



Viviane Moriya Shiota

Secagem de celulases de origem fungica por *spray-drying*

São José do Rio Preto

2014

Viviane Moriya Shiota

Secagem de celulases de origem fungica por *spray-drying*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos na Área de concentração em Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto

2014

Shiota, Viviane Moriya
Secagem de celulases de origem fúngica por spray-drying/Viviane
Moriya Shiota.-- São José do Rio Preto, 2014.
115 f.: il ; gráfs., tabs.

Orientador: João Cláudio Thoméo
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Enzimas de fungos – Aplicações
industriais.. 3. Enzimas de fungos – Armazenamento. 4. Fungos
termofílicos. 5. Celulase. 6. Secagem em spray. I. Thoméo, João Cláudio.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU -663.18

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Viviane Moriya Shiota

Secagem de celulases de origem fungica por *spray-drying*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos na Área de concentração em Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Izabela Dutra Alvin

ITAL – Campinas

São José do Rio Preto

29 de maio de 2014

*“A alegria está na luta, na
tentativa, no sofrimento
envolvido. Não na vitória
propriamente dita”*

Mahatma Gandhi

Aos meus pais, Alvaro e Filomena,

aos meus irmãos Alvaro e Leticia e

a meus avós Ikue, Mutsumi e

Maria (in memoriam) pelo amor e

paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas graças concedidas e por todas as pessoas que colocaste em meu caminho durante este trabalho!

Ao meu querido orientador Prof. João Cláudio pela confiança depositada, compreensão, incentivos e ensinamentos compartilhados durante estes anos.

Aos meus pais, Alvaro e Filomena por caminharem sempre comigo me inspirando, orientando e pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Alvaro e Letícia, por serem antes de tudo melhores amigos.

Aos meus avós, Ikue, Mutsumi e Maria (*in memoriam*) pelo imenso amor e cuidado.

À minha tia Teresa e seus filhos Márcio, Lelo e Vanessa pelo grande apoio nestas ultimas etapas.

Ao meu namorado, Bruno, pela maravilhosa companhia, amor, paciência e incentivo.

Aos meus irmãos - “Filhos do João Cláudio”: Carol, Isabela, Eduardo, Teresa, Juliana, Fernanda, Lina e Fabrício, por estarem sempre ao meu lado, compartilhando das dificuldades e conquistas, tornando mais agradável os dias de trabalho. Muito obrigada por extrapolarem nossa convivência para além do laboratório e tornarem esses anos inesquecíveis!

À minha amiga e aluna de iniciação científica, Camila, pela companhia, dedicação e amizade. Sua ajuda foi indispensável para realização deste trabalho!

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada pelo auxílio com equipamentos e análises, em especial ao Pedro e ao Diego pelas infinitas ajudas, à Márcia pelos esclarecimentos com o fungo e à Christiane pelas análises de MEV.

À Katieli, muito obrigada pelo ombro amigo, pelos incentivos, pela companhia nos treinos, nos finais de semana, e por tudo que você me ensinou!

Às minhas companheiras de apartamento, pelos momentos alegres, pelos deliciosos cafés da tarde, e em especial a minha baianinha preferida, Daniela, por ser imenso coração, sempre dispostos a destacar o melhor das coisas!

À Fapesp pelo suporte financeiro.

A todos os professores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos e do Departamento de Química Ambiental pelos ensinamentos!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

Enfim, a todos meu sincero ~~MUITO~~ OBRIGADO”!

RESUMO

Este trabalho visou dar tratamento tecnológico a extratos enzimáticos ricos em endoglucanases obtidos por cultivo em estado sólido (CES) do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M77, através da secagem por *spray-drying*. A fim de garantir a estabilidade das enzimas durante um período de armazenamento, o extrato enzimático bruto (EEB) foi seco em *spray-dryer* sendo investigados os parâmetros operacionais e os adjuvantes de secagem para garantir a maior retenção da atividade enzimática após a secagem. Os ensaios foram divididos entre discriminação do adjuvante que proporcionasse maior proteção às enzimas, otimização das condições de secagem, armazenamento do EEB e dos pós secos, avaliação do efeito da secagem sobre as propriedades físico-químicas das endoglucanases e morfologia dos pós. Utilizou-se de planejamentos estatísticos para analisar os efeitos das variáveis temperatura de saída do ar de secagem, vazão de alimentação de solução, proporção entre o EEB e adjuvante, e teor de sólidos na formulação, sendo as respostas retenção de atividade enzimática e umidade dos pós. Nos ensaios de discriminação foi selecionado o adjuvante goma arábica. Em seguida, nos ensaios para otimização das condições de secagem, foi identificado menor vazão de alimentação e menores temperaturas de saída do ar de secagem para maiores retenções de atividade enzimática e maiores temperaturas e menores vazões para menores teores de umidade dos pós, o teor de sólidos revelou-se não significativo. O pó obtido nas condições mais favorável e menos favorável para a retenção da atividade enzimática foi armazenado à temperatura ambiente e sob refrigeração e a atividade enzimática determinada quinzenalmente. A análise estatística revelou não haver diferença na retenção da atividade enzimática após longos períodos para ambas as condições de secagem selecionadas e alternativas de armazenamento. Investigou-se também a influencia do pH e temperatura na atividade enzimática antes e

depois da secagem, observando que estas características não eram afetadas pela adição dos adjuvantes e nem pelo processo de secagem. Em relação à morfologia das partículas, a análise por adsorção de gás inerte sobre os pós indicou maior área superficial para o pó obtido na condição menos favorável à secagem.

Palavras-chave: *Spray-dryer*, Endoglucanase, Adjuvantes, Armazenamento.

ABSTRACT

This work aimed to provide technological treatment to enzymatic extract rich in endoglucanase, obtained by solid state culture using the fungus *Myceliophthora thermophila* M77, through spray-drying. Operational parameters and adjuvants were varied in order to obtain stable enzymes with high activities during storage. The experiments were divided into adjuvant discrimination, optimization of the drying conditions, storage of the raw enzymatic extract (REE) and powders, evaluation of drying on the physical-chemical characteristics of the endoglucanase, and powder morphology. Statistical experimental designs were used to evaluate the effect of the variables exit air temperature, solution flow rate, proportion REE/adjuvant, and total solid content on the enzyme activity retention and powder moisture content. The adjuvant Arabic gum was selected from the discrimination assays. From the optimization experiments, it was determined that the lower flow rate and air exit temperature resulted in the highest enzyme activity retention, while low temperature and solution flow rate resulted in the lowest retention. The total solid concentration was not statistically significant. The powders produced in the Best and in the worst drying conditions were stored at room temperature and under refrigeration and the enzymatic activity was measured at 15 days intervals. The statistical analysis did not show any difference in the enzymatic activity retention after long periods of storage for both drying conditions and both storage alternatives. The influence of temperature and pH on the enzyme activity was also investigated before and after the drying process, and it was noticed that these physical-chemical properties were not affected by the adjuvants and by the drying process. The morphology of the powders, obtained using the inert gas adsorption method, indicated that the powder obtained under the worst drying condition

presented specific superficial area twice as high than the powder obtained in the best condition.

Key-words: Spray-dryer, endoglucanase, adjuvants, storage

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Diagrama esquemático da secagem em mini <i>spray-dryer</i> .	13
Figura 1.2 -	Morfologia de partículas secas em <i>spray dryer</i> .	19
Figura 3.1 -	Embalagem de polipropileno para ces com o fungo <i>Myceliophthora themophila</i> M77 após o período de incubação de 96 h na DBO a 45 °C.	23
Figura 3.2 -	Secador <i>spray-dryer</i> empregado nos ensaios de discriminação de adjuvantes e otimização das condições de secagem (A)- Vista geral do equipamento com sua bomba peristáltica original; (B)- Bomba peristáltica substituta.	25
Figura 4.1 -	Amostra do extrato enzimático bruto e celulose microcristalina: em suspensão (A) e decantada (B).	34
Figura 4.2 -	Gráfico - Atividade relativa dos E.E.B. secos por <i>spray dryer</i> armazenados em <i>freezer</i> doméstico.	36
Figura 4.3 -	Secagem do E.E.B. no <i>spray dryer</i> sem adição de adjuvantes. Destaques: Schott e ciclone ao final da secagem.	38
Figura 4.4 -	Média das atividades residuais de endoglucanase para cada um dos fatores analisados nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	42
Figura 4.5 -	Variação da variável de resposta atividade residual de xilanase em função dos níveis das variáveis controladas, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	44
Figura 4.6 -	Média das umidades finais dos pós para cada um dos fatores analisados nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	46
Figura 4.7 -	Curvas de contorno quadráticas para as atividades enzimáticas residuais para soluções reconstituídas a partir de pós secos em <i>spray-dryer</i> nos ensaios de otimização das condições de secagem com o adjuvante goma arábica.	54
Figura 4.8 -	Curvas de contorno quadrática para a umidade final para o pós obtidos em <i>spray-dryer</i> nos ensaios de otimização das condições de secagem	60

empregando o adjuvante goma arábica

- Figura 4.9 -** Gráfico - Retenção da atividade endoglucanase do EEB líquido congelado e dos pós obtidos na melhor (A) e pior condições (B), armazenados sob refrigeração e no ambiente. 64
- Figura 4.10 -** Gráfico - Teor de umidade dos pós obtidos na “melhor” (A) e “pior” condição (B), armazenados sob refrigeração e à temperatura ambiente. 68
- Figura 4.11 -** Superfície resposta para a atividade endoglucanase das amostras EEB (A), controle-secagem (B), secas em *spray-dryer* (C). 75
- Figura 4.12 -** Aspecto das micrografias dos pós resultantes do EEB com goma arábica e Aerosil obtidos por *spray-drying* na melhor (A) e na pior condição (B) de secagem. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Planejamento estatístico fatorial multiníveis para a discriminação do adjuvante que proporcione maior retenção da atividade enzimática.	27
Tabela 3.2	Planejamento estatístico fatorial Box-Behnken para os ensaios de otimização das condições de secagem.	28
Tabela 3.3	Valores utilizados no planejamento estatístico fatorial para a avaliação do efeito da variação de temperatura e pH sobre a atividade de endoglucanase.	29
Tabela 4.1	Atividade relativa do extrato enzimático não centrifugado	32
Tabela 4.2	Atividade relativa para endoglucanase e xilanase, com goma arábica (GA) dissolvida em água e na solução contendo extrato enzimático bruto.	33
Tabela 4.3	Atividade enzimática do EEB. com MCC em suspensão e decantado	34
Tabela 4.4	Parâmetros operacionais e resultados obtidos nos ensaios discriminativos de secagem em <i>spray dryer</i> de extrato enzimático bruto acrescido de adjuvante.	39
Tabela 4.5	Análise de variância para resposta atividade endoglucanase, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	41
Tabela 4.6	Análise de variância para resposta atividade xilanase, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	43
Tabela 4.7	Análise de variância para resposta umidade nos ensaios de discriminação dos adjuvantes	45
Tabela 4.8	Valores observada para temperatura de entrada do ar conforme variação da vazão de alimentação.	47
Tabela 4.9	Valores codificados e respostas da atividade residual da endoglucanase e umidade final dos pós nos ensaios de otimização das condições de secagem.	50
Tabela 4.10	Equações das curvas de contorno para retenção de atividade	53

endoglucanase nos ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica.

Tabela 4.11	ANOVA para atividade residual endoglucanase para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica.	56
Tabela 4.12	ANOVA para umidade dos pós após secagem em <i>spray-dryer</i> para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica	58
Tabela 4.13	Equações das curvas de contorno para teor de umidade nos ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica.	59
Tabela 4.14	Relação entre temperatura de entrada do ar de secagem com a vazão de alimentação e teor de sólidos na formulação, para os ensaios de otimização de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica.	61
Tabela 4.15	Condições otimizadas para melhor % A.Re e menor % U ao final da secagem	62
Tabela 4.16	Teste Tukey (95%) para as amostras armazenadas e valores médio das A.Re. e respectivos desvios padrões (DP).	67
Tabela 4.17	Teste Tukey e os valores médios da U (%) com respectivos desvios padrão (DP) dos pós armazenados.	69
Tabela 4.18	Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo e atividade enzimática.	71
Tabela 4.19	Análise de variância dos ensaios para determinação da condição ótima de pH e temperatura para as atividades de endoglucanase.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.Re	Atividade Residual
ADJ	Adjuvante
Ae	Aerosil®
BET	Brunauer, Emmett e Teller
CBM	Carbohydrate-binding modules
CES	Cultivo em Estado Sólido
CMC	Carboximetil-celulose
DC	Domínio Catalítico
DNS	Ácido 3-5-dinitrosalicílico
EEB	Extrato Enzimático Bruto
GA	Goma Arábica
GL	Graus de Liberdade
LMBA	Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada
MCC	Celulose Microcristalina
MD	Maltodextrina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
P	Proporção extrato bruto e adjuvante
Q _{alim}	Vazão de alimentação da solução no <i>spray dryer</i>
SQ	Soma de Quadrados
ST	Sólidos Totais

T_e Temperatura de entrada do ar de secagem

T_s Temperatura de saída do ar de secagem

$U_{b,s}$ Teor de umidade em base seca

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 Celulase	3
1.2 Aplicações industriais	5
1.3 Produção de enzimas celulase por cultivo em estado sólido (CES)	9
1.4 Fungos produtores de celulase	10
1.5 Aporte tecnológico às enzimas	11
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Cultivo em Estado Sólido (CES)	22
3.2 Determinação da atividade endoglucanase e xilanase	24
3.3 Determinação da umidade e teor de sólidos	24
3.4 Secagem em <i>spray-dryer</i>	25
3.4.1 Ensaios discriminativos dos adjuvantes	26
3.5.2 Ensaios de otimização	27
3.5 Ensaios de armazenamento	28
3.6 Propriedades físico-químicas das endoglucanase	29
Morfologia dos pós por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
3.8 Morfologia dos pós por análise superficial específica	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1 Testes Preliminares	31
4.1.1 Influência da etapa de centrifugação	31

	no extrato enzimático	
4.1.2	Estudo preliminar para os ensaios de discriminação dos adjuvantes.	32
4.2	Ensaaios de secagem	35
4.2.1	Secagem do extrato enzimático bruto sem agentes de secagem	35
4.2.2	Ensaaios discriminativos dos adjuvantes	38
4.2.3	Ensaaios de otimização das condições de secagem	49
4.3	Ensaaios de armazenamento	63
4.4	Avaliação do efeito do pH e temperatura na atividade enzimática endoglucanase	70
4.5	Análises morfológicas	76
5	CONCLUSÕES	79
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO 1		95

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação ambiental e o conseqüente desenvolvimento de processos “verdes” têm incentivado o uso de enzimas nas aplicações industriais em substituição aos processos químicos tradicionais, uma vez que as enzimas possuem alta especificidade pelo substrato. Segundo a empresa de consultoria *The Freedonia Group* (2014) o mercado mundial de enzimas crescerá em torno de 6,4 % ao ano até 2017, resultado da soma de diversos setores econômicos, como de detergentes, alimentos, farmacêutico, alimentação animal, biocombustíveis e têxtil, dentre outros. Neste contexto, as hidrolases, enzimas que catalisam a quebra dos substratos na presença de moléculas de água, representam 75% das enzimas industriais, sendo uma parcela de 20% representada pelas celulasas (SHINGHANIA et al., 2010).

Atualmente o maior interesse comercial por enzimas fibrolíticas (celulasas, hemicelulasas e ligninases) é decorrente da necessidade de conversão de biomassa lignocelulósica em glicose, gerando produtos de valor agregado, como o etanol de segunda geração, e mitigando impactos ambientais, como o efeito estufa (PANDEY et al., 2011). Contudo a enzima, mesmo sendo promissora, não terá grande aplicabilidade se não for mantida estável durante o processamento, transporte e armazenamento no local de aplicação. Neste sentido, a busca de soluções tecnológicas que permitam a manutenção da atividade das enzimas por longos períodos e facilitem o armazenamento das mesmas é necessária e tem recebido atenção de pesquisadores e indústrias. Dentre as alternativas de processamento de extratos enzimáticos, a técnica de secagem por *spray – drying* é promissora devido ao baixo custo e à alta retenção da atividade enzimática. No entanto, estudos detalhados acerca dos melhores adjuvantes de secagem,

das condições operacionais ótimas e dos efeitos do armazenamento dos pós sobre as atividades enzimáticas residuais são escassos para estas classes de enzimas.

Neste sentido, neste trabalho, estudou-se a viabilidade de aplicação da técnica de secagem por *spray-drying* nas enzimas endoglucanase produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M77.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Celulase

As celulasas compreendem um grupo de biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares e constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo hidrólise das ligações glicosídicas β -1-4 na celulose.

Em geral, as celulasas são constituídas por dois domínios distintos, domínio catalítico (DC) e domínio de ligação à celulose (CBM – “carbohydrate-binding modules”). O CBM está relacionado à adsorção, visando facilitar a hidrólise da celulose, aproximando o DC do substrato insolúvel, permitindo o aumento da concentração de enzima sobre a superfície do substrato sólido por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas. (GILKES et al., 1991; TOMME et al., 1995; LYND et al., 2002).

Microrganismos, como fungos e algumas bactérias, secretam coquetéis de “enzimas livres”, que trabalham em sinergia para degradar o material lignocelulósico, difundindo independentemente uma das outras, e conforme sua especificidade ao substrato. (LEHTIO, et al., 2003). As “enzimas livres” constituem de uma unidade catalítica ou várias unidades catalíticas por molécula de proteína (RESCH et al., 2013), e possuem a capacidade de penetrar no substrato através de extensões de hifas. Por outro lado, as enzimas secretadas por algumas bactérias, não têm a capacidade para penetrar com eficácia no material celulósico, tendo desenvolvido um sistema enzimático complexado (ou celulosoma), onde várias enzimas são fisicamente ligadas através de uma proteína “esqueleto” (BAYER et al, 1998; RESCH et al., 2013). Segundo Resch e colaboradores (2013), existem diferença na organização dos DC e CBMs das “enzimas

livres” e dos celulosomas, o que reflete sobre a ação em diferentes substratos, tendo as –enzimas livres” melhor desempenho na degradação da biomassa tratada termicamente e os celulosomas, sobre a celulose não tratada.

As etapas da degradação enzimática da celulose não são totalmente conhecidas, mas sabe-se que o complexo celulósico –livre” secretado por fungos filamentosos engloba três enzimas que atuam em sinergia, as Endoglucanases ou CMCase (ou 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4)); Exoglucanases, que inclui as celodextrinases (ou 1,4- β -D-glucano glucanohidrolases (EC 3.2.1.74)), e as celobiohidrolases (ou 1,4- β -D-glucan-celobiohidrolases (EC 3.2.1.91)); e β -glicosidases (ou β -glucósido-glucohidrolases (EC 3.2.1.21)).

Endoglucanase/CMCase (EnD): Clivam aleatoriamente as regiões internas amorfas da cadeia polissacarídica da celulose, liberando oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização, produzindo novos terminais. (LYND et al., 2002).

Exoglucanases (EXG): Apresentam ação sinérgica com endoglucanases, atuam nas extremidades da celulose, redutoras ou não redutoras, liberando subunidades de quatro ou seis celobioses (ROUVINEN et al., 1990), podendo sofrer inibição por estas. A glucanohidrolase (GH) catalisa a hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas nas unidades de glicose de terminais não redutores da cadeia (BHAT;BHAT, 1997), enquanto que a celobiohidrolase (CHB) é catalisadora da hidrólise de resíduos da celulose com terminais redutores e não redutores.

β -glicosidase: Catalisam a hidrólise de celobiose gerada pelas EXG e EnD e oligossacarídeos solúveis à glicose. A β -glicosidase é geralmente responsável pela regulação do processo celulolítico, sendo um fator limitante durante a hidrólise enzimática da celulose, uma vez que a atividade das endoglucanases e celobiohidrolases é muitas vezes inibidas pela celobiose, sendo assim a β -glicosidase produz glicose a

partir da celobiose, e reduz a inibição, permitindo maior eficiência as enzimas celulolíticas. Entretanto, as β -glicosidases podem também sofrer inibição pelo produto, a glicose (SAHA et al., 1994; LYND et al., 2002).

As celulases podem atuar em quatro formas de sinergismo: (i) a sinergia endo-exo entre endoglucanases e exoglucanases; (ii) a sinergia exo-exo entre exoglucanases no processamento de extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose; (iii) a sinergia entre exoglucanases e β -glucosidases, que a celobiose (e celodextrinas) como os produtos finais das duas primeiras enzimas; (iv) sinergismo intramolecular dos domínios catalíticos e CBMs (LYND et al., 2002).

Juntamente com as celulases, são co-produzidas as hemicelulases. A estrutura da xilana apresenta-se heterogênea e complexa, requerindo um sistema multienzimático com diferentes especificidades. No sistema xilanolítico as principais enzimas envolvidas são as β -1,4-endoxilanases, β -D-xilosidases, que degradam a cadeia principal da xilana (BIELY, 1985; PRADE, 1995; BEG et al., 2001) e as α -glucuronidases, α -L-arabinofuranosidases e acetilesterases que degradam as cadeias laterais (BIELY, 1985).

1.2. Aplicações industriais

Indústria Têxtil:

Celulases são amplamente empregadas no tratamento *“biopolishing”* ou bioacabamento, que representa a remoção de microfibrilas superficiais da fibra de algodão (*penugens*) que se projetam das fibras principais, facilitando o tingimento, visto que o pré-tratamento dos tecidos de algodão reduz os problemas relacionados com fibras imaturas, que não captam a mesma quantidade de corante como as maduras. As

celulases removem as fibras salientes conferindo aparência uniforme, alteram as propriedades de absorção e umidade dos tecidos devido a desfibrilação do algodão e aumentam a suavidade, maciez e brilho do tecido de algodão, assim com também reduzem o encolhimento no caso dos tecidos de lã (CEGARA, 2000; CONTRERAS, 2001; LIPP-SYMONOWICZ et al., 2004; SARAVANAN et al., 2009).

Outra aplicação de destaque refere-se ao “*biostoning*”, onde a celulase substitui o uso das pedra-pomes no desbotamento e diminui a resistência à flexão melhorando o toque do tecido. Entretanto, a utilização de celulase apresenta o inconveniente de redepositar, sobre o fio branco ou no fio tingido do *denim*, o índigo removido, diminuindo o contraste desejado entre a trama e o urdume. Este problema é conhecido como *backstaining*. Dentre as celulases as ácidas são as que causam *backstaining* em níveis não aceitáveis sendo, portanto enzimas de caráter neutro e básico preferidas na indústria têxtil (MIETTINEN-OINONEN, et al., 2004). As celulases neutras utilizadas para obter efeitos mais acentuados em tratamentos mais intensos (55 °C / 60 min), e as ácidas para tratamentos rápidos (45-55 °C / 30 min). (CEGARA, 2000).

Indústria de Detergentes:

A aplicação de enzimas na formulação de detergentes substitui o uso de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e que provocam o desgaste de materiais e de instrumentos. Os principais tipos de enzimas utilizadas em detergentes incluem amilases, proteases, lipases e celulases (MITIDIERE, 2002).

As celulases são incluídas em muitos detergentes em pó, especialmente aqueles que são ativos na faixa alcalina, por conferirem ao produto propriedades que possibilitam a modificação da estrutura de fibras de celulose encontradas no algodão. As celulases são comumente adicionadas aos detergentes para limpeza de tecidos contribuindo para a eficiência da lavagem, conferindo alisamento do tecido através da

remoção de microfibras, preservam também a vivacidade das cores com um efeito amaciante. (MITIDIÈRE, 2002; PANDEY et al., 2011).

Indústria de alimentos:

Sucos e néctar: Em meados de 1930, a indústria de sucos encontrou na aplicação das celulasas, pectinases e hemicelulasas o aumento do rendimento e a clareza necessária aos sucos. A celulase juntamente com hemicelulase e pectinase são denominadas enzimas de maceração, sendo aplicadas em duas etapas do processo:

- após o esmagamento, na maceração da polpa da fruta ou na liquefacção parcial ou completa, aumentando o rendimento, reduzindo o tempo de processamento do suco, e melhorando a extracção de componentes valiosos da fruta;
- depois da extração de sumo, as pectinases são utilizadas para a clarificação, diminuindo a viscosidade de sumo de fruta antes da concentração, aumentando a taxa de filtração e estabilidade do produto final. (BHAT, 2000).

As enzimas de maceração também são aplicadas na indústria de néctar e pures visando melhor estabilidade, textura e facilidade de concentração, assim como também na extração de carotenóides para a produção de corantes alimentares (PANDEY et al., 2011).

Óleo de oliva: Na década de 80 estudos revelaram que o uso das enzimas pectinase, celulase e hemicelulase tornavam a produção de óleo a partir das azeitonas mais eficiente. Outros benefícios do uso de enzimas de maceração são a obtenção de um óleo com níveis elevados de anti-oxidantes e vitamina E, indução lenta da rancidez, melhor fracionamento por centrifugação do mosto oleoso e baixo teor de óleo nas águas residuais (BHAT, 2000).

Indústria de papel e celulose:

Celulases e hemicelulases tem sido aplicadas visando modificações nas propriedades das fibras da pasta de papel e assim melhorando a operação dos moinhos, descoloração das fibras recicladas, a partir da hidrólise parcial dos carboidratos (BHAT, 2000). Recentemente as celulases tem sido utilizadas na preparação de papelão facilmente biodegradável, onde uma formulação estável de enzima é adicionada durante o processo de fabricação, sendo ativada quando entra em contato com umidade, ajudando a acelerar a degradação do cartão. A celulase é também empregada na fabricação de papel macio, como papel toalha e papel higiênico (PANDEY et al., 2011).

Biocombustível:

Os biocombustíveis são produzidos a partir de culturas alimentares, como cana-de-açúcar, milho, beterraba e soja. No Brasil o etanol produzido a partir da sacarose do caldo de cana-de-açúcar é denominado Etanol de Primeira Geração e o Etanol de Segunda Geração ou Celulósico é obtido a partir da conversão dos compostos poliméricos presentes no material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis. A produção de etanol celulósico envolve quatro etapas: pré-tratamento do material lignocelulósico, para a deslignificação do material; hidrólise dos carboidratos, onde ocorre a liberação dos açúcares fermentescíveis; fermentação etanólica e destilação.

Entre as tecnologias para a conversão da celulose em açúcar está a hidrólise química, que utiliza um ácido ou uma base (concentrada ou diluída) e a hidrólise enzimática, que utiliza enzimas hidrolíticas. A hidrólise enzimática tem se destacado como a rota mais promissora, visto que apresenta taxa de hidrólise superior a rota química, devido a elevada especificidade, além de ocorrer em condições operacionais mais brandas, como pressão, temperatura e pH, não geram resíduos agressivos, eliminando assim a etapa de tratamento dos mesmos. Apesar da utilização comercial da rota enzimática apresentar dificuldades econômicas, devido ao custo elevado das

enzimas fibrolíticas, obtêm-se economias no processo, do ponto de vista energético, e metalúrgico, já que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres (FARINAS, 2008, CASTRO;PEREIRA, 2010).

1.3. Produção das enzimas celulase por cultivo em estado sólido (CES)

Uma opção para a redução dos custos da produção das enzimas está na possibilidade de usar resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido, principalmente em nível nacional. O Brasil se destaca por dispor de uma grande variedade de resíduos agroindustriais e agrícolas, como os oriundos da indústria de papel e celulose, derivados da madeira (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana e palha), culturas de trigo (palha e farelo de trigo), milho (casca e sabugo), arroz (cascas), laranja (bagaço) (RAMOS, 2003). O cultivo em estado sólido (CES) envolve o crescimento de microorganismos, geralmente fungos filamentosos em meio sólido insolúvel, o qual age como suporte físico e/ou fonte de nutrientes para os microorganismos. A quantidade de água no sistema é suficiente para garantir o crescimento microbiano e as atividades metabólicas das células. Os espaços entre as partículas sólidas contêm uma fase gasosa contínua e um mínimo de água, podendo haver gotículas de água entre as partículas, e películas de água na superfície destas, porém a fase aquosa entre as partículas é descontínua e a maior parte do inter-espço é preenchido por partículas da fase gasosa. A maior parte da água no sistema é absorvido no interior das partículas sólidas. (DURAND et al., 1988; SINGHANIA et al, 2009; MITCHELL et al., 2005; RODRIGUEZ, 2005; RANI et al., 2009).

Quando comparada com o cultivo submerso, o em estado sólido se destaca por melhor produção de enzimas, possibilidade do uso de resíduos agroindustriais como substrato, menor consumo de água, o que possibilita usar um reator de menor volume; apresentam condições de cultivo similares ao habitat natural dos microorganismos empregados, especialmente os fungos. Entretanto as desvantagens referem-se à dificuldade de controle do processo, principalmente a remoção do calor metabólico gerado pelo crescimento do microorganismo, podendo as enzimas produzidas durante o processo serem desnaturadas pelo calor ao final do processo. Segundo Mitchell e colaboradores (2005) a temperatura interna do biorreator pode apresentar-se até 20 °C acima da temperatura de incubação; outro fator refere-se à formação de gradientes de umidade e concentração de metabólito, fatores estes que implicam diretamente na ampliação de escala (COUTO; SANROMÁN, 2006; SINGHANIA et al., 2009).

1.4. Fungos produtores de celulase

Bactérias, fungos e algumas leveduras são capazes de sintetizar enzimas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos, podendo estes ser aeróbios ou anaeróbios mesófilos ou termófilos, dentre estes os fungos são os microorganismos mais utilizados pela indústria na produção de enzimas em CES devido à capacidade das hifas crescerem na superfície das partículas e penetrar nos espaços intra-partículas, colonizando os substratos sólidos (HOLKER; LENZ, 2005).

Dentre os fungos filamentosos, os termofílicos têm se destacado uma vez que as enzimas sintetizadas têm boa estabilidade térmica, atividade ótima a altas temperaturas e altas taxas de hidrólise, geralmente apresentam-se mais resistentes a agentes detergentes e às enzimas proteolíticas, são estáveis em amplas faixas de pH, podendo

ser usadas em diferentes tipos de materiais e processos (HAKI, 2003, GOMES et al., 2007.), além de vantagens durante o processo fermentativo como redução da contaminação por microrganismos mesófilos indesejáveis, possibilidade de trabalhar em temperaturas mais elevadas, favorecendo a solubilidade de substratos e produtos, e aumentando as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos. (GOMES et al., 2007). Os fungos termofílicos possuem membrana celular composta por ácidos graxos saturados, o que proporciona um ambiente hidrofóbico e os mantêm rígidos o suficiente para viver a temperaturas elevadas (HERBERT; SHARP, 1992). As enzimas produzidas por estes microorganismos, apresentam características de grande importância industrial, como resistência a solventes orgânicos e a temperaturas mais altas, sendo estáveis e ativas em temperaturas superiores à temperatura ótima para o crescimento do microorganismo (SABOTO et al., 1999). No presente estudo, foi utilizado o fungo termofílico moderado *Myceliophthora thermophila* M77, isolado pelo grupo do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do IBILCE/UNESP, o qual se destacou por produzir boas quantidades de enzimas lignocelulolíticas em resíduos agroindustriais diversos (MORETTI et al., 2012).

1.5. Aporte tecnológico às enzimas

Apesar dos avanços obtidos nos processos de obtenção de enzimas, a consolidação da aplicação em processos tecnológicos depende dos produtos apresentarem-se altamente ativos e estáveis por longos períodos, mesmo quando armazenadas fora das condições ideais (SAMBORSKA et al., 2005). Extratos enzimáticos aquosos, além do espaço que ocupam no transporte e armazenamento, têm

como outros inconvenientes a possibilidade de contaminação por microrganismos e maior suscetibilidade a deteriorações físicas (ex: agregação e precipitação), e químicas (ex: oxidação e deaminação) e até proteólise por enzimas do microorganismo contaminante, favorecidas pela mediação da água, durante as etapas de purificação, transporte, estocagem e aplicação (ARAKAWA et al., 1993; NAMALDI et al., 2006). Neste sentido, formulações enzimáticas desidratadas apresentam vantagens em relação aos extratos enzimáticos aquosos, proporcionando aumento da vida útil e praticidade no manuseio, mesmo à temperatura ambiente (LIAO et al., 2003). A remoção de água fracamente ligada ao conteúdo sólido do extrato bruto reduz o movimento livre das proteínas, minimizando mudanças conformacionais e desnaturação (BELGHITH et al., 2001; SAMBORSKA et al., 2005; ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2007). A desidratação é considerada eficiente quando as moléculas de água são retiradas de tal maneira que a estrutura tridimensional das moléculas permaneça a mais intacta possível, pois, quanto mais uma enzima consegue manter o balanço iônico, melhor a preservação de suas funções biocatalíticas (Ó'FAGÁIN, 1997; AEHLE, 1990).

A secagem por atomização ou *spray drying* tem sido freqüentemente aplicada a materiais termos-sensíveis de setores industriais variados, tais como de alimentos (leite, soro de leite, chá, sopas e café) e farmacêutica (fármacos e produtos funcionais – vitaminas, enzimas, sangue e microrganismos), e também na agricultura (fungos entomopatogênicos) (PEIGHAMBARDoust, et al., 2011). Caracteriza-se por ser um método de desidratação contínuo, rápido e de baixo custo, além de proporcionar materiais com propriedades físicas desejadas, e condições assépticas de processamento. (WERNER et al., 1993; MILLQVIST-FUREBY et al., 1999; DEPAZ et al., 2002; SAMBORSKA et al., 2005; NALMANDI et al., 2006; ALLOUE et al., 2007; COSTA-SILVA, 2010).

A técnica consiste na atomização de materiais no estado líquido ou plástico (solução ou emulsão) dentro de uma câmara submetida a uma corrente controlada de ar quente, onde o contato das gotículas atomizadas e o ar promovem evaporação do solvente quase instantaneamente, obtendo-se o material pulverulento. O processo pode ser resumido em quatro estágios: atomização; contato do líquido pulverizado e o gás; evaporação do solvente (formação do produto, secagem) e recuperação do produto (coletor). (MASTERS, 1979) A Figura 1.1, ilustra esquematicamente o processo de secagem em *spray-dryer*.

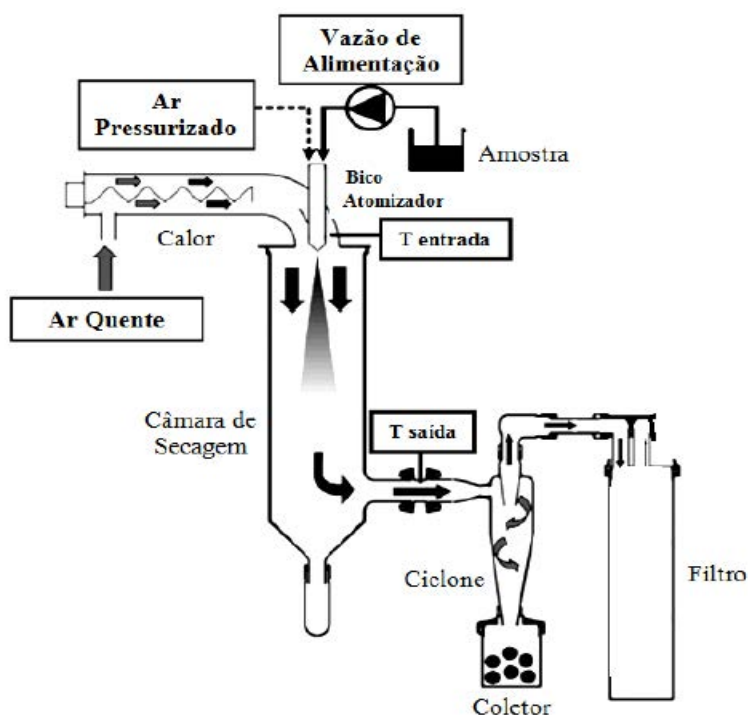


Figura 1.1: Diagrama esquemático da secagem em mini *spray-dryer*. (Modificado de BURKI et al., 2011).

A atomização ou sistema de pulverização transforma a solução/suspensão em gotículas e determina a distribuição do tamanho de partícula e área de troca térmica, sendo desejável uma elevada área superficial da gotícula, pois a associação da alta diferença de temperatura entre o ar quente e a gotícula resulta numa secagem quase

instantânea, o que juntamente com o resfriamento causado pela evaporação da água evita o superaquecimento do interior das gotículas, otimizando assim, a transferência de calor e massa (ROUSTAPOUR et al., 2006; CAL;SOLLOHUB, 2010; PEIGHAMBARDoust, et al., 2011). Há vários tipos de atomização disponíveis dependendo da energia envolvida, sendo os principais atomizadores os bicos de pressão, duplo fluido, e o atomizador centrífugo. Os bicos de duplo fluido, também denominados pneumático, são bastante utilizados em escala laboratorial e plantas pilotos, uma vez que permitem o uso de câmaras menores e produzem boa dispersão de fluidos com baixa viscosidade. Neste modelo de atomizador, o fluxo do líquido é “quebrado” em pequenas gotas pelo cisalhamento gerado pela diferença de velocidades entre a amostra e um segundo fluido, geralmente, ar pressurizado. (CAL; SOLLOHUB, 2010). Estudos com materiais sensíveis, como microorganismos, indicam esse modelo como mais apropriado (CHÁVEZ;LEDEBOER 2007). A mais recente tecnologia de atomização refere-se aos bicos supersônicos, com base em tecnologia de pulverização por vibração que permite a geração de gotículas muito pequenas e com tamanhos mais uniformes (PAUDEL et al., 2013).

Na câmara de secagem as gotículas entram em contato com o gás de secagem, geralmente ar atmosférico. A temperatura de entrada e umidade do gás de secagem influenciam na evaporação e no teor residual do solvente, segundo Goula, et al. (2010) e Cal;Sollohub (2010) o uso de ar seco influi positivamente na densidade, escoabilidade e solubilidade do produto final. O projeto da câmara de secagem também constitui um parâmetro importante do processo, uma vez que diâmetros muito reduzidos afetam a atomização, devido à deposição de produto nas paredes. De acordo com a posição do atomizador existem três possíveis combinações de fluxo do líquido atomizado e do gás de secagem: co-corrente, contra-corrente e fluxo misto. Geralmente, a literatura indica

movimentação co-corrente, ou seja, entrada do gás de secagem e o bico atomizador posicionados na parte superior da câmara de secagem, proporcionando o encontro das gotículas com o gás de secagem em sua maior temperatura, resultando numa rápida evaporação (CAL; SOLLOHUB, 2010; PEIGHAMBARDoust, et al., 2011).

O sistema de separação gás-sólido é responsável por captar o pó, sendo utilizado um ciclone, onde o ar contendo certa quantidade de partículas entra no ciclone e descreve uma trajetória helicoidal, entretanto num certo momento há inversão do sentido da trajetória e as partículas sólidas são despejadas num coletor, localizado logo abaixo do ciclone, e o ar sai pela extremidade superior.

A secagem de uma gota em *spray drying* é um fenômeno complexo com diferentes estágios de secagem, levando a diferentes temperaturas da gota e morfologia das partículas (FARID, 2003; MEZHERICHER et al., 2007; ESLAMIAN et al., 2009; SLOTH et al., 2009). No momento que as gotas do atomizado entram em contato com o ar de secagem, esta é aquecida de sua temperatura original até a temperatura de bulbo úmido (T_{bu}), iniciando o processo de evaporação da película de vapor saturado que circunda a superfície da gota, neste estágio existe umidade suficiente dentro da gota para repor a perda na superfície, assim a difusão da água do centro para a superfície da gota a mantém saturada e a evaporação ocorre a velocidade constante. Há encolhimento da partícula, aumento da concentração de sólidos e não há variação da temperatura dentro da partícula. Entretanto, no decorrer do processo, duas regiões distintas na partícula começam a ser observadas, uma crosta externa e uma região úmida interna, a espessura da zona seca aumenta com o tempo, provocando uma diminuição da velocidade de evaporação (PERRY & GREEN, 1997), pode ocorrer um aumento de temperatura correspondente ao acréscimo de calor sensível à partícula sólida, elevando acima da temperatura de bulbo úmido, permanecendo 15 a 20 °C abaixo da temperatura

do ar que sai do secador saturado (MILLQVIST-FUREBY et al., 1999; ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2007). Materiais termos-sensíveis devem ser mantidos nesta etapa final pelo tempo mínimo necessário à sua secagem aos níveis requeridos para sua estocagem e aplicação, sob risco de degradação. Assim, as condições de operação do equipamento devem ser ajustadas para que o mínimo de dano seja causado, uma vez que, dependendo das condições operacionais, a secagem pode trazer estresse térmico e cisalhante sobre a enzima que podem provocar danos às estruturas secundárias (alfa-hélice e beta-folha) e terciárias da cadeia peptídica, levando inclusive ao desenovelamento da enzima (MILLQVIST-FUREBY et al., 1999; DePAZ et al., 2002; NALMANDI et al., 2006).

As degradações em estado sólido das proteínas podem ser classificadas em químicas e físicas, onde as instabilidades químicas envolvem modificações covalentes da proteína ou aminoácido residuais formando nova molécula e as físicas referem-se a mudanças na conformação tridimensional da proteína, e incluem desnaturação, agregação, precipitação e adsorção na superfície (LAI; TOPP, 1999). Para minimizar os efeitos negativos da secagem realiza-se o controle de parâmetros operacionais como temperatura de entrada e/ou saída do ar, concentração de sólidos, vazão de líquido, e faz-se uso de aditivos, visando proteção a enzima. A temperatura é uma das variáveis mais críticas do processo. Em um sistema co-corrente, a temperatura de entrada do gás de secagem é a primeira temperatura que o líquido entra em contato ao ser atomizado na câmara, podendo influenciar, dependendo da vazão do ar e de alimentação, na quantidade de solvente removido e propriedades do pó final. Por outro lado, a temperatura de saída, refere-se ao limite máximo admissível para a temperatura da partícula termo-sensível na saída do equipamento, sendo seu controle importante para

produtos como as enzimas (AMERI;MAA, 2006; CAL;SOLLOHUB, 2010), assim, neste trabalho optou-se por controlar a temperatura de saída do ar de secagem.

Encontra-se na literatura a aplicação de diversos aditivos como maltodextrina, açúcares, celobiose, glicose, lactose, sucrose e trealose, os polímeros carboximetilcelulose, celulose micro-cristalina, dextrana e goma arábica, os polióis, glicerol, manitol, propileno glicol, sorbitol e xilitol, dióxido de silício coloidal (Aerosil[®]200), comumente aplicado na indústria farmacêutica. (BELGHITH et al., 2001; DePAZ et al, 2002; SINGH; SINGH, 2003; SELIVANOV, 2005; NAMALDI et al., 2006; SLOTH et al., 2009; COSTA-SILVA, 2010). De acordo com Belghith e colaboradores (2001), os aditivos podem ser divididos entre protetores e estabilizadores. Os protetores evitariam a degradação das enzimas durante a secagem, enquanto que os estabilizadores manteriam as condições ideais para a manutenção da atividade enzimática durante a estocagem. Assim, testes específicos acerca dos aditivos adequados a cada função devem ser realizados para cada extrato enzimático a ser seco, assim como a quantidade mínima de agente de secagem, é desejável para evitar alterações nas propriedades do produto, e diminuir o custo do mesmo. Os adjuvantes utilizados no presente estudo foram:

Maltodextrina (MD) - definida como um produto de amido parcialmente despolimerizado com um valor DE inferior a 20 (STORZ; STEFFENS, 2004). Consistem unidades de α -D-glicose ligadas principalmente por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4), e são geralmente classificados de acordo com a sua equivalência de dextrose (DE). A DE de uma maltodextrina determina a sua capacidade de redução e está inversamente relacionada com o seu peso molecular médio (BEMILLER; WHISTLER, 1996). As maltodextrinas são usados principalmente em materiais de que são difíceis de secar - como sucos de fruta, aromatizantes e edulcorantes e para reduzir os problemas

de aglomeração durante o armazenamento, melhorando assim a estabilidade do produto (BHANDARI et al., 1993).

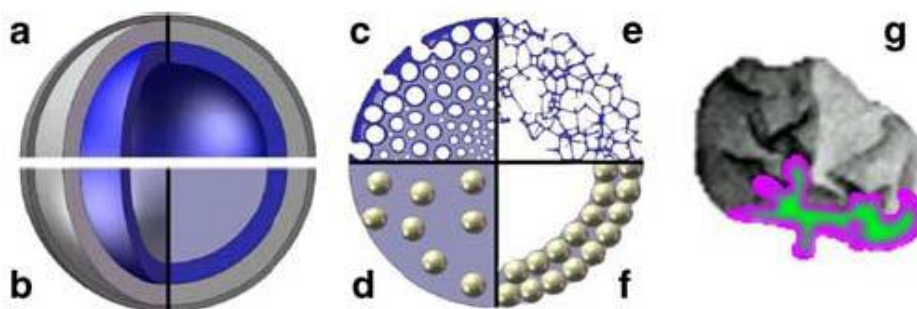
Goma Arábica (GA) - A goma arábica é o exsudato gomoso dessecado dos troncos e dos ramos da Acacia, em sua grande maioria da *A.senegal* ou *A.seyal*, um heteropolissacarídeo complexo com uma estrutura altamente ramificada de galactose, arabinose, ramnose e ácido glicurônico, contendo cerca de 2% de um componente protéico ligado covalentemente a esse arranjo molecular. (IDRIS et al., 1998; AZEREDO, 2005) A goma arábica tem sido usada como um material de parede em microencapsulação por secagem por pulverização, principalmente por causa da sua boa capacidade de emulsificação e de baixa viscosidade em solução aquosa, o que auxilia o processo de secagem por pulverização. Além disso, proporciona uma boa retenção de substâncias voláteis e que confere proteção eficaz contra a oxidação (ROSEMBERG et al., 1990; ALLOUE et al., 2007).

Celulose Microcristalina (MCC) ($C_6H_{10}O_5$)_n - uma forma despolimerizada parcialmente purificada de celulose, apresentando-se como pó branco, inodoro, insípido, cristalino composto por partículas porosas, comumente utilizada como excipiente na indústria farmacêutica pelas características supracitadas e por produzir comprimidos rígidos que desintegram rapidamente em água, devido ao inchamento das partículas de MCC e destruição das forças de ligação que as mantêm juntas (EK et al., 1994; ADEL et al., 2011). A MCC pode ser obtida por meio de hidrólise com ácidos minerais diluídos, a temperaturas elevadas, de qualquer material que é rico em celulose, como polpa de madeira, algodão, soja, bagaço e sabugo de milho, casca de arroz e amendoim (ADEL et al., 2011). A celulose, obtida como uma polpa a partir de materiais de plantas fibrosas, consiste em áreas de celulose amorfa e, regiões ordenadas, cristalinas. A MCC

é descrito como celulose purificada e parcialmente despolimerizada, com um grau de polimerização (DP) abaixo de 350 (ADEL et al., 2011).

Dióxido de Silício Coloidal (Aerosil®) – material inorgânico, apresentado como um pó branco fino, bastante adsorvente, com baixa densidade aparente e boas características de vazão, sendo comumente aplicado em secagem por *spray-drying* de extratos vegetais (ROWE;SHESKEY;OWEN, 2006).

Uma grande variedade de morfologias pode ser obtida, dependendo das características das formulações e das condições operacionais, como densidade do gás de secagem e do líquido, tensão superficial e viscosidade do líquido, sendo a forma e o tamanho dos grãos do pó produzido não uniforme, pois as gotas geradas no atomizador exibem diferentes comportamentos durante a evaporação, podendo durante a secagem alguns materiais expandir e outros desintegrarem, gerar formas porosas mantendo a forma esférica ou contraírem, aumentando sua densidade, como pode ser visto na Figura 1.2. As variações do formato das partículas e das características do pó estão geralmente relacionadas com a velocidade de secagem e composição da formulação (PERRY; GREEN, 1997; AMERI; MAA, 2006; SLOTH et al., 2009; CAL; SOLLOHUB, 2010; PAUDEL et al., 2013).



a-Camadas com centro sólido; b-Camadas com centro oco; c-Porosa com poros fechados; d-Porosa com poros abertos; e-Nanopartículas dispersas em matriz sólida; f-Nanopartículas concentradas na superfície; g-Partículas irregulares com gradientes internos de concentração

Figura 1.2: Morfologia de partículas secas em *spray dryer* (Extraído e modificado de Vehring, 2008)

Dentre as técnicas aplicadas a pós produzidos por *spray drying* para avaliar a morfologia das partículas, as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) é a técnica mais utilizada, e a determinação da área superficial é analisada pelo método de isothermas de adsorção, sendo um dos modelos físicos mais comuns o BET (Brunauer-Emmett-Teller) (NERY et al., 2008; PARK et al., 2010; VOLLENBROEK et al., 2010; LI et al., 2011).

Como pode ser observado, o processo de viabilização das enzimas não se limita ao estudo dos parâmetros de cultivo, mas também ao estudo operações unitárias, como a secagem por *spray-dryer*, que visam garantir a estabilidade e vida útil aceitável das enzimas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é aplicar a técnica de *spray drying* à secagem de celulase fúngica visando produção de enzima pulverulenta com boa retenção de atividade e estabilidade ao longo do armazenamento.

Os objetivos específicos:

- a) Analisar a viabilidade do uso de diferentes adjuvantes e as condições operacionais durante o processo de secagem do extrato bruto em *spray dryer* visando otimizar o processo de secagem afim de obter melhor retenção de atividade enzimática;
- b) Estudar a estabilidade da enzima seca durante armazenamento refrigerado e no ambiente, e comparar com a estabilidade do extrato bruto armazenado sob refrigeração e congelamento.
- c) Avaliar a característica física das partículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e área superficial por BET.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades experimentais deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Bioprocessos e Biorreatores e no Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada (LBPMA) ambos do IBILCE/UNESP.

3.1. Cultivo em Estado Sólido (CES)

O microorganismo utilizado foi o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M77, pertencente à coleção do LBPMA. Este se apresentava mantido em ágar Sabouraud a 7°C em refrigerador doméstico, imerso em água estéril e óleo mineral.

A primeira etapa consistiu no repique para reativação da cepa armazenada, com auxílio de alça de platina. Em câmara de fluxo laminar, a cepa armazenada foi repicada para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio Sabouraud inclinado e incubada a 45 °C por 48 h. Em seguida a superfície do meio de cultivo foi raspada com alça de platina e os esporos transferidos, como na etapa anterior, para erlenmeyers contendo 50 mL de meio Sabouraud inclinado e incubados a 45 °C por 48 h, etapa esta denominada pré-inóculo. Posteriormente, os esporos foram suspensos com auxílio de alça de platina em solução nutriente, descrita a seguir, contados em Câmara de Neubauer e inoculados à concentração de 10^6 esporos / grama de substrato seco.

As condições de cultivo foram as otimizadas por Moretti (2010), sendo o substrato sólido a mistura (25,0 g de massa seca) de palha de milho e farelo de trigo, na proporção 1:1 (p/p), à umidade de 70% (b.u.) e temperatura de 40 °C, por 96 h em câmara DBO. O meio de cultivo foi acondicionado em embalagens de polipropileno, com dimensões de 25 cm x 30 cm, conforme pode ser visto na Figura 3.1, e esterilizados a 121 °C por 30 min. A solução nutriente foi composta por: sulfato de

amônio (1 %, v/v); MAP (Monofosfato de amônio) (3 g / L); cloreto de potássio (2 g / L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g / L); CaCl_2 (0.1 g / L) e Tween[®] 80 (0,1 %, v/v), ajustada a pH 5, sendo os três primeiros itens fertilizantes agrícolas adquiridos no comércio local. Antes da fermentação a palha de milho foi triturada com um picador de palmas, munido com uma peneira de 3 mm de diâmetro, sendo em seguida lavada em água corrente até a retirada de impureza física. Posteriormente, a palha de milho foi seca em estufa de convecção forçada a 60 °C até a obtenção de peso constante. O farelo de trigo também foi lavado em água corrente e seco em estufa a 60 °C até peso constante.

Após o período de incubação de 96 horas, a amostra foi retirada do climatizador DBO e adicionado 10 mL de água destilada por grama de substrato seco, seguido por agitação por 30 min em agitador orbital, a 100 rpm. A suspensão resultante foi filtrada em tecido *voil*, e utilizada como extrato enzimático bruto (EEB).



Figura 3.1: Embalagem de polipropileno para CES com o fungo *Myceliophthora thermophila* M77 após o período de incubação de 96 h em DBO a 45 °C (Figuras A e B).

3.2. Determinação das atividades de endoglucanase e xilanase.

A atividade de endoglucanase (ou CMCase) e xilanase foram determinadas segundo Ghose (1987), com modificações, sendo os açúcares redutores, expressos em glicose e xilose, respectivamente, liberados pela ação enzimática a partir da reação entre 0,1 mL da solução enzimática bruta e 0,9 mL de solução 4% (p/p) de carboximetilcelulose (CMC) (Carboximetilcelulose sódica de baixa viscosidade, SIGMA-ALDRICH), para a enzima endoglucanase, e solução 1 % (p/p) de xilana (de madeira de faia, SIGMA-ALDRICH), para a enzima xilanase, ambos em solução tampão de acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. A reação foi mantida a 65 °C por 10 min., sendo, interrompido pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 3-5-dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, segundo Miller (1959). O açúcar redutor foi quantificado por espectrofotometria a 540 nm com base em uma curva padrão de glicose e xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida, como a quantidade de enzima requerida para liberar um μmol de açúcar redutor do substrato por minuto.

A avaliação da atividade enzimática após a secagem em *spray-dryer* foi realizada reconstituindo-se o pó, com base no teor de sólidos totais da formulação líquida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3. Determinação da umidade e teor de sólidos

As amostras foram analisadas em uma balança determinadora de umidade OHAUS MB45 (Toledo), onde o teor de umidade/sólidos totais foi mensurado por secagem em alta temperatura, através de elemento de aquecimento halogênio. A balança possui faixa de medição para umidade em base seca de 0,01 a 100%, com precisão de

leitura de 0,01%. A umidade foi determinada imediatamente após a obtenção dos pós e ao longo do período de armazenamento e o teor de sólidos do extrato enzimático bruto logo após a fermentação.

3.4. Secagem em *spray-dryer*

Os ensaios foram realizados no secador por nebulização, *spray-dryer*, modelo MSD 0,5 (Labmaq do Brasil), mostrado na Figura 3.2 dotado de bico atomizador de duplo fluido com orifício de saída de 1,0 mm e câmara de secagem cilíndrica de vidro borossilicato, com 51 cm de altura e diâmetro interno de 13 cm, sendo a coleta dos pós em um ciclone de alumínio. A temperatura de saída e a vazão de alimentação do líquido foram controladas, e a temperatura de entrada do ar de secagem monitorada.



(A)



(B)

Figura 3.2: **Figura 2.1:** Secador *spray-dryer* empregado nos ensaios de discriminação de adjuvantes e otimização das condições de secagem (A)- Vista geral do equipamento com sua bomba peristáltica original; (B)- Bomba peristáltica substituta

Os ensaios de discriminação de adjuvantes (item 3.5.1) foram realizados com a bomba original do equipamento, que opera em vazões entre 0 e 16,7 mL/min. No entanto, as características construtivas desta bomba ocasionaram dificuldades experimentais, como entupimento e desgaste da mangueira de silicone de alimentação, de modo que a mesma foi substituída por uma bomba peristáltica externa QDOS -30 (Watson-Marlow) para os experimentos de otimização das condições de secagem (item 3.5.2).

A operação foi iniciada com o aquecimento do gás de secagem. Após atingir temperatura desejada medida na saída da câmara de secagem, água destilada foi introduzida na alimentação do bico atomizador, na vazão pré-determinada para o experimento, até o equipamento entrar em regime permanente, sendo a água em seguida substituída pela amostra. Em todos os ensaios de secagem os parâmetros pressão do ar de atomização, vazão do ar de secagem e vazão do ar de atomização foram fixados em 4,5 Kgf/cm², 0,55 m³/min e 50 L/min, respectivamente. A solução ou suspensão de EEB e adjuvante foi mantida em constante agitação, à temperatura ambiente, com auxílio de um agitador magnético.

O efeito da secagem por *spray dryer* sobre as enzimas foi analisado através da atividade residual de atividade enzimática obtida após a secagem e a umidade dos pós imediatamente após o processo.

3.4.1. Ensaios discriminativos dos adjuvantes

O extrato enzimático utilizado nestes ensaios de discriminação do adjuvante que melhor protegesse as enzimas foi obtido conforme descrito no item 3.1. O extrato enzimático bruto utilizado foi de uma única fermentação.

O teste discriminativo seguiu um Planejamento Fatorial Multiníveis, com quatro fatores: tipo de adjuvante (Adj), temperatura de saída do ar de secagem (T_s) vazão de alimentação da solução ou suspensão no *spray dryer* (Q_{alim}) e proporção em peso entre o extrato bruto e o adjuvante (P). O fator adjuvante foi estudado em três níveis e os demais fatores com dois níveis, como pode ser visto na Tabela 3.1. O teor de sólidos totais na formulação foi fixado em 10 % (p/p) para os adjuvantes maltodextrina (MD) e goma arábica (GA), e em 5% (p/p) para celulose microcristalina (MCC). Inicialmente foi ajustado o teor de sólidos do EEB com água destilada e completou o teor de sólido da formulação para 10 % ou 5 % (p/p) com adjuvante.

Tabela 3.1: Planejamento estatístico fatorial multiníveis para a discriminação do adjuvante que proporcione maior retenção da atividade enzimática.

Variáveis	Níveis		
	A	B	C
Adjuvante	MD	GA	MCC
	Níveis		
	-1	1	
T_s (°C)	80 ± 4	110 ± 4	
Q_{alim} (mL/min)	$7,5 \pm 0,3$	$13,5 \pm 0,3$	
Proporção EEB:Adj	$0,5 : 9,5$	$1,5 : 8,5$	

3.4.2. Ensaios de Otimização

Os ensaios para a otimização da condição ideal de secagem foram realizados com a mistura goma arábica e Aerosil® como adjuvantes, na proporção de 7:3 (p/p), mantendo-se fixa a concentração de sólidos do extrato enzimático em 1,5%. A goma

arábica foi escolhida com base nos ensaios de discriminação do adjuvante que proporcionou a maior retenção da atividade enzimática após a secagem. Os ensaios de otimização foram conduzidos seguindo-se um planejamento fatorial do tipo *Box Behnken*, com sete repetições no ponto central, sendo três fatores analisados: temperatura de saída do ar de secagem (T_s), vazão de alimentação da solução no *spray dryer* (Q_{alim}) e concentração de sólidos totais na formulação (ST). A matriz de planejamento é apresentada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Planejamento estatístico fatorial Box-Behnken para os ensaios de otimização das condições de secagem.

Variáveis	Nível		
	-1	0	1
T_s (°C)	70	90	110
Q_{alim} (mL/min)	8	12	16
ST (%)	10	15	20

3.5. Ensaios de armazenamento

O EEB seco por *spray-drying* foi acondicionado em tubos Falcon®, envoltos com filme plástico, e armazenados à temperatura ambiente (30°C) e sob refrigeração (5°C) e a atividade de endoglucanase acompanhada quinzenalmente. Simultaneamente, amostras de EEB líquido foram armazenadas sob congelamento (-20 °C) e as atividades de endoglucanase igualmente avaliadas quinzenalmente.

Analizou-se a atividade de endoglucanase das enzimas contidas nos pós após a a secagem em *spray-dryer*. Para tanto, as amostras pulverulentas foram diluídas em água e o teor de sólidos da formulação foi reconstituído. Foram realizadas determinações das

atividades de endoglucanase após os ensaios de discriminação de adjuvantes (item 3.4.1) e de endoglucanase após os ensaios de otimização das condições de secagem (item 3.4.2). Após os ensaios de otimização de secagem, duas condições experimentais foram selecionadas para fornecer pós que seriam armazenados à temperatura ambiente (cerca de 30 °C) e sob refrigeração (5 °C). As condições selecionadas foram as que proporcionaram maior e menor retenção da atividade enzimática após o processo de secagem.

3.6. Propriedades físico-químicas das endoglucanase

Foram feitas avaliações do efeito do pH e da temperatura sobre as atividades da enzima endoglucanase do EEB líquido, da formulação EEB/Adj antes da secagem por *spray-drying* e da solução aquosa reconstituída a partir do pó seco, utilizando um planejamento estatístico fatorial rotacional de composto central, para análise por superfície de resposta, utilizando os tampões acetato de sódio (pH 3 – 5,5), MES (pH 5,5) e HEPES (pH 7,26 – 8). Na Tabela 3.3, estão apresentados os valores codificados e os originais para pH e temperatura. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 3.3: Valores utilizados no planejamento estatístico fatorial para a avaliação do efeito da variação de temperatura e pH sobre a atividade de endoglucanase.

Variáveis	Nível				
	-1,4142	-1	0	1	1,4142
pH	3	3,73	5,5	7,26	8
Temperatura (°C)	40	57,67	65	82,67	90

3.7. Morfologia dos pós por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os materiais foram fixados por 24 h em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,3), pós-fixados em tetróxido de ósmio 0,5% no mesmo tampão por 30 min. O material foi seco em CO₂ líquido em aparelho de Ponto Crítico CPD 010 (Balzers Union) e recobertos com ouro em metalizador MED da Balzers Union. A análise do material e a documentação fotográfica foram realizadas em MEV 515 (Philips) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências da Unesp, campus Botucatu.

3.8. Morfologia dos pós por análises superficial específica

As medidas da área superficial específica dos pós obtidos nas condições de secagem que proporcionaram maior e menor retenção das atividades enzimáticas foram determinadas a partir da adsorção física de N₂ a quatro diferentes pressões, na temperatura de ebulição do nitrogênio líquido (77 K), por um analisador de área superficial modelo Gemini VII 2390p (Micrometrics). Amostras de aproximadamente 50mg (pós da melhor condição de secagem) e 10mg (pós da pior condição de secagem) foram pré-tratadas previamente no dispositivo Flow Prep 060 (Micrometrics) acoplado ao equipamento, para degasagem das amostras, a 80 °C por 1 hora, sob pressão de 5 psi de N₂ antes da análise para retirada de possíveis espécies adsorvidas na superfície.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A proteção das endoglucanases é o foco do trabalho porém visando compreender se os resultados obtidos nesta dissertação poderiam ser estendidos a outras enzimas lignocelulolíticas, em alguns ensaios avaliou-se também como respostas a retenção da atividade de xilanase.

4.1. Testes preliminares

4.1.1. Influência da etapa de centrifugação no extrato enzimático

De acordo com o protocolo adotado pelo Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada, a última etapa do processo de obtenção do extrato enzimático, consiste em centrifugar a solução obtida após o cultivo. Entretanto, após a centrifugação o extrato enzimático apresenta teor de sólido muito baixo, em torno de 1 %. Almejando padronizar as amostras e posterior, variação da proporção do teor de sólidos do extrato enzimático bruto e do adjuvante na solução a ser seca (EEB /adjuvante) decidiu-se trabalhar com o extrato sem centrifugá-lo. No entanto, suspeitou-se que os sólidos presentes na solução poderiam mascarar as atividades enzimáticas determinadas pelo método espectrofotométrico. Portanto, analisou-se a influência da etapa de centrifugação na atividade de endoglucanase e de xilanase, sendo determinada a atividade enzimática da amostra centrifugada e não centrifugada. Na Tabela 4.1, estão expressos os valores das atividades enzimáticas relativas, sendo referência a amostra centrifugada.

Tabela 4.1: Atividade relativa do extrato enzimático não centrifugado

	Atividade Relativa (%)
Endoglucanase	100
Xilanase	95,4

Dos resultados obtidos, pode-se inferir que a etapa de centrifugação não interferiu na atividade endoglucanase, e apresentou uma ligeira variação, menor que 5 % no valor da atividade xilanase, entretanto este valor pode ser atribuído ao erro intrínseco associado à determinação da atividade xilanolítica. Assim, para os demais ensaios desta dissertação optou-se por não centrifugar o extrato enzimático, de modo que o teor de sólidos do extrato enzimático bruto sem a etapa de centrifugação teve um valor médio de 2 %. Em termos de aplicação industrial, acredita-se que a manutenção do extrato enzimático com seu teor de sólidos original é interessante, pois dispensaria a etapa de centrifugação, que requer tempo e equipamento de alto custo.

4.1.2. Estudo preliminar para os ensaios de discriminação dos adjuvantes.

- Goma Arábica

Goma arábica é um heteropolissacarídeo complexo com uma estrutura ramificada, solúvel em água, sendo a dissolução melhor a temperaturas em torno de 60 °C. Assim, visando analisar a influência do preparo da solução de EEB e goma arábica sobre a atividade enzimática, em uma amostra o adjuvante foi dissolvido em água destilada no banho-maria (60 °C/ 1 h com agitação manual), e depois o EEB. foi adicionado à mistura, obtendo-se então a solução de alimentação. Outra amostra foi preparada ajustando-se o teor de sólidos do EEB. com adição de água destilada e,

posteriormente, a este foi adicionado o adjuvante, sendo a mistura levada ao banho-maria a 60 °C por uma hora com agitação manual para a dissolução da goma arábica. As atividades enzimáticas das soluções foram determinadas logo após o preparo, no estado líquido e após a secagem, sendo os resultados apresentados em termos de atividade relativa (%) na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Atividade relativa para endoglucanase e xilanase, com goma arábica (GA) dissolvida em água e na solução contendo extrato enzimático bruto.

Atividade Relativa	G.A. dissolvida em água	G.A. dissolvida no EEB
Endoglucanase	92,72 %	98,73 %
Xilanase	105,23 %	100,09 %

Observe-se que houve pouca influência do processo de preparo da solução, de modo que se optou por dissolver a goma arábica no EEB, devido à maior facilidade de preparo. Em estudo realizado por Moretti (2010), as mesmas enzimas, produzidas pelo mesmo microrganismo e nas mesmas condições de cultivo, mostraram-se termostáveis quando mantidas em banho-maria a 65 °C por 1 hora, mantendo 90 % da atividade inicial. No presente estudo nota-se apenas ligeira diferença de atividade enzimática tanto para endoglucanase quanto para xilanase para o EEB quando mantido ou não em banho-maria a 60 °C por uma hora.

- Celulose Microcristalina (M.C.C.)

A M.C.C. foi selecionada por ser um substrato natural para as celulasas, o que tenderia a preservar a atividade das enzimas ao longo do armazenamento. Porém, a M.C.C. apresenta baixa solubilidade em água, cerca de 0,24 % (segundo dados fornecidos pelo fabricante - Synth), e, nas condições previstas pelo planejamento estatístico dos experimentos, é uma suspensão. Assim testou-se a concentração

máxima de sólidos da suspensão que poderia ser utilizada para a secagem sem causar problemas operacionais no *spray-dryer*. Formulações com 10%, 7,5% e 5% (p/p) de sólidos foram preparadas, sendo possível secar apenas a solução com 5 % de sólidos, uma vez que soluções com teores mais elevados entupiram o bico atomizador, mesmo quando este foi substituído pelo de maior diâmetro disponível (1,2 mm).

Outro teste realizado foi verificar a atividade enzimática da amostra em suspensão (Figura 4.1A) e da amostra decantada (Figura 4.1B), a fim de analisar se a existência de partículas em suspensão alteraria os resultados do ensaio espectrofotométrico. Como pode ser observado na Tabela 4.3 a análise de atividade para a amostra em suspensão e decantado são bastante próximas, possivelmente em decorrência do pequeno volume de amostra utilizado no método (0,1 mL com diluição de quatro vezes para endoglucanase e onze vezes para xilanase).

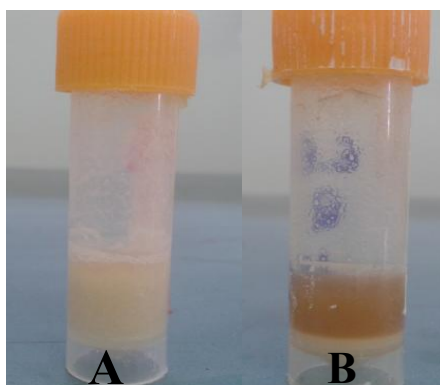


Figura 4.1: Amostra do extrato enzimático bruto e celulose microcristalina: em suspensão (A) e decantada (B).

Tabela 4.3: Atividade enzimática do EEB. com MCC em suspensão e decantado

	Endoglucanase (U/mL)	Xilanase (U/mL)
Em suspensão	6,76 ± 0,08	127,89 ± 2,24
Decantado	6,81 ± 0,62	114,82 ± 3,21

4.2. Ensaios de secagem

Devido às grandes variações de temperatura e de umidade por qual passa a partícula na câmara de secagem, a formulação deve ser projetada para manter as características ao longo do processo de secagem, ou atingir uma característica específica ao final da operação, sendo assim os ensaios de secagem seguiram uma ordem até a obtenção da melhor condição para retenção da atividade enzimática de endoglucanase, qual seja a de secagem do extrato enzimático bruto sem a adição de adjuvantes, ensaios de discriminação do adjuvante mais adequado à secagem e otimização das condições de secagem com o adjuvante selecionado.

4.2.1. Secagem do extrato enzimático bruto sem agentes de secagem

Com o intuito de analisar o efeito do processo de secagem sobre o extrato enzimático bruto (EEB), realizou-se a secagem no *spray-dryer* nas seguintes condições: $T_s = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $Q_{\text{alim}} = 10,5\text{ mL / min}$. Comparou-se a conservação da atividade das endoglucanases antes e após a secagem, ou seja valor apresentado no $t = 0$, e durante o armazenamento do pó seco em *freezer* doméstico (Figura 4.2). Os valores estão apresentados em termos de atividade relativa (A.Re.) em relação a atividade enzimática do EEB líquido.

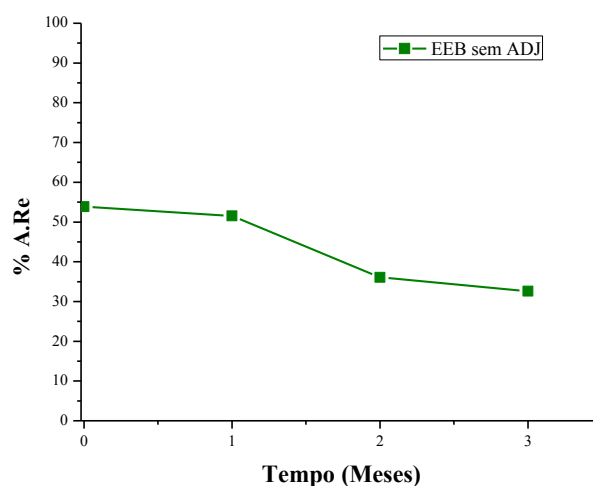


Figura 4.2: Atividade relativa endoglucanase do EEB, sem adição de adjuvantes, secos por *spray dryer* armazenados em *freezer* doméstico.

Em um processo sem uso de adjuvantes, nota-se uma conservação de apenas 53,84 % da atividade endoglucanase imediatamente após o processo e, uma tendência de queda ao longo do tempo de armazenamento em *freezer* doméstico, restando ao final de três meses 32,60 % da atividade endoglucanase.

Em sua grande maioria, a atividade de proteínas e enzimas está relacionada à sua estrutura terciária, sendo, desejável em um processo de desidratação, em que a água seja retirada de tal forma que as moléculas destes compostos mantenham sua estrutura tridimensional o mais intacta possível. (PARTRIDGE et al., 1998; LEE; DORDICK, 2002). Embora a temperatura da gota não se eleve até a temperatura do gás de secagem, mantendo-se em torno da temperatura de bulbo úmido a maior parte do processo, a alta velocidade do processo pode acarretar danos físicos nas moléculas de proteína e alto cisalhamento, desfavorecendo a estabilidade. As tensões cisalhantes também decorrentes da atomização, contribuindo para a desnaturação das proteínas (CARPENTER et al., 1997; MILLQVIST-FUREBY et al., 1999; ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2007; KRISHNAIAH et al., 2012).

A heterogeneidade do extrato bruto é um fator relevante, sua composição não é totalmente conhecida, entretanto, pode-se afirmar que, em decorrência de análises anteriores de carboidratos há presença de açúcares como glicose, xilose, arabinose e celobiose. As interações da proteína com os demais componentes do extrato bruto são desconhecidas, porém supõe-se a formação de ligações desses com a água, estabilizam a proteína, assim, quando água é removida rapidamente, como no *spray-drying*, surgem fenômenos de mobilidade das espécies a velocidades distintas, que expõe a proteína a condições severas, impedindo a formação de ligações mais fortes. No *spray-drying*, a gota passa por diferentes estágios de secagem: aquecimento até a temperatura de bulbo úmido, encolhimento da partícula e aumento da concentração de sólidos (FARID, 2003) de modo que as ligações químicas são instáveis. Devido à redução do tamanho da gota, as espécies de maior peso molecular, dentre as quais as proteínas, tendem a ocupar a superfície da gota, expondo-as a condições severas de temperatura e cisalhamento, enquanto que os compostos de menor peso molecular, como os açúcares, tendem a mover-se para o centro da gota e, num primeiro momento, formam fortes ligações com a água (FÄLDT;BERGENSTAHL, 1994). Com o prosseguimento da secagem, devido à diferença de concentração, a água tem que se mover para a superfície por difusão molecular, através da camada superficial rica em proteínas, tendendo a afetá-las. Assim, é de vital importância aplicação de adjuvantes para minimização dos efeitos negativos do processo.

Materiais com presença de açúcares, como o EEB, apresentam, após a rápida remoção da umidade, um pó amorfo altamente higroscópico, refletindo em problemas de estabilidade do produto, baixos rendimentos, decorrente da aderência nas paredes das câmaras, além de outros problemas operacionais. A adesividade é atribuída a uma elevada concentração de açúcares de baixo peso molecular, de baixa temperatura de

transição vítrea (T_g) (KRISHNAIAH et al., 2012), resultando em tendência à adesão na câmara de secagem e no ciclone de separação, como pode ser visto na Figura 4.3, resultando em baixo rendimento, uma vez que a quantidade de pó depositado no coletor é muito pequena.



Figura 4.3: Secagem do EEB no *spray dryer* sem adição de adjuvantes. Destaques: Schott e ciclone ao final da secagem.

4.2.2. Ensaios discriminativos dos adjuvantes.

A Tabela 4.4 apresenta os parâmetros operacionais e os resultados dos ensaios de secagem do EEB. com os adjuvantes maltodextrina (A), goma arábica (B) e celulose microcristalina (C). As atividades enzimáticas dos pós estão expressas em relação às do líquido antes do processo de secagem. É possível observar valores de umidade variando de 2,98 % até 14,28 % (b.s.), sendo o menor valor obtido na corrida nº22 utilizando celulose microcristalina como adjuvante e o maior na corrida nº8 com maltodextrina. Já a conservação da atividade enzimática após a secagem variou de 41,44 % a 116,97 % para endoglucanase e para xilanase de 26,52 % até 119,95 %. Todos os ensaios foram realizados com três repetições, sendo apresentados os valores médios.

Tabela 4.4: Parâmetros operacionais e resultados obtidos nos ensaios discriminativos de secagem em *spray dryer* de extrato enzimático bruto acrescido de adjuvante.

Corrida	Adj	T _s (°C)		Q _{alim} (ml/min)		Proporção EEB: Adj		Atividade Residual (%)		U _{final} (%, b.s.)
								Endogluc	Xilanase	
1	A	-1	80	-1	7,5	-1	0,5 : 9,5	116,97	85,57	5,72
2	A	-1	80	-1	7,5	1	1,5 : 8,5	116,06	117,67	9,15
3	A	-1	80	1	13,5	-1	0,5 : 9,5	102,70	95,66	5,85
4	A	-1	80	1	13,5	1	1,5 : 8,5	103,54	86,81	5,40
5	A	1	110	-1	7,5	-1	0,5 : 9,5	81,60	108,74	5,43
6	A	1	110	-1	7,5	1	1,5 : 8,5	95,52	81,89	5,85
7	A	1	110	1	13,5	-1	0,5 : 9,5	96,67	89,32	3,42
8	A	1	110	1	13,5	1	1,5 : 8,5	108,70	109,43	14,28
9	B	-1	80	-1	7,5	-1	0,5 : 9,5	103,64	119,38	8,01
10	B	-1	80	-1	7,5	1	1,5 : 8,5	98,63	119,95	5,78
11	B	-1	80	1	13,5	-1	0,5 : 9,5	111,89	119,07	7,74
12	B	-1	80	1	13,5	1	1,5 : 8,5	94,72	115,52	7,22
13	B	1	110	-1	7,5	-1	0,5 : 9,5	103,93	107,83	4,92
14	B	1	110	-1	7,5	1	1,5 : 8,5	93,22	110,98	3,78
15	B	1	110	1	13,5	-1	0,5 : 9,5	112,82	101,56	5,27
16	B	1	110	1	13,5	1	1,5 : 8,5	109,42	119,13	4,16
17	C	-1	80	-1	7,5	-1	0,5 : 9,5	73,14	29,25	5,72
18	C	-1	80	-1	7,5	1	1,5 : 8,5	52,10	48,98	5,54
19	C	-1	80	1	13,5	-1	0,5 : 9,5	78,29	48,38	5,57
20	C	-1	80	1	13,5	1	1,5 : 8,5	48,92	26,52	5,63
21	C	1	110	-1	7,5	-1	0,5 : 9,5	74,89	24,43	4,32
22	C	1	110	-1	7,5	1	1,5 : 8,5	43,71	29,96	2,98
23	C	1	110	1	13,5	-1	0,5 : 9,5	61,84	59,34	4,64
24	C	1	110	1	13,5	1	1,5 : 8,5	41,44	27,22	4,44

É possível observar uma relação entre Atividade Residual (A.Re.) e proporção de teor de sólidos de EEB e Adj (P), onde maiores valores de A.Re. foram obtidos nas formulações com maior concentração de adjuvante (0,5:9,5 EEB.:Adj), tanto para endoglucanase (A.Re. = 93%), como para xilanase (A.Re. = 94,6 %). Em relação à temperatura de saída do ar, também se observam maiores valores de A.Re. na menor temperatura de secagem (80 °C).

As respostas de Atividade Residual foram submetidas à análise de variância, sendo identificados como parâmetros significativos para retenção da atividade endoglucanase a temperatura de saída do gás de secagem (T_s), a proporção de teor de sólidos entre o EEB e o adjuvante (P), e a interação entre os parâmetros adjuvante e a proporção (P), como pode ser visto na Tabela 4. 5. O parâmetro, vazão de alimentação (Q_{alim}), não foi significativo para a retenção da atividade enzimática na faixa analisada; contudo, não se pode generalizar a não influencia desta variável no processo de secagem por *spray drying*, sendo necessário expandir a faixa de estudo para confirmação da premissa. Outro aspecto que deve ser levado em consideração na análise da vazão de alimentação é que, embora o mostrador da bomba peristáltica do equipamento indicasse valores entre 3,3 e 6,7 mL/min para a vazão de alimentação, testes realizados com água para aferição da vazão resultaram nos valores selecionados 7,5 e 13,5 mL/min, possivelmente acima da capacidade de secagem do equipamento, que, de acordo com o fabricante, é igual a 8,3mL/min, justificando a não significância da variável vazão.

Uma equação relacionando a retenção de atividade enzimática endoglucanase com os parâmetros do processo foi obtida por regressão linear múltipla, sendo o coeficiente de determinação (R^2) para o ajuste do modelo estatístico igual a 0,964, demonstrando que o modelo de regressão é determinístico para a conservação de atividade englucanasase nas condições estudadas.

Tabela 4.5: Análise de variância para resposta atividade endoglucanase, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.

ANOVA			R² = 0,964	
Parâmetro	GL	SQ	F	p
Adj	2	10250,82	97,53	0,000
T _s	1	245,97	4,68	0,059
Q _{alim}	1	12,81	0,24	0,633
P	1	526,27	10,01	0,011
Adj x T _s	2	287,52	2,74	0,118
Adj x Q _{alim}	2	117,91	1,12	0,367
Adj x P	2	1021,95	9,72	0,006
T _s x Q _{alim}	1	142,63	2,71	0,137
T _s x P	1	45,11	0,86	0,378
Q _{alim} x P	1	0,27	0,01	0,945
Erro	9	472,95		
Total	23	13124,21		

*Adj = Adjuvante; T_s = Temperatura de saída do ar de secagem (°C); Q_{alim} = Vazão de alimentação (ml/min); P = Proporção de Teor de Sólidos entre o E.E.B. e o Adjuvante;

A análise revelou, para as faixas operacionais selecionadas, uma tendência de melhores atividades residuais para os adjuvantes maltodextrina (MD) e goma arábica (GA), assim como para a menor proporção EEB:Adj, 0,5:0,95 e para a menor temperatura de saída do gás de secagem (T_s = 80 °C), como pode ser observado na Figura 4.4.

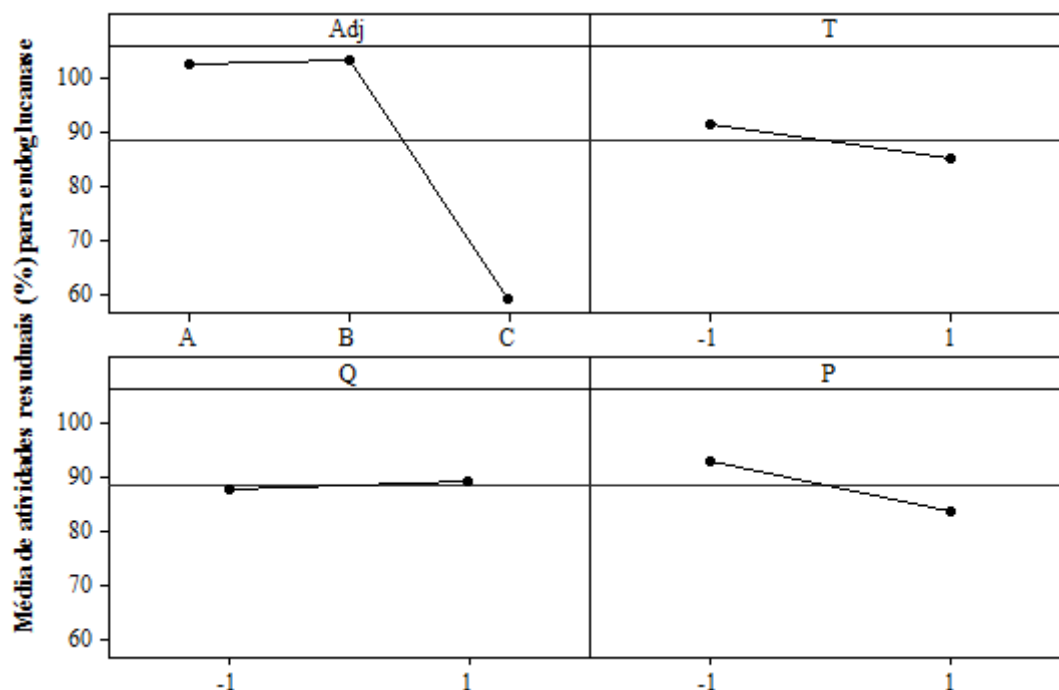


Figura 4.4: Média das atividades residuais de endoglucanase para cada um dos fatores analisados nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.

Para a atividade residual de xilanase, a análise de variância indicou apenas o parâmetro adjuvante (Adj) como significativo, como pode ser visto na Tabela 4.6, e os melhores resultados foram obtidos com goma arábica (GA), como se constata na Figura 4.5. A interação entre os parâmetros adjuvante e proporção de teor de sólidos EEB. e Adj (Adj x P) gerou um valor da estatística p quase significativo a 95% de significância ($p = 0,054$). A equação relacionando os parâmetros do processo e a A.Re de xilanase apresentou um ajuste com maior variabilidade do que o observado para endoglucanase ($R^2 = 0,8647$), haja visto que apenas um dos fatores analisados foi significativo no nível de significância adotado.

Tabela 4.6: Análise de variância para resposta atividade xilanase, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.

ANOVA			$R^2 = 0,8647$	
Parâmetro	GL	SQ	F	p
Adj	2	16089,9	18,89	0,000
T _s	1	171,7	0,42	0,531
Q _{alim}	1	395,8	0,98	0,348
P	1	918,7	2,27	0,166
Adj x T _s	2	1104,3	1,37	0,303
Adj x Q _{alim}	2	464,6	0,57	0,582
Adj x P	2	3328,9	4,12	0,054
T _s x Q _{alim}	1	37,6	0,09	0,767
T _s x P	1	515,7	1,28	0,288
Q _{alim} x P	1	231,0	0,57	0,469
Erro	9	3639,3		
Total	23	26897,5		

*Adj = Adjuvante; T_s = Temperatura de saída do ar de secagem (°C); Q_{alim} = Vazão de alimentação (ml/min); P = Proporção de Teor de Sólidos entre o E.E.B. e o Adjuvante;

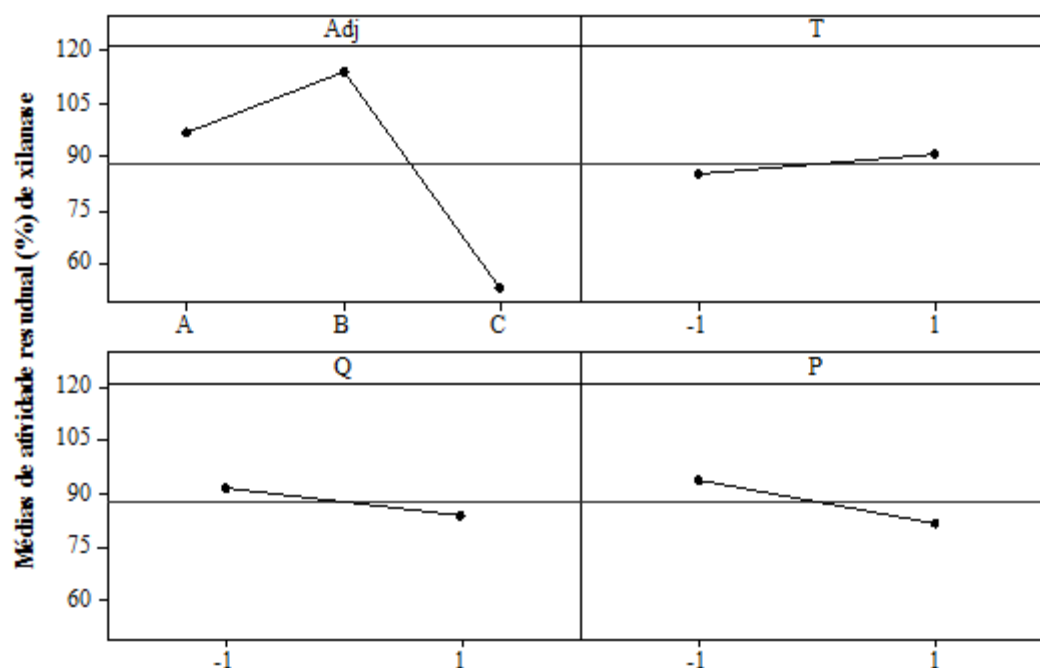


Figura 4.5.: Variação da variável de resposta atividade residual de xilanase em função dos níveis das variáveis controladas, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.

Em relação ao teor de umidade do pó obtido, nenhum dos parâmetros analisados revelou-se significativo, tendo o modelo um coeficiente de determinação $R^2 = 0,6497$ ou seja, o modelo tem uma forte componente não determinística. Como pode ser visto na Tabela 4.7, a interação entre adjuvante e proporção do teor de sólidos resultou no menor valor p (0,113), reafirmando sua importância para o processo como um todo.

Apesar dos parâmetros não serem significativos, é possível estabelecer algumas relações para a umidade. Os menores valores de umidade foram obtidos nos ensaios com maior temperatura de saída do ar de secagem (110 °C), menor vazão de alimentação (7,5 ml/min) e menor concentração de adjuvante (1,5:8,5 (EEB.:Adj)), à exceção do adjuvante maltodextrina, cuja menor umidade esteve relacionada à maior vazão de alimentação (13,5 ml/min) e maior concentração de adjuvante (0,5:9,5 (EEB.:Adj)). Em relação aos adjuvantes utilizados, os menores valores de umidade média

estão associados à M.C.C., seguidos da G.A. e MD, com 4,83 %, 5,86 % e 6,88 % (b.s.), respectivamente; assim, supõe-se que, devido à pouca solubilidade deste material em água, esta estaria mais disponível para sua transferência para o ar de secagem.

Tabela 4.7: Análise de variância para resposta umidade nos ensaios de discriminação dos adjuvantes

ANOVA			$R^2 = 0,6497$	
Parâmetro	GL	SQ	F	p
Adj	2	16,556	1,76	0,227
T _s	1	7,964	1,69	0,226
Q _{alim}	1	1,715	0,36	0,561
P	1	2,397	0,51	0,493
Adj x T _s	2	11,755	1,25	0,332
Adj x Q _{alim}	2	0,084	0,01	0,991
Adj x P	2	24,466	2,81	0,113
T _s x Q _{alim}	1	5,429	1,15	0,311
T _s x P	1	2,272	0,48	0,505
Q _{alim} x P	1	3,908	0,83	0,386
Erro	9	42,350		
Total	23	120,895		

*Adj = Adjuvante; T_s = Temperatura de saída do ar de secagem (°C); Q_{alim} = Vazão de alimentação (l/h); P = Proporção de Teor de Sólidos entre o E.E.B. e o Adjuvante;

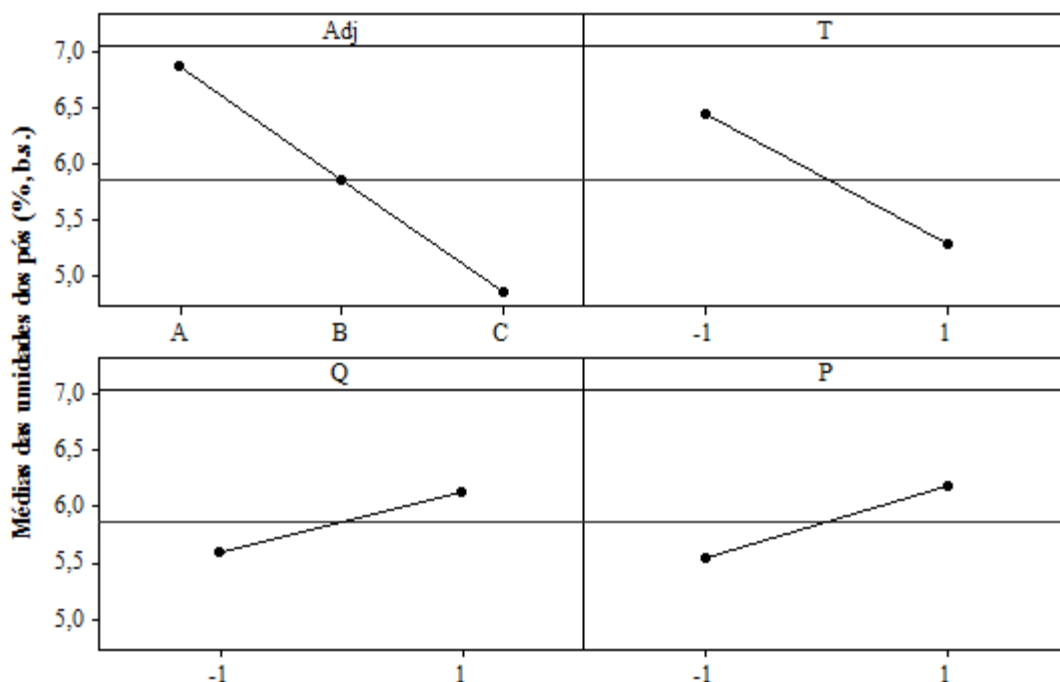


Figura 4.6: Média das umidades finais dos pós para cada um dos fatores analisados nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.

Embora a vazão de solução ou suspensão não tenha sido um fator estatisticamente significativo nas análises dos ensaios de discriminação dos adjuvantes, sua relação com as temperaturas de entrada (T_e) e saída do ar de secagem e, conseqüentemente, com a temperatura média na câmara de secagem, não podem ser negligenciadas. Durante os ensaios, a temperatura de saída da câmara e a vazão de solução ou suspensão foram as variáveis controladas e constatou-se aumento da temperatura de entrada do gás de secagem para maiores vazões de alimentação, como pode ser observado na Tabela 4.8. A variação entre T_e e T_s (ΔT) pode ser atribuída ao aumento da taxa de evaporação da água com o aumento de Q , ou seja, para manter T_s constante é necessário que haja aumento de T_e para que mais água seja evaporada (AMIGHI et al, 2008; AGHBASHLO et al.,2013). Deste modo, apesar de Q não ter sido

um fator significativo, indiretamente afeta a temperatura interna da câmara, este sim um fator importante na manutenção das atividades das endoglucanase.

Tabela 4.8: Valores observados para temperatura de entrada do ar conforme variação da vazão de alimentação.

Q (ml/min)	T _{saída} (°C)	T _{entrada médio} (°C)	ΔT (°C)
7,5	80	135	55
	110	185	75
13,5	80	165	85
	110	205	95

A literatura é unânime quanto á importância do uso de adjuvantes na secagem de bioativos, como as enzimas, uma vez que processos como *spray-drying* induz ao *stress*, podendo levar a instabilidades químicas e/ou físicas; entretanto os mecanismos de estabilização destes compostos no estado sólido ainda não são bem definidos (CHANG;PIKAL 2009). Segundo Carpenter & Crowe (1984) e Chang & Pikal (2009) mudanças na estrutura secundária das proteínas (α -hélice, β -folha) observadas nos processos de secagem como *spray-drying* são atribuídas à remoção de moléculas de água de hidratação, necessárias para formação de ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura secundária, sendo, portanto, necessário o uso de um adjuvante que interaja estequiometricamente com as proteínas nos sítios específicos.

Dentre os adjuvantes utilizados, a maltodextrina e a goma arábica formam uma solução quando adicionadas ao EEB, ao contrário da celulose microcristalina que resulta em suspensão. Assim, supõe-se que os grupos hidroxilas da maltodextrina e da goma arábica formam ligações de hidrogênio com a molécula da proteína, substituintes às da

água, rompidas durante a secagem. Já o efeito negativo observado com o uso da celulose microcristalina, pode estar relacionado à sua alta estabilidade de sua estrutura, com pequena quantidade de substituintes polares que possam se ligar às proteínas. Desta forma, a celulose microcristalina não estaria formando ligações suficientes com os compostos do EEB, os quais estariam se depositando sobre o adjuvante, sem serem adsorvidos quimicamente pelo mesmo. Portanto, durante a secagem, que ocorre mais eficientemente devido à baixa solubilidade do material, as proteínas ficam mais expostas aos efeitos do processo, ao contrário do que deve ocorrer com os adjuvantes maltodextrina e goma arábica, que protegem fisicamente os compostos do EEB, colaborando para a manutenção da estrutura nativa das proteínas analisadas por estabilização termodinâmica de sua conformação. Comportamento semelhante foi observado por Machado (2011) que obteve maiores degradações de compostos termosensíveis, como flavonóides totais e marcadores químicos, quercetrina e afzelina, do fitoterápico *Copaifera langsdorffii* ao utilizar celulose microcristalina como excipiente, e Tonon et al. (2010) em relação à preservação da atividade antioxidante de açaí quando seco em *spray-dryer* utilizando adjuvante de baixa solubilidade em água, o amido de tapioca.

Outras propostas de mecanismos de proteção têm sido reportadas na literatura, como a teoria relacionada à característica amorfa do material sólido formado, onde a estabilidade é consequência do aprisionamento das proteínas em um sólido amorfo, minimizando dessa forma, a mobilidade molecular no sólido e conseqüente degradação por desdobramento ou outra degradação que requer mobilidade. (CONSTANTINO et al., 1994; CHANG; PIKAL, 2009; COSTA-SILVA et al., 2010).

4.2.3. Ensaios de otimização das condições de secagem

Os ensaios de secagem para otimização da retenção da atividade enzimática foram inicialmente realizados para as enzimas endoglucanases e xilanases, porém esta última apresentou grande oscilação em relação às repetições dos ensaios, sendo assim, prosseguiu-se o trabalho com a enzima endoglucanase, real foco do trabalho. No Anexo 1 estão apresentados os valores codificados e as respostas das atividades residuais da xilanase obtidos.

Após selecionar o adjuvante goma arábica, buscou-se otimizar as condições de secagem visando a manutenção da atividade das endoglucanases. Nestes ensaios, o teor de sólidos do EEB foi fixado em 1,5 %, sendo analisado os fatores temperatura de saída do ar de secagem (T_s), vazão de alimentação do *spray-dryer* (Q_{Alim}) e sólidos totais presentes na amostra (ST), através de um planejamento Box-Behnken. Os ensaios foram realizados com três repetições, sendo a média da atividade residual e da umidade final dos pós apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Valores codificados e respostas da atividade residual da endoglucanase e umidade final dos pós nos ensaios de otimização das condições de secagem.

Ensaio	T _s (°C)		Q _{alim} (mL/min)		ST (%)		Atividade	DP	%
							Residual (%)		Umidade (b.s.)
1	-1	70	-1	8	0	15	99,74	0,21	5,88
2	1	110	-1	8	0	15	70,65	2,17	2,59
3	-1	70	1	16	0	15	92,85	0,79	8,22
4	1	110	1	16	0	15	79,18	0,77	3,43
5	-1	70	0	12	-1	10	97,07	0,52	8,20
6	1	110	0	12	-1	10	82,94	3,75	3,75
7	-1	70	0	12	1	20	91,63	0,75	6,07
8	1	110	0	12	1	20	83,12	0,93	3,26
9	0	90	-1	8	-1	10	95,81	1,40	3,35
10	0	90	1	16	-1	10	88,76	2,39	5,42
11	0	90	-1	8	1	20	100,76	0,28	3,59
12	0	90	1	16	1	20	85,82	1,30	4,99
13	0	90	0	12	0	15	94,69	0,25	4,05
14	0	90	0	12	0	15	94,34	1,63	4,16
15	0	90	0	12	0	15	94,85	1,98	4,65
16	0	90	0	12	0	15	94,76	1,34	4,20
17	0	90	0	12	0	15	96,40	1,28	4,15
18	0	90	0	12	0	15	92,54	1,35	4,11
19	0	90	0	12	0	15	94,18	0,54	4,33
Média Global							91,1		4,6

Conforme as condições aplicadas na secagem *spray-drying*, a atividade residual de endoglucanase variou de 70,65 a 100,76 %, ensaios 2 e 11, respectivamente. Ainda que a faixa de variação de A.Re. tenha sido ampla, a média foi elevada, 91,1%, com intervalo de confiança a 95% de significância (IC) baixo, 3,4%. Da mesma forma, observou-se valores de umidade de 2,59 a 8,22 % (b.s), ensaios 2 e 3, respectivamente, e média das umidades dos pós e IC baixos, $4,6\% \pm 0,7\%$. A partir dos dados apresentados notam-se melhores condições de conservação nas menores temperaturas (70 e 90 °C), e menores vazões de alimentação (8 e 12 ml/min). Tal observação é comprovada pelas curvas de contorno (Figura 4.7) e pela condição ótima de secagem obtida pela solução das equações canônicas, que indicou máxima atividade para temperatura de saída do ar de 74 °C (refletindo em um valor médio de temperatura de entrada de 130 °C) e vazão de alimentação de 8 ml / min.

Observações similares de impactos da degradação de enzimas relacionados a altas temperaturas de secagem são comumente reportados na literatura (NAMALDI et al., 2006; ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2007; YOSHII et al., 2008; BURKI et al., 2011). Estudos sugerem que os efeitos negativos do processo ocorrem no período de queda da taxa de secagem, ou seja, nos últimos estágios do processo, quando o gradiente de umidade é baixo e a difusão da água para a superfície da gota não consegue manter a saturação, de modo que a temperatura da gota aumenta, aproximando-se da temperatura de saída do ar de secagem (AMERI; MAA, 2006; SLOTH et al., 2009; SCHUTYSER et al., 2012).

Em relação ao teor de sólidos, nota-se que os resultados obtidos para teor de sólidos totais na formulação, não suporta a hipótese sugerida anteriormente, de que maiores concentrações de adjuvante, resultariam em maior proteção ao bioativo, podendo-se então inferir que existe um limite para a concentração de adjuvante utilizada

abaixo do qual haveria influência desta variável. As curvas de contorno quadráticas (Figura 4.7 B e C) e a análise de variância (Tabela 4.11) corroboram a percepção de não influência da concentração do adjuvante, o que do ponto de vista econômico sugere menor concentração de adjuvantes na formulação, ou seja, 10 %, uma vez que se estaria comercializando uma maior quantidade de bioativos. No entanto, ensaios complementares deveriam ser realizados para identificar-se o valor da menor concentração admissível para o adjuvante sem ocasionar perda da sua capacidade de proteção às proteínas. Concentrações próximas à mínima encontrada no presente trabalho são reportadas na literatura como adequadas. Costa-Silva (2010) fez ensaios para discriminar adjuvantes (maltodextrina, manitol, goma arábica, trealose, sacarose, β -ciclodextrina e lactose) para a secagem de lipases e, dentre as concentrações testadas, observou a concentração de 10 % como a mais adequada; a concentração mais baixa empregada, 10 %, de goma arábica também foi melhor para a preservação de bifidobactérias no estudo de Lian et al (2002). Segundo ANANDHARAMAKRISHNAN et al., (2007) alta concentração de sólidos da solução resulta em uma crosta mais espessa na superfície da partícula que, associado à altas temperaturas do gás de secagem e elevadas taxas de alimentação, resulta na formação rápida de uma massa seca, enquanto o interior ainda está úmido, favorecendo assim a desnaturação das proteínas.

As equações das curvas de contorno traçadas a partir do modelo quadrático são fornecidas na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Equações das curvas de contorno para retenção de atividade endoglucanase nos ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica.

% A.Re versus Temperatura de saída e Vazão de alimentação	$\% A.Re = 39,7994 + 1,9096 * x - 1,462 * y - 0,0161 * x * x + 0,0482 * x * y - 0,1462 * y * y$
% A.Re versus Vazão de Alimentação e Sólidos Totais	$\% A.Re = 53,7035 + 5,6446 * x + 1,2406 * y - 0,2001 * x * x - 0,0986 * x * y - 0,0046 * y * y$
% A.Re versus Temperatura de saída e Sólidos totais	$\% A.Re = 16,326 + 2,443 * x - 1,7997 * y - 0,017 * x * x + 0,0141 * x * y + 0,0151 * y * y$

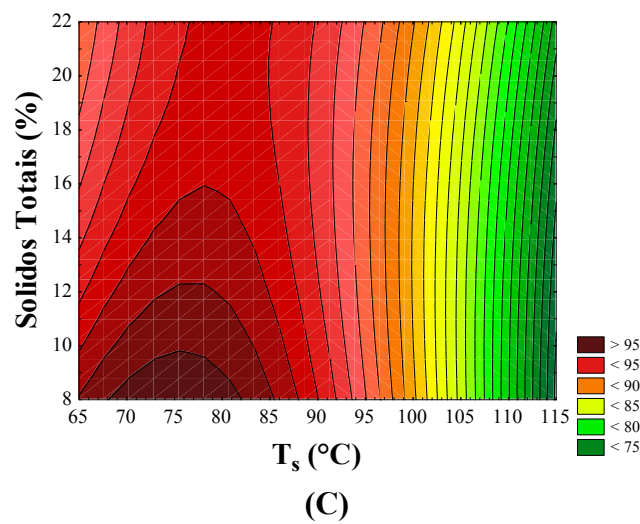
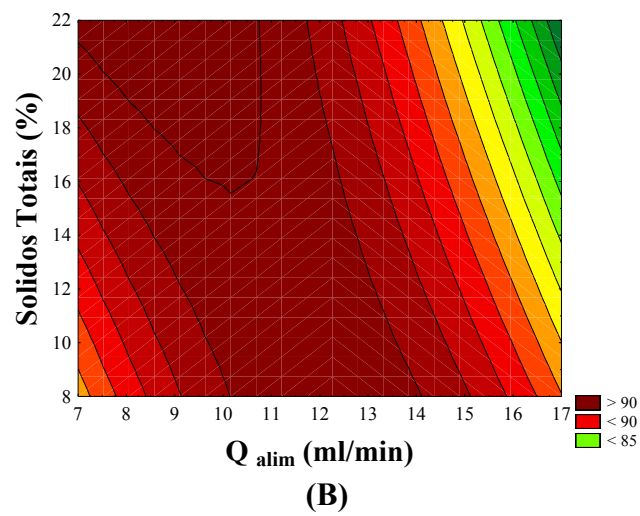
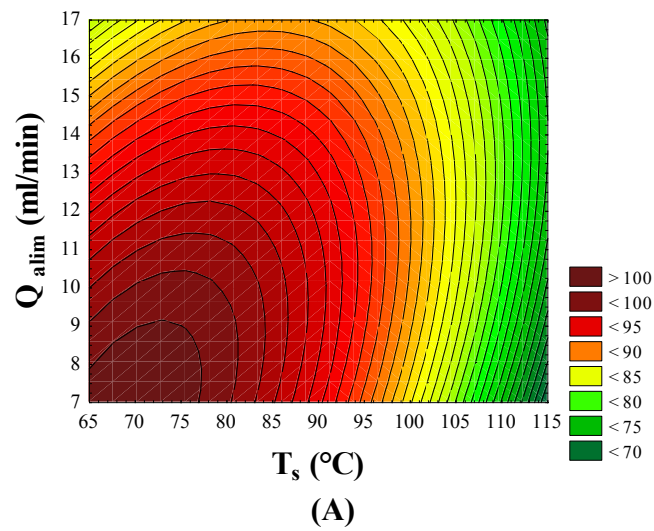


Figura 4.7: Curvas de contorno quadráticas para as atividades enzimáticas residuais para soluções reconstituídas a partir de pós secos em *spray-dryer* nos ensaios de otimização das condições de secagem com o adjuvante goma arábica.

Assim como observado nas curvas de contorno, a literatura também indica que altas temperaturas e baixas vazões resultam em menor preservação de materiais sensíveis ao calor, como outras enzimas (JESUS, 2002), proteínas (MAA et al., 1998), pigmentos (TONON et al 2008; VARDIN;YASAR, 2012), microorganismos (BOZA et al., 2004; SILVA et al, 2011) e fitoterápicos (MACHADO, 2011).

A análise de variância destes resultados, Tabela 4.11, mostra que o ajuste do modelo pode ser considerado satisfatório (coeficiente $R^2 = 87,08\%$). Observa-se que ao nível de significância de 5 % foram significativos o termo linear e quadrático da $T_{saída}$, e se for considerado nível de significância de 10 %, também o fator linear da Q_{alim} e a interação $T_{saída} \times Q_{alim}$ seriam significativos. O teor de sólidos totais (ST) não foi significativo em nenhum dos desdobramentos dos graus de liberdade. Verificam-se ainda os baixos valores de SQ para o erro puro ($SQ = 7,93$) quando comparados à SQ_{Total} (1043,49), ou seja, há baixa variabilidade dentro de cada grupo que compõe a amostra.

Tabela 4.11: ANOVA para atividade residual endoglucanase para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica.

ANOVA			$R^2 = 87,08 \%$	
Parâmetro	GL	SQ	F_{calc}	p
Regressão	9	908,66	6,74	0,004
Linear	3	587,60	13,07	0,001
$T_{Saída}$	1	534,52	35,68	0,000
Q_{Alim}	1	51,77	3,46	0,096
ST	1	1,31	0,09	0,774
Quadrática	3	238,20	5,30	0,022
$T_{Saída} \times T_{Saída}$	1	211,34	12,70	0,006
$Q_{Alim} \times Q_{Alim}$	1	24,87	1,75	0,219
ST x ST	1	1,99	0,13	0,724
Interação	3	82,86	1,84	0,210
$T_{Saída} \times Q_{Alim}$	1	59,38	3,96	0,078
$T_{Saída} \times ST$	1	7,93	0,53	0,485
$Q_{Alim} \times ST$	1	15,56	1,04	0,335
Erro residual	9	134,82		
Falta de ajuste	3	127,02	32,56	0,000
Erro puro	6	7,80		
Total	18	1043,49		

*Nível de significância 5 %; T_s = Temperatura de saída do ar de secagem (°C); Q_{alim} = Vazão de alimentação (mL/min); ST = Sólidos Totais da formulação (%).

A Tabela 4.12 apresenta a ANOVA para a umidade dos pós, onde se constata que, a 95 % de índice de significância, todos os termos lineares são significativos para as variáveis adotadas, e que apenas o termo quadrático de T_s é significativo; observa-se ainda que a interação temperatura de saída e vazão de alimentação ($T_s \times Q_{Alim}$) é pouco abaixo do índice de significância adotado ($p = 0,053$). O ajuste do modelo apresentou coeficiente de determinação elevado ($R^2 = 97,28\%$), e, assim como para a resposta atividade enzimática residual, a soma quadrática do erro puro apresenta baixos valores quando comparados à SQ_{Total} .

Tabela 4.12: ANOVA para umidade dos pós após secagem em *spray-dryer* para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica

ANOVA			$R^2 = 97,28 \%$	
Parâmetro	GL	SQ	F _{calc}	p
Regressão	9	43,55	35,75	0,000
Linear	3	38,91	95,82	0,000
T _{Saída}	1	31,48	232,57	0,000
Q _{Alim}	1	6,44	47,6	0,000
ST	1	0,98	7,29	0,024
Quadrática	3	3,62	8,92	0,005
T _{Saída} x T _{Saída}	1	3,23	22,37	0,001
Q _{Alim} x Q _{Alim}	1	0,07	0,85	0,380
ST x ST	1	0,3	2,27	0,166
Interação	3	1,01	2,51	0,124
T _{Saída} x Q _{Alim}	1	0,23	1,74	0,220
T _{Saída} x ST	1	0,67	4,97	0,053
Q _{Alim} x ST	1	0,11	0,83	0,386
Erro residual	9	1,21		
Falta de ajuste	3	0,97	7,94	0,016
Erro puro	6	0,24		
Total	18	44,77		

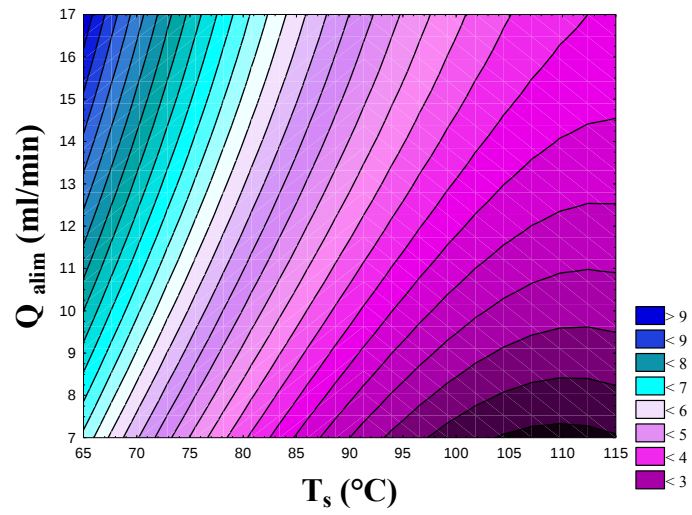
*Nível de significância 5 %; T = Temperatura de saída do ar de secagem (°C); Q = Vazão de alimentação (mL/min); ST = Sólidos Totais da formulação (%).

As curvas de contorno para umidade dos pós são apresentadas na Figura 4.8 e revelam pós mais secos para maiores temperaturas e menores vazões de alimentação, comportamento, típico deste processo de secagem, visto que maiores temperatura de entrada e saída do ar aumentam o gradiente de temperatura entre o líquido atomizado e o ar de secagem, refletindo em maior transferência de calor para a gota e conseqüente aumento da taxa de evaporação (MASTERS, 1985; LEÓN-MARTÍNEZ et al., 2010; KUROZAWA et al., 2011;). Já em relação ao teor de sólidos na formulação, observa-se nas curvas de contorno, que na faixa analisada (10 – 20 % ST) a umidade obtida é sempre baixa, como pode ser visto na Figuras 4.8 B e C. Esperava-se que o teor de umidade aumentasse com o aumento da concentração do adjuvante, uma vez que se acreditava que os sólidos dispostos na superfície da partícula formariam uma grossa camada, provocando a retenção da água no interior da partícula, principalmente quando associado às maiores temperaturas do gás de secagem e taxa de alimentação. Este fenômeno possivelmente deve ocorrer para teores de sólido acima dos empregados neste trabalho.

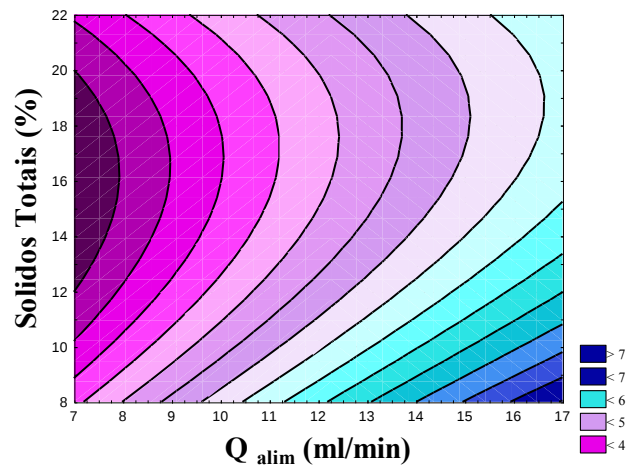
As equações das curvas de contorno traçadas a partir do modelo quadrático são fornecidas na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Equações das curvas de contorno para teor de umidade nos ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica.

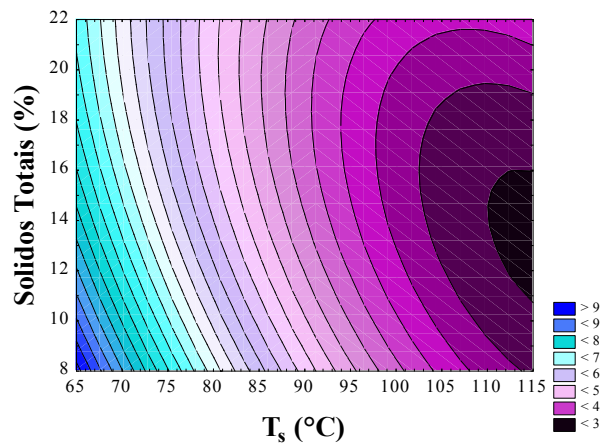
% U versus Temperatura de saída e Vazão de alimentação	$\% U_{bs} = 23,4055 - 0,4469 * x + 0,6905 * y + 0,0021 * x * x - 0,003 * x * y - 0,0081 * y * y$
% U versus Vazão de alimentação e Sólidos totais	$\% U_{bs} = 4,0445 + 0,4425 * x - 0,4027 * y - 0,0039 * x * x - 0,0084 * x * y + 0,0144 * y * y$
% Umidade versus Temperatura de saída e Sólidos Totais	$\% U_{bs} = 38,1449 - 0,522 * x - 0,7307 * y + 0,002 * x * x + 0,0041 * x * y + 0,0097 * y * y$



(A)



(B)



(C)

Figura 4.8: Curvas de contorno quadrática para a umidade final para o pós obtidos em *spray-dryer* nos ensaios de otimização das condições de secagem empregando o adjuvante goma arábica

Em relação às temperaturas de entrada e de saída do ar de secagem, observa-se que, assim como no ensaio discriminativo, para uma mesma temperatura de saída, a temperatura de entrada tende a aumentar conforme a vazão de alimentação aumenta, uma vez que a quantidade de água a ser evaporada também aumenta, como pode ser visto na Tabela 4.14. Por outro lado, quando se busca uma relação do teor de sólido na formulação e T_e , infere-se que não há variação entre a menor e a maior porcentagem de sólidos, supondo-se que o teor máximo de sólidos ainda seja baixo para que esta variável possa afetar sensivelmente as características de secagem. Deve-se considerar que a vazão de alimentação da solução não foi uma variável significativa, a 95% de significância, nos ensaios realizados, possivelmente por estar no limiar da capacidade máxima de secagem do equipamento e que se vazões menores fossem empregadas, possivelmente o teor de sólidos afetaria a T_e .

Tabela 4.14: Relação entre temperatura de entrada do ar de secagem com a vazão de alimentação e teor de sólidos na formulação, para os ensaios de otimização de secagem empregando-se o adjuvante goma arábica.

	Q_{alim} (ml/min)			% ST		
	8	12	16	10	15	20
T_{entrada} (°C) (*)	157	173	189	175	173	170

(*) Valor médio entre todas as condições experimentais que fornecessem uma mesma $T_{\text{saída}}$.

As estatísticas dos ajustes dos modelos para A.Re. e para U são mais determinísticas para a variável U, indicando que as alterações na conformação das enzimas não está relacionada somente a aspectos físicos decorrentes do processo de secagem, havendo razões físico-químicas que não são compreendidas através da análise dos resultados aqui obtidos. Possivelmente, as drásticas alterações de pH da gota, a

mobilidade da água e suas ligações com os constituintes sólidos do material e as características físico-químicas intrínsecas das proteínas são fatores que influenciam a atividade enzimática e não necessariamente estão ligados ao processo físico de secagem.

Tabela 4.15: Condições otimizadas para melhor % A.Re e menor % U ao final da secagem

Resposta	T_s (°C)	Q_{alim} (ml/min)
Melhor % A.Re.	74	8
Menor % U	110	8

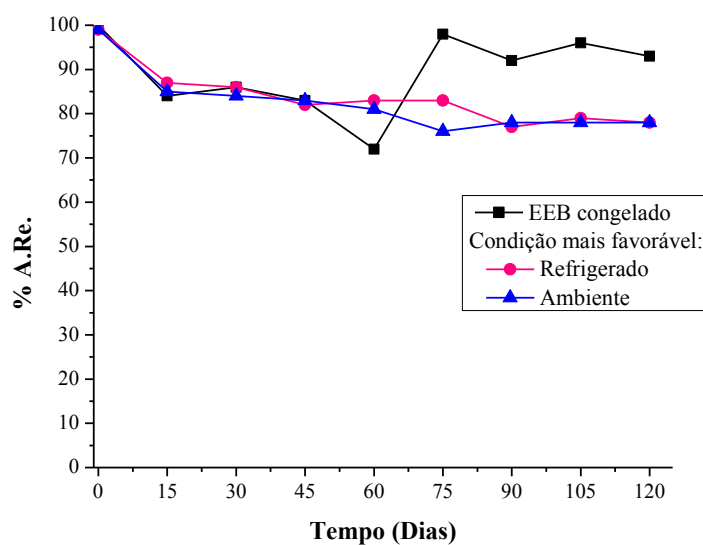
As condições ótimas de secagem obtidas através da solução das equações canônicas são apresentadas na para as maiores retenções de atividade enzimática e menores umidade Tabela 4.15, resultaram em baixas vazões de alimentação, o que pode estar relacionado, ao fato de atomizadores de duplo-fluido apresentar sua eficácia reduzida à medida que a vazão de alimentação do líquido aumenta, uma vez que o ar de atomização age sobre o líquido de forma menos homogênea (AMERI; MAA, 2006). Reforce-se que a variável Q_{Alim} só é estatisticamente significativa a 90% de nível de significância e que as vazões empregadas estão no limiar máximo de capacidade do equipamento.

Por outro lado, as temperaturas de saída do ar de secagem diferem consideravelmente, 74°C para a maior A.Re. e 110 °C para a menor U. Embora a umidade seja um indicador qualitativo do processo, assumiu-se como temperatura ótima estimada para a retenção de atividade enzimática, por ser este o objetivo do trabalho, o de manter a atividade do material bioativo após a secagem. Ademais, os valores de umidade dos pós obtidos nos ensaios nas menores temperaturas foram próximos a 10%, valores aceitáveis para este tipo de material, uma vez que, quando ocorrem, as

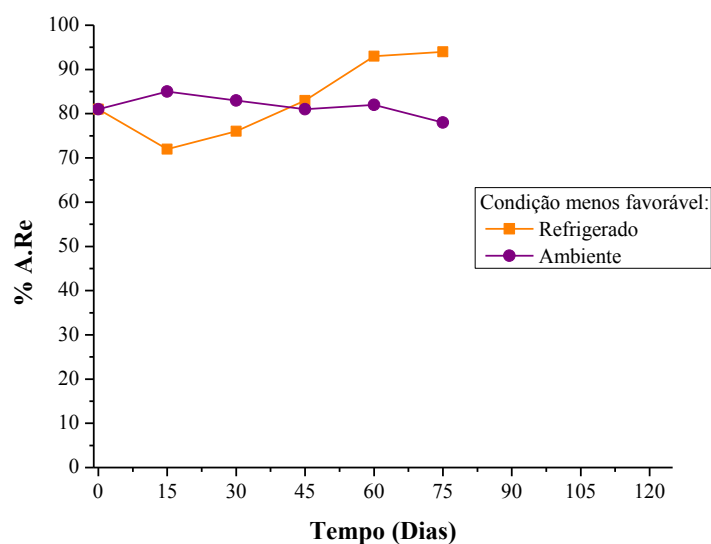
alterações bioquímicas neste teor de umidade são bastante lentas. (AMERI;MAA, 2006). Para confirmar estes resultados, três secagens adicionais foram realizadas na condição ótima prevista para A.Re., sendo o valor médio obtido igual a 94,5% com intervalo de confiança, a 95% de índice de confiabilidade, igual a 0,6% e um valor médio de umidade final de 6,5 %. Comparando-se com o maior valor experimental de A.Re., 100,8%, constata-se que o valor obtido na condição ótima é inferior. Tal discrepância pode ser explicada pela razoável porção não explicada pelo modelo estatístico ajustado (12,9%), o que acarreta incerteza razoável na determinação da condição ótima de secagem.

4.3. Ensaios de armazenamento

Os resultados para a estabilidade dos pós, avaliada através da retenção da atividade enzimática em relação à atividade inicial da formulação líquida (EEB + GA + Ae) e do EEB líquido estão apresentados na Figura 4.9. A condição denominada “menos favorável” foi selecionada de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de otimização das condições de secagem e proporcionam os mais baixos valores de atividade enzimática residual, e coincidentemente os menores teores de umidade final, sendo as condições operacionais menos favoráveis: $T_s = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Q_{\text{alim}} = 8\text{ mL/min}$, $ST = 15\text{ \%}$.



(A)



(B)

Figura 4.9: Retenção da atividade endoglucanase do EEB líquido congelado e dos pós obtidos na condição mais favorável (A) e menos (B), armazenados sob refrigeração e no ambiente.

É possível notar que o armazenamento em diferentes condições do pó obtido na condição mais favorável de secagem apresenta comportamento semelhante, ou seja, de queda de A.Re. nos primeiros 15 dias, seguida de uma tendência de estabilidade em torno de 83 %. Já o obtido na condição menos favorável as A.Re. diferem mais entre si,

porém também é possível observar tendência à estabilidade, também em torno de 80%. O comportamento observado para ambas as condições de secagem durante o armazenamento pode ser considerado satisfatório quando comparado à literatura. Neto (2012) obteve comportamento semelhante ao armazenar por 180 dias proteases secas em *spray-dryer* com maltodextrina, retendo nas melhores condições de secagem, 80 % da atividade enzimática quando armazenadas a 25 °C, já a 4 °C observou retenção de 90 % tanto para os pós obtidos na melhor condição quanto para o extrato bruto líquido. Por outro lado, Belghith et al. (2001) relata perda superior a 30% de atividade endoglucanase imediatamente após a secagem em *spray-dryer* e comportamento de queda na retenção de atividade durante o armazenamento a 4 e 30 °C a partir de 60 dias de armazenamento.

Encontram-se também na literatura relatos de estabilidade de proteínas no estado sólido similares ou até menor que quando em solução (LAI;TOPP, 1999), como observado nos resultados aqui obtidos para o EEB, que revelou um comportamento inesperado, de queda de A.Re. até o t= 45 dias, seguido de um retorno a valores próximos a 96%. Ramos et al. (2012) em estudo de armazenamento sob congelamento e refrigeração de extrato enzimático líquido de fitase bruta, também observaram comportamento semelhante,ou seja, oscilatório da atividade relativa.

Segundo a literatura (ARAKAWA et al.,1993; KUELITZO et al, 2008) durante o congelamento, as proteínas são expostas a tensões, devido à baixa temperatura e a formação de gelo. Se a proteína fosse excluída dos cristais de gelo durante o congelamento, ficariam mais suscetíveis às mudanças químicas e físicas que ocorrem na fase de não congelada, pois, conforme o gelo é formado, a concentração dos solutos aumenta drasticamente e se os solutos presentes na fração não congelada a desestabilizassem, o efeito de sua concentração poderia provocar a desnaturação da

proteína. Outro fator de *stress* está relacionado à duração da exposição da proteína às condições desfavoráveis. Durante o congelamento e descongelamento, as proteínas estão sujeitas a outras condições desestabilizadoras, como a alteração no pH da solução, e durante o período de armazenamento podem ainda ocorrer reações nas ligações peptídicas, podendo ao longo do tempo de armazenamento a proteína adquirir uma estrutura diferente da original. Assim, constata-se que questões complexas estão associadas à estabilidade das enzimas devido ao congelamento, principalmente em estado bruto líquido, de modo que a compreensão dos fenômenos até aqui observados neste trabalho necessitariam de estudos mais aprofundados dos fenômenos bioquímicos que ocorrem na solução protéica.

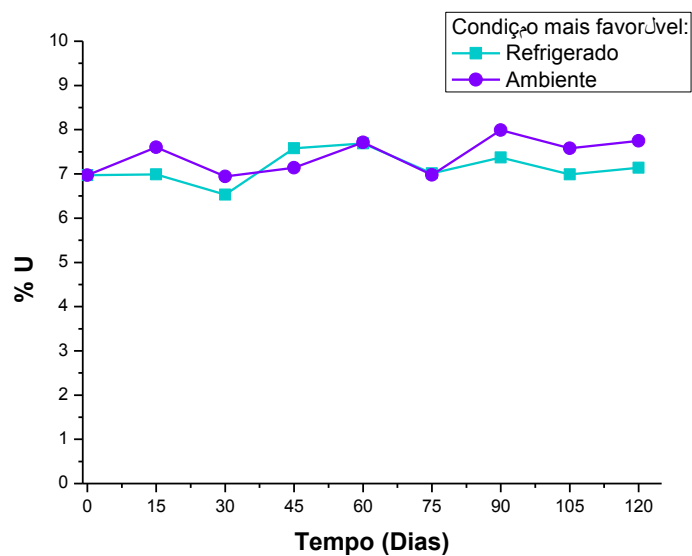
Na Tabela 4.16 são apresentadas as médias das A.Re. dos resultados obtidos para as condições de armazenamento testas e os respectivos desvios padrão (DP). A estes resultados foi aplicado um teste de Tukey a 95% de nível de significância, podendo-se observar que no período analisado não há diferença estatística entre os pós obtidos nas condições denominadas como mais e menos favorável, nem entre as condições de armazenamento, se à temperatura ambiente ou sob refrigeração, assim como também não diferem do EEB líquido. Assim, pode-se classificar o armazenamento dos pós em condições ambientes como a melhor alternativa de armazenamento, uma vez que do ponto de vista econômico é mais vantajoso. Já em relação à secagem das enzimas, apesar dos pós e do líquido apresentarem A.Re. próximas durante o período analisado, pode-se considerar a secagem por *spray-drying* viável, uma vez que os extratos enzimáticos aquosos requerem maiores cuidados durante o transporte e armazenamento, ao contrário de formulações secas que apresentam praticidade no manuseio e transporte

Tabela 4.16: Teste Tukey (95%) para as amostras armazenadas e valores médio das A.Re. e respectivos desvios padrões (DP).

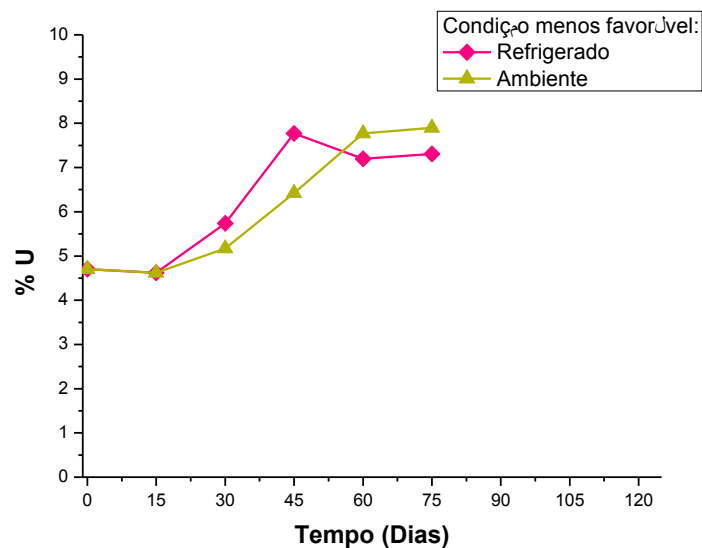
Tratamento (*)	A.Re. $\pm$ DP
Mais favorável - Refrigerado	84,5 $\pm$ 6,7 ^a
Mais favorável – Ambiente	83,0 $\pm$ 7,2 ^a
Menos favorável – Refrigerado	81,0 $\pm$ 7,9 ^a
Menos favorável – Ambiente	84,6 $\pm$ 3,5 ^a
EEB líquido congelado	89,7 $\pm$ 10,1 ^a

(*)Valores apresentados nas linhas seguidos de letras iguais não são distintos significativamente a 95% de confiabilidade

Em relação à umidade dos pós, é possível observar na Figura 4.10 A que o pó obtido na condição mais favorável de secagem apresentou menor variação na preservação da atividade enzimática, no período analisado, em ambas as condições de armazenamento, sendo comprovado pelo teste de Tukey, que a 95 % de nível de significância, como pode se visto na Tabela 4.17. Por outro lado o pó obtido na condição menos favorável de secagem apresentou uma tendência de aumento da umidade nas duas condições de armazenamento, como se pode constatar na Figura 4.10 B, porém, o teste de Tukey indicou também não haver diferenças significativas entre as umidades nas duas condições de armazenamento.



(A)



(B)

Figura 4.10: Teor de umidade dos pós obtidos na “melhor” (A) e “pior” condição (B), armazenados sob refrigeração e à temperatura ambiente.

Tabela 4.17: Teste Tukey e os valores médios da umidade (%) com respectivos desvios padrão (DP) dos pós armazenados.

Tratamento (*)	% U $\pm$ DP
Mais favorável - Refrigerado	7,14 $\pm$ 0,38 ^a
Mais favorável – Ambiente	7,36 $\pm$ 0,4 ^a
Menos favorável – Refrigerado	6,0 $\pm$ 1,43 ^b
Menos favorável – Ambiente	5,73 $\pm$ 1,34 ^b

(*)Valores apresentados nas linhas seguidos de letras iguais não são distintos significativamente a 95% de confiabilidade

A partir destes resultados apresentados, nota-se que as respostas analisadas dos pós obtidos nas duas condições de secagem e armazenados tanto em temperatura ambiente como refrigerada mostram uma tendência de se igualarem ao longo do armazenamento, tendo atividades residuais médias de 83 % e umidade 6,55 %. Assim pode-se inferir ser desnecessário buscar as condições ótimas de secagem através da resolução das equações canônicas, tanto para A.Re. como para e U pois as condições extremas de secagem empregadas convergiram para os mesmos valores de atividade residual e umidade ao longo deste período de armazenamento. Caso o material fosse empregado em curto intervalo após sua secagem, a condição denominada mais favorável seria a mais adequada, além de ser obtida a uma temperatura menor, resultando em maior economia de energia. Outro aspecto operacional a se considerar é que a vazão de solução não foi um fator significativo para a retenção de atividade endoglucanase, de modo que a adição das maiores vazões resultaria em aumento da produtividade do processo. De todo modo, em equipamentos industriais testes específicos devem ser realizados, pois a configuração do equipamento certamente

influenciará na avaliação das condições ideais de secagem e outros aspectos, como o rendimento do processo, aqui não analisado, deverão ser considerados.

4.4. Propriedades físico-químicas da endoglucanase.

As variações de pH e a temperatura afetam a atuação das enzimas no meio reacional ao qual são aplicadas. Assim, para a avaliação do efeito do pH e temperatura na atividade da enzima endoglucanase foi realizado um planejamento fatorial rotacional de composto central para análise por superfície de resposta. A Tabela 4.18 apresenta o planejamento, com os resultados dos treze ensaios realizados para amostras do extrato enzimático bruto (EEB), do controle de secagem e do pó seco na condição mais favorável de secagem. A amostra denominada controle de secagem refere-se à mistura do EEB líquido com os adjuvantes goma arábica e Aerosil®, ou seja, a formulação a ser seca no *spray-dryer*. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 4.18: Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo e atividade enzimática.

Corrida	T °C		pH		EEB (U/ml)	DP	Controle	DP	Spray-	DP
							Secagem (U/ml)		dryer (U/ml)	
1	-1	57,67	-1	3,73	15,20	1,16	11,18	0,48	10,47	0,28
2	1	82,67	-1	3,73	13,00	0,24	7,15	0,39	6,95	0,23
3	-1	57,67	1	7,26	13,10	0,24	10,11	0,12	9,12	0,57
4	1	82,67	1	7,26	5,86	0,55	3,73	0,27	3,46	0,20
5	-1,41	40	0	5,5	12,17	0,28	9,38	0,08	8,57	0,96
6	1,41	90	0	5,5	9,26	0,91	6,88	0,97	6,48	0,77
7	0	65	-1,41	3	23,01	1,04	14,21	1,09	14,29	0,21
8	0	65	1,41	8	9,44	0,49	7,74	0,38	7,63	0,29
9	0	65	0	5,5	40,37	1,35	27,74	0,84	24,15	0,79
10	0	65	0	5,5	40,77	1,27	27,71	0,56	24,84	0,96
11	0	65	0	5,5	40,70	0,63	27,80	0,00	24,47	1,47
12	0	65	0	5,5	40,18	1,37	27,49	0,88	24,28	0,88
13	0	65	0	5,5	40,34	0,38	27,75	0,35	24,55	0,28

Dos resultados apresentados na Tabela 4.18, observa-se que as atividades enzimáticas variaram em ampla faixa, de 5,86 a 40,77 U/mL para o EEB, de 3,73 a 27,74 U/mL para o Controle de Secagem e de 3,46 a 24,84 U/mL para a amostra seca por *spray-dryer*.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos indicou que o efeito da interação pH x Temperatura não foi significativo e o coeficiente de determinação elevado ($R^2 \geq 98,07\%$). As análises de variância estão apresentadas na Tabela 4.19, onde se observa que nenhum dos modelos ajustados apresentaram falta de ajuste e que os erros puros, que refletem a variabilidade das repetições, são muito baixos.

Tabela 4.19: Análise de variância dos ensaios para determinação da condição ótima de pH e temperatura para as atividades de endoglucanase.

Material	Parâmetro	GL	SQ	F _{calc}	p
E.E.B. R ² = 99,1%	Regressão	5	2545,89	163,52	0,000
	T	1	22,95	7,37	0,030
	pH	1	101,06	32,45	0,001
	T x T	1	1320,90	522,85	0,000
	pH x pH	1	1094,63	351,54	0,000
	T x pH	1	6,36	2,04	0,196
	Erro residual	7	21,80		
	Falta de ajuste	3	21,54	110,56	0,000
	Erro puro	4	0,26		
	Total	12	2567,69		
Controle-secagem R ² = 98,07%	Regressão	5	1156,59	122,63	0,000
	T	1	24,3	12,88	0,009
	pH	1	23,24	12,32	0,010
	T x T	1	576,09	380,89	0,000
	pH x pH	1	531,58	281,82	0,000
	T x pH	1	1,38	0,73	0,421
	Erro residual	7	13,20		
	Falta de ajuste	3	13,15	307,07	0,000
	Erro puro	4	0,06		
	Total	12	1169,80		
Spray-Dried R ² = 98,4%	Regressão	5	853,188	86,52	0,000
	T	1	18,423	9,34	0,018
	pH	1	25,357	12,86	0,009
	T x T	1	449,055	279,59	0,000
	pH x pH	1	359,206	182,14	0,000
	T x pH	1	1,147	0,58	0,471
	Erro residual	7	13,805		
	Falta de ajuste	3	13,520	63,18	0,001
	Erro puro	4	0,285		
	Total	12	866,993		

Analisando a superfície de resposta apresentada na Figura 4.11, pode-se verificar a existência de uma combinação ótima para a atividade enzimática endoglucanase comum às amostras analisadas, cujos valores são $T = 64\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH } 5,3$. Uma mesma combinação ótima dos fatores pH e temperatura para as amostras analisadas era almejado, pois indica que a presença dos adjuvantes de secagem, goma arábica e Aerosil®, assim como o processo de secagem, mesmo com as alterações físico-químicas que a gota sofre ao longo do processo, devido aos estresses térmico e cisalhante, não são severos a ponto de alterar significativamente a conformação da enzima. O mesmo comportamento é esperado para as demais características físico-química, como estabilidade à temperatura e pH.

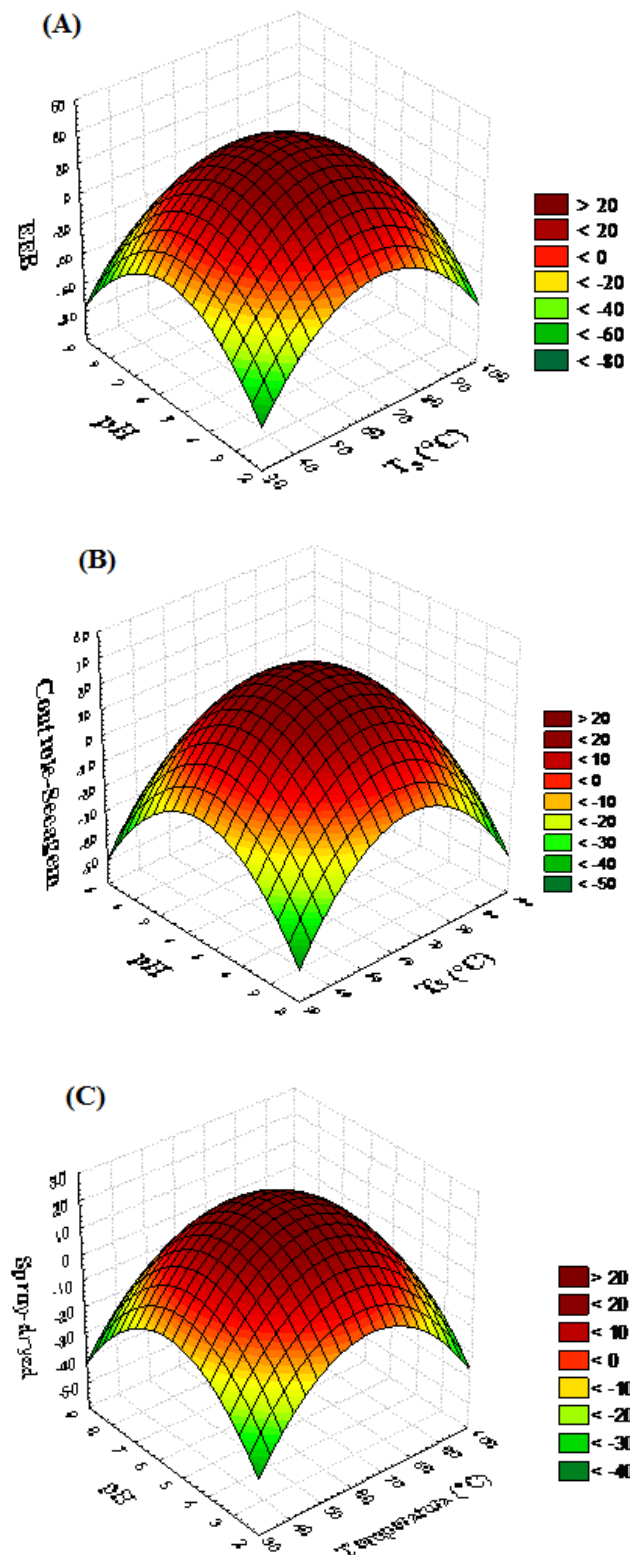


Figura 4.11: Superfície resposta para a atividade endoglucanase das amostras EEB (A), controle-secagem (B), secas em *spray-dryer* (C).

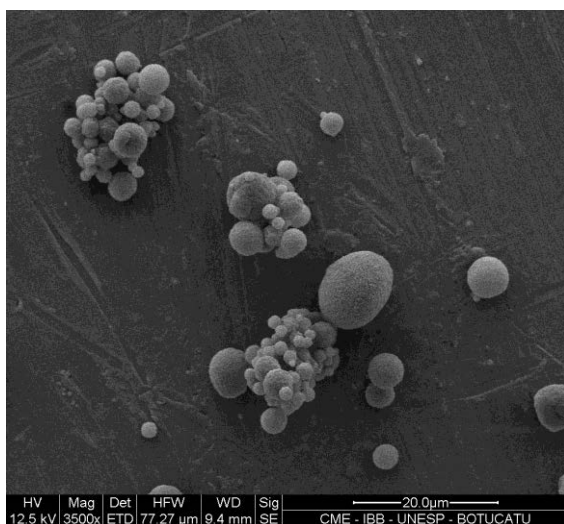
4.5. Análises Morfológicas

Uma das principais características físicas dos pós finos é a área superficial específica, definida como a superfície interna presente no material por unidade de massa, m^2/g (SANTANA, et al. 2012). A análise de área superficial através da técnica de adsorção de gás inerte, comumente denominada de BET, revelou áreas superficiais específicas diferentes para os pós secos na condição mais e menos favorável de secagem, sendo o pó obtido na pior condição um valor aproximadamente duas vezes maior que da melhor condição, ou seja, $2,313 \pm 0,04 \text{ m}^2/\text{g}$ e $1,284 \pm 0,1 \text{ m}^2/\text{g}$, respectivamente. A área superficial específica é inversamente proporcional ao diâmetro médio do poro, ou seja, uma maior superfície específica indica a presença de pequenos poros, enquanto menores valores são característicos de materiais macroporosos (SANTANA et al, 2012).

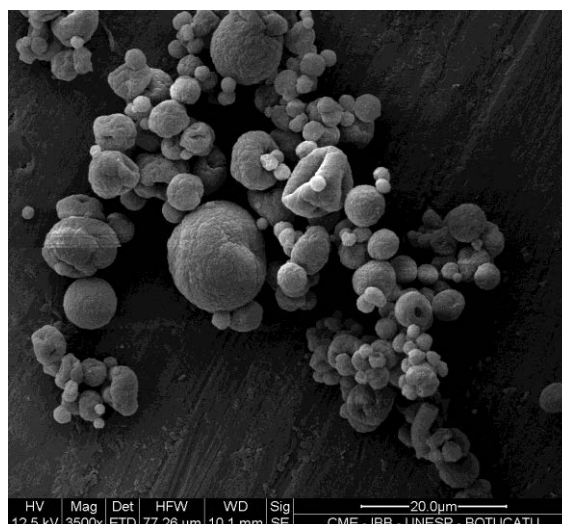
Relacionando-se os resultados de área específica com os da retenção da atividade residual no processo de secagem, pode-se inferir que a maior área superficial do pó obtido na condição menos favorável de secagem sujeitou uma maior quantidade de proteínas às condições severas de secagem. Corrobora esta hipótese o fato dos pós secos na condição menos favorável serem mais secos logo após a secagem, e apresentarem ganho de umidade ao longo do período armazenado. De acordo com Milquvist-Fureby et al. (1999) e Ameri e Maa (2006) a relação da maior área superficial com a condição de maior desnaturação das enzimas durante a secagem pode ser justificada pela hipótese de que proteínas tendem a sofrer adsorção na interface água/ar da gota resultando em desdobramento e consequente agregação e precipitação, ou seja, quanto maior área superficial mais suscetíveis estão as proteínas aos efeitos do processo.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram visualizar a morfologia e detalhes da superfície das partículas, e complementar os resultados obtidos de área superficial específica. Observa-se na Figura 4.12, que os pós obtidos nas condições mais e menos favoráveis de secagem são esféricos com textura ligeiramente rugosa, entretanto os obtidos na condição menos favorável apresentaram-se com maior frequência concavidades, gerando assim maior área superficial específica. Segundo Ameri e Maa (2006) a forma e a morfologia das partículas obtidas por *spray-drying* são regidas pela taxa de evaporação da gota e composição da formulação. Em teoria, durante a secagem uma película é formada na superfície externa, dificultando a difusão de água para o exterior, gerando assim, uma pressão de vapor no interior, o que quando associado a rápidas taxas de secagem faz com que a pressão da água no interior aumente rapidamente, levando ao rompimento da película e resultando em partículas com ondulações e cavidades.

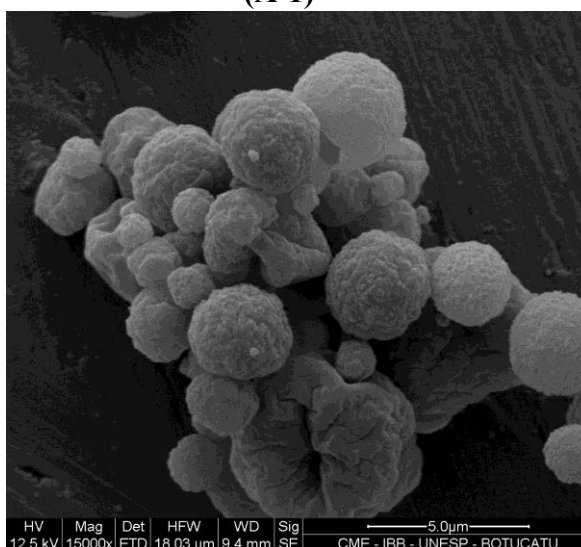
Analisando da Figura 4.12 também é possível notar a presença de partículas aglomeradas com tamanhos variados, característica de materiais produzidos por *spray – drying* (LIAN, et al., 2002; TONON, et al., 2008, LÉON-MARTÍNEZ, et al., 2010; COSTA-SILVA, et al., 2011), e a presença de pequenas partículas esféricas bem definidas sempre adjuntas às maiores, no pó obtido nas duas condições de secagem, que supõe-se serem Aerosil, uma vez que é um auxiliar de secagem inerte, no entanto outras investigações são necessárias.



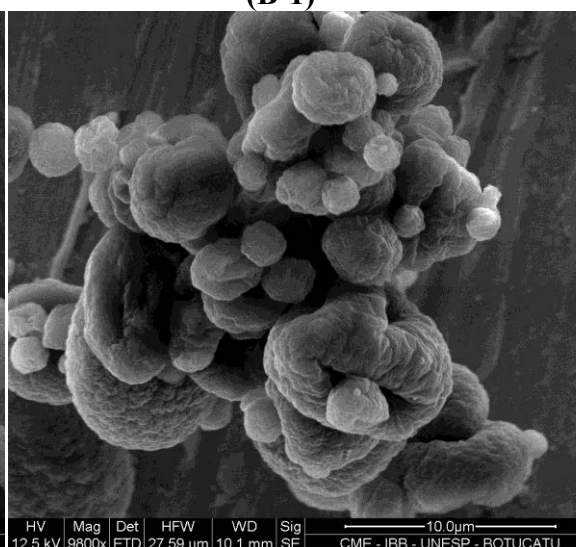
(A-1)



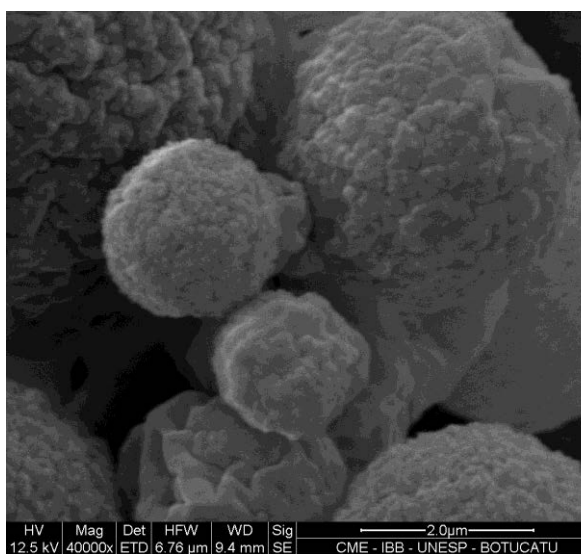
(B-1)



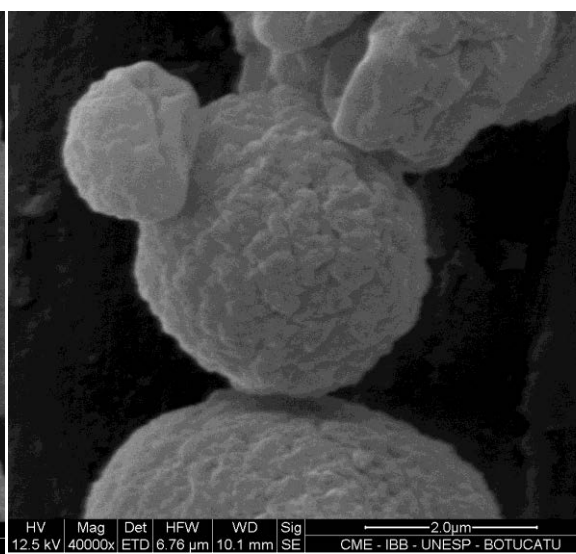
(A-2)



(B-2)



(A-3)



(B-3)

Figura 4.12.: Aspecto das micrografias dos pós resultantes do EEB com goma arábica e Aerosil obtidos por *spray-drying* na melhor (A) e na pior condição (B) de secagem.

5. CONCLUSÕES

Ao final deste estudo de secagem de enzimas em *spray-dryer*, pode-se concluir que nas condições avaliadas:

- Os adjuvantes de secagem maltodextrina e goma arábica são os mais indicadas para conservação da atividade endoglucanase e xilanase após o processo de secagem, mais indicado para a retenção da atividade xilanase a goma arábica;
- A concentração do adjuvante goma arábica na formulação não é significativamente influente na conservação da atividade enzimática após a secagem, sendo mais viável economicamente a menor concentração de adjuvante;
- A combinação de baixa temperatura de saída do ar de secagem e baixa vazão de alimentação resultam em pós com maior retenção de atividade de endoglucanases, e que para menores valores de umidade dos pós a melhor combinação é alta temperatura de saída do ar de secagem e baixa vazão de alimentação;
- Os pós obtidos nas condições mais favorável e mais desfavorável de secagem, que resultaram na maior e na menor retenção da atividade de endoglucanase, podem ser considerados estáveis e que não diferem entre si e não diferem do extrato enzimático bruto após longos períodos de armazenamento, em condições de refrigeração e à temperatura ambiente;
- Os pós obtidos na condição mais desfavorável de secagem têm área superficial específica expressivamente maior do os pós obtidos nas condições mais favorável de secagem.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as condições da metodologia de determinação da atividade endoglucanase para esta enzima específica, produzida pelo *Myceliophthora thermophila* M77 nas condições do cultivo.

- Realizar estudos para melhor compreensão da composição do extrato enzimático bruto e suas interações com as enzimas e com os adjuvantes;

- Realizar estudos de secagem com extrato enzimático parcialmente purificado e concentrado.

- Analisar os efeitos da secagem com combinação dos adjuvantes, maltodextrina e goma, e também outros adjuvantes como surfactantes e sais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEL, A.M.; EL-WAHAB,Z.H.A.; IBRAHIMA, A.A.; AL-SHEMYA, M.T. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part II: Physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.676–687, 2011.
- AEHLE, W. (1990). **Enzymes in Industry: Production and Application**. 2nd Ed., Wiley – VCH, The Netherlands.
- AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; MADADLOU, A.; RAFIEE, S. Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, 1561–1569, 2013.
- ALLOUE, W.A.M.; DESTAIN, J.; AMIGHI, K.; THONART. Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after *spray-drying* in the presence of additives. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1357–1361, 2007.
- AMERI, M.; MAA, Y-F. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, v.24, p. 763–768, 2006.
- AMIGHI, F.; EMAM-DJOMEH, Z.; MADADLOU, A. Spray drying of ACE-inhibitory enzyme-modified white cheese. **International Journal of Food Science & Technology**. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12214/full>. Acessado em julho de 2013.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; RIELLY, C. D; STAPLEY, A. G. F. Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. **Drying Technology**, v.25, p. 799–807, 2007.
- ARAKAWA, T.; PRESTRELSKI, S.J.; KENNY, W.C.; CARPENTER, J. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 10, p. 1 – 28, 1993

- AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 16, p. 89-97, 2005.
- BAYER, E.A., CHANZY, H., LAMED, R., SHOHAM, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, v.8, p. 548–557, 1998.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.326-338, 2001.
- BELGHITH, H.; CHAABOUNI, S. E.; GARGOURI, A. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p. 253–258, 2001.
- BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R.L. Carbohydrates. Em: Fenemma, O.R. **Food Chemistry**, Nova Iorque: Marcel Dekker, 3 ed., p.157-224. 1996.
- BHANDARI, B.R.; SENOUSSE, A.; DUMOULIN, E.D.; LEBERT, A. Spray drying of concentrated fruit juices. **Drying Technology**, v. 11, p. 1081–1092, 1993.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**. v.18, p. 355–383, 2000.
- BHAT, M.K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.15, p. 583 – 620, 1997.
- BOZA, Y., BARBIN, D., SCAMPARINI, A.R.P. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. **Process Biochemistry**, v.39, p. 1275 – 1284, 2004.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal. Am. Chemical. Soc.*, n. 60, 1938. 309-319.

- BURKI, K., JEON, I., ARPAGAUSS, C., BETZ, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *International Journal of Pharmaceutics*, v.408, p.248 – 256, 2011.
- BÜRKI, K.; JEON, I.; ARPAGAUSS, C.; BETZ, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano *spray dryer*. **Pharmaceutical Nanotechnology**, V.408, p.248 – 256, 2011.
- CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, p. 575 – 586, 2010.
- CARPENTER, J.F.; PIKAL, M.J.; CHANG, B.S.; RANDOLPH, T.W. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. **Pharmaceutical Research**, v.14, p.969 - 975, 1997.
- CASTRO, A.M., PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, p.181-188, 2010.
- CEGARA, J. Biotecnologia aplicada aos processos de química têxtil. **Química Têxtil**, v. 58, p. 5 – 14, 2000.
- CHANG, L.; PIKAL, M.J. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.98, p.2886 – 2908, 2009.
- CHÁVEZ, B.E.; LEDEBOER, A.M. Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. **Drying Technology**, v.25, p.1193 – 1201, 2007.
- The Freedonia Group – World Enzyme to 2017. Disponível em: <http://www.rnrmarketresearch.com/world-enzymes-to-2017-market-report.html?vsmaid=1079> .Acessado em 1 de maio de 2014.

- CONSTANTINO, H.R.; LANGER, R.; KLIBANOV, A.M. Solid phase aggregation of proteins under pharmaceutically relevant conditions. *Journal Pharmaceutical Science* 1994, 83, 1662–1669.
- CONTRERAS, R. D. Interação de enzima e tensoativo não-iônico no biocabamento. **Química Têxtil**, n. 65, p. 68-72, 2001.
- COSTA-SILVA, T.S.; SAID,S.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Stabilization of Endophytic Fungus *Cercospora kikuchii* lipase by *Spray Drying* in the Presence of Maltodextrin and β -Cyclodextrin. **Drying Technology**, v.28, p.1245 – 1254, 2010.
- COUTO, S.R.; SANROMA, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, p. 291–302, 2006.
- DePAZ, R. A.; DALE, D. A.; BARNETT, C. C.; CARPENTER, J. F.; GAERTNER, A. L; RANDOLPH, T. W. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 765–774, 2002.
- DURAND, A.; DE LA BROISE, D.; BLACHERE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 59 – 66, 1988.
- EK, R.; ALDERBORN, G.; NYSTRÖM, C. Particle analysis of microcrystalline cellulose: Differentiation between individual particles and their agglomerates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 111, p.43-50, 1994.
- ESLAMIAN, M.; AHMED, M.; ASHGRIZ, N. Modeling of Solution Droplet Evaporation and Particle Evolution in Droplet-to-Particle Spray Methods. **Drying Technology**, v.27, p.3–13, 2009.

- FÄLDT, P.; BERGENSTAHL, B. The surface composition of spray-dried protein-lactose powders. **Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.90, p.183-190, 1994.
- FARID, M. A new approach to modeling of single droplet drying. **Chemical Engineering Science**, v.58, p. 2985 – 2993, 2003.
- FARINAS, C.S., LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F., NETO. V.B.,COURI, S., Avaliação e Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22 ISSN 1678-0434, **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, novembro 2008.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v.59, p. 257-268, 1997.
- GILKES, N. R.; HENRISSAT,B; KILBURN, D. G.; MILLER R. C. JR.; WARREN, R. A. J. Domains in Microbial 3-1,4-Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families. **Microbiological Reviews**, v.55, p.303-315, 1991.
- GOMES, E., UMSZA GUEZ, M.A; MARTIN, N.; SILVA, R., Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial, **Química Nova**, v.30, p. 136-145, 2007.
- GOULA, A.M., ADAMOPOULOS, K.G. A new technique for spray drying Orange juice concentrate. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 342 – 351, 2010.
- HAKI, G.D., RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**,v. 89, p.17 – 34, 2003.
- HELBERT, R., SHARP, R. Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles. **Chapman and Hall**, 1992.

- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation- are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301- 306, 2005.
- IDRIS, O.H.M.; WILLIAMS, P.A.; PHILLIPS, G.O. Characterisation of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. **Food Hydrocolloids**, v.12, p. 379–388. 1998.
- JESUS, S.S. desenvolvimento e análise do processo de secagem de α -amilase por microondas a vácuo. 2002. [s.n.]. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas – SP, 2002.
- KRISHNAIAH. D.; NITHYANANDAM, R.; SARBATLY, R. A Critical Review on the Spray Drying of Fruit Extract: Effect of Additives on Physicochemical Properties. Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2011.587038#_i64. Acessado em 12 de julho de 2013.
- KUELTOZ, L.A.; WANG, W.; RANDOLPH, T.W.; CARPENTER, J.F. Effects of Solution Conditions, Processing Parameters, and Container Materials on Aggregation of a Monoclonal Antibody during Freeze–Thawing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.97, p.1801 - 1812, 2008.
- KUROZAWA, L.E., PARK, K.J., HUBINGER, M.D. Spray Drying of Chicken Meat Protein Hydrolysate: Influence of Process Conditions on Powder property and Dryer Performance. **Drying Technology: An International Journal**, v. 29, p. 163-173.
- LAI, M.C., TOPP, E.M. Solido-State Chemical Stability of Proteins and Peptides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.88, p.489-500.
- LEE, M.Y.; DORDICK, J. Enzyme activation for nonaqueous media. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 376 - 384, 2002.

- LEHTIO, J.; SUGIYAMA, J.; GUSTAVSSON, M.; FRANSSON, L.; LINDER, M.; TEERI, T.T. The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. **PNAS**, v.100, p.484 – 489, 2003.
- LEÓN-MARTÍNEZ, F.M., MÉNDEZ-LAGUNAS, L.L., RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p. 864-879, 2010.
- LI, C.; LI, A.; LE, Y.; CHEN, J-F. Formation of bicalutamide nanodispersion for dissolution rate enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p.257–263, 2011.
- LIAN, W-C, HSIAO, H-C, CHOU, C-C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of food Microbiology**, v.74, p. 79-86, 2002.
- LIAO, Y.H.; BROWN, M.B.; ABDUL, Q.; MARTIN, G.P. Investigation of the physical properties of spray-dried stabilized lysozyme particles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.55, p.1213-1223, 2003.
- LINDER, M. e TEERI, T. The roles and function of cellulose-binding domains. **Journal of Biotechnology**, v.57, p.15-28, 1997.
- LIPP-SYMONOWICZ, B.; TANSKA, B.; WOLUKANIS, A.; WRZOSEK, H. Influence of enzymatic treatment on the flax fibre morphological structure, physico-chemical properties and metrological parameters of yarn. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 12, p. 61-65, 2004.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p. 506–577, 2002.

- MAA, Y.F.; NGUYEN, P.A.; ANDYA, J.D.; DASOVICH, N.; SWEENEY, T.D.; SHIRE, S.J.; HSU, C.C. Effect of spray drying and subsequent processing conditions on residual moisture content and physical/biochemical stability of protein inhalation powders. **Pharmaceutical Research** 1998, 15, 768–775.
- MACHADO, A.R.M.C. Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: otimização da extração e secagem em *spray-dryer* utilizando planejamentos experimentais. 2011. 130p. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos); Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2011.
- MASTERS, K. Spray drying Handbook, Halsted Press; 3rd edition (1979); 687p.
- MEZHERICHER, M.; LEVY, A.; BORDE I. Theoretical Drying Model of Single Droplets Containing Insoluble or Dissolved Solids. **Drying Technology**, v.25: p.1035–1042, 2007.
- MIETTINEN-OINONEN, A.; LONDESBOROUGH, J.; JOUTSJOKI, V.; LANTTO, R.; VEHEMAANPERÄ, J.; PRIMALCO LTD. BIOTEC. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.332–341, 2004.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426 – 428, 1959.
- MILLQVIST-FUREBY, A.; MALMSTEN, M.; BERGENSTÅHL, B. Spray-drying of trypsin — surface characterisation and activity preservation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.188, p. 243–253, 1999.
- MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-state fermentation bioreactors – Fundamentals of design and operation. New York, Springer, 2005.

- MITIDIERE, S., Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.5, p. 56 – 60, 2002.
- MORETTI, M.M.S. Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis., 2010. [s.n.]. Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada); **Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro – SP, 2010.
- MORETTI, M.M.S., BOCCHINI-MARTINS, D.A., SILVA, R., RODRIGUES, A., SETTE, L.D., GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology** , v. 43, p. 1062-1071, 2012.
- NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**, v.4, p. 1495–1500, 2006.
- NERY, C.G.C, PIRES, M.A.S., PIANETTI, G.A., VIANNA-SOARES, C.D. Caracterização do fármaco hipoglicêmico glibenclamida. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, 61-72, 2008.
- NETO, Y.A.A.H. Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação de protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, 2012, 60p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) – **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2012.
- Ó'FÁGÁIN, C. (1997). **Stabilizing Protein Function**. Springer, Ireland.
- PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S.C.; DUSSAP, C.G.; GNANSOUNOU, E. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Oxford, U.K. Academic Press, v.1., 2011.

- PARK, J.; PARK, H. J.; CHO, W.; CHA, K-H.; KANG, Y. S.; HWANG, S-J. Preparation and pharmaceutical characterization of amorphous cefdinir using spray-drying and SAS-process. **International Journal of Pharmaceutics**, v.396, p. 239–245, 2010.
- PARTRIDGE, J.; HALLING, P.J.; MOORE, B.D. Practical route to high activity enzyme preparation for synthesis in organic media. **Chemical Communications**, n. 7, p. 841 - 842, 1998.
- PAUDEL, A.; WORKU, Z.A.; MEEUS, J.; GUNS, S.; MOOTER, G.V. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, p. 253– 284, 2013.
- PEIGHAMBARDOUST, S.H., TAFTI, A.G., HESARI, J. Applicationa of spray-drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. Trends in **Food Science & Tecnology**, v.22, p.215 – 224, 2011.
- PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's chemical engineering handbook**. 7. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1997. 660 p.
- PRADÉ, R.A. Xylanases: from biology and biotechnology. **Biotechnology & Genetic Engineering**, v.13, p. 101-131, 1995.
- RAMOS, G.D.M., ASCHERI, J.R., SILVA, L.G., DAMASCO, M.C.T, SOUSA, G.F.COURI, S. Estabilidade da fitase de *Aspergillus niger* 11t53a9 ao armazenamento e sua aplicação na hidrólise do ácido fítico na farinha de sorgo. Revista Brasileira de Agrociência, v.18, p.95-106, 2012.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26,p. 863-871, 2003.

- RANI, R.; KUMAR, A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009.
- RESCH, M.G.; BRYON S. DONOHOE, B.S.; BAKER, J.O.; DECKER, S.R.; BAYER, E.A.; BECKHAM, G.T.; HIMMEL, M.E. Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction. **Energy & Environmental Science**, v. 6, p. 1858 – 1867, 2013.
- RODRIGUEZ, S.; SAROMÁN, M. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 11–219, 2005.
- ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p. 1288–1294, 1990.
- ROUSTAPOUR, O.R.; HOSSEINALIPOUR, M. GHOBADIAN, B. An experimental investigation of lime juice drying in a pilot plant spray dryer. **Drying Technology**, v.24, p. 181 – 188, 2006.
- ROUVINEN, J.; BERGFORS, T.; TEERI, T.; KNOWLES, C. K. J.; JONES, T. A. Three dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 249, p. 380-386, 1990.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, Siân C. Handbook of pharmaceutical excipients. 5.ed London: PhP, 2006. 918 p.
- SABOTO, D., NUCCI, R., ROSSI, M., GRYEZYNSKY, I., GRYEZYNSKY, Z., LAKOWICZ, J. The β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C. **Biophys. Chem**, v.81, p. 23 – 31, 1999.

- SAHA, B.C.; FREER, S.N.; BOTHAST, R.J. Production, Purification, and Properties of a Thermostable β -Glucosidase from a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*. **Environmental Microbiology**, v.60 p. 3774-3780, 1994.
- SAMBORSKA, K.; WITROWA-RAJCHERT, D.; GONÇALVES, A. Spray-drying of amylase—The effect of process variables on the enzyme inactivation. **Drying Technology**, v. 23,p. 941 – 953, 2005.
- SANTANA, M.F.S., KATEKAWA, M.E., TANNOUS, K., LIMA, A.K.V.O.GASPARETTO, C.A. Área superficial e porosidade da fibra alimentar do albedo de laranja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, p.261-273, 2012.
- SARAVANAN, D.; VASANTHI, N. S.;RAMACHANDRAN, T. A review on influential behaviour of biopolishing on dyeability and certain physico-mechanical properties of cotton fabrics. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p. 1 – 7, 2009.
- SCHUTYSER, M.A.I., PERDANA, J., BOOM, R.M. Single droplet drying for optimal spray drying of enzyme and probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. xx, p. 1- 10, 2012.
- SELIVANOV, A. S. Stabilization of cellulases using spray drying. **Engineering for Life and Science**, v.5, p.78–80, 2005.
- SILVA, J., FREIXO, R., GIBBS, P., TEIXEIRA, P.Spray-drying for the production of dried cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v.65, p. 321 – 335, 2011.
- SINGH, S.; SINGH, J. Effect of Polyols on the Conformational Stability and Biological Activity of a Model Protein Lysozyme. **AAPS Pharmaceutical Science and Technology**, v. 4, p.1 – 9, 2003.

- SINGHANIA , R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.13-18, 2009.
- SLOTH, J. Formation of enzyme containing particles by spray drying. 2007, 158p. Tese (Doutorado) - **Technical University of Denmark**, 2007.
- SLOTH, J.; JØRGENSEN, K.; BACH, P.; JENSEN, A. D.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Spray drying of suspensions for pharma and bio products: drying kinetics and morphology. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v.48, p. 3657–3664, 2009.
- STORZ, E.; STEFFENS, J.K. Feasibility study for determination of the dextrose equivalent (DE) of starch hydrolysis products with Near-Infrared Spectroscopy (NIRS). **Starch /Sträke**, v.56, p. 58–62, 2004.
- TOMME, P.; DRIVER, D.P; AMANDORON, E. A.; MILLER, R.C.JR.; ANTONY, R.; WARREN, J.; KILBURN, D.G. Comparison of a Fungal (Family I) and Bacterial (Family II) Cellulose-Binding Domain. **Journal of Bacteriology**, v.177, p. 4356 – 4363, 1995.
- TONON, R.V., BRABET, C., HUBINGER, M.D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v.43, p.907 – 914, 2010.
- TONON, R.V., BRABET, C., HUBINGER, M.D., Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae Mart.*) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v.88, p.411 – 418, 2008.
- VARDIN, H., YASAR, M. Optimisation of pomegranate (*Punica granatum L.*) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrina content. **International Journal of Food Science & Tecnology**, v. 47, p.167 – 176, 2012.

- VOLLENBROEK, J.; HEBBINK, G.A.; ZIFFELS, S.; STECKEL, H.
Determination of low levels of amorphous content in inhalation grade lactose by moisture sorption isotherms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.395, p.62–70, 2010.
- WERNER, L; LATZKO, F; HAMPEL, W. Spray-drying of yeast-lytic enzymes from *Arthrobacter* sp. **Biotechnology Techniques**, v.7; p. 663-666, 1993.
- YOSHII, H., BUCHE, F., TAKEUCHI, N., OHGAWARA, M., FURUTA, T.
Effects of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying. *Journal of Food Engineering*, v.87, p.34 – 39, 2008.

ANEXO 1

Valores codificados e respostas da atividade residual da xilanase.

Ensaio	T _{Saída} (°C)		Q _{Alim} (mL/min)		ST (%)		Atividade Residual Xilanase (%)			
							Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4
1	-1	70	-1	8	0	15	84,68	61,87	76,05	75,65
2	1	110	-1	8	0	15	76,00	76,98	41,44	96,31
3	-1	70	1	16	0	15	75,49	62,74	53,56	95,57
4	1	110	1	16	0	15	49,85	61,34	49,41	83,27
5	-1	70	0	12	-1	10	82,92	90,53	92,75	70,59
6	1	110	0	12	-1	10	110,80	61,38	108,97	65,34
7	-1	70	0	12	1	20	92,57	103,19	96,12	85,95
8	1	110	0	12	1	20	93,18	81,48	69,86	85,70
9	0	90	-1	8	-1	10	102,26	60,68	97,76	72,64
10	0	90	1	16	-1	10	112,31	103,21	87,89	64,43
11	0	90	-1	8	1	20	88,63	79,78	84,63	85,70
12	0	90	1	16	1	20	86,81	80,84	76,87	83,61
13	0	90	0	12	0	15	84,90	58,72	63,49	79,59
14	0	90	0	12	0	15	96,18	100,74	56,04	80,07
15	0	90	0	12	0	15	59,82	80,18	77,05	98,52

