etapas subsequentes, particularmente no que diz respeito à utilização de glucoamilase imobilizada em suportes de PLA e de geopolímero em sistemas de reatores operados de forma contínua. Conforme apresentado na Figura 17, a glucoamilase imobilizada em suporte de PLA atingiu uma taxa de conversão máxima de pouco mais de 90% após 6 horas do primeiro ciclo, enquanto que a glucoamilase imobilizada em geopolímero atingiu conversão semelhante ao final de 24h (Figura 18). Considerando-se as conversões observadas, os derivados obtidos no presente trabalho possuem potencial para a aplicação industrial na hidrólise do amido. Em reatores contínuos, a utilização desses derivados, combinada com um aumento da carga enzimática, conforme proposto por Basso e Serban (BASSO; SERBAN, 2019), pode otimizar a produção de glicose, permitindo alcançar taxas de conversão mais elevadas em um tempo de reação reduzido. Dessa forma, seria possível obter rendimentos de glicose próximos a 100% tanto no início do processo quanto em ciclos operacionais subsequentes.

A imobilização da glucoamilase A7095, uma enzima de alto custo e valor agregado, em PLA e geopolímero, embora tenha apresentado quedas relevantes nas conversões de amido em glicose ao longo dos ciclos de reuso, demonstrou a viabilidade de sua reutilização quando aplicada à hidrólise do amido. Apesar dos resultados das quedas nas taxas de conversão observadas ao longo dos reusos, a possibilidade de utilizar a enzima imobilizada por mais de um ciclo de hidrólise representa um avanço significativo, considerando o custo associado à sua aquisição. A otimização das condições de imobilização, podem contribuir para melhorar a estabilidade e a atividade da enzima imobilizada, tornando o processo mais eficiente e economicamente viável. Futuras pesquisas nesse sentido são cruciais para explorar todo o potencial desses suportes promissores e inovadores na imobilização de glucoamilases.

6. Conclusões

O presente trabalho explorou a aplicação da impressão 3D na fabricação de suportes de PLA e suportes de geopolímero para a imobilização da glucoamilase de *Aspergillus niger* A7095, demonstrando a versatilidade da impressão 3D na criação de suportes personalizados para a imobilização de enzimas, abrindo novas possibilidades para otimização de processos biocatalíticos.

Os resultados obtidos indicam a possibilidade de reutilização da enzima, destacando-se a melhora da estabilidade frente ao pH ótimo de atividade observado pela imobilização em suportes de geopolímero e o melhor desempenho na hidrólise do amido obtido pelos derivados de PLA.

Nesse sentido, embora pesquisas futuras sejam necessárias para explorar as condições de imobilização e modificação dos suportes e da enzima, visando uma melhora da estabilidade dos derivados obtidos, o presente trabalho contribuiu não apenas para o avanço da ciência de imobilização enzimática, ao propor o uso de impressão 3D no design de novos suportes para imobilização de glucoamilases, mas também oferece soluções práticas para aumentar a eficiência e a sustentabilidade dos processos enzimáticos.

7. Referências

ADHIKARI, S.; PRAMANIK, N. Application of immobilized enzymes in the food industry. **Enzymes in Food Biotechnology**, [s. l.], p. 711–721, 2019.

AGGARWAL, S.; CHAKRAVARTY, A.; IKRAM, S. A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 167, p. 962–986, 2021.

AI, Y.; JANE, J.-L. Understanding Starch Structure and Functionality. In: SJÖÖ, Malin; NILSSON, Lars (org.). **Starch in Food: Structure, Function and Applications**. Seconded. [S. l.]: Woodhead Publishing, 2018. p. 151–178.

AKHOND, M.; PASHANGEH, K.; KARBALAEI-HEIDARY, H. R.; ABSALAN, G. Efficient Immobilization of Porcine Pancreatic α -Amylase on Amino-Functionalized Magnetite Nanoparticles: Characterization and Stability Evaluation of the Immobilized Enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 180, p. 954–968, 2016.

ALMEIDA, V. O.; PASCOAL, A. M.; FERREIRA, M. C.; MORAIS, R. R.; MORAES, M. G.; BATISTA, K. A.; FERNANDES, K. F. Molecular structure of amylopectin/amylose from *Solanum lycocarpum* starch after enzymatic hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 100, n. June 2019, p. 1–8, 2020.

AMIRBANDEH, M.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; GAILLARD, C. Triazine-functionalized chitosan-encapsulated superparamagnetic nanoparticles as reusable and robust nanocarrier for glucoamylase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 127, p. 119–127, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.001>.

ARBIGE, M. V.; SHETTY, J. K.; CHOTANI, G. K. Industrial Enzymology: The Next Chapter. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 1355–1366, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.010>.

ARULMURUGAN, S.; KAVITHA, H. P.; VENKATRAMAN, B. R. Biological activities of schiff base and its complexes: A review. **Rasayan Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 385–410, 2010.

ASLAN, Y.; SHARIF, Y. M.; SAHIN, O. Covalent immobilization of *Aspergillus niger* amyloglucosidase (ANAG) with ethylenediamine-functionalized and glutaraldehyde-activated active carbon (EFAAC) obtained from sesame seed shell. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 142, p. 222–231, 2020.

ASLAN, Yakup; SHARIF, Y. M.; ŞAHIN, Ö. Covalent immobilization of *Aspergillus niger* amyloglucosidase (ANAG) with ethylenediamine-functionalized and glutaraldehyde-activated active carbon (EFGAAC) obtained from sesame seed shell. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 142, p. 222–231, 2020.

BADOEI-DALFARD, A.; MALEKABADI, S.; KARAMI, Z.; SARGAZI, G. Magnetic cross-linked enzyme aggregates of Km12 lipase: A stable nanobiocatalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 141, p. 874–882, 2019.

BAIG, U.; GONDAL, M. A.; ALAM, M. F.; LASKAR, A. A.; ALAM, M.; YOUNUS, H. Enzyme immobilization and molecular modeling studies on an organic–inorganic polypyrrole–titanium(IV)phosphate nanocomposite. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 39, p. 6976–6986, 2015.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015.

BASSO, A.; SERBAN, S. **Industrial applications of immobilized enzymes—A review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019.

BENAMIA, F.; BENOUIS, S.; BELAFRIEKH, A.; SEMACHE, N.; REBBANI, N.; DJEGHABA, Z. Efficient *Candida rugosa* lipase immobilization on Maghnite clay and application for the production of (1R)-(2)-Menthyl acetate. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 71, p. 785–793, 2017.

BERTOFT, E. Understanding Starch Structure: Recent Progress. **Agronomy**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 56, 2017.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 6, p. 151–160, 2002.

BILAL, M.; ASGHER, M.; CHENG, H.; YAN, Y.; IQBAL, H. M. N. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 202–219, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1531822>.

CHEN, N.; ZHANG, C.; LIU, Y.; DONG, X.; SUN, Y. Cysteine-modified poly(glycidyl methacrylate) grafted onto silica nanoparticles: New supports for significantly enhanced performance of immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 145, p. 137–144, 2019.

CORNETT, C. A. G.; FANG, T.-Y.; REILLY, P. J.; FORD, C. Starch-binding domain shuffling in *Aspergillus niger* glucoamylase. **Protein Engineering, Design and Selection**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 521–529, 2003.

CRABB, W. D.; MITCHINSON, C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 349–352, 1997.

DA COSTA LUCHIARI, I.; CEDENO, F. R. P.; DE MACÊDO FARIAS, T. A.; PICHELI, F. P.; DE PAULA, A. V.; MONTI, R.; MASARIN, F. Glucoamylase Immobilization in Corncob Powder: Assessment of Enzymatic Hydrolysis of Starch in the Production of Glucose. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 5491–5504, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01379-0>.

DABA, T.; KOJIMA, K.; INOUE, K. Chemical modification of wheat β -amylase by trinitrobenzenesulfonic acid, methoxypolyethylene glycol, and glutaraldehyde to improve its thermal stability and activity. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 53, n. 6–7, p. 420–426, 2013.

DATTA, S.; CHRISTENA, R. L.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [s. l.], v. 3, p. 1–9, 2013.

DÍAZ-RODRIGUEZ, A.; DAVIS, B. G. Chemical modification in the creation of novel biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 211–219, 2011.

DOMINGUES, O.; REMONATTO, D.; DOS SANTOS, L. K.; MARTINEZ-GALÁN, J. P.; FLUMIGNAN, D. L.; DE PAULA, A. V. Evaluation of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles in Enzymatic/Chemical

Hydroesterification for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 194, p. 5419–5442, 2022.

DOS SANTOS, L. K.; BOTTI, R. F.; INNOCENTINI, M. D. de M.; MARQUES, R. F. C.; COLOMBO, P.; DE PAULA, A. V.; FLUMIGNAN, D. L. 3D printed geopolymer: An efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 414, p. 128843, 2021.

EMRUZI, Z.; AMINZADEH, S.; KARKHANE, A. A.; ALIKHAJEH, J.; HAGBEEN, K.; GHOLAMI, D. Improving the thermostability of *Serratia marcescens* B4A chitinase via G191V site-directed mutagenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 116, p. 64–70, 2018.

FANG, X.; WANG, X.; LI, G.; ZENG, J.; LI, J.; LIU, J. SS-mPEG chemical modification of recombinant phospholipase C for enhanced thermal stability and catalytic efficiency. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 111, p. 1032–1039, 2018.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 107, p. 367–392, 2016.

FRANCHIN, G.; SCANFERLA, P.; ZEFFIRO, L.; ELSAYED, H.; BALIELLO, A.; GIACOMELLO, G.; PASETTO, M.; COLOMBO, P. Direct ink writing of geopolymeric inks. **Journal of the European Ceramic Society**, [s. l.], v. 37, p. 2481–2489, 2017.

FRASER, N. J.; LIU, J.-W.; MABBITT, P. D.; CORREY, G. J.; COPPIN, C. W.; LETHIER, M.; PERUGINI, M. A.; MURPHY, J. M.; OAKESHOTT, J. G.; WELK,

M.; JACKSON, C. J. Evolution of Protein Quaternary Structure in Response to Selective Pressure for Increased Thermostability. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 11, p. 2359–2371, 2016.

FROTA, E. G.; SARTOR, K. B.; BIDUSKI, B.; MARGARITES, A. C. F.; COLLA, L. M.; PICCIN, J. S. Co-immobilization of amylases in porous crosslinked gelatin matrices by different reticulations approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 165, p. 1002–1009, 2020.

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

GEORGE, R.; SUGUNAN, S. Synthesis and characterization of immobilized glucoamylase on mesocellular foams through spectroscopic techniques and catalytic activity of immobilized enzyme. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 50, p. 107–112, 2021. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.06.245>.

GKANTZOU, E.; SKONTA, A.; TSAKNI, A.; POLYDERA, A.; MOSCHOVAS, D.; SPYROU, K.; AVGEROPOULOS, A.; GOURNIS, D.; HOUHOULA, D.; STAMATIS, H. 3D printed PLA enzyme microreactors: Characterization and application for the modification of bioactive compounds. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 350, p. 75–85, 2022.

GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ROCHA-MARTIN, J.; MORENO-GAMERO, D. Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**,

[s. l.], v. 35, p. 100593, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100593>.

GUISAN, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; BOLIVAR, J. M.; ROCHA-MARTIN, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G. The science of enzyme immobilization. *In*:

GUISAN, Jose M.; BOLIVAR, Juan M.; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; ROCHA-MARTIN, Javier (org.). **Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols**. 4th. ed. [S. l.: s. n.], 2020. p. 1–26.

GUMEL, A. H.; BALA, M.; SHEHU, A.; ADAM, I. K.; NASIDI, M.; MUHAMMAD, I. U.; IMAM, A. A. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Cocoyam. **Annual Research & Review in Biology**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1–9, 2018.

HAMID, B.; BASHIR, Z.; YATOO, A. M.; MOHIDDIN, F.; MAJEED, N.; BANSAL, M.; POCZAI, P.; ALMALKI, W. H.; SAYYED, R. Z.; SHATI, A. A.; ALFAIFI, M. Y. Cold-Active Enzymes and Their Potential Industrial Applications—A Review. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 18, p. 5885, 2022.

HASSAN, M.; MISRA, M.; TAYLOR, G. W.; MOHANTY, A. K. A Review of AI for optimization of 3D Printing of Sustainable Polymers and Composites. **Composites Part C: Open Access**, [s. l.], p. 100513, 2024.

HASSAN, M. E.; YANG, Q.; XIAO, Z. Covalent immobilization of glucoamylase enzyme onto chemically activated surface of κ-carrageenan. **Bulletin of the National Research Centre**, [s. l.], v. 43, n. 1, 2019.

HETTIARACHCHY, N. S.; FELIZ, D. J.; EDWARDS, J. S.; HORAX, R. The use of immobilized enzymes to improve functionality. *In*: PROTEINS IN FOOD PRECESSING. [S. l.: s. n.], 2018. p. 559–597.

HOBBS, L. Sweeteners from Starch: Production, Properties and Uses. *In*: STARCH: CHEMISTRY AND TECHNOLOGY. [S. l.: s. n.], 2009. p. 797–832.

HSIEH, Y.-P.; LIN, S.-C. Effect of PEGylation on the activity and stability of horseradish peroxidase and L-N-carbamoylase in aqueous phases. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 1372–1378, 2015.

JANECEK, S.; SVENSSON, B. How many α -amylase GH families are there in the CAZy database?. **Amylase**, [s. l.], v. 6, p. 1–10, 2022.

JEMLI, S.; AYADI-ZOUARI, D.; BEN HLIMA, H.; BEJAR, S. Critical Reviews in Biotechnology Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Crit Rev Biotechnol**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 246–258, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ibty20http://informahealthcare.com/bty>. Acesso em: 29 jul. 2021.

JENSEN, T.; ABDELMALEK, M. F.; SULLIVAN, S.; NADEAU, K. J.; GREEN, M.; RONCAL, C.; NAKAGAWA, T.; KUWABARA, M.; SATO, Y.; HANG, D.-H.; TOLAN, D. R.; SANCHEZ-LOZADA, L. G.; ROSEN, H. R.; LANASPA, M. A.; DIEHL, A. M.; JOHNSON, R. J. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 68, p. 1063–1075, 2018.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, [s. l.], v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

KOSHLAND JR, D. . STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. **Biological Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 416–436, 1953.

KOUKOUVITI, E.; KOKKINOS, C. 3D printed enzymatic microchip for multiplexed electrochemical biosensing. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1186, p. 339114, 2021.

KUMAR, S.; CHAKRAVARTY, S. Amylases. *In*: NUNES, Carlos Simões; KUMAR, Vikas (org.). **Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and perspectives**. [S. l.]: Academic Press, 2018. p. 163–180.

KUMAR, N. S. M.; KISHORE, V.; MANONMANI, H. K. Chemical modification of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. for improved activity and thermal stability. **Preparativa Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 433–450, 2014.

KUMAR, S.; NATH, P.; BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; BHATTACHARJEE, R.; SATYANARAYANA, T. Diversity and biotechnological applications of microbial glucoamylases. *In*: GOYAL, Arun; SHARMA, Kedar (org.). **Glycoside Hydrolases Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology A volume in Foundations and Frontiers in Enzymology**. [S. l.: s. n.], 2023. p. 365–387.

LEE, J.; PAETZEL, M. Structure of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Acta Crystallographica**, [s. l.], v. 67, p. 188–192, 2011.

LEMOS, C. M.; FUCHS, E.; GOMES, E.; SILVA, R. Glucoamilase: Estrutura e Termoestabilização. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 31, p. 86–94, 2003.

LI, S.; ZHAO, S.; HOU, Y.; CHEN, G.; CHEN, Y.; ZHANG, Z. Polylactic Acid (PLA) Modified by Polyethylene Glycol (PEG) for the Immobilization of Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 190, p. 982–996, 2020.

LI, J.; ZHAO, R.; XU, Y.; WU, X.; BEAN, S. R.; WANG, D. Fuel ethanol production from starchy grain and other crops: An overview on feedstocks, affecting factors, and technical advances. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 188, p. 223–239, 2022.

LIU, S.; BILAL, M.; RIZWAN, K.; GUL, I.; RASHEED, T.; IGBAL, H. M. N. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 190, p. 396–408, 2021.

LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 102, p. 332–342, 2018.

LIU, J.; SHEN, X.; ZHENG, Z.; LI, M.; ZHU, X.; CAO, H.; CUI, C. Immobilization of laccase by 3D bioprinting and its application in the biodegradation of phenolic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 518–525, 2020.

LIU, Q.; XUN, G.; FENG, Y. The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 530–537, 2019.

LÓPEZ MARZO, A. M.; MAYORGA-MARTINEZ, C. C.; PUMERA, M. 3D-printed graphene direct electron transfer enzyme biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 151, p. 111980, 2020.

MARSHALL, R. O.; KOOL, E. R. Enzymatic Conversion of D-Glucose to D-Fructose. **Science**, [s. l.], v. 125, n. 3249, p. 648–549, 1957.

MIGNEALUT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C.

Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 709–802, 2004.

MINGUES, H.; SCHNEPEL, C.; BÖTTCHER, D.; WEISS, M. S.; SPROSS, J.; BORNSCHEUER, U. T.; SEWALD, N. Targeted Enzyme Engineering Unveiled Unexpected Patterns of Halogenase Stabilization. **ChemCatChem**, [s. l.], v. 12, p. 818–831, 2020.

MOHANAN, N.; SATYANARAYANA, T. Amylases. *In*: REFERENCE MODULE IN LIFE SCIENCES. ENCYCLOPEDIA OF MICROBIOLOGY. [S. l.: s. n.], 2019. p. 107–126.

MOLLER, M. S.; SVENSSON, B. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 40, p. 33–42, 2016.

MONAJATI, M.; TAMADDON, A. M.; YOUSEFI, G.; ABOLMAALI, S. S.; DINARVAND, R. Applications of RAFT polymerization for chemical and enzymatic stabilization of l-asparaginase conjugates with well-defined poly(HPMA). **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 43, p. 11564–11574, 2019.

MONDAL, S.; HALDER, S. K.; MONDAL, K. C. Fungal Enzymes for Bioconversion of Lignocellulosic Biomass. *In*: YADAV, A.; SIGH, S.; MISHRA, S.; GUPTA, A. (org.). **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. [S. l.: s. n.], 2019. p. 349–380.

MONDAL, S.; MONDAL, K.; HALDER, S. K.; THAKUR, N.; MONDAL, K. C. Microbial Amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 45, p. 102509, 2022.

MUKHERJEE, S.; KULKARNI, M.; KULKARNI, S.; NAIK, S. Covalent immobilization of amyloglucosidase on Tulsion® weak base anionic resin: optimization by Box-Behnken DOE followed by thermal characterization. **The Journal of Bioprocess Technology**, [s. l.], p. 293–302, 2013.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Facile synthesis of glucoamylase embedded metal-organic frameworks (glucoamylase-MOF) with enhanced stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 95, p. 511–519, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.084>.

NDOCHINWA, O. G.; WANG, Q.-Y.; AMADI, O. C.; NWAGU, T. N.; NNAMCHI, C. I.; OKEKE, E. S.; MONEKE, A. N. Current status and emerging frontiers in enzyme engineering: An industrial perspective. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, p. 32673, 2024.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 135–152, 2000.

PARKER, K.; SALAS, M.; NWOSU, V. C. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. **BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 71–78, 2010.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal Cellulases. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

PAZUR, J. H.; ANDO, T. The action of an amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 234, n. 8, p. 1966–1970, 1959.

PEREIRA, J. de C.; BOCCHINI, D. A.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; GOMES, J. E. G.; SANCHES, R. D. de O.; LIMA JUNIOR, D. S.; PEREIRA, W. E. S.; DA SILVA, G. O.; NASCIMENTO, C. E. de O. Microbial plant material–degrading enzymes: catalysis and application. *In*: INAMMUDIN, Tariq Altalhi; ALROOQI, Arwa (org.). **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science Natural Materials-Based Green Composites 2 : Biomass**. [S. l.: s. n.], 2023. p. 79–120.

PEREIRA, S. E.; FERNANDES, K. F.; ULHOA, C. J. Immobilization of *Cryptococcus flavus* α -amylase on glass tubes and its application in starch hydrolysis. **Starch**, [s. l.], v. 69, n. 3–4, p. 1600189, 2017.

POLIZELI, M. L. T. .; CARVALHO, C. .; POLIZELI, A. M. O sistema amilolítico. *In*: POLIZELI, M.L.T.M; SILVA, T.M. (org.). **Amilases Microbianas**. [S. l.]: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2016.

QUINTANILLA-GUERRERO, F.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A.; TINOCO, R.; GÓMEZ-SUÁREZ, M.; GARCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; REGALADO, C. Chemical modification of turnip peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 17, p. 8058–8065, 2008.

REICHERT, C.; BORCHARD, G. Noncovalent PEGylation, An Innovative Subchapter in the Field of Protein Modification. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 386–390, 2016.

REMONATTO, D.; FERRARI, B. R.; BASSAN, J. C.; MUSSAGY, C. U.; SANTOS-EBINUMA, V. de C.; DE PAULA, A. V. Utilization of Clay Materials as

Support for *Aspergillus japonicus* Lipase: An Eco-Friendly Approach. **Catalysts**, [s. l.], v. 11, n. 1173, 2021.

REMONATTO, D.; IZIDORO, B. F.; MAZZIERO, V. T.; CATARINO, B. P.; DO NASCIMENTO, J. F. C.; CERRI, M. O.; ANDRADE, G. S. S.; DE PAULA, A. V. 3D printing and enzyme immobilization: An overview of current trends.

Bioprinting, [s. l.], v. 33, p. e00289, 2023.

RINALDI, M.; CATERINO, M.; FERA, M.; MANCO, P.; MACCHIAROLI, R. Technology selection in green supply chains - the effects of additive and traditional manufacturing. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 282, p. 124554, 2021.

ROTH, C.; MOROZ, O. V.; ARIZA, A.; SKOV, L. K.; AYABE, K.; DAVIES, G. J.; WILSON, K. S. Structural insight into industrially relevant glucoamylases: flexible positions of starch-binding domains. **Acta Crystallographica**, [s. l.], v. 74, p. 463–470, 2018.

SAADI, M. A. S. .; MAGUIRE, A.; POTTACKAL, N. T.; THAKUR, S. H.; IKRAM, M.; HART, A. J.; AJAYAN, P. M.; RAHMAN, M. M. Direct Ink Writing: A 3D Printing Technology for Diverse Materials. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 34, p. 2108855, 2022.

SAHA, B. C.; ZEIKUS, J. G. Microbial glucoamylase: Biochemical and Biotechnological features. **Starch/Stärke**, [s. l.], v. 41, p. 57–64, 1989.

SAINI, R.; SINGH SAINI, H.; DAHIYA, A. Amylases: Characteristics and industrial applications. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1895–1871, 2017.

SEMENYUK, P.; TIAINEN, T.; HIETALA, S.; TENHU, H.; ASEYEV, V.;

MURONETZ, V. Artificial chaperones based on thermoresponsive polymers recognize the unfolded state of the protein. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 121, p. 536–545, 2019.

SHAO, Y.; GAN, N.; GAO, B.; HE, B. Sustainable 3D-printed β -galactosidase immobilization coupled with continuous-flow reactor for efficient lactose-free milk production. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 481, p. 148557, 2024.

SHAO, Y.; LIAO, Z.; GAO, B.; HE, B. Emerging 3D Printing Strategies for Enzyme Immobilization: Materials, Methods, and Applications. **ACS Omega**, [s. l.], v. 7, p. 11530–11543, 2022.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [s. l.], v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.

SINDHU, R.; BINOD, P.; MADHAVAN, A.; BEEVI, U. S.; MATHEW, A. K.; ABRAHAM, A.; PANDEY, A.; KUMAR, V. Molecular improvements in microbial alpha-amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 245, p. 1740–1748, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.098>.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 260, p. 395–403, 2018.

SONG, J. E.; SONG, W. S.; YEO, S. Y.; KIM, H. R.; LEE, S. H. Covalent immobilization of enzyme on aminated woven poly (lactic acid) via ammonia plasma: evaluation of the optimum immobilization conditions. **Textile Research**

Journal, [s. l.], v. 87, n. 10, 2017.

SOUZA, L. T. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *In*: RESENDE, Rodrigo R. (org.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. [S. l.]: Blucher, 2016. p. 529–568.

SOY, E.; PYESHKOVA, V.; ARKHYPOVA, V.; KHADRO, B.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; SACCO JR, A.; DZYADEVYCH, S. V.; KURÇ, B. A. POTENTIALITIES OF ZEOLITES FOR IMMOBILIZATION OF ENZYMES IN CONDUCTOMETRIC BIOSENSORS. **Sensor Electronic and Microsystem Technologies**, [s. l.], v. 7, p. 28–35, 2014.

SU, C.-K.; YEN, S.-C.; LI, T.-W.; SUN, Y.-C. Enzyme-Immobilized 3D-Printed Reactors for Online Monitoring of Rat Brain Extracellular Glucose and Lactate. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 88, n. 12, p. 6265–6273, 2016.

SURIYA, J.; BHARATHIRAJA, S.; KRISHNAM, M.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. K. Marine microbial amylases properties and applications. *In*: KIM, Se-Kwon; TOLDRÁ, Fidel (org.). **Advances in Food and Nutrition Research**. [S. l.: s. n.], 2016. p. 161–177.

SYED, F.; ALI, K.; ASAD, M. J.; FRAZ, M. G.; KHAN, Z.; IMRAN, M.; TAJ, R.; AHMAD, A. Preparation and characterization of a green nano-support for the covalent immobilization of glucoamylase from *Neurospora sitophila*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 162, p. 309–317, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.002>.

TANIGUCHI, H. Maltohexaose-Producing Amylase of *Bacillus circulans* F—2. *In*: BIOTECHNOLOGY OF AMYLODEXTRIN OLIGOSACCHARIDES. [S. l.: s. n.], 1991.

TARDIOLI, P. W.; VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M. S.; ZANIN, G. M.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization-stabilization of glucoamylase: Chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 409–412, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.011>.

UNICA. **Acompanhamento quinzenal da safra na região Centro-Sul**. [S. l.: s. n.], 2024.

VAIDYA, L. B.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Biological metal organic framework (bio-MOF) of glucoamylase with enhanced stability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 193, n. December 2019, 2020.

VIHINEN, M.; MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 24, p. 329–418, 1989.

VILLA, C. C.; VALENCIA, G. A.; CÓRDOBA, A. L.; ORTEGA-TORO, R.; AHMED, S.; GUTIÉRREZ, T. J. Zeolites for food applications: A review. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 46, p. 101577, 2022.

VUILLEUMIER, S. Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructose. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 733S-736S, 1993.

WAHAB, R. A.; ELIAS, N.; ABDULLAH, F.; GHOSHAL, S. K. **On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.

WALKER, R. W.; DUMKE, K. A.; GORAN, M. I. Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. **Nutrition**, [s. l.], v.

30, n. 7–8, p. 928–935, 2014.

WANG, D.; JIANG, W. Preparation of chitosan-based nanoparticles for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 126, p. 1125–1132, 2019.

WHITE, J. S.; HOBBS, L. J.; FERNANDEZ, S. Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 39, p. 176–182, 2014.

WONG, J. K. H.; TAN, H. K.; LAU, S. Y.; YAP, P. S.; DANQUAH, M. K. Potential and challenges of enzyme incorporated nanotechnology in dye wastewater treatment: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2019.

WU, C.; ZHOU, G.; JIANG, X.; MA, J.; ZHANG, H.; SONG, H. Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 953–959, 2012.

XU, Y.; WANG, D. Integrating starch substrate into cellulosic ethanol production to boost ethanol titers and yields. **Applied Energy**, [s. l.], v. 195, p. 196–203, 2017. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.03.035>.

YAZGAN, I.; TURNER, E. G.; CRONMILLER, L. E.; TEPE, M.; OZTURK, TAYLAN, K.; ELIBOL, M. Modification of chitosan-bead support materials with L-lysine and L-asparagine for α -amylase immobilization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 41, n. 423–434, 2017.

ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics,

properties, practical utility. **Catalysts**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2018.

ZHANG, J.; DING, S.; GE, Y.; LI, Z. Enhanced removal of crystal violet in water using a facile-fabricated and environmental-friendly laccase immobilized composite membrane. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 98, p. 122–130, 2020.

ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes. **ACS Catalysis**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 4503–4513, 2015.

ZHAO, B.; DENG, X.; HE, Y.; XIAO, P.; DHMEES, A. S.; CUI, X. Carbonic anhydrase immobilized on Zn(II)-geopolymer membrane for CO₂ capture. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 208, p. 109364, 2024.

ZHAO, Y.-Z.; YU, W.-L.; ZHENG, H.; GUO, X.; GUO, N.; HU, T.; ZHONG, J. Y. PEGylation with the thiosuccinimido butylamine linker significantly increases the stability of haloalkane dehalogenase DhaA. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 254, p. 25–33, 2017.

ZHU, D.; WU, Q.; HUA, L. Industrial Enzymes. *In*: MOO-YOUNG, M. (org.).

Comprehensive Biotechnology (Third Edition). [S. l.]: Pergamon, 2019. p. 1–13.

ZHUANG, J.; ZHU, J.; CHEUNG, P. C. K.; LI, C. The physical and chemical interactions between starch and dietary fiber: Their impact on the physicochemical and nutritional properties of starch. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 149, p. 104566, 2024.

ZIERO, H. D.; BERNI, M. D.; BULLER, L. S.; VASCONCELOS, L. G.;

DORILEO, I. L.; MUDHOO, A.; FORSTER-CARNEIRO, T. Foresight for corn-to-ethanol mills in the Southern Brazilian Amazon: Energy, economic and environmental analysis. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s.

l.], v. 9, n. 6, p. 106740, 2021.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. **Molecules**, [*s. l.*], v. 19, n. 9, p. 14139–14194, 2014.