

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA**

RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI

Secagem, imobilização e aplicações das tanases produzidas por
diferentes espécies de *Aspergillus*

ARARAQUARA

2021

RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI

**Secagem, imobilização e aplicações das tanases produzidas por
diferentes espécies de *Aspergillus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza
Guimarães

ARARAQUARA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

C376s Cavalcanti, Rayza Morganna Farias
Secagem, imobilização e aplicações das tanases
produzidas por diferentes espécies de *Aspergillus* / Rayza
Morganna Farias Cavalcanti. – Araraquara : [s.n.], 2021
178 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Fungos. 4. Enzimas
imobilizadas. 5. Alginatos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Secagem, imobilização e aplicações das tanases produzidas por diferentes espécies de *Aspergillus*"

AUTORA: RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI

ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:




Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto



Prof.^a Dr.^a SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



p/ Prof. Dr. JOÃO BENEVIDES COSTA PESSELA (Participação Virtual)
Instituto de Pesquisa em Ciência dos Alimentos / Universidade Autônoma de Madrid - UAM - Madrid



Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Rio Claro



Prof.^a Dr.^a LUCIANA FRANCISCO FLEURI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu

Araraquara, 30 de setembro de 2021

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rayza Morganna Farias Cavalcanti

Nome em citações bibliográficas: CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, Rayza Morganna Farias; CAVALCANTI, Rayza; Cavalcanti, Rayza Morganna F.; CAVALCANTI, Rayza Morganna.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre. 14040-901 - Ribeirão Preto, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2017 - Doutorado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Secagem, imobilização e aplicações de tanases produzidas por espécies de *Aspergillus*. Orientador: Luís Henrique Souza Guimarães. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2015 - 2017 Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 5). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Bioprospecção de tanases produzidas por fungos endofíticos de espécies vegetais isoladas da Caatinga. Orientador: Luís Henrique Souza Guimarães. Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2009 – 2014 - Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2021 - Curso geral de Propriedade Intelectual à distância. (Carga horária: 75h). World Intellectual Property Organization, WIPO, Suíça.

2021 - Extensão universitária em Docência no ensino superior: fundamentos e práticas pedagógicas. (Carga horária: 30h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2020 - Extensão universitária em Gerenciamento de resíduos. (Carga horária: 60h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

2020 - Abordagens Pedagógicas Modernas na Educação a Distância. (Carga horária: 20h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

2020 - Técnicas de Eletroforese Aplicadas à Proteômica. (Carga horária: 6h). Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

2020 - Patentes: Proteção de Tecnologias e Uso na Pesquisa Científica. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

2020 - Didática no Ensino Superior. (Carga horária: 68h). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Brasil.

2020 - Planejamento, Avaliação e Fundamentos cognitivos da EAD. (Carga horária: 51h). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Brasil.

2020 - Moodle para Professores e Tutores. (Carga horária: 34h). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Brasil.

2017 - Delineamento Experimental Aplicado à Biotecnologia. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

2017 - Espectrometria de massas - Avançado. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBQ, Brasil.

2015 - Treinamento base de dados Elsevier. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2014 - Curso de Métodos Numéricos. (Carga horária: 24h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

2013 - Treinamento no Portal de Periódicos da Capes. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

2013 - Treinamento de operação do biorreator de bancada B. (Carga horária: 16h). Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda, TECNAL, Brasil.

2012 - Polimorfismo de Apolipoproteínas em doenças crônicas. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBQ, Brasil.

2010 - Farmacobiotechnologia. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

2009 - Atividades Experimentais em Biologia Celular. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA

2013 - 2014 Prospecção de biossurfactantes de fungos filamentosos da Caatinga (PIBIC).

2012 - 2013 Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga (PIVIC).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

CAVALCANTI, Rayza Morganna Farias; MARTINEZ, MARCELO LUÍS LOMBARDI; OLIVEIRA, WANDERLEY PEREIRA; GUIMARÃES, LUÍS HENRIQUE SOUZA Stabilization and application of spray-dried tannase from *Aspergillus fumigatus* CAS21 in the presence of different carriers. 3 Biotech, v. 10, p. 177, 2020.

ARACRI, F. M.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARAES, L. H. S. Extracellular Tannase from *Aspergillus ochraceus*: Influence of the Culture Conditions on Biofilm

Formation, Enzyme Production, and Application. JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY (ONLINE), v. 29, p. 1749-1759, 2019.

CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARAES, L. H. S. Produção e caracterização parcial de tanase pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* ANG18 em fermentação em estado sólido. REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA ONLINE, v. 7, p. 426-440, 2018.

CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, D. P. D.; PAZ, M. C. F.; QUEIROZ, J. C. F. Avaliação do potencial de síntese de biossurfactantes por fungo da caatinga. REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA ONLINE, v. 7, p. 240-251, 2018.

CAVALCANTI, Rayza Morganna Farias; JORGE, JOÃO ATÍLIO; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Characterization of *Aspergillus fumigatus* CAS-21 tannase with potential for propyl gallate synthesis and treatment of tannery effluent from leather industry. 3 Biotech, v. 8, p. 270, 2018.

CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, D. P. D.; PAZ, M. C. F.; QUEIROZ, J. C. F. Screening, production and characterization of biosurfactants from Caatinga's filamentous fungi. International Journal of Pharmaceutical Science Invention, v. 6, p. 23-28, 2017.

CAVALCANTI, R. M. F.; ORNELA, P. H. O.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Screening, Selection and Optimization of the Culture Conditions for Tannase Production by Endophytic Fungi Isolated from Caatinga. Journal of Applied Biology & Biotechnology, v. 5, p. 1-9, 2017.

NASCIMENTO, R. F. Q.; PINHEIRO, B. L.; BEZERRA, R. M. S.; CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, R. B.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos. Revista Saúde e Ciência Online, v. 3, p. 76-85, 2015.

CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A. Estudo sobre a utilização de plantas medicinais no município de Cabaceiras - PB. Cadernos de Agroecologia, v. 10, p. 1-5, 2015.

CAVALCANTI, N. T. F.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A.; FARIAS, M. E. A. C.; CAVALCANTI, R. M. F. Mercado de orgânicos no estado da Paraíba: caracterização da produção e grau de consumo da população. Cadernos de Agroecologia, v. 10, p. 1, 2015.

CAVALCANTI, R. M. F.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C. Nível de conhecimento e aceitabilidade de alimentos transgênicos nos municípios de Sumé e Taperoá- PB. Cadernos de Agroecologia, v. 10, p. 1-5, 2015.

OLIVEIRA SOBRINHO, J.; CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C.; SILVA JUNIOR, C. A. Análise da influência do marketing verde na decisão de compra de estudantes universitários no interior da Paraíba. Cadernos de Agroecologia, v. 10, p. 1-5, 2015.

SILVA, D. P. D.; SOUSA, J. P.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; SOUSA, B. R. S.; BRITO, A. F. S.; QUEIROZ, J. C. F. Produção artesanal de aguardente a partir de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua aceitação por consumidores. Revista Saúde e Ciência Online, v. 3, p. 330-339, 2015.

Capítulos de livros publicados

CAVALCANTI, R. M. F.; MAESTRELLO, C. C.; GUIMARAES, L. H. S. Imobilização da tanase DE *Aspergillus ochraceus* e aplicação na síntese de propil galato analisada por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). In: Erica de Melo Azevedo. (Org.). Ensino e Pesquisa em Bioquímica. 1ed. Ponta Grossa: Atena, 2021, p. 68-80.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

SILVA, R. B.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; QUEIROZ, J. C. F. Análise das águas do município de Sumé- PB por meio de parâmetros físico-químicos. In: I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014, Sumé. I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014.

OLIVEIRA SOBRINHO, J.; LIMA, T. G. L. S.; LIMA, H. C. A.; MELO, G. A.; CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Avaliação da gestão ambiental e desenvolvimento sustentável do “O Boticário” no interior da Paraíba por seus clientes. In: I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014, Sumé. I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014.

NASCIMENTO, R. F. Q.; PINHEIRO, B. L.; BEZERRA, R. M. S.; CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, R. B.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos. In: I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014, Sumé. I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014.

SILVA, D. P. D.; SOUSA, J. P.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; SOUSA, B. R. S.; BRITO, A. F. S.; QUEIROZ, J. C. F. Produção artesanal de aguardente a partir de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua aceitação por consumidores. In: I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014, Sumé. I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014.

Resumos publicados em anais de congressos

CAVALCANTI, Rayza Morganna Farias; MAESTRELLO, Chadia Chahud; GUIMARAES, Luís Henrique S. Imobilização da tanase de *Aspergillus ochraceus* e aplicação na síntese de propil galato analisada por TLC e FTIR. In: Congresso Online Internacional de Bioquímica, 2020, Divinópolis. Congresso Online Internacional de Bioquímica, 2020. v. 1.

CAVALCANTI, R. M. F.; MAESTRELLO, C. C.; GUIMARAES, L. H. S. Tratamento enzimático do chá verde em reator de leito fixo com tanase imobilizada em esferas de alginato. *In: I Semana de Bioquímica Aplicada, 2020, Viçosa. Semana de Bioquímica Aplicada, 2020. v. 1. p. 67-69.*

CAVALCANTI, R. M. F.; MAESTRELLO, C. C.; GUIMARAES, L. H. S. Immobilization of the *Aspergillus ochraceus* tannase and application of the derivate in enzymatic hydrolysis of tannins of grape juice and black tea. *In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.*

MAESTRELLO, C. C.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARAES, L. H. S. Hydrolysis of xylans extracted from corn cobs by free and immobilized xylanase produced by *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223. *In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.*

ARACRI, F. M.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARAES, L. H. S. Produção de tanases utilizando biofilmes de *Aspergillus ochraceus* e síntese de propilgalato. *In: VIII Congresso Farmacêutico e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2018. v. 39.*

CAVALCANTI, R. M. F.; MARTINEZ, M. L. L.; OLIVEIRA, W. P.; GUIMARAES, L. H. S. Secagem da tanase de *Aspergillus ochraceus* em spray dryer com adição de adjuvantes. *In: VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2018. v. 39.*

Cavalcanti, Rayza Morganna F.; MARTINEZ, Marcelo Luís L.; OLIVEIRA, Wanderley P.; GUIMARAES, Luís Henrique S. Estabilização da atividade da tanase de *Aspergillus fumigatus* CAS21 por secagem em spray dryer e caracterização dos extratos secos com diferentes adjuvantes. *In: XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago. Libro de Resúmenes - XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2018. p. 278-278.*

CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARAES, L. H. S. Produção e caracterização parcial de tanase pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* ANG18 em Fermentação em Estado Sólido. *In: II Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2017, Sumé. Anais do II Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2017. v. 2. p. 315-331.*

CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, D. P. D.; PAZ, M. C. F.; QUEIROZ, J. C. F. Avaliação do potencial de síntese de biossurfactante por fungo da Caatinga. *In: II Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2017, Sumé. Anais do II Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido. v. 2. p. 250-261.*

CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de biossurfactantes de fungos filamentosos da Caatinga. *In: XI Congresso de Iniciação Científica da*

Universidade Federal de Campina Grande, 2014, Campina Grande. XI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

Apresentações de Trabalho

CAVALCANTI, R. M. F.; MAESTRELLO, C. C.; GUIMARAES, L. H. S. Imobilização da tanase de *Aspergillus ochraceus* e aplicação na síntese de propil galato analisada por TLC e FTIR. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; MAESTRELLO, C. C.; GUIMARAES, L. H. S. Tratamento enzimático do chá verde em reator de leito fixo com tanase imobilizada em esferas de alginato. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).

CAVALCANTI, R. M. F.; MAESTRELLO, C. C.; GUIMARAES, L. H. S. Immobilization of the *Aspergillus ochraceus* tannase and application of the derivate in enzymatic hydrolysis of tannins of grape juice and black tea. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MAESTRELLO, C. C.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARAES, L. H. S. Hydrolysis of xylans extracted from corn cobs by free and immobilized xylanase produced by *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; MARTINEZ, M. L. L.; OLIVEIRA, W. P.; GUIMARAES, L. H. S. Secagem da tanase de *Aspergillus ochraceus* em *spray dryer* com adição de adjuvantes. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ARACRI, F. M.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARAES, L. H. S. Produção de tanase utilizando biofilmes de *Aspergillus ochraceus* e síntese de propil galato. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Cavalcanti, Rayza Morganna F.; MARTINEZ, Marcelo Luís L.; OLIVEIRA, Wanderley P.; GUIMARAES, Luís Henrique S. Estabilização da atividade da tanase de *Aspergillus fumigatus* CAS21 por secagem em *spray dryer* e caracterização dos extratos secos com diferentes adjuvantes. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Purification and partial characterization of the tannase produced by endophytic fungus *Aspergillus niger* ANG18 under solid state fermentation. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARAES, L. H. S. Produção e caracterização parcial de tanase pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* ANG18 em Fermentação em Estado Sólido. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, D. P. D.; PAZ, M. C. F.; QUEIROZ, J. C. F. Avaliação do potencial de síntese de biossurfactante por fungo da Caatinga. 2017. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

CAVALCANTI, R. M. F. Meetup: Egressos do Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos (CDSA/UFCG). 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

CAVALCANTI, N. T. F.; OLIVEIRA SOBRINHO, J. ; SILVA JUNIOR, C. A.; FARIAS, M. E. A. C.; CAVALCANTI, R. M. F. Mercado de orgânicos no estado da Paraíba: caracterização da produção e grau de consumo da população. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A. Estudo sobre a utilização de plantas medicinais no município de Cabaceiras-PB. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C. Nível de conhecimento e aceitabilidade de alimentos transgênicos nos municípios de Sumé e Taperoá- PB. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

OLIVEIRA SOBRINHO, J.; CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C.; SILVA JUNIOR, C. A. Análise da influência do marketing verde na decisão de compra de estudantes universitários no interior da Paraíba. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de biossurfactantes de fungos filamentosos da Caatinga. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

NASCIMENTO, R. F. Q.; PINHEIRO, B. L.; BEZERRA, R. M. S.; CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, R. B.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

SILVA, R. B.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; QUEIROZ, J. C. F. Análise das águas do município de Sumé- PB por meio de parâmetros físico-químicos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

SILVA, D. P. D.; SOUSA, J. P.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; SOUSA, B. R. S.; BRITO, A. F. S.; QUEIROZ, J. C. F. Produção artesanal de aguardente a partir de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua aceitação por consumidores. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

OLIVEIRA SOBRINHO, J.; LIMA, T. G. L. S.; MELO, G. A.; LIMA, H. C. A.; CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Avaliação da gestão ambiental e desenvolvimento sustentável do “O Boticário” no interior da Paraíba por seus clientes. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Participação em bancas de comissões julgadoras

CAVALCANTI, R. M. F. CINASAMA - Congresso Internacional de saúde e meio ambiente. 2020. Instituto Medeiros de Educação Avançada.

CAVALCANTI, R. M. F. XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2020. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

Congresso Online Internacional de Bioquímica. 2020. (Congresso).

I Semana de Bioquímica Aplicada. 2020. (Outra).

X Four Biotec - Quatro dias pela Biotecnologia. 2020. (Congresso).

30º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2019. (Congresso).

VIII Congresso Científico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. 2018. (Congresso).

XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. 2018. (Congresso).

46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2017. (Outra).

II Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido. 2017. (Simpósio).

Mulheres na Ciência 2015: Desafios e Atalhos para o Sucesso. 2015. (Encontro).

Seminário Técnico de Cromatografia: HPLC - GC - PREPARAÇÃO DE AMOSTRA. 2015. (Seminário).

Simpósio de Engenharia de Produção - Simep. 2014. (Simpósio).

X Congresso de Iniciação Científica da UFCG. 2013. (Congresso).

XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology. 2012. (Congresso).

II Congresso Norte Nordeste de Genética Médica e I Jornada Paraibana de Genética na Pediatria. 2011. (Congresso).

I Workshop de Biotecnologia do CDSA. 2010. (Outra).

Seminário Integrador 2010 - Seminário Brasileiro: Potencialidades, Desafios e Estratégias da Convivência no Século XXI. 2010. (Seminário).

Seminário Integrador 2009 - Semiárido Brasileiro: Potencialidades, Desafios e Estratégias da Convivência no Século XXI. 2009. (Seminário).

Orientações

Iniciação científica

Caroline Tamires de Freitas. Análise do perfil proteico extracelular e intracelular de fungos filamentosos cultivados em fermentação submersa tendo ácido tânico como indutor de tanases. 2019. Iniciação científica (Graduanda em Química) - Universidade de São Paulo. (Coorientadora).

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Agnelo Filho e Neuma Eliene, pelo amor incondicional e pelo apoio durante toda minha vida. A minha irmã, Natália Cavalcanti, minha força e inspiração!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e amor, por sempre guiar meus passos e zelar por mim. “Louvado seja nosso Senhor Jesus Cristo!”

A painho, Agnelo Filho, e mainha, Neuma Eliene, pelo amor, pela escuta, pelo companheirismo, por ser quem vocês são, os melhores pais do mundo. É uma honra ser filha de vocês. Tudo é para vocês e por vocês, sempre!

A minha irmã, Natália Cavalcanti, pela amizade, apoio incondicional, pelos seus sorrisos que me acalmam, pelo seu amor que me faz forte, por ser minha inspiração e o amor da minha vida! Te amo, te amo e te amo!

Aos meus avós paternos Agnelo de Freitas (*in memoriam*) e Amélia Aires (*in memoriam*), meus exemplos de simplicidade e amor. Agradeço especialmente a vovó Amélia, que mesmo não me reconhecendo nos últimos anos nunca deixou de me abençoar!

Aos meus avós maternos José Nunes e Iraci, pela torcida, pelo amor e pela vida de vocês. Obrigada pelos abraços e beijos a cada retorno para casa! Amo vocês infinitamente!

A tia Nenê (*in memoriam*) e, especialmente, a tia Marieta (*in memoriam*), que tanto torceu por esse momento. Obrigada pelo amor incondicional, pelo cuidado e carinho durante toda minha vida. Minha eterna gratidão e saudade!

A família Aires Cavalcanti e Farias Nunes, pelo apoio incondicional ao longo dessa jornada, pelos momentos felizes e pelo amor durante toda minha vida! Que sorte a minha ser parte dessa família e poder contar com vocês!

A minha Suzy, pela sua vida, pelo companheirismo, pela alegria a cada retorno para casa e por nunca ter me esquecido! Obrigada pelo seu amor durante esses 13 anos juntas!

A Dobby Ornela, meu presente, minha melhor escolha. Obrigada pelos momentos lindos que vivemos juntos, por ter me proporcionado tanto amor e felicidade quando eu menos esperei. Você é minha saudade e meu amor, perto ou longe!

Ao prof. Dr. Luís Henrique, pela orientação durante esses seis anos, pela confiança, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Muito obrigada pelo apoio e dedicação ao longo dessa jornada!

A Josenildo Oliveira, por ser calma em meio ao caos, por ser meu pensamento positivo, ser meu colo e meu repouso. Obrigada pela sintonia e pelo amor mantidos e aquecidos durante longos anos. Meu parceiro de vida!

A Leandro Costa, companheiro de universidade e de vida. Enfrentamos graduação, mestrado e doutorado juntos, nossa amizade se moldou a cada momento que passamos e foi uma honra dividir essa vida contigo. Que os nossos caminhos continuem se cruzando!

A Pedro Henrique Ornela, obrigada por ter sido minha base em São Paulo, por ter me proporcionado momentos de alegrias e amor, por dividir a carga e somar as alegrias. Foram 6 anos intensos e agradeço imensamente porque estivemos juntos!

A Layanne Aires, Alline Mayara e Amanda Mayana, minhas primas e amigas de toda vida, laços de sangue nos unem e nos mantêm próximas. Obrigada pelos momentos felizes que compartilhamos juntas, por ser casa e família. Que sorte a minha dividir a vida com vocês desde sempre!

A Hugo Britto (*in memoriam*), pelos sonhos que amenizam a saudade, por ser presente em meu pensamento e pela proteção!

A Jucilene Pereira, nosso encontro foi um presente e eu não me canso de agradecer por ter sua amizade. Obrigada pelos momentos de conexão, mesmo na distância. Que orgulho eu tenho de ser sua amiga!

As minhas engenheiras, Mila de Castro, Dayse Pereira, Rhayanne Freitas e Raíssa Mayane, pela amizade, pelos reencontros, pela família que construímos juntas. Nosso laço é forte, seguro e infinito! Seguiremos juntas!

A Carol Strabelli, pela amizade, pelos chocolates divididos, pela torcida e pelos momentos felizes que passamos juntas. Que seja apenas o começo!

A Chadia Maestrello e Isabela Amatto, pelo companheirismo durante o mestrado e doutorado, pela leveza, amizade e pelos momentos compartilhados. O mundo precisa de pessoas de luz como vocês duas!

A Luiz Felipe, Camila Guedes, Fernanda Aracri, Larissa Toderó, Thais Barnoni e Maysa Parente, meus companheiros de laboratório e vida acadêmica. A vida longe de casa foi menos dolorosa porque vocês estiveram comigo. Obrigada pelo suporte nos experimentos, pelos conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração. Guardarei vocês comigo para sempre!

Ao prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira e ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos, pela disponibilidade e pelo auxílio durante a realização de parte desta pesquisa.

Aos técnicos Mauricio de Oliveira e Marcelo Luís Lombardi pelo auxílio e apoio para o desenvolvimento das atividades nos laboratórios.

A Carlos Ambrosio, responsável pela Cooperativa dos Curtidores e Artesãos em Couro de Ribeira de Cabaceiras (ARTEZA), pelas amostras cedidas para esta pesquisa.

Aos funcionários da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto e do Instituto de Química da Unesp-Araraquara SP que contribuíram com esse trabalho, em especial aos funcionários da seção de Pós-graduação em Biotecnologia pela paciência, disponibilidade e auxílio durante o doutorado.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela disponibilidade para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Unesp, pela atenção e auxílio durante os experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo 142389/2017-0) e FAPESP, pelo suporte financeiro.

*Não! Eu não sou do lugar dos esquecidos
Não sou da nação dos condenados
Não sou do sertão dos ofendidos
Você sabe bem: conheço o meu lugar*

(Conheço o meu lugar – Belchior)

*“Porque – disse ela – quando você tem
medo e faz mesmo assim, isso é coragem”*

(Niel Gaiman)

RESUMO

A tanase (tanino acil hidrolase; EC 3.1.1.20) atua na hidrólise de taninos complexos e hidrolisáveis, liberando glicose e ácido gálico. Destaca-se pelo seu potencial de aplicação nas indústrias química, alimentícia e no tratamento de efluentes. No entanto, o uso industrial da tanase é limitado devido à manutenção da estabilidade enzimática durante o processo e armazenamento. Deste modo, este estudo teve como objetivo investigar a estabilização das tanases produzidas por espécies de *Aspergillus* por meio de técnicas de spray drying e de imobilização enzimática, com potencial de aplicação no setor de bebidas, síntese de propil galato, tratamento de efluentes e ração animal. Os fungos *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18 foram cultivados em fermentação submersa e *A. carbonarius* em fermentação em estado sólido para produção de tanase. O processo de secagem, realizado em Spray Dryer SD05 na presença de β -ciclodextrina, amido Capsul®, farinha de soja, lactose e maltodextrina como adjuvantes, possibilitou a manutenção da atividade enzimática independente do adjuvante. Os pós contendo tanase apresentaram teor de umidade entre 4,19-12,48% e a atividade de água entre 0,24-0,51, valores adequados para garantir a qualidade físico-química e estabilidade microbiológica dos produtos secos. Após armazenamento por 1 ano, as tanases secas de *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21 e *A. niger* ANG18 preservaram suas atividades acima de 62,53%. O produto seco contendo tanase de *A. fumigatus* CAS21 e lactose exibiu potencial de aplicação para síntese de propil galato (PG). As enzimas de *A. ochraceus*, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius*, seca com farinha de soja, reduziram aproximadamente 62% dos taninos e 27% dos compostos fenólicos presentes nas rações de sorgo, peixe e uva. Na imobilização, a tanase de *A. fumigatus* CAS21 apresentou rendimento de 100%, eficiência de 98,80% e atividade enzimática recuperada de 94,32% no suporte Ca-alginato pelo método de imobilização por encapsulamento. O derivado exibiu maior atividade a 50-60 °C e pH 5,0, e estabilidade térmica e ao pH superiores comparada a tanase livre. Adicionalmente, reteve mais de 78% da sua atividade inicial após 10 de ciclos e manteve 70% da atividade após 9 meses de armazenamento a 4 °C. A enzima imobilizada hidrolisou 84,56% dos taninos presentes no chá verde e aumentou o conteúdo de ácido gálico em 256%, em processo conduzido em reator de leito fixo. O chá verde tratado com tanase apresentou propriedades superiores com relação à cor e clareza, e elevou a atividade antioxidante em 25%. No tratamento de efluentes, a tanase imobilizada de *A. fumigatus* CAS21 degradou aproximadamente 78% dos taninos presentes no efluente da indústria de curtume após aplicação em reator por 48 h. O tratamento enzimático também melhorou o teor de compostos fenólicos (-70%), cor (-48,76%) e clareza (+6,65 vezes) do efluente. Deste modo, os métodos de spray drying e imobilização enzimática demonstraram eficiência para estabilizar as tanases de *Aspergillus* e potencializar suas aplicações no setor de alimentos, no tratamento de efluentes e na ração animal.

Palavras-chave: Tanino acil hidrolase; *Spray drying*; Imobilização por encapsulamento; Reator de leito fixo.

ABSTRACT

Tannase (tannin acyl hydrolase; EC 3.1.1.20) acts in the hydrolysis of complex and hydrolyzable tannins, releasing glucose and gallic acid. It stands out for its potential application in the chemical, food and effluent treatment industries. However, the industrial use of tannase is limited due to the maintenance of enzymatic stability during the process and storage. Thus, this study aimed to investigate the stabilization of tannases produced by *Aspergillus* species through spray drying and enzymatic immobilization techniques, with potential application in the beverage sector, synthesis of propyl gallate, treatment of effluents and animal feed. The fungi *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18 were grown in submerged fermentation and *A. carbonarius* in solid state fermentation for tannase production. The drying process, carried out in Spray Dryer SD05 in the presence of β -cyclodextrin, Capsul[®] starch, soybean meal, lactose and maltodextrin as adjuvants, made it possible to maintain the enzymatic activity regardless of the adjuvant. The powders containing the tannase had moisture content between 4.19-12.48% and the water activity between 0.24-0.51, adequate values to guarantee the physical-chemical quality and microbiological stability of the dry products. After storage for 1 year, the dry tannases of *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21 and *A. niger* ANG1 preserved their activities above 62.53%. The dry product containing tannase from *A. fumigatus* CAS21 and lactose showed potential for the synthesis of propyl gallate (PG). The enzymes of *A. ochraceus*, *A. niger* ANG18 and *A. carbonarius*, dried with soybean meal, reduced about 62% of the tannins and 27% of the phenolic compounds present in the sorghum, fish and grape diets. In immobilization, *A. fumigatus* CAS21 tannase showed 100% yield, 98.80% efficiency and 94.32% recovered enzyme activity in Ca-alginate support using the encapsulation immobilization method. The derivative exhibited greater activity at 50-60 °C and pH 5.0, and higher thermal and pH stability compared to free tannase. In addition, it retained more than 78% of its initial activity after 10 cycles and maintained 70% of its activity after 9 months of storage at 4 °C. The immobilized enzyme hydrolyzed 84.56% of the tannins present in green tea and increased the content of gallic acid by 256%, in a process conducted in a fixed bed reactor. Green tea treated with tannase showed superior properties in terms of color and clarity, and increased antioxidant activity by 25%. In the treatment of effluents, the immobilized tannase of *A. fumigatus* CAS21 degraded about 78% of the tannins present in the tannery industry effluent after application in a reactor for 48 h. The enzymatic treatment also improved the content of phenolic compounds (-70%), color (- 48.76%) and clarity (+ 6.65 times) of the effluent. In this way, the spray drying and enzymatic immobilization methods demonstrated efficiency to stabilize the *Aspergillus* tannase and enhance their applications in the food sector, in the treatment of effluents and in animal feed.

Keywords: Tannin acyl hydrolase; Spray drying; Immobilization by encapsulation; Fixed bed reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hidrólise do ácido tânico pela ação da tanase e, como produtos de hidrólise, ácido gálico e glicose.	29
Figura 2 - Atividade depsidase e atividade esterase da enzima tanino acil hidrolase.	30
Figura 3 - Estrutura química dos taninos hidrolisáveis.....	32
Figura 4 - Estrutura química dos taninos condensados.	33
Figura 5 - Estrutura química do tanino complexo.	33
Figura 6 - Estrutura química do propil galato (PG).....	42
Figura 7 - Esquema simplificado dos experimentos realizados na presente pesquisa.	55
Figura 8 - Representação esquemática do reator de leito fixo com sistema de recirculação.....	72
Figura 9 - Processo de tratamento do couro de bode realizado na Cooperativa ARTEZA da Ribeira de Cabaceiras – PB.	75
Figura 10 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos na presença de diferentes adjuvantes obtidos do processo em <i>spray dryer</i> da tanase de <i>A. phoenicis</i>	90
Figura 11 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos na presença de diferentes adjuvantes obtidos do processo em <i>spray dryer</i> da tanase de <i>A. ochraceus</i>	91
Figura 12 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos na presença de diferentes adjuvantes obtidos do processo em <i>spray dryer</i> da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21.	92
Figura 13 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos na presença de diferentes adjuvantes obtidos do processo em <i>spray dryer</i> da tanase de <i>A. niger</i> ANG18.....	93
Figura 14 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos com diferentes adjuvantes obtidos do processo de <i>spray dryer</i> da tanase de <i>A. carbonarius</i>	94
Figura 15 - Espectros de FTIR característicos das tanases.....	97
Figura 16 - Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade da tanase produzida por <i>A. phoenicis</i>	99
Figura 17 - Estabilidade térmica da tanase produzida por <i>A. phoenicis</i>	100

Figura 18 - Estabilidade ao pH para a da tanase produzida por <i>A. phoenicis</i>	101
Figura 19 - Efeito da temperatura e pH na atividade da tanase produzida por <i>A. ochraceus</i>	102
Figura 20 - Estabilidade térmica da tanase produzida por <i>A. ochraceus</i>	103
Figura 21 - Estabilidade ao pH para a tanase produzida por <i>A. ochraceus</i>	104
Figura 22 - Efeito da temperatura e pH na atividade da tanase produzida por <i>A. fumigatus</i> CAS21	105
Figura 23 - Estabilidade térmica da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21	106
Figura 24 - Estabilidade ao pH da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21	107
Figura 25 - Efeito da temperatura e pH na atividade da tanase produzida por <i>A. niger</i> ANG18	108
Figura 26 - Estabilidade térmica da tanase de <i>A. niger</i> ANG18.	109
Figura 27 - Estabilidade ao pH para a da tanase produzida por <i>A. niger</i> ANG18 ..	110
Figura 28 - Estabilidade enzimática do produto seco com lactose contendo tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 nos solventes orgânicos.	117
Figura 29 - Perfil cromatográfico em TLC dos produtos obtidos a partir da reação de transesterificação do ácido tânico na presença de 1-propanol pela ação da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 seca com lactose.....	119
Figura 30 - Espectros de FTIR do propil galato padrão e sintetizado pela ação da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 seca com lactose.	120
Figura 31 - Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática das tanases de <i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. carbonarius</i> secas em farinha de soja.....	123
Figura 32 - Extração de taninos e compostos fenólicos totais presentes na ração de peixe, farelo de soja e bagaço de uva.	125
Figura 33 - Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 livre e imobilizada	136
Figura 34 - Estabilidade térmica da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 livre e imobilizada em Ca-alginato.	137
Figura 35 - Estabilidade ao pH da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 na forma livre e imobilizada em Ca-alginato.	138
Figura 36 - Ciclos de reutilização da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em Ca-alginato.	139

Figura 37 - Estabilidade ao armazenamento da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em Ca-alginato.	140
Figura 38 - Efeito do tratamento enzimático do chá verde com tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em Ca-alginato em reator de leito fixo.....	146
Figura 39 - Detanificação do efluente da indústria de curtume pela ação da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em Ca-alginato em reator de leito fixo	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela nutricional da ração de peixe Alcon® Basic	63
Tabela 2 - Efeito de diferentes adjuvantes na secagem em <i>spray dryer</i> das tanases produzidas pelas espécies de <i>Aspergillus</i>	82
Tabela 3 - Características físico-químicas dos produtos secos obtidos da secagem em <i>spray dryer</i> das tanases produzidas pelas espécies de <i>Aspergillus</i>	88
Tabela 4 - Estabilidade da atividade enzimática das tanases produzidas pelas espécies de <i>Aspergillus</i> na forma líquida e seca em diferentes adjuvantes após armazenamento por 1 ano a 4 °C e 28 °C.....	112
Tabela 5 - Influência de diferentes compostos na atividade enzimática da tanase solúvel de <i>A. fumigatus</i> CAS21 e seca em <i>spray dryer</i> na presença de adjuvantes	116
Tabela 6 - Aplicação da tanase seca em farinha de soja para tratamento enzimático da ração animal	127
Tabela 7 - Imobilização das tanases produzidas pelas espécies de <i>Aspergillus</i> empregando diferentes métodos e suportes	131
Tabela 8 - Parâmetros calculados do processo conduzido em reator de leito fixo para tratamento enzimático do chá verde com tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em esferas de alginato em um período de 24 horas	144
Tabela 9 - Propriedades físico-químicas do chá verde não tratado e após tratamento enzimático.....	148
Tabela 10 - Parâmetros calculados do processo conduzido em reator de leito fixo para tratamento enzimático do efluente da indústria de curtume com tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em esferas de alginato.....	149
Tabela 11 - Características físico-químicas do efluente vegetal não tratado e após tratamento enzimático conduzido em reator de leito fixo por 24 e 48 horas	153

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR - Reflexo total atenuado

AG - Ácido gálico

AT – Ácido tânico

BDA - Batata Dextrose Ágar

BSA - Albumina de Soro Bovino

CAGR - Taxa de crescimento anual composta

CBPBR - Reator de leito fixo com recirculação

CCD - Cromatografia de Camada Delgada

CDs - Ciclodextrinas

CE - Epicatequina

DEAE - Dietilaminoetil

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EC - Enzyme Commission

ECG - Epicatequina galato

EGC - Epigallocatequina

EGCG - Epigallocatequina galato

FB – Fermentação por Biofilme

FES - Fermentação em Estado Sólido

FL - Flavonoides

FSbm - Fermentação Submersa

FTIR - Espectrometria de

infravermelho com transformada de Fourier

GRAS - Materiais geralmente seguros

kDa - mil Daltons

m/v - Massa por volume

PBR - Reator de leito fixo

PG – Propil galato

qsp - quantidade suficiente para

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TAH - Tanino acil hidrolase

U - Unidade de atividade enzimática

v/v - volume por volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	27
1.1	Enzimas industriais	27
1.2	Tanino acil hidrolase	28
1.2.1	Substrato da tanase: taninos	30
1.3	Tanases produzidas por fungos filamentosos	34
1.4	Aplicações das tanases	36
1.4.1	Indústria de alimentos	36
1.4.2	Indústria de ração animal	38
1.4.3	Tratamento de efluentes.....	39
1.4.4	Produção de ácido gálico e síntese de propil galato	42
1.5	Secagem em <i>spray dryer</i>	44
1.5.1	Adjuvantes aplicados na secagem de enzimas	46
1.6	Imobilização enzimática	48
1.7	Aplicação de enzimas imobilizadas em reatores	51
2.	OBJETIVOS	53
2.1	Objetivo geral	53
2.2	Objetivos específicos	53
3.	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	Microrganismos	56
3.2	Produção e obtenção de tanase extracelular	56
3.4	Secagem em <i>spray dryer</i>	57
3.4.1	Determinação do teor de sólidos	58
3.4.2	Determinação da atividade enzimática do produto seco contendo tanase ...	59
3.4.3	Atividade de água e umidade do pó	59
3.4.4	Tamanho das partículas	59

3.4.5	Análise de partículas secas por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier.....	60
3.4.6	Recuperação do produto	60
3.4.7	Caracterização da atividade enzimática das tanases secas em <i>spray dryer</i>	61
3.4.8	Estabilidade ao armazenamento após 1 ano	62
3.4.9	Aplicação dos produtos secos contendo tanase	62
3.5	Imobilização enzimática	65
3.5.1	Purificação parcial em membrana de ultrafiltração	65
3.5.2	Imobilização das tanases de <i>Aspergillus</i>	65
3.5.3	Determinação do rendimento, eficiência e atividade recuperada após imobilização	68
3.5.4	Determinação da atividade enzimática da tanase imobilizada	69
3.5.5	Quantificação de proteínas	69
3.5.6	Caracterização da atividade enzimática da tanase imobilizada	69
3.6	Aplicações da tanase imobilizada em reator de leito fixo	71
3.6.1	Reator de leito fixo.....	71
3.6.2	Infusão de chá verde	72
3.6.3	Tratamento do chá com tanase imobilizada.....	72
3.6.4	Tratamento enzimático do efluente da indústria de curtume	75
3.6.5	Parâmetros operacionais dos processos em PBR	76
3.7	Análise dos experimentos	78
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1	Secagem em <i>spray dryer</i> das tanases produzidas pelas espécies de <i>Aspergillus</i>	81
4.1.1	Parâmetros dos processos de secagem.....	81
4.1.2	Características físico-químicas dos produtos secos	87
4.1.3	Caracterização enzimática dos produtos secos contendo tanase	98
4.1.4	Estabilidade ao armazenamento das tanases secas	111

4.2	Aplicação da tanase presente nos produtos secos de <i>A. fumigatus</i> CAS21 na síntese de propil galato.....	115
4.2.1	Influência de solventes orgânicos na atividade tanásica.....	115
4.2.2	Síntese de propil galato pela ação da tanase seca com lactose	118
4.3	Aplicação da tanase seca na ração animal	121
4.3.1	Influência da temperatura e do pH na atividade tanásica do pó seco com farinha de soja	121
4.3.2	Extração de taninos e demais compostos fenólicos com solventes orgânicos..	124
4.3.3	Tratamento enzimático da ração animal	125
4.4	Imobilização das tanases produzidas pelas espécies de <i>Aspergillus</i> em diferentes suportes.....	130
4.4.1	Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em Ca-alginato.....	134
4.4.2	Estabilidade térmica e ao pH da tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em Ca-alginato.....	136
4.4.3	Estabilidade operacional e ao armazenamento	138
4.5	Tratamento do chá verde em reator de leito fixo com tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em Ca-alginato.....	141
4.5.1	Influência da vazão de alimentação e tempo espacial no tratamento enzimático do chá verde	141
4.5.2	Efeito do tempo de tratamento enzimático na hidrólise dos taninos do chá verde.....	145
4.5.3	Propriedades físico-químicas do chá verde após tratamento enzimático... ..	147
4.6	Tratamento de efluente da indústria de curtume em reator de leito fixo com tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21 imobilizada em Ca-alginato.....	148
4.6.1	Influência da vazão de alimentação e tempo espacial no tratamento enzimático do efluente de curtume.....	149

4.6.2	Efeito do tempo de tratamento enzimático na hidrólise dos taninos presentes no efluente	150
4.6.3	Caracterização físico-química do efluente de curtume após tratamento enzimático.....	152
5.	CONCLUSÕES	154
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	156
	REFERÊNCIAS	157
	APÊNDICE	172
	ANEXOS	178

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas industriais

A busca por processos ecologicamente corretos, aliados com maior viabilidade econômica e produtos de alta qualidade, promoveu a ascensão de enzimas microbianas em processos industriais (SHARMA et al., 2021). O potencial biocatalítico das enzimas fornece vantagens em relação aos catalisadores químicos, devido à alta especificidade, possibilidade de reutilização, reações em condições amenas e maior eficiência (DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Processos em condições suaves de temperatura, pressão e pH são economicamente viáveis para as indústrias pela redução de custos com equipamentos (bombas, válvulas, sistema de aquecimento/resfriamento) necessários para atingir condições extremas (WONG et al., 2019). Adicionalmente, biomoléculas, como enzimas, são biodegradáveis e causam impactos mínimos ao meio ambiente. No entanto, apesar das inúmeras vantagens, catalisadores enzimáticos apresentam alto custo e instabilidade de suas atividades durante a aplicação (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Tais características podem limitar seus usos industriais e, portanto, a busca por metodologias que possibilitem a melhoria da estabilidade enzimática é necessária.

De acordo com a *Business Communication Company* (BCC), o mercado global de enzimas foi avaliado em US \$ 9,9 bilhões em 2019 e no período de 2020 a 2027 há uma projeção de expansão com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 7,1%¹. O aumento da demanda será, provavelmente, na indústria alimentícia, especialmente de bebidas, biocombustíveis, alimentação animal e limpeza (detergentes). Nos alimentos, as enzimas são comumente aplicadas para elevar a qualidade dos produtos, seja no sabor, aparência (cor, clareza) ou na quebra de compostos complexos para favorecer a assimilação de nutrientes (GUERRAND, 2018; BCC, 2020). O crescimento do mercado de enzimas na indústria alimentícia foi proporcionado pelo aumento da conscientização de uma alimentação saudável e dietética, como também pelo crescimento populacional (BCC, 2020). Na indústria de ração animal, fitase, xilanase, amilase e protease são conhecidas por melhorar a nutrição de ruminantes, aves e suínos pela degradação

¹ Estudo realizado antes da crise mundial de 2020 causada pela pandemia da COVID-19.

de compostos prejudiciais e por aumentar a biodisponibilidade dos nutrientes (ARBIGE; SHETTY; CHOTANI, 2019; SHARMA et al., 2021). Nas indústrias químicas, a aplicação de biocatalisadores enzimáticos torna o processo biodegradável, com geração mínima de subprodutos tóxicos e reduz o descarte de resíduos (ARBIGE; SHETTY; CHOTANI, 2019). As enzimas são potencialmente aplicadas também para recuperação de áreas atingidas por compostos químicos tóxicos ou no tratamento de efluentes, especificamente da indústria têxtil (WONG et al., 2019).

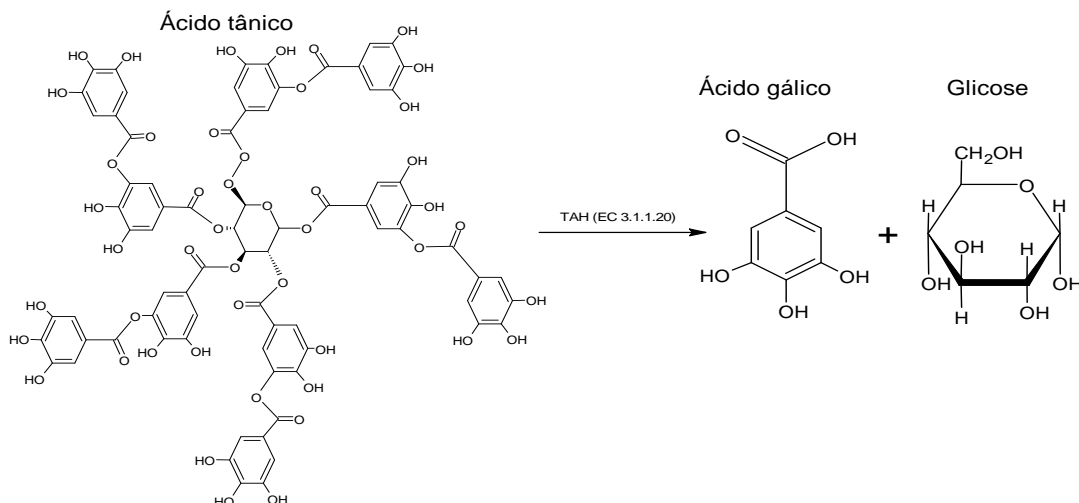
A maioria das enzimas aplicadas em processos industriais são hidrolases, ou seja, biomoléculas que catalisam a quebra de substratos complexos em moléculas mais simples na presença de água (ARBIGE; SHETTY; CHOTANI, 2019). Dentre as hidrolases, as tanases merecem destaque pela versatilidade de aplicação nos setores químico, farmacêutico, alimentício e no tratamento de efluentes industriais.

1.2 Tanino acil hidrolase

A tanino acil hidrolase (TAH; EC 3.1.1.20), também denominada de tanase, atua na hidrólise de ésteres e ligações depsídicas de taninos complexos e hidrolisáveis, liberando glicose e ácido gálico a partir de galotaninos como o ácido tânico, e ácido elágico para hidrólise de elagitaninos (AGUILAR et al., 2007; CHÁVEZ GONZÁLEZ et al., 2016; GOVINDARAJAN et al., 2016; ZHANG et al., 2015).

O mecanismo de ação da tanase sobre o ácido tânico foi descrito por libuchi, Minoda e Yamada (1972). Inicialmente, a enzima cliva as ligações depsídicas, seguida pela hidrólise das ligações éster. No decorrer da reação, os autores relataram a formação de 2,3,4,6-tetragaloilglicose, dois tipos de monogaloilglicose e ácido gálico livre. Segundo Rodríguez-Durán et al. (2011), como produtos finais são liberadas nove moléculas de ácido gálico e uma molécula de glicose (Figura 1).

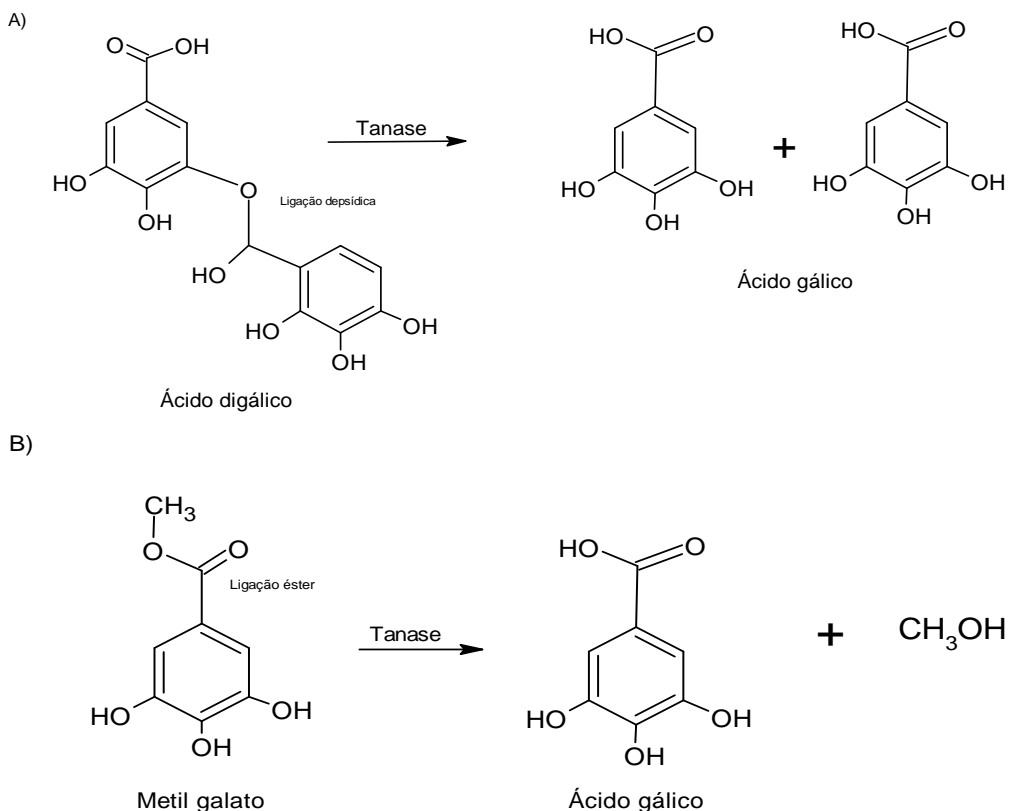
Figura 1 - Hidrólise do ácido tânico pela ação da tanase e, como produtos de hidrólise, ácido gálico e glicose



Fonte: Modificado de Aguilar e Gutiérrez-Sánchez (2001).

Além do ácido tânico, a tanase também atua na hidrólise dos substratos epicatequina galato (ECG), epigalocatequina galato (EGCG), metil galato, propil galato e ácido digálico (RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2011; ZHANG et al., 2016b). Acredita-se que esta enzima catalisa duas reações diferentes (Figura 2), uma caracterizada pela atividade de esterase, que envolve a hidrólise de ésteres de ácido gálico (exemplo, metil galato), e a outra atividade de depsidase, que atua na clivagem das ligações depsídicas do ácido digálico, galotaninos, elagitaninos e taninos complexos (ABD EL TAW; KHATTAB, 2018; AHARWAR; PARIHAR, 2018; SHARMA; BHAT; DAWRA, 2000). A produção de tanases bifuncionais foi relatada para os microrganismos *Aspergillus fumigatus* CAS21 (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018), *Lactobacillus plantarum* (REN et al., 2013) e *Emericella nidulans* (GONÇALVES et al., 2011). A especificidade ao substrato depende da fonte de obtenção da enzima e o modo de produção, além de que, um microrganismo pode produzir isoformas com diferentes afinidades ao substrato (ABD EL TAW; KHATTAB, 2018; RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2011).

Figura 2 - Atividade depsidase (A) no substrato ácido digálico e atividade esterase (B) no substrato metil galato da enzima tanino acil hidrolase



Fonte: Modificado de Rodríguez-Duran et al. (2011).

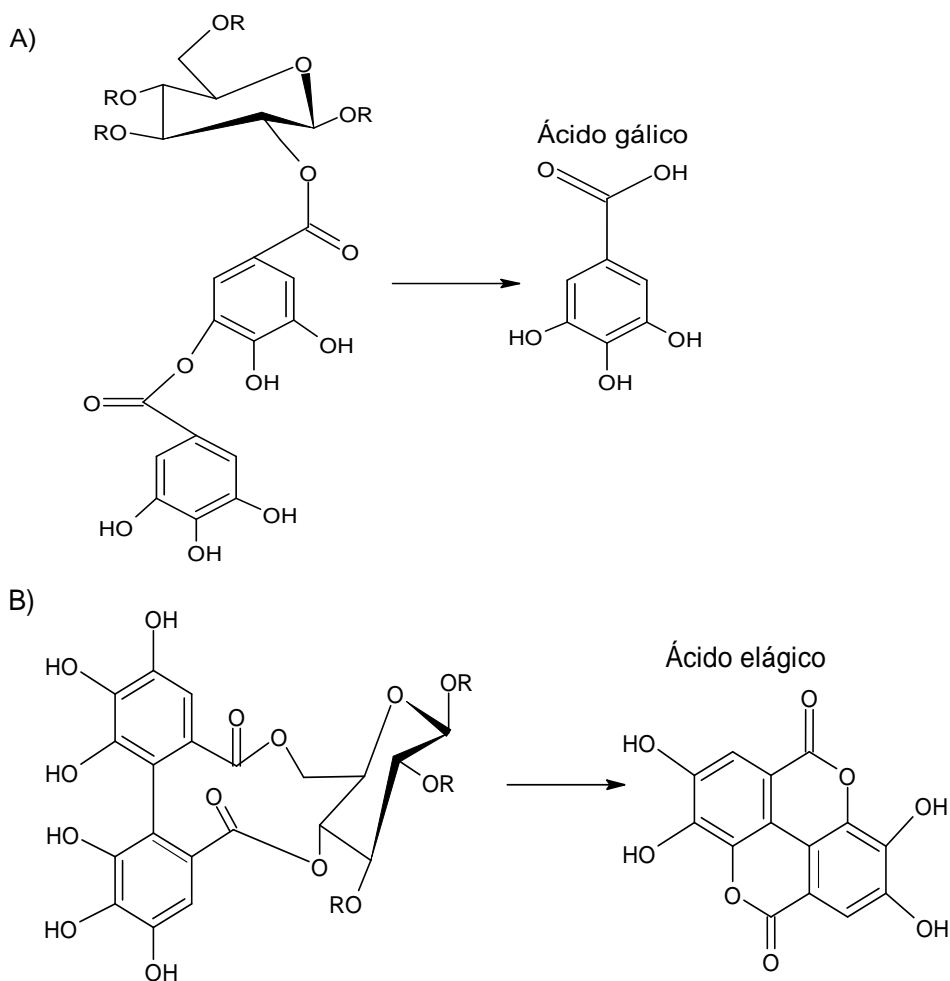
1.2.1 Substrato da tanase: taninos

Os taninos são metabólitos secundários fenólicos produzidos por diferentes vegetais como parte do mecanismo de defesa contra ataques de insetos, fungos ou bactérias (GOVINDARAJAN et al., 2016; KUMAR et al., 2018). Depois da lignina, constituem o segundo grupo de fenóis mais abundantes na natureza e são caracterizados como moléculas de alta massa molecular (500-3000 kDa) e pela solubilidade em água (CHÁVEZ GONZÁLEZ et al., 2016; GOVINDARAJAN et al., 2016). A concentração de taninos nas plantas varia de acordo com a espécie, parte da planta (casca, folha, semente, fruto, raiz), fatores sazonais e ambientais, como clima, solo e disponibilidade de água (HOYOS-MARTÍNEZ et al., 2019). São comumente encontrados nos grãos de cacau, em frutas, legumes e grãos de cereais (SMERIGLIO et al., 2017). Atualmente, com base nas suas estruturas e

propriedades, os taninos são divididos em três grandes grupos: condensados, hidrolisáveis e complexos (CHANG et al., 2019; GOVINDARAJAN et al., 2016).

Os taninos hidrolisáveis são heteropolímeros formados por ácidos polifenólicos e seus derivados, esterificados a um poliol, geralmente, glicose. As unidades de ácido polifenólico estão ligadas ao poliol por meio de ligações éster (HOYOS-MARTÍNEZ et al., 2019). Devido sua estrutura, são facilmente hidrolisados sob condições ácidas, alcalinas, altas temperaturas e por ação enzimática (VASTA et al., 2019). Geralmente, são divididos em duas subcategorias: galotaninos (Figura 3A) e elagitaninos (Figura 3B). Os galotaninos representam o tipo mais simples de taninos, são formados por ácidos orgânicos, como os ácidos gálico e digálico, esterificados com o grupo hidroxila de um carboidrato (GOVINDARAJAN et al., 2016; RAUF et al., 2019; SIENIAWSKA; BAJ, 2017). O ácido tânico é o galotanino mais disponível comercialmente e quando hidrolisado fornece moléculas de ácido gálico e glicose (DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018). Os elagitaninos são constituídos de unidades de ácido hexahidroxidifênico ligadas ao poliol, e após hidrólise, fornecem moléculas de açúcar e ácido hexahidroxidifênico, que se lactoniza espontaneamente e forma o ácido elágico (HOYOS-MARTÍNEZ et al., 2019; RAUF et al., 2019). Embora a glicose seja o poliol mais abundante encontrado nas estruturas dos taninos hidrolisáveis, outros tipos de carboidratos já foram descritos, como frutose, xilose, ácido chiquímico, sacarose e quercitol (SMERIGLIO et al., 2017).

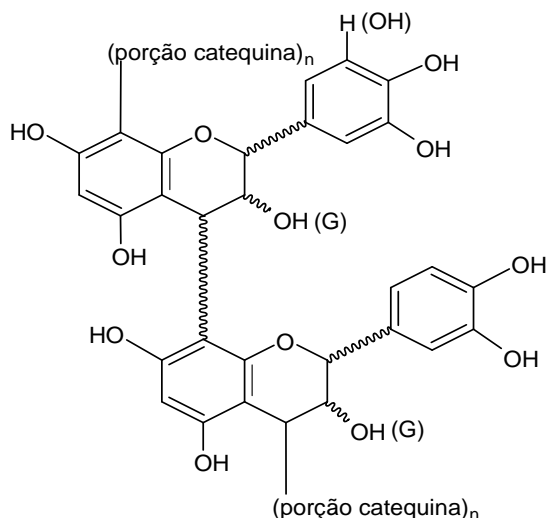
Figura 3 - Estrutura química dos taninos hidrolisáveis do tipo galotaninos (A), formados por ésteres de ácido gálico, e elagitaninos (B), moléculas constituídas de unidades de ácido hexahidroxidifênico, que após lactonização forma ácido elágico



Fonte: Modificado de Sieniawska e Baj (2017).

As proantocianidinas, ou taninos condensados, estão presentes em diferentes partes das plantas como cascas, flores, frutos e sementes, e são caracterizados pela adstringência, amargura, acidez, doçura, aroma e cor (RAUF et al., 2019). São oligômeros de flavan-3-ol ligados por ligações carbono-carbono (Figura 4) e, as mais abundantes nos vegetais são compostas por unidades de catequina e epicatequina (procianidinas) ou seu derivado galocatequina (CHANG et al., 2019; SMERIGLIO et al., 2017).

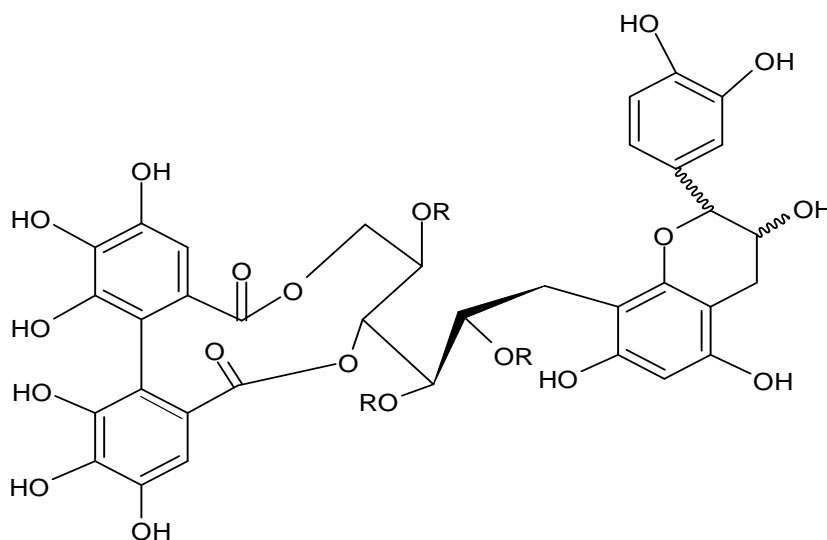
Figura 4 - Estrutura química dos taninos condensados



Fonte: Modificado de Dhiman, Muhherjee e Singh (2018).

Os taninos complexos são formados por flavan-3-ol e taninos hidrolisáveis (Figura 5) (CHANG et al., 2019). Geralmente, a epicatequina está ligada por uma ligação glicosídica a um galotanino ou elagitanino e, após hidrólise, são formados epicatequina e ácido gálico ou ácido elágico (SHARMA, 2019; SIENIAWSKA; BAJ, 2017). Portanto, são constituídos pela combinação das moléculas de tanino condensado e de tanino hidrolisável.

Figura 5 - Estrutura química do tanino complexo



Fonte: Modificado de Sieniawska e Baj (2017).

As atividades antimicrobiana e antioxidante dos diferentes tipos de taninos são amplamente exploradas na indústria farmacêutica, médica, química e alimentar

(HOYOS-MARTÍNEZ et al., 2019). A presença de grupos hidroxilas fenólicos (aproximadamente 20) permite que essas moléculas formem complexos insolúveis com proteínas, minerais e carboidratos, como pectina, celulose e amido (SMERIGLIO et al., 2017). Em razão disso, apresentam alguns efeitos negativos como adstringência de frutos e vegetais, formação de precipitado em sucos e bebidas, e dificultam a assimilação de alguns nutrientes na alimentação animal (BENIWAL et al., 2013; RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2011). Devido à capacidade de se ligarem as proteínas, os taninos são aplicados no tratamento do couro para evitar a putrefação da pele animal, portanto, é um dos principais constituintes dos efluentes liberados pelas indústrias de curtumes (DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018).

Apesar das propriedades antimicrobianas dos taninos, muitos microrganismos desenvolveram mecanismos adaptativos e vias de degradação para hidrólise desses compostos quando presentes no meio ambiente, como a síntese da enzima tanase (GOVINDARAJAN et al., 2016). Deste modo, a biotransformação dos taninos pela ação da tanase é a abordagem mais eminente para minimizar os efeitos negativos que esses compostos apresentam quando presentes nos alimentos, ração animal e no meio ambiente (DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018).

1.3 Tanases produzidas por fungos filamentosos

A tanase pode ser obtida a partir de fonte vegetal, animal e microbiana. Algumas plantas que apresentam taninos hidrolisáveis foram relatadas como produtoras de tanase como, por exemplo, *Terminalia chebula*, *Acacia Arabica* (BELUR; MUGERAYA, 2011) e *Camellia sinensis* (DAI et al., 2020). Nos animais, a tanase foi encontrada no intestino bovino, mucosa ruminal e em alguns insetos (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001; DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018). No entanto, a fonte mais significativa para obtenção da enzima é a microbiana devido ao rendimento elevado, possibilidade de produção constante, emprego de substratos de menor custo para produção enzimática, como os subprodutos agrícolas, a possibilidade de manipulação genética dos microrganismos e a facilidade no processamento a jusante, como na recuperação, concentração e purificação (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ,

2001; DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018; GUERRAND, 2018; KUMAR et al., 2018; YAO et al., 2014b).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são potenciais produtores de tanases, de modo que estes últimos têm se destacado pela degradação eficiente de diferentes tipos de taninos (LATA; RANI, 2015; SHARMA, 2019; YAO et al., 2014b). Cerca de 120 espécies de fungos foram relatadas como produtoras de tanases, no entanto, as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* encontram-se entre os produtores mais eficientes quando cultivados em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Estado Sólido (FES) (DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018; LATA; RANI, 2015). Recentemente, também foi relatada a produção da enzima por Fermentação por Biofilmes (FB) de *A. ochraceus* (ARACRI; CAVALCANTI; GUIMARÃES, 2019).

Os mecanismos e propriedades moleculares das tanases fúngicas têm sido investigados. Até o presente momento sabe-se que os aminoácidos presentes no sítio ativo das tanases fúngicas são serina, aspartato e histidina, que, geralmente, atuam como uma tríade catalítica (AHARWAR; PARIHAR, 2018; KUMAR et al., 2018). Alguns estudos apontam que as tanases bacterianas e fúngicas, apesar das diferenças que apresentam entre si, compartilham esses mesmos aminoácidos como, por exemplo, relatado para tanase produzida por *L. plantarum* (REN et al., 2013). Adicionalmente, Zhang et al. (2016a) descreveram que a enzima de *A. niger* N5-5 apresenta dobras semelhantes as encontradas na estrutura da tanase de *L. plantarum*. Diferente das bactérias, as tanases fúngicas são glicoproteínas, com massa molecular entre 45 e 310 kDa, formadas por uma ou mais subunidades e pertencem a superfamília de α/β hidrolases (AHARWAR; PARIHAR, 2018; KUMAR et al., 2018).

As tanases disponibilizadas comercialmente pelas empresas Sangherb (China), Kikkoman (Japão) e a enzima ASA Special (Alemanha) são produzidas pelos microrganismos *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus oryzae* e *Arxula adenivorans* LS3 (GOVINDARAJAN et al., 2016). Ressalta-se que as tanases de *Aspergillus* se destacam por apresentarem propriedades interessantes para as diferentes aplicações industriais, como estabilidade térmica, resistência a solventes e íons metálicos, e hidrólise de diferentes substratos. Na literatura os fungos endofíticos *A. fumigatus* CAS21 e *A. niger* ANG18 foram descritos por produzirem tanase quando

cultivados em FSbm na presença de ácido tânico por 24 horas a 37 °C (CAVALCANTI et al., 2017). A tanase de *A. fumigatus* CAS21 é uma glicoproteína de 60 kDa, estável aos pH 5,0 e 6,0 por 3 horas de incubação, com potencial de aplicação no tratamento de efluentes e na síntese de propil galato (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018). A enzima extracelular produzida por *A. ochraceus* em FSbm apresenta massa molecular de 112 kDa, temperatura de maior atividade a 40 °C e pH 5,0, estabilidade térmica entre 40 e 60 °C por 1 hora, e é ativada na presença de Mn²⁺ (GONÇALVES et al., 2012). Valera, Jorge e Guimarães (2015) relataram que a tanase produzida por *A. carbonarius*, em FES empregando folhas de chá verde, é uma glicoproteína heterodimérica de 134,89 kDa, com estabilidade térmica entre 20 e 60 °C, e estabilidade ao pH 5,0 por 1 hora. Riul et al. (2013) descreveram que fungo *A. phoenicis* produziu tanase com 65% de conteúdo de carboidrato e massa molecular de 218 kDa, termoestável a 50 °C por 1 hora, tolerante a solventes orgânicos, íons e detergentes, e com potencial para síntese de propil galato em meio orgânico.

1.4 Aplicações das tanases

1.4.1 Indústria de alimentos

Potencialmente aplicadas em diversos setores industriais, as tanases podem ser empregadas na indústria de alimentos no setor de bebidas durante o processamento de chás instantâneos. A fabricação de chás prontos é dificultada pela formação de “creme de chá”, precipitados insolúveis formados devido à complexação de polifenóis, que influencia diretamente a qualidade do produto final durante o armazenamento (LI et al., 2017). Constituinte natural de sucos e chás, os taninos se ligam as proteínas, aos carboidratos e a outras macromoléculas e, devido a isto, proporcionam o aumento da turbidez (LI et al., 2018). De acordo com Rodríguez-Durán et al. (2011), a tanase aplicada no chá hidrolisa as ligações éster das catequinas, liberando ácido gálico e compostos solúveis de menor massa molecular, o que promove redução da turbidez e aumento da solubilidade.

Nos sucos de frutas e em bebidas geladas a base de café, as tanases atuam como agente clarificante pela remoção dos compostos fenólicos (BENIWAL et al., 2013). Na fabricação de vinho e cerveja, os taninos presentes são oxidados a

quinonas por meio do contato com o ar, o que leva a uma turbidez indesejável, além de formar complexos insolúveis com as proteínas (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001). Neste caso, a tanase pode ser potencialmente aplicada para reduzir a turbidez e melhorar a qualidade destas bebidas (RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2011). De acordo com Chávez González et al. (2016), os processos químicos tradicionalmente utilizados para remover precipitados insolúveis prejudicam a qualidade final das bebidas, visto que eliminam quantidades significativas de compostos aromáticos. Por outro lado, de acordo com os autores, o tratamento enzimático com tanase auxilia para obtenção de produtos com alto valor agregado, eleva o teor de compostos aromáticos, melhora a qualidade da cor e estabilidade durante o armazenamento. Deste modo, a biotransformação dos taninos é necessária para melhorar a qualidade nutricional sem prejudicar as principais características e benefícios dos alimentos (KUMAR et al., 2018).

O chá é a bebida não alcoólica mais popular do mundo, mais de dois terços da população mundial o consomem (KUMAR et al., 2018). Dentre eles, o chá verde (*Camellia sinensis* L.) é consumido, principalmente, em muitos países asiáticos, como a China e o Japão, e amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas e nutracêuticas (HONG et al., 2020; LI et al., 2017). Os constituintes principais do chá são os polifenóis. As catequinas do tipo epicatequina (CE), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigalocatequina galato (EGCG) são responsáveis por 75 a 80% dos ingredientes solúveis presentes na bebida (HWANG et al., 2019). De acordo com Cao et al. (2019), esses compostos são caracterizados por conferir sabor adstringente e amargo, provocando entrave no consumo do chá. Adicionalmente, o tamanho e número de ligações de hidrogênio presentes nas moléculas da catequina dificultam sua biodisponibilidade (HWANG et al., 2019).

O tratamento do chá com tanase é uma alternativa para melhorar a eficiência da extração de polifenóis e aumentar as atividades de eliminação de radicais (atividade antioxidante) (HWANG et al., 2019). A tanase pode atuar na hidrólise das ligações éster presentes nas moléculas de EGCG e ECG do chá verde, reduzindo o conteúdo desses compostos e impedindo a formação de precipitados pela agregação de macromoléculas durante o armazenamento (LI et al., 2017; XU et al., 2019). Também é uma opção viável para aumentar a bioacessibilidade do ácido gálico, antioxidante relatado pelos seus efeitos benéficos a saúde, desde que não

altere negativamente a qualidade do produto final durante o armazenamento (SIRVEN; NEGRETE; TALCOTT, 2018).

1.4.2 Indústria de ração animal

Plantas e subprodutos agroindustriais são geralmente utilizados como base da alimentação animal, no entanto, a presença de taninos dificulta sua utilização ou os torna de baixo valor agregado (KUMAR et al., 2018). Taninos, fitatos e demais compostos fenólicos, por exemplo, são considerados fatores antinutricionais, ou seja, substâncias que quando presentes nos alimentos interferem na absorção de nutrientes e prejudicam o crescimento (ABD EL TAW; KHATTAB, 2018). De acordo com Guerrand (2018), os animais, normalmente, não conseguem digerir 15% a 20% da ração devidos aos componentes de difícil digestão. Alimentos comumente utilizados na alimentação animal, como feijão, sorgo, cevada, castanha e mandioca, já foram descritos na literatura pela presença de compostos antinutricionais, como taninos hidrolisáveis e condensados (ABD EL TAW; KHATTAB, 2018). Os taninos dificultam a absorção de ferro e minerais, e interferem na atividade de enzimas digestivas presentes na saliva e no rúmen (SIRVEN; NEGRETE; TALCOTT, 2018). Contudo, seus efeitos variam de acordo com a fonte de obtenção, sua composição e concentração na dieta, além da fisiologia da espécie animal que o consumiu (ABD EL TAW; KHATTAB, 2018; FRUTOS et al., 2004; VASTA et al., 2019). De acordo com Omnes et al. (2017), na dieta de peixes, os taninos, assim como outros componentes antinutricionais, prejudicam a função digestiva e o metabolismo de nutrientes. Nos ruminantes são descritos por influenciar o ambiente microbiano ruminal (bactérias, protistas e fungos), afetar o crescimento e a produção de leite (RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2011; VASTA et al., 2019).

Uma das estratégias viáveis para diminuir os efeitos negativos dos componentes antinutricionais presentes nas rações é adição de enzimas exógenas. A suplementação enzimática pode melhorar as características nutricionais da ração a base de subprodutos e de proteínas vegetais (CHAMORRO et al., 2017). O mercado global de enzimas aplicadas em rações é estimado em US\$ 850 milhões, com destaque para rações de suínos e aves (representam 70% do mercado de rações), seguido por rações para ruminantes, peixes e camarão (GUERRAND, 2018). O tratamento de resíduos orgânicos vegetais com enzimas pode ser uma

alternativa para maximizar as características nutricionais de subprodutos como, por exemplo, bagaço de uva, tornando-os aptos para nutrição animal (EBRAHIMZADEH et al., 2017).

Tanase e fitase foram descritas na literatura pelo seu potencial de aplicação na alimentação de frangos, ruminantes e peixes (AZZAZ et al., 2020; EBRAHIMZADEH et al., 2017; MANDAL; GHOSH, 2013; SATO et al., 2017). A suplementação com tanase pode trazer efeitos benéficos na remoção dos taninos, elevar o coeficiente de digestibilidade e favorecer a assimilação dos nutrientes (BENIWAL et al., 2013; KUMAR et al., 2018). A enzima pode ser administrada diretamente na ração ou utilizar técnicas de processamento, como a FES (MANDAL; GHOSH, 2013). Em ambos os casos a degradação dos taninos ocorre antes da ingestão dos alimentos pelos animais. Azzaz et al. (2020) descreveram a utilização da tanase de *A. terreus* na dieta de cabras lactantes e observaram que a suplementação enzimática aumentou o aproveitamento da dieta rica em taninos, a concentração de proteínas no sangue e melhorou a produção de leite. Mandal e Ghosh (2013) observaram redução do teor de taninos da ração de peixe, utilizada como substrato sólido em FES, pela ação da tanase de *Pichia kudriavzevii*. Abdulla et al. (2016) concluíram que o tratamento de grãos de feijão de fava (*Vicia faba* L. var. *minor*) com tanase melhorou a utilização dos nutrientes, a energia dietética metabolizável e a eficiência alimentar de frangos de corte.

1.4.3 Tratamento de efluentes

Os taninos podem ser encontrados nas águas residuais das indústrias de poupa de suco, fitoterápica, alimentos (vinho e cerveja, por exemplo), papel e couro (HE et al., 2007; MURUGAN; AL-SOHAIBA, 2010). A fabricação do couro é um dos processos mais difundidos mundialmente por ser insumo nas indústrias de calçados, roupas, acessórios, móveis e artigos automobilísticos (DIXIT et al., 2015). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a indústria de couro tem um papel importante na economia nacional (SAXENA; CHANDRA; BHARAGAVA, 2017). O couro é obtido a partir do processo de curtimento da pele animal, geralmente provinda de fontes bovinas, equinas e caprinas, fornecida pela pecuária de corte e frigoríficos (SAXENA; CHANDRA; BHARAGAVA, 2017). De forma geral, o processo envolve as

etapas de ribeira, curtimento e acabamento (DIXIT et al., 2015). A ribeira, ou fase preparatória, compreende a etapa de limpeza e eliminação de partes que não serão utilizadas, como a remoção do pelo animal (ANGELUCCI et al., 2017; DIXIT et al., 2015). A maioria dos curtumes utiliza sal para restringir o ataque microbiano e cal para remover os pelos (KANAGARAJ et al., 2015). No processo de curtimento são aplicados taninos naturais (cascas, madeiras, folhas, raízes), sintéticos ou agentes minerais (alumínio, cromo e zircônio) a fim de evitar a putrefação da pele (LAURENTI et al., 2017). Esses compostos promovem maior durabilidade do couro e estabilização do colágeno presente na pele animal, evitando degradações químicas, térmicas e microbiológicas (KRISHNAMOORTHY et al., 2013; ONEM et al., 2015). A etapa de acabamento abrange o enxague do couro curtido, secagem, corte e conclusão dos aspectos definitivos para melhorar seu valor comercial (ANGELUCCI et al., 2017).

A indústria de curtume é classificada como uma das mais poluidoras por gerar grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos prejudiciais ao meio ambiente (SAXENA; CHANDRA; BHARAGAVA, 2017). O tratamento comumente utilizado para os resíduos sólidos é a deposição em aterros sanitários. Já os efluentes são tratados, geralmente, em tanques, resultando na mistura de águas residuais das diferentes etapas (LOFRANO et al., 2013). Portanto, são caracterizadas pela grande quantidade de cal, sais, ácidos minerais, íons metálicos, cromo e compostos orgânicos, como taninos e proteínas (SAXENA; CHANDRA; BHARAGAVA, 2017; TENG et al., 2016). Do ponto de vista ambiental, algumas propriedades desses efluentes provocam alterações no solo, o que pode acarretar deficiência dos nutrientes necessários para as plantas e inibir o crescimento microbiano, alterando a biota local (KUMAR et al., 2018; ZHANG et al., 2015). Especificamente, os taninos retardam o processo de formação do húmus e inibe a atividade enzimática dos microrganismos do solo (SHARMA, 2019). Ainda torna a água imprópria para abastecimento e prejudica a vida de animais terrestres e aquáticos, visto que a alta concentração de taninos é tóxica para uma variedade de microrganismos e animais, e a exposição prolongada da pele a polifenóis pode causar irritação local e eczema (DIXIT et al., 2015; ZHANG et al., 2015). De Nicola et al. (2007) relataram que a presença de taninos naturais e sintéticos afetou a vida marinha do ouriço-do-mar, visto que prejudicou a embriogênese, além de que inibiu

o crescimento de algas. Deste modo, representam uma ameaça para o meio ambiente e seres humanos.

Os métodos utilizados para tratamento de efluentes da indústria de curtume são, usualmente, biológicos, químicos e/ou a combinação destes (LOFRANO et al., 2013). No tratamento biológico são aplicados microrganismos para decomposição dos compostos inorgânicos inofensivos em processos aeróbios e anaeróbios (SAXENA; CHANDRA; BHARAGAVA, 2017). Contudo, a presença de taninos, sulfetos e a alta salinidade, fatores que influenciam negativamente o crescimento microbiano, podem dificultar a sua eficiência (ANGELUCCI et al., 2017; HASSOUNE et al., 2017). Os taninos podem inativar enzimas extracelulares, formar ligações cruzadas com compostos presentes nas membranas de células microbianas, inibindo seu crescimento e, conseqüentemente, afetando o tratamento biológico (BALAKRISHNAN; SRI BALA; KALYANARAMAN, 2018; GOVINDARAJAN et al., 2016). Essas moléculas também dificultam o tratamento primário dos efluentes pela sua alta solubilidade em água, o que impede a separação por floculação e coagulação (ROMERO-DONDIZ et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

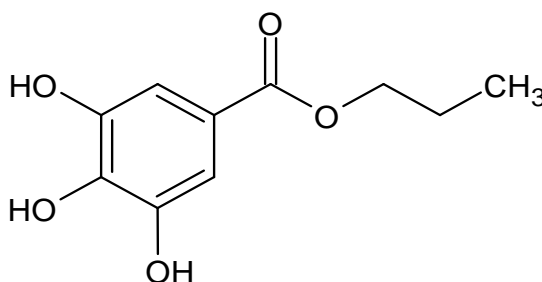
Os métodos já relatados na literatura para o tratamento de efluentes com alto teor de compostos fenólicos são caracterizados pelo longo tempo de aplicação e ineficiência do processo de remoção dos taninos (VASHI; IORHEMEN; TAY, 2018). Deste modo, para superar as dificuldades associadas aos processos de tratamento biológico e químico, metodologias eficientes, limpas e ambientalmente sustentáveis atraem atenção mundial (DIXIT et al., 2015). Uma alternativa viável é o tratamento enzimático. O uso da tanase com este propósito representa uma alternativa efetiva na remoção de polifenóis (AGUILAR et al., 2007). Balakrishnan, Sri Bala e Kalyanaraman (2018) relataram que, para aumentar a eficiência no tratamento biológico das águas residuais produzidas pela indústria do couro, é necessário adicionar uma fase primária de degradação dos taninos, seguida pelo tratamento biológico para a decomposição de outros constituintes. Portanto, a suplementação com tanase pode auxiliar os tratamentos biológicos, minimizar os impactos ambientais causados pela presença excessiva de taninos no meio ambiente e melhorar a degradação biológica de águas residuais.

1.4.4 Produção de ácido gálico e síntese de propil galato

A aplicação mais importante das tanases é na produção de ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzoína) (AG), molécula com atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena e antidiabética (CHOUBEY et al., 2018; ZHANG et al., 2015). Industrialmente, o AG é obtido pela hidrólise ácida de taninos, um processo caracterizado pela geração de efluentes tóxicos, alto custo de produção e baixos rendimentos (DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018). A produção de AG por tanase é realizada por fermentação microbiana pela clivagem das ligações depsídicas e éster presentes nos taninos hidrolisáveis, obtendo-se, deste modo, moléculas de ácido gálico como produto de hidrólise (DHIMAN; MUKHERJEE; SINGH, 2018). Esse processo é caracterizado por ser economicamente viável e pela redução de poluentes prejudiciais ao meio ambiente.

A principal aplicação industrial do AG é no setor farmacêutico para fabricação de analgésicos e produtos antimicrobianos, como trimetropina (composto antibacteriano) (CHOUBEY et al., 2018). Além de atuar como agente intermediário essencial na síntese de propil galato e pirogalol (conservante) (CHÁVEZ GONZÁLEZ et al., 2016; CHOUBEY et al., 2018). O propil galato, ou 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de n-propila (PG), é um éster do ácido gálico (Figura 6) amplamente utilizado como aditivo na indústria de alimentos, principalmente em produtos que contém óleos e gorduras (GÁLICO et al., 2015). Devido sua capacidade antioxidante e baixa toxicidade, o PG é capaz de prevenir ou reduzir as reações de oxidação de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e alimentícios, além de exibir propriedades antimicrobianas (BOUAZIZ et al., 2010).

Figura 6 - Estrutura química do propil galato (PG)



Fonte: Modificado de Zhang et al. (2015).

O PG comercial é produzido tradicionalmente pela reação de condensação do ácido gálico e propanol. Este tipo de reação é caracterizada por maior tempo de processo, temperaturas altas, ambiente altamente corrosivo proporcionado por condições fortemente ácidas, o que acarreta a geração de inúmeros poluentes (NIE et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Por via enzimática, o PG pode ser sintetizado a partir do ácido gálico e n-propanol por reação de esterificação ou transesterificação entre o ácido tânico e n-propanol (SHARMA et al., 2017). Comumente, as enzimas utilizadas neste processo são lipases (BOUAZIZ et al., 2010; SHARMA et al., 2017) e tanases (ZHANG et al., 2015). Por via enzimática utilizando tanase, a síntese de propil galato é realizada por reação de transesterificação. Inicialmente, o ácido tânico é hidrolisado pela ação da tanase obtendo, como produto de hidrólise, ácido gálico, em seguida, na presença de um solvente orgânico, o ácido gálico é esterificado em PG (NIE et al., 2014).

A substituição de catalisadores químicos por enzimáticos oferece vantagens pelo uso de materiais ecológicos, reação em condições amenas de temperatura e pH, baixo consumo de energia e redução de poluentes (TABATABAEI et al., 2019). A biotransformação do ácido tânico ou ácido gálico em PG na presença de tanase fúngica já foi relatada para as enzimas produzidas por *A. phoenicis* (RIUL et al., 2013), *Emericella nidulans* (GONÇALVES et al., 2013b) e *A. fumigatus* CAS21 (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018).

Apesar das diversas aplicações da tanase, há inúmeras limitações para seu uso comercial, como custo da produção e metodologias eficientes para processamento a jusante. No que diz respeito à produção e purificação, inúmeros estudos descrevem diferentes metodologias (ARACRI; CAVALCANTI; GUIMARÃES, 2019; CAVALCANTI et al., 2017; CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018; GONÇALVES et al., 2012; RIUL et al., 2013; VALERA; JORGE; GUIMARÃES, 2015), mas há escassez de relatos com relação à obtenção de enzimas para uso comercial, uma vez que, a manutenção da estabilidade enzimática durante o armazenamento é um dos desafios para sua comercialização. Contudo, metodologias de secagem e imobilização podem ser potencialmente as respostas para essa questão.

1.5 Secagem em *spray dryer*

A água é considerada um contaminante importante nas preparações enzimáticas, uma vez que, a maior parte das degradações químicas (oxidação, hidrólise, corrosão), físicas (agregação ou precipitação) e biológicas (contaminação por microrganismos) ocorre durante o armazenamento em estado líquido (CHÁVEZ GONZÁLEZ et al., 2016). Por outro lado, formulações enzimáticas desidratadas apresentam vantagens, como maior estabilidade, maior prazo de validade para o produto, facilidade no manuseio e transporte, e estocagem à temperatura ambiente (LANGFORD et al., 2018; ZHANG et al., 2018b). Uma das metodologias utilizadas para secagem de enzimas é a técnica de *spray drying*, secagem por atomização, em que produtos líquidos são transformados em pó em uma única etapa (ABDEL-MAGEED et al., 2019; LEE; TAIP; ABDULLA, 2018). De forma resumida, o processo envolve três etapas (LANGFORD et al., 2018; SHISHIR; CHEN, 2017; WATSON; LEA; BETT-GARBER, 2017):

- 1) Atomização da amostra: pulverização da solução através de um dispositivo atomizador, em que gotículas muito finas são formadas e entram instantaneamente em contato com o ar quente na câmara de secagem;
- 2) Secagem das gotículas: na câmara de secagem o ar quente aumenta a temperatura das gotículas e o solvente presente na solução rapidamente evapora, para então, o material sólido presente na gota, formar partículas secas;
- 3) Recuperação do pó: as partículas secas formadas são separadas do ar quente por meio, geralmente, de um ciclone e são recuperadas no frasco coletor.

Esta técnica é amplamente aplicada na indústria química, bioquímica, alimentícia e farmacêutica pela possibilidade de controlar e alterar as propriedades do produto final por meio de modificações nas composições das formulações e pela otimização das variáveis (LANGFORD et al., 2018; LEE; TAIP; ABDULLA, 2018). Inúmeras variáveis influenciam o processo de secagem em *spray dryer*, tais como as características do material a ser seco, como teor de sólidos, viscosidade e tensão superficial, e as características do processo, temperatura de entrada e saída, vazão de alimentação e as configurações do secador (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Essas variáveis devem ser controladas com o objetivo de obter rendimento máximo, teor de umidade e propriedades físico-químicas adequadas para produto seco e,

principalmente, manutenção da atividade biológica após o processo (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Uma das vantagens da secagem em *spray dryer* é a possibilidade de secar diferentes tipos de amostras (solução, emulsão ou suspensão) e, normalmente, os custos do processo são menores do que aqueles associados à maioria dos outros métodos de secagem, como a liofilização (ESTEVINHO, 2013; KESHANI et al., 2015). Trata-se de uma operação contínua, com tempo de processo curto, escalonável, de alta eficiência e aplicável a materiais sensíveis ao calor, como microrganismos, vitaminas e enzimas (KESHANI et al., 2015).

O *spray drying* é um método eficaz, simples e econômico para estabilizar formulações enzimáticas, no qual possibilita a remoção rápida das moléculas de água. Contudo, nas proteínas as moléculas de água são responsáveis por estabilizar sua estrutura secundária por meio da formação de ligações de hidrogênio (CABRAL et al., 2017). Além da remoção da água, o processo é realizado em altas temperaturas, geralmente a uma temperatura de gás de 100 °C, o que pode prejudicar a estabilidade conformacional de algumas moléculas biológicas (ZHANG et al., 2018b). Deste modo, as condições de secagem devem ser adequadas para garantir que a atividade enzimática seja retida tanto quanto possível (SCHUTYSER; PERDANA; BOOM, 2012). Uma das metodologias utilizada para superar esse desafio é a adição de compostos cuja uma das funções é proteger a enzima do estresse térmico (LANGFORD et al., 2018). Esses compostos são denominados de adjuvantes, aditivos ou agentes estabilizadores, e devem garantir a preservação da estrutura secundária da enzima, evitando a desnaturação e perda da sua atividade biológica (COSTA et al., 2015; SCHUTYSER; PERDANA; BOOM, 2012).

As propriedades e características dos adjuvantes influenciam os parâmetros do processo de secagem e as propriedades físico-químicas do produto final (LEE; TAIP; ABDULLA, 2018; LORENZEN; LEE, 2016). Além de atuarem para proteger a molécula de interesse de fatores que possam causar sua deterioração, os adjuvantes são empregados para moldar as propriedades do produto final, como umidade, cor, tamanho e forma das partículas, aparência e textura (GHARSALLAOUI; CHAMBIN, 2007; NATH; SATPATHY, 1998). Adicionalmente, limitam as perdas durante a secagem e aumentam, deste modo, o rendimento do processo (GHARSALLAOUI; CHAMBIN, 2007). Os critérios para a seleção do

adjuvante devem considerar as propriedades físico-químicas, como solubilidade, massa molecular, propriedades emulsificantes e cristalinas, além do custo e da aplicação do produto final (GHARSALLAOUI; CHAMBIN, 2007; LEE; TAIP; ABDULLA, 2018; RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016). Os adjuvantes mais utilizados para secagem de enzimas são, geralmente, carboidratos, gomas, lipídios e proteínas (COSTA et al., 2015; LEE; TAIP; ABDULLA, 2018).

1.5.1 Adjuvantes aplicados na secagem de enzimas

Os amidos e seus derivados, sacarose, celulose e lactose são os carboidratos mais utilizados como adjuvantes nos processos de secagem em *spray dryer* (COSTA et al., 2015). A lactose é um dissacarídeo formado pela combinação dos monossacarídeos glicose e galactose e encontrado naturalmente no leite. Como adjuvante atua formando uma barreira hidrofílica, que protege a molécula de interesse e, adicionalmente, maximiza o rendimento de secagem por evitar perdas do produto durante o processo (GHARSALLAOUI; CHAMBIN, 2007).

O amido é um biopolímero amplamente distribuído na natureza, formado por unidades de glicose associadas por ligações glicosídicas (SHISHIR et al., 2018). Apesar das inúmeras aplicações nos setores industriais, sua eficiência como adjuvante era comprometida devido à alta viscosidade e ausência de grupos hidrofóbicos (COSTA et al., 2015). Portanto, surgiu a necessidade de modificá-lo para estender a aplicabilidade e adicionar algumas propriedades necessárias para utilização como adjuvante (GHARSALLAOUI; CHAMBIN, 2007; SHISHIR et al., 2018). Os amidos modificados comercialmente disponíveis apresentam características superiores, como baixa viscosidade, capacidade emulsificante e maior capacidade estabilizadora, devido, principalmente, a adição de grupos hidrofóbicos (COSTA et al., 2015; HOYOS-LEYVA et al., 2018). A modificação pode ocorrer usando produtos químicos, físicos ou por ação enzimática (HOYOS-LEYVA et al., 2018). O amido modificado Capsul[®], por exemplo, produzido pela *National Starch and Chemical Corporation*, é derivado do milho e usualmente utilizado como adjuvante na secagem de vitaminas, pigmentos e ésteres pela sua alta solubilidade (ROCHA; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2012; SILVA et al., 2013b). O Capsul[®] foi modificado quimicamente pela incorporação de um componente lipofílico

(succinato de octanil), o que proporcionou adição de propriedades emulsificantes e maior estabilidade (ROCHA; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2012).

Além de amidos modificados, são empregados também como adjuvantes em *spray dryer* os amidos hidrolisados como a maltodextrina e a ciclodextrina. A maltodextrina é um carboidrato formado por unidades de D-glicose unidas por uma cadeia α 1-4, obtido pela hidrólise parcial do amido de milho pela ação de enzimas ou ácidos (COSTA et al., 2015; HOYOS-LEYVA et al., 2018). Pode ser encontrada na forma de pó branco e está disponível comercialmente em diferentes equivalentes dextrose (DE), quanto maior o DE menor massa molecular do produto e maior solubilidade (COSTA et al., 2015; LEE; TAIP; ABDULLA, 2018). A maltodextrina é aplicada como adjuvante devido a sua baixa higroscopicidade, alta solubilidade em água, baixa viscosidade e baixo custo (COSTA et al., 2015; HOYOS-LEYVA et al., 2018). Geralmente, são utilizadas para secagem de produtos associados à indústria de alimentos, como sucos, frutas e óleos, e na indústria farmacêutica, para secagem de metabólitos isolados de plantas (GHARSALLAOUI; CHAMBIN, 2007; KESHANI et al., 2015; SHISHIR et al., 2018).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos obtidas pela modificação enzimática do amido devido a ação da enzima ciclodextrina glucanotransferase (HOYOS-LEYVA et al., 2018). Apresentam formato de cone, com uma cavidade interna hidrofóbica e uma superfície hidrofílica (SHISHIR et al., 2018). São compostos atóxicos, reconhecidos como materiais geralmente seguros (GRAS) e estáveis a 100 °C, por isso comumente utilizados como adjuvantes em processos de secagem de diferentes materiais (CHEONG; NYAM, 2016). As CDs são classificadas em três tipos (α , β e γ) de acordo com o número de unidades de glicose que apresentam. A α -ciclodextrina possui seis moléculas de glicose no anel, β -ciclodextrina apresenta sete moléculas de glicose e γ -ciclodextrina, com oito ou mais unidades de glicose (WATSON; LEA; BETT-GARBER, 2017). Nos processos de secagem em *spray dryer* a β -ciclodextrina é a mais utilizada como adjuvante por apresentar maior disponibilidade, menor custo e obtenção de produtos mais estáveis com relação as propriedades biológicas e físico-químicas (CHEONG; NYAM, 2016).

Além de carboidratos, há também os adjuvantes a base de proteínas, que apresentam vantagens pela diversidade da cadeia molecular e das propriedades funcionais, além da alta solubilidade e viscosidade (LEE; TAIP; ABDULLA, 2018).

Geralmente são utilizadas proteínas de origem vegetal ou animal, como caseína, proteínas do soro de leite, gelatinas e colágeno, que já foram descritos na literatura como adjuvantes para secagem de peptídeos e proteínas bioativas (SARABANDI; GHAREHBEGLOU; JAFARI, 2020). As proteínas vegetais são caracterizadas pelo hidrofobicidade, são atóxicas, conferem menor efeito alérgico e custo reduzido comparada as proteínas de origem animal (SHISHIR et al., 2018). Dentre elas, destacam-se as proteínas de soja por apresentar alta capacidade de emulsão e proteção contra oxidação (SHISHIR et al., 2018).

De acordo com a literatura, inúmeras enzimas já foram secas em *spray dryer*, como α -amilases (ABDEL-MAGEED et al., 2019; JESUS; MACIEL FILHO, 2014; OBÓN et al., 2020), lipases (COSTA-SILVA, 2014; TORRES et al., 2016), peptidases (CABRAL et al., 2017; HAMIN NETO et al., 2014), celulases (LIBARDI et al., 2020), β -galactosidases (ESTEVINHO; RAMOS; ROCHA, 2015; LIPIÄINEN et al., 2018), xilanase (GUPTA et al., 2014), álcool desidrogenase (SHIGA et al., 2014), β -frutofuranosidase (GONÇALVES et al., 2013a), fitase (SATO et al., 2014), tripsina (ZHANG et al., 2018b), lisoizima (AMARA et al., 2016) e savinase (TORRES et al., 2016). Entretanto, até o presente momento, não há estudos relativos de tanases fúngicas submetidas ao processo de secagem em *spray dryer*, sendo então este um importante foco de estudo.

1.6 Imobilização enzimática

O emprego das tanases em processos industriais pode ser realizado com a enzima livre ou imobilizada. No entanto, a instabilidade de enzimas livres quando utilizadas em diferentes condições, a desnaturação em altas temperaturas e na presença de solventes, além da impossibilidade de reciclagem, são desafios para sua efetiva aplicação industrial (BILAL; IQBAL, 2019; WU et al., 2016). Por outro lado, a imobilização enzimática proporciona vantagens, como reutilização da enzima por repetidos ciclos de reação, reduzindo os custos de produção, facilidade no manuseio e na separação do produto, e melhoria da estabilidade enzimática (ONG; ANNUAR, 2018; WU et al., 2016).

A imobilização enzimática consiste em confinar, ligar ou reter enzimas em uma determinada matriz/suporte, de modo que, a atividade catalítica seja preservada (OLIVEIRA et al., 2018; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Enzimas

imobilizadas apresentam propriedades aprimoradas com relação à temperatura e pH de reação, estabilidade térmica, tolerância a diferentes faixas de pH, maior desempenho catalítico e estabilidade durante o armazenamento (WONG et al., 2019). As técnicas mais utilizadas para imobilização são, geralmente, adsorção física, ligação iônica, ligação covalente e encapsulação ou aprisionamento.

Além da técnica de imobilização, a escolha do suporte é crucial para preservar a atividade catalítica e aprimorar o desempenho enzimático (WONG et al., 2019). Para selecionar o melhor método e suporte alguns fatores devem ser considerados, tais como o custo do processo e suporte, estabilidade operacional, toxicidade dos reagentes utilizados e as propriedades desejadas do derivado (enzima imobilizada no suporte) (JANA et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Os suportes mais utilizados são polímeros inertes e materiais inorgânicos, os quais devem ser atóxicos, inertes, econômicos, ecologicamente corretos, apresentar resistência térmica e mecânica, além de propriedades antimicrobianas (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Na literatura diferentes suportes foram descritos para imobilização de tanases como, por exemplo, alginato de sódio (LAROSA et al., 2018; LIMA et al., 2018a), nanotubos de carbono (ONG; ANNUAR, 2018), alginato-quitina (JANA et al., 2015), quitina (KUMAR et al., 2015), nanopartículas de quitosana funcionalizadas com Fe_3SO_4 (LI et al., 2018), pérolas de vidro (CHANG et al., 2006), terra de diatomácea magnetizada (LIMA et al., 2018b), nanopartículas de óxido férrico (WU et al., 2016), resinas Eupergit® C 250 L (CRESTINI; LANGE, 2015), DEAE-Sepharose (GONÇALVES et al., 2013b), Dowex 50 e Amberlite (KUMAR et al., 2015).

Na adsorção física as enzimas são imobilizadas reversivelmente nos suportes por interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e/ou ligações de hidrogênio (SOUZA et al., 2016). É considerado um método simples e relativamente barato, no entanto, parâmetros como pH e temperatura podem facilmente enfraquecer as ligações e ocasionar a dessorção da enzima do suporte (ADHIKARI; PRAMANIK, 2019; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Na imobilização por ligação covalente a enzima é imobilizada ao suporte por meio de grupos funcionais presentes na superfície da enzima (SOUZA et al., 2016). Geralmente, as ligações acontecem entre os aminoácidos presentes na sua cadeia lateral, como histidina, ácido aspártico, arginina, entre outros, e os grupos funcionais do suporte (naturais

ou adicionados) (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Os suportes podem ser modificados pela adição de grupos aldeídos, por exemplo, que reagem com as hidroxilas presentes no suporte. Os reagentes mais empregados são o glutaraldeído e o glioxil, que atuam favorecendo a ligação covalente com a enzima (POPPE et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Este método apresenta como vantagens maior rigidez da estrutura enzimática e estabilidade a diferentes condições de reação, como temperatura, pH e presença de solventes. Entretanto, esta ligação pode bloquear o sítio catalítico e promover a perda da atividade enzimática (ADHIKARI; PRAMANIK, 2019). Quando a enzima é imobilizada por ligações iônicas, geralmente, utilizam-se como suportes resinas cromatográficas (ADHIKARI; PRAMANIK, 2019). Apesar dos custos relativamente altos das resinas, este tipo de suporte permite a regeneração após repetidos ciclos de utilização. Portanto, a resina pode ser recuperada, regenerada e, em seguida, utilizada novamente como suporte (BASSO; SERBAN, 2019). Os métodos por adsorção, ligação iônica e covalente possibilitam a ligação externa da enzima ao suporte, o que facilita o acesso do substrato (PAL; KHANUM, 2011).

A metodologia de encapsulação é considerada a mais simples e econômica, por não envolver modificações químicas tanto na enzima como no suporte (LAROSA et al., 2018). Neste método, a enzima é imobilizada dentro de uma rede polimérica e, neste caso, a imobilização deve garantir que a biomolécula permaneça retida, assim como a livre difusão do substrato e dos produtos (ADHIKARI; PRAMANIK, 2019). Esta técnica permite aumento da estabilidade mecânica da enzima, mas pode ocorrer diminuição ou perda da atividade enzimática devido à formação de uma barreira que impede a difusão do substrato na rede polimérica (WONG et al., 2019). O alginato é um dos suportes mais utilizados neste tipo de imobilização. Trata-se de um copolímero linear composto por ácidos α -L-gulurônicos (G) e β -D-manurônico (M) com ligações 1-4, derivado da parede celular de algas marinhas marrons (AHARWAR; PARIHAR, 2021; LAROSA et al., 2018). O alginato é utilizado, principalmente, nas áreas farmacêutica, alimentar, cosmética e médica pela sua propriedade gelificante. Sua capacidade de formar géis depende da proporção de M/G e das ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. As propriedades gelificantes são baseadas em interações com íons multivalentes (OLIVEIRA et al., 2018). Ocasionalmente, suas cadeias poliméricas são reticuladas com Ca^{2+} , no

entanto, íons de metais de transição bivalentes, como Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} também podem formar ligações fortes com o biopolímero (BRUS et al., 2017).

1.7 Aplicação de enzimas imobilizadas em reatores

A imobilização permite o emprego das enzimas em processos industriais utilizando reatores enzimáticos de diferentes configurações, como os reatores de leito fixo (PBR) (DAL MAGRO et al., 2020). Neste tipo de reator a enzima é mantida no interior do reator em um sistema de leito fixo enquanto o fluxo de substrato é constante (KUMAR et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). O PBR basicamente consiste de uma coluna cilíndrica empacotada com o derivado (enzima imobilizada no suporte). Neste sistema o substrato é bombeado ao longo da coluna em fluxo ascendente ou descendente, empregando uma vazão específica que determinará o tempo de reação (residência), de acordo com o volume da coluna (OLIVEIRA et al., 2018; POPPE et al., 2015). Este tipo de reator é o mais utilizado nas indústrias alimentícia e química pela facilidade de operação, ampliação de escala, por permitir maior produtividade ao longo do tempo e por proporcionar maior estabilidade para a enzima (BASSO; SERBAN, 2019). Destaca-se ainda que os PBR são compatíveis com condições de temperaturas e pressões mais altas, portanto, adequados para reação de transesterificação. Também são considerados sistemas simples e de baixo custo, que geram altos rendimentos e podem ser empregados em processos semi-contínuos ou descontínuos (TABATABAEI et al., 2019). Adicionalmente, promovem menores danos aos biocatalisadores quando comparados aos reatores de leito fluidizado, por reduzir a tensão de cisalhamento, evitando a ruptura, desgaste ou quebra do derivado (DAL MAGRO et al., 2020). No entanto, há maior possibilidade de reações colaterais, baixa transferência de calor, dificuldade de distribuição de fluxo regular durante o processo, surgimento de caminhos preferenciais, instabilidade na pressão e dificuldades de manutenção (TABATABAEI et al., 2019). Com a finalidade de minimizar problemas de entupimento e queda de pressão, deve-se considerar o diâmetro dos biocatalisadores, visto que partículas pequenas podem entupir o reator, bloquear o fluxo de alimentação e promover queda de pressão (POPPE et al., 2015).

Os reatores tipo PBR podem ser operados com sistemas de recirculação (CBPBR), que permite melhores condições de misturas, além de maximizar a conversão de substrato em produto (POPPE et al., 2015). Para cumprir sua função, o desempenho dos reatores enzimáticos depende do controle de parâmetros operacionais, como temperatura e pH, retenção da atividade da enzima durante seu funcionamento e a ausência de limitação de transferência de massa (ILLANES; ALTAMIRANO, 2008).

O PBR foi relatado na literatura para diferentes aplicações industriais. Lipases imobilizadas são comumente utilizadas em PBR para reações de transesterificação (POPPE et al., 2015; TABATABAEI et al., 2019). Bilal et al. (2017) descreveram a aplicação de peroxidase imobilizada em agarose para tratamento de efluentes da indústria têxtil em PBR. Um coquetel enzimático a base de enzimas pectinolíticas e celulolíticas imobilizadas em quitosanas foram aplicadas em PBR para clarificação de suco de laranja (DAL MAGRO et al., 2020). Oliveira et al. (2018) relataram o uso de pectinase imobilizada em alginato para clarificação de sucos de maçã e umbu em PBR. No entanto, apesar das inúmeras aplicações e vantagens, atualmente, não há estudos descritos na literatura voltados para o emprego de tanases imobilizadas aplicadas nesses reatores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabilizar as tanases de diferentes fontes fúngicas por meio de metodologias de secagem em *spray dryer* e de imobilização enzimática, com foco no potencial de aplicação nas indústrias alimentícias, especificamente no setor de bebidas, síntese de propil galato, tratamento de efluentes e ração animal.

2.2 Objetivos específicos

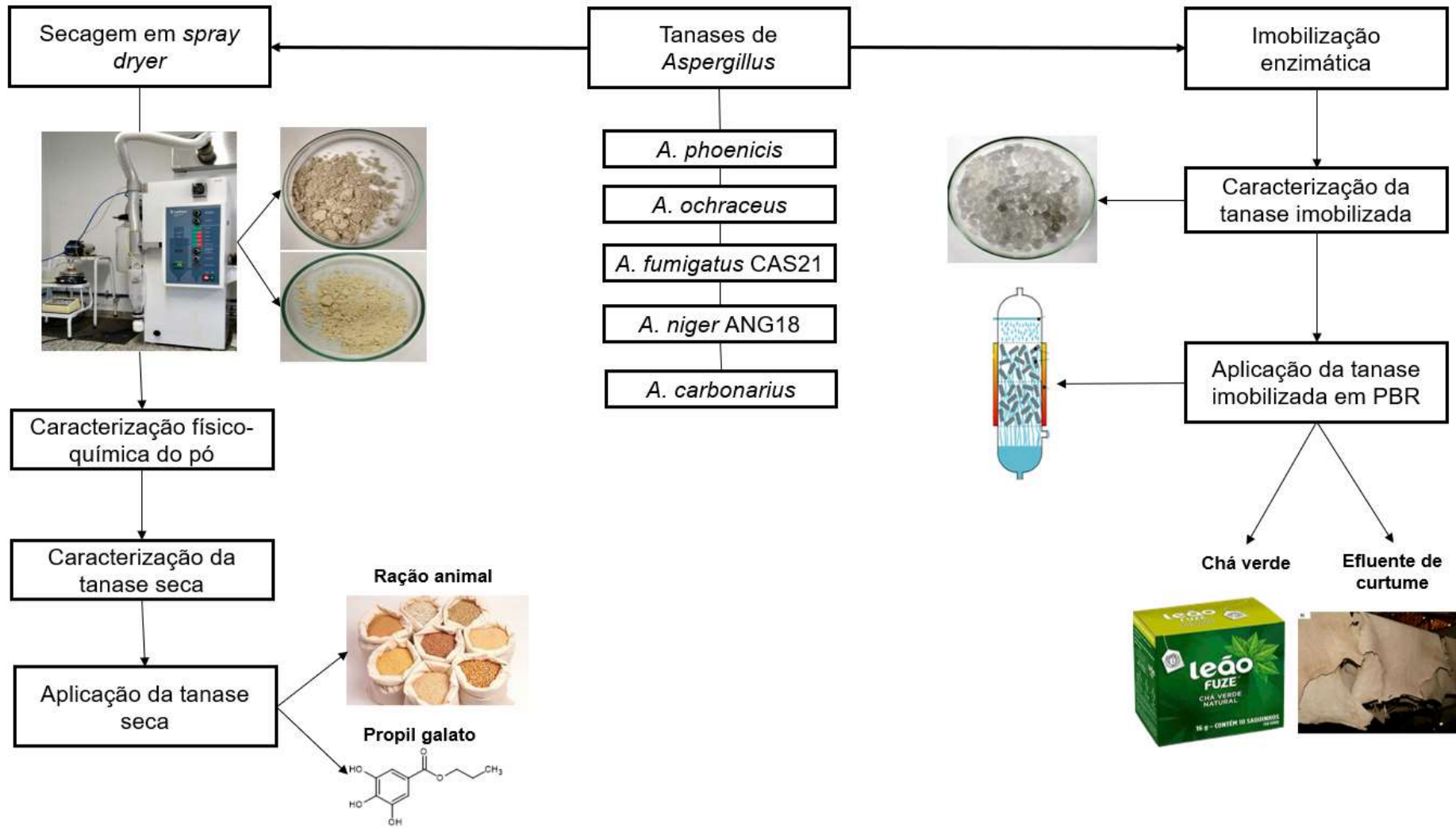
- Secar as tanases produzidas por *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius* no equipamento *spray dryer* empregando diferentes adjuvantes;
- Determinar as propriedades físico-químicas dos produtos secos obtidos;
- Avaliar a manutenção da atividade da tanase contida nos produtos secos frente a diferentes condições;
- Analisar a estabilidade ao armazenamento dos produtos secos;
- Aplicar o produto seco contendo tanase em ração animal e na síntese de propil galato;
- Imobilizar as tanases produzidas por *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius* empregando diferentes métodos e suportes;
- Selecionar o melhor suporte/matriz para imobilização e caracterizar a atividade tanásica da enzima imobilizada;
- Aplicar a tanase imobilizada em reator enzimático tipo leito fixo no tratamento de chá verde e do efluente da indústria de curtume.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (FFCLRP – USP) em Ribeirão Preto/SP, no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas do Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

A Figura 7 descreve simplificada os procedimentos realizados na presente pesquisa.

Figura 7 - Esquema simplificado dos experimentos realizados na presente pesquisa



Fonte: Autora (2021).

3.1 Microrganismos

Os fungos filamentosos *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius*, caracterizados previamente como produtores de tanases (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018; CAVALCANTI et al., 2017; GONÇALVES et al., 2012; RIUL et al., 2013; VALERA; JORGE; GUIMARÃES, 2015), foram empregados neste estudo. Os microrganismos estão depositados na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Novas culturas das espécies de *Aspergillus* foram obtidas em tubos de ensaio com meio BDA comercial (Acumedia®) inclinado e, posteriormente, conservados a 4 °C. Repiques periódicos foram realizados a cada 30 dias. Os microrganismos também foram preservados pelo método *Castellani*, que consiste em colônias fúngicas, crescidas em meio de cultura BDA, depositadas em tubos cônicos (Eppendorf®) contendo 1 mL de água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939).

3.2 Produção e obtenção de tanase extracelular

Os fungos *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18, *A. phoenicis*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius* foram cultivados de acordo com as condições ótimas descritas na literatura (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018; CAVALCANTI et al., 2017; GONÇALVES et al., 2012; RIUL et al., 2013; VALERA; JORGE; GUIMARÃES, 2015). Todos os meios de cultura² foram previamente autoclavados a 121 °C por 20 min e o ácido tânico esterilizado separadamente por microfiltração (0,22 µm).

Os cultivos obtidos da FSbm foram filtrados a vácuo em funil Büchner, com papel de filtro Whatman nº 1, obtendo-se o caldo de cultura livre de células, denominado de filtrado extracelular. Na FES, após o período de incubação, os cultivos foram adicionados de 50 mL de água destilada gelada e submetidos à agitação de 140 rpm por 20 min a 4 °C. Em seguida, foram filtrados a vácuo utilizando gaze e posteriormente papel de filtro Whatman nº1. Os filtrados foram

² A composição dos meios de cultivos está descrita detalhadamente nos Anexos.

dialisados contra 4 L de água destilada por 24 horas a 4 °C e, então, empregados para determinação da atividade enzimática.

3.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica como descrito por Sharma, Bhat e Dawra (2000), utilizando metil galato (0,2% m/v) como substrato em tampão acetato de sódio (100 mmol L⁻¹, pH 5,0). O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de ácido gálico (0 a 0,1 mg mL⁻¹). A reação foi composta por 250 µL do substrato e 250 µL da amostra enzimática, e conduzida em diferentes temperaturas, de acordo com o definido previamente para cada enzima (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018; CAVALCANTI et al., 2017; GONÇALVES et al., 2012; RIUL et al., 2013; VALERA; JORGE; GUIMARÃES, 2015). A reação enzimática foi parada pela adição de 300 µL de rodanina metanólica 0,667% (m/v). Após 5 min, 200 µL de hidróxido de potássio (0,5 mol L⁻¹) foram adicionados para formação de um cromatógeno de coloração violeta. O volume obtido foi adicionado de 4 mL de água destilada. Após 10 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 520 nm. A unidade de atividade tanásica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido gálico por min nas condições de ensaio.

3.4 Secagem em *spray dryer*

Os experimentos de secagem foram realizados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, coordenado pelo professor Dr. Wanderley Pereira Oliveira.

Os filtrados dialisados obtidos dos cultivos das espécies de *Aspergillus* foram submetidos à secagem utilizando o equipamento *Spray Dryer* SD 05 - (Lab-Plant UK Ltd, Huddersfield, UK), com câmara de secagem de 215 mm de diâmetro e 500 mm de altura, operando com fluxo co-corrente. Para a proteção da amostra enzimática foram adicionados aos filtrados os adjuvantes (10% m/v) β-ciclodextrina,

amido modificado Capsul[®], farinha de soja (<106 µm), lactose e maltodextrina. As formulações foram submetidas à agitação por 2 horas, em seguida, armazenadas *overnight* por 15 horas a 4 °C.

As condições experimentais para secagem foram fixadas em: W_g (vazão do ar de secagem) 60 m³/h, W_{susp} (vazão de alimentação da amostra) 4 g/min, P_{atm} (pressão de atomização) 1,5 kgf/ cm², W_{atm} (vazão de atomização) 17 lpm e diâmetro do bico atomizador de 1 mm. A temperatura de entrada do ar foi padronizada em 100 °C e a temperatura de saída do ar variou entre 55,25 °C e 60 °C. O processo teve início com a alimentação e aquecimento do gás de secagem e, após estabilização do equipamento, foi iniciada a alimentação da formulação enzimática sob agitação constante. A temperatura de saída do gás (T_{gs}) foi monitorada a cada 5 min para verificar a estabilidade do processo. O produto seco foi retirado aproximadamente 17 min após o início da secagem e analisadas as propriedades físico-químicas (atividade de água, umidade do pó e diâmetro da partícula) e atividade enzimática.

3.4.1 Determinação do teor de sólidos

O teor de sólidos para as formulações enzimáticas adicionadas dos adjuvantes foi determinado pelo método de gravimetria utilizando a balança com sistema de aquecimento por resistência (Sartorius - MA 35). O experimento foi realizado em placas de alumínio onde foi depositado 1 mL da formulação e submetida ao aquecimento a 100 °C. O teor de sólidos foi detectado após atingir massa constante e o resultado expresso em percentual.

Para o filtrado dialisado, o teor de sólidos (C_s) foi determinado por gravimetria pelo método de estufa, que consiste em pesar uma placa de Petri vazia e depois pesar a mesma placa com o filtrado dialisado. A placa com a amostra foi mantida na estufa a 100 °C até atingir massa constante e o teor de sólidos foi calculado pela porcentagem de massa constante restante (Equação 1):

$$C_s = \frac{\text{Massa seca}}{\text{Massa total adicionada}}$$

Equação 1

3.4.2 Determinação da atividade enzimática do produto seco contendo tanase

O teor de sólidos do filtrado dialisado foi reconstituído para determinar a atividade do produto seco contendo tanase. A enzima foi mantida em tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 5,0), seguida por agitação suave em agitador vortex e mantida em banho de gelo. A atividade enzimática foi quantificada como descrito no item 3.3 e os resultados expressos em atividade relativa (%), considerando como 100% a atividade enzimática do filtrado dialisado submetido ao processo de secagem.

3.4.3 Atividade de água e umidade do pó

A atividade de água foi determinada no analisador de água Aqua Lab 4TEV (Decagon – Devices Inc Pullman, WA), a temperatura de 25 °C, utilizando o sensor de ponto de orvalho.

A umidade residual foi determinada por titulação Karl Fischer no equipamento Titrino plus 870 (Metrohm Ltd., Herisau, Suíça). Os testes foram realizados em duplicata e o resultado foi expresso em média e erro padrão.

3.4.4 Tamanho das partículas

O contador de bancada digital (BIO-RAD TC20™) foi utilizado para medir os tamanhos das partículas dos produtos secos obtidos por *spray drying*. Os pós foram dissolvidos em tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 5,0) e agitados em agitador vortex. Em seguida, 10 µL foram aplicados na câmara de contagem. A distribuição de partículas foi determinada pela relação entre o número de partículas e o diâmetro (µm).

3.4.5 Análise de partículas secas por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier

A análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para identificar os principais grupos estruturais presentes na molécula da tanase em meio aquoso (solúvel) e mantidos após secagem em *spray dryer*. Os espectros foram obtidos usando espectrômetro de infravermelho Bruker Vertex 70 com reflexão total atenuada (ATR), utilizando o *software* OPUS 7,5, resolução de 4 cm⁻¹, tempo de 64 varreduras e comprimento de onda de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuários de Análise Química do Instituto de Química de Araraquara (UNESP) e os dados analisados no *software* OriginPro 8.

3.4.6 Recuperação do produto

A taxa de recuperação do produto (R%) ou rendimento do processo foi calculada pelo percentual entre a massa de pó coletada e a massa de sólidos alimentada no equipamento, de acordo com a Equação 2 (SOUZA; OLIVEIRA, 2006).

$$R (\%) = \frac{M_c(1-X_p)}{W_s C_s \Theta} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que: M_c = Massa coletada (g); X_p = Umidade do produto; W_s = Vazão de suspensão alimentada (g/min); C_s = Concentração de sólidos totais (g/g); Θ = Tempo de processo (min).

3.4.7 Caracterização da atividade enzimática das tanases secas em *spray dryer*

3.4.7.1 *Efeito da temperatura e estabilidade térmica*

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade enzimática da tanase solúvel e seca as reações enzimáticas foram conduzidas nas temperaturas entre 30 °C e 80 °C. A atividade máxima foi considerada 100% e usada como referência.

A estabilidade térmica foi determinada nas temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C por até 120 min. A cada intervalo de tempo alíquotas foram retiradas, mantidas em banho de gelo e, em seguida, ensaiadas para atividade tanásica. A atividade enzimática no tempo 0 foi expressa como 100%.

3.4.7.2 *Efeito do pH e estabilidade ao pH*

O efeito do pH na atividade enzimática da tanase solúvel e seca foi determinado nas faixas entre 3,0 e 7,0, utilizando tampão ácido cítrico 100 mmol L⁻¹ (pH 3,0 e 4,0), tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹ (pH 5,0 e 6,0) e tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ (pH 7,0). A atividade máxima foi considerada 100% e usada como referência.

A estabilidade ao pH foi realizada incubando a enzima solúvel e seca no tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ no pH 5,0 e 6,0, em banho de gelo. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e a atividade enzimática foi determinada. A atividade enzimática no tempo 0 foi expressa como 100%.

3.4.7.3 *Influência de solventes orgânicos e estabilidade*

Os solventes orgânicos (1% v/v) acetona, acetonitrila, metanol, etanol, isopropanol e butanol foram adicionados na reação enzimática para analisar suas influências na atividade tanásica dos produtos secos e da enzima contida no filtrado dialisado. A estabilidade enzimática foi analisada incubando-se a enzima nos solventes orgânicos mencionados por 120 min, em seguida, a atividade enzimática foi determinada. A atividade no tempo 0 foi expressa como 100%.

3.4.8 Estabilidade ao armazenamento após 1 ano

Os produtos secos em *spray dryer* e as amostras líquidas foram armazenados a 4 °C e 28 °C por 1 ano para investigar a estabilidade da atividade enzimática ao armazenamento. As amostras armazenadas a 28 °C foram mantidas em caixa preta, vedadas, afim de evitar o contato com a luz. Na geladeira a 4 °C, as amostras permaneceram em frascos brancos, vedados, fora do alcance da luz. As atividades enzimáticas determinadas imediatamente após o processo de secagem foram consideradas como 100%.

3.4.9 Aplicação dos produtos secos contendo tanase

3.4.9.1 *Síntese de propil galato por tanase*

O pó contendo tanase foi aplicado para síntese de propil galato a partir da transesterificação do ácido tânico na presença de 1-propanol. A reação foi composta por 250 µL de ácido tânico (5 mmol L⁻¹), previamente preparado em tampão MES (100 mmol L⁻¹ pH 6,0), 250 µL de 1-propanol e 0,04 g de tanase seca. Os tubos foram levemente agitados e, posteriormente, incubados em banho maria a 30 °C por 96 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 2800 x g e o sobrenadante foi utilizado para detectar a presença de PG por cromatografia de camada delgada (CCD) e Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), como descrito no item 3.4.5 O propil galato (Sigma®) foi utilizado como padrão para comparação dos grupos estruturais.

3.4.9.1.1 Cromatografia de Camada Delgada

Para analisar qualitativamente a hidrólise do ácido tânico em ácido gálico e a síntese de propil galato, as amostras foram aplicadas em CCD, seguindo metodologia descrita por Mahendran, Raman e Kim (2006). Como fase móvel foi utilizada solução de benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (18:15:1, v/v/v). Após a corrida, o ácido tânico residual, o propil galato e o ácido gálico formados foram

revelados com FeCl₃ 1% (m/v). Como padrões foram utilizados ácido tânico (AT) (1 mmol L⁻¹), ácido gálico (AG) (10 mmol L⁻¹) e propil galato (PG) (10 mmol L⁻¹) preparados em tampão MES (100 mmol L⁻¹ pH 6,0).

3.4.9.2 *Tratamento enzimático da ração animal*

Três tipos diferentes de rações (sorgo, ração de peixe e bagaço de uva) foram submetidos ao tratamento enzimático com tanase seca. Os grãos de sorgo foram adquiridos no município de Boqueirão, estado da Paraíba (Brasil), lavados intensivamente com água corrente, secos a 60 °C por 24 horas e triturados em liquidificador para obtenção da farinha de sorgo. A ração de peixe Alcon Basic® e as uvas Thompson foram adquiridas no comércio local em Ribeirão Preto (SP-Brasil). A Tabela 1 apresenta a composição da ração de peixe. As uvas foram lavadas com água corrente, a casca foi removida manualmente e, em seguida, as frutas foram batidas em liquidificador. O suco foi filtrado em filtro de pano e os resíduos sólidos, assim como as cascas, foram denominados de bagaço de uva. Após este procedimento, o bagaço de uva foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas.

Tabela 1 - Tabela nutricional da ração de peixe Alcon® Basic

Composição	(%)
Corantes naturais	1,54
Proteína isolada de soja	-
Premix vitamínico mineral ¹	0,85
Premix mineral ²	0,10
Aditivo prebiótico	0,09
Antioxidantes	-
Aditivo enzimático ³	0,50

¹ Vitamina A, D3, K3, B1, B2, B6, B12, Niacina, Pantotenato de cálcio, Biotina, Ácido fólico, Colina, Ferro, Cobre, Zinco, Manganês, Selênio, Iodo, Metionina e Vitamina C; ² Cálcio, Fósforo; ³ Protease, Amilase e Celulase.

Fonte: Alcon® Basic.

3.4.9.2.1 Extração de taninos e compostos fenólicos com solventes orgânicos

Para extração dos taninos e compostos fenólicos presentes na ração de peixe, no sorgo e no bagaço de uva, foram utilizados os seguintes solventes: acetona/água (70% v/v), metanol/água (70% v/v) e etanol/água (70% v/v),

separadamente. A extração foi realizada adicionando 10 mL de solvente para cada 200 mg de ração, a 200 rpm, 25 °C por 2 horas. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 1320 x g por 15 min a 5 °C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para quantificação do teor de taninos e compostos fenólicos totais como descrito no item 3.4.9.2.2.1.

3.4.9.2.2 Aplicação dos produtos secos contendo tanase nas rações

Em frascos Erlenmeyers de 25 mL foram adicionados 1 g de ração animal, pulverizado 0,1 g de tanase seca e 1 mL de água destilada. O tratamento foi conduzido por 120 horas a 30 °C, seguindo a metodologia descrita por Schons, Battestin e Macedo (2012). Como controle foi utilizada a ração adicionada de 1 mL de água destilada. Os controles e as rações suplementadas com tanase foram analisados considerando o conteúdo de taninos e compostos fenólicos totais.

3.4.9.2.2.1 Quantificação do teor de taninos e compostos fenólicos totais

O teor de taninos foi determinado pelo método de precipitação de proteínas, previamente padronizado por curva analítica de ácido tânico (0-0,2 mg mL⁻¹) (HAGERMAN; BUTLER, 1978). A reação foi composta por 500 µL da amostra adicionados de 1 mL de solução de BSA, preparada em tampão acetato de sódio (0,2 mol L⁻¹ pH 5,0), e mantidas por 15 min à temperatura ambiente. Após centrifugação a 5000 x g durante 15 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi dissolvido em 750 µL de SDS (1% m/v). Em seguida, foram adicionados aos tubos 1,5 mL de solução de SDS-trietanolamina (1% SDS (m/v) e 7% (v/v) trietanolamina) e 500 µL de FeCl₃ (0,01 mol L⁻¹ em 0,1 mol L⁻¹ de HCl). Após repouso por 20 min à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 510 nm em espectrofotômetro.

Os compostos fenólicos foram determinados seguindo metodologia de Rao et al. (2018). O método foi previamente padronizado por curva analítica de ácido gálico (0-0,2 mg mL⁻¹). A reação foi composta por 125 µL da amostra, 125 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 500 µL de água destilada. Após 6 min de incubação no escuro, em temperatura ambiente, foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio

(7% m/v) e 1 mL de água destilada. Após 90 min de incubação no escuro, a temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 725 nm em espectrofotômetro.

3.5 Imobilização enzimática

3.5.1 Purificação parcial em membrana de ultrafiltração

As tanases produzidas por *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius* foram obtidas como descrito no item 3.2. Os filtrados dialisados foram aplicados em membrana Millipore com *cutoff* de 50 kDa e submetido a centrifugação a 2800 x *g* a 4 °C por 15 min. A tanase retida no permeado foi empregada para imobilização enzimática.

3.5.2 Imobilização das tanases de *Aspergillus*

As tanases parcialmente purificadas foram imobilizadas empregando os métodos de encapsulação (alginato de sódio), ligação covalente (Amberlite IR 140, alginato de sódio e pérolas de vidro) e iônica (DEAE-Sephadex A25). O processo de imobilização foi monitorado pela atividade enzimática e concentração de proteínas no sobrenadante.

3.5.2.1 Encapsulação em alginato de sódio reticulado com CaCl_2 e MnCl_2

A solução de alginato de sódio 4% (m/v) foi preparada em água destilada e agitada por 4 horas a 28 °C. Em seguida, a solução foi misturada com amostra enzimática para obter uma concentração final de 3% de alginato, e suavemente agitada por 15 min a 4 °C. A suspensão foi gotejada, com auxílio de uma seringa, na solução de CaCl_2 (0,1 mol L⁻¹), previamente preparada em água destilada gelada, de acordo com metodologia descrita por Lima et al. (2018a), com modificações. As esferas formadas foram mantidas em agitação suave na solução de CaCl_2 por 20 min a 4 °C, em seguida, foram separadas por peneiramento e lavadas

intensivamente com tampão acetato de sódio (100 mmol L⁻¹ pH 5,0). O mesmo procedimento foi realizado substituindo CaCl₂ (Ca-alginato) por MnCl₂ (0,1 mol L⁻¹) (Mn-alginato). As esferas foram armazenadas em tampão acetato de sódio (100 mmol L⁻¹ pH 5,0) a 4 °C e, em seguida, utilizadas para quantificação da atividade enzimática. Esferas de alginato de sódio 3% (m/v) reticulado com CaCl₂ e MnCl₂ sem adição da solução enzimática foram utilizadas como controle.

3.5.2.2 *Ligação covalente*

3.5.2.2.1 Alginato ativado com glutaraldeído

Cápsulas de alginato ativadas com glutaraldeído (GA) foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Pal e Khanum (2011), com modificação. A solução de alginato de sódio 3% (m/v) foi preparada como descrito no item anterior (item 3.5.2.1), sem adição da enzima. A solução foi gotejada, com auxílio de uma seringa, em CaCl₂ (0,1 mol L⁻¹), previamente preparado em água destilada gelada. As esferas foram mantidas por 20 min em CaCl₂ a 4 °C sob agitação constante, em seguida, foram recuperadas por peneiramento e ativadas em glutaraldeído 9% (v/v), previamente preparado em tampão acetato de sódio (10 mmol L⁻¹ pH 5,0), na proporção 1:1 (m/v), por 2 horas. As esferas ativadas foram lavadas com tampão acetato de sódio e adicionadas de 10 mL de amostra enzimática, a mistura foi mantida sob agitação suave por 120 min a 4 °C. Posteriormente, os derivados foram recuperados por peneiramento, lavados com tampão acetato de sódio para remover a enzima não ligada e armazenados em tampão acetato de sódio (100 mmol L⁻¹ pH 5,0) a 4 °C. O alginato de sódio ativado com glutaraldeído (GA- alginato) sem adição da enzima foi utilizado como controle.

3.5.2.2.2 Amberlite ativada com glutaraldeído

O suporte Amberlite IR 140 ativado com glutaraldeído (GA) foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Kumari e Kayastha (2011), com modificação. Um grama de esfera de Amberlite IR 140 foi equilibrada em 4 mL de tampão acetato

de sódio (10 mmol L^{-1} pH 4,0) sob agitação em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, o tampão acetato de sódio foi removido e as esferas foram ativadas com 2 mL de glutaraldeído a 2,5% (v/v) por 2 horas, sob agitação. Para imobilização enzimática a solução de glutaraldeído foi removida por filtração a vácuo, as esferas foram lavadas intensivamente com tampão acetato de sódio (10 mmol L^{-1} pH 4,0) e 10 mL de amostra enzimática foram adicionados. A suspensão foi mantida em agitação suave por 16 horas, a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após este período, o derivado foi recuperado por filtração a vácuo, lavado 2 vezes com tampão acetato de sódio (10 mmol L^{-1} pH 4,0) para remover as proteínas não ligadas e, então, armazenado no mesmo tampão a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Como controle, adotou-se as esferas de Amberlite ativadas com glutaraldeído na ausência da enzima.

3.5.2.2.3 Pérolas de vidro ativadas com glutaraldeído

A tanase foi imobilizada em pérolas de vidro ativadas com glutaraldeído seguindo a metodologia descrita por Chang et al. (2006), com modificações. Inicialmente, pérolas de vidro (5 g) foram ativadas em 4 mL de glutaraldeído 9% (v/v) (GA), previamente preparado em tampão acetato de sódio (10 mmol L^{-1} pH 5,0). A suspensão foi mantida sob agitação por 2 horas em temperatura ambiente, em seguida, o suporte foi filtrado a vácuo para remover o glutaraldeído e lavado intensivamente com tampão acetato de sódio (10 mmol L^{-1} pH 5,0). Para imobilização, 10 mL de amostra enzimática foram mantidos em contato com o suporte, sob agitação por 16 horas, a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, o derivado foi recuperado por filtração a vácuo e lavados com tampão acetato de sódio (10 mmol L^{-1} pH 5,0) para remoção das proteínas não ligadas. Pérolas de vidro ativadas com glutaraldeído na ausência de enzima foram utilizadas como controle.

3.5.2.3 Ligação iônica em resina DEAE-Sephadex A25

A imobilização em DEAE-Sephadex A25 foi realizada seguindo a metodologia de Gonçalves et al. (2013b), com alterações. Um grama de resina DEAE-Sephadex A25 foi equilibrada em 20 mL de tampão acetato de sódio (10

mmol L⁻¹ pH 5,0) por 2 horas, sob agitação, a temperatura ambiente. Após este procedimento, a suspensão foi mantida em repouso para decantar a resina e, em seguida, 15 mL do tampão foram removidos. Para o processo de imobilização, 10 mL de solução enzimática foram adicionados na resina equilibrada e a suspensão foi mantida em agitação por 16 horas, a 4 °C. Em seguida, o derivado foi recuperado por filtração a vácuo, lavado 3 vezes com tampão acetato de sódio (10 mmol L⁻¹ pH 5,0) para remover as proteínas não ligadas e armazenado a 4 °C no mesmo tampão. A DEAE-Sephadex A25, previamente equilibrada, foi utilizada como controle.

3.5.3 Determinação do rendimento, eficiência e atividade recuperada após imobilização

O rendimento da imobilização (R%) foi calculado pela relação entre a atividade inicialmente oferecida e a atividade enzimática do sobrenadante, de acordo com a Equação 3:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que: *A* corresponde à atividade enzimática da tanase livre e *B* à atividade do sobrenadante após imobilização.

A eficiência do processo de imobilização foi calculada por meio da quantificação de proteínas do sobrenadante, após o processo de imobilização, e da concentração de proteínas oferecida (Equação 4).

$$PI (\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que: *P₀* é concentração de proteína no tempo inicial da imobilização, *P_f* é a concentração de proteína no sobrenadante após imobilização.

A atividade recuperada foi calculada considerando a atividade enzimática dos derivados (CARAVANTE, 2014), de acordo a Equação 5:

$$\text{Atividade recuperada} = \frac{\text{Atividade do derivado}}{U_{esperado}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que: *U_{esperado}* foi determinado conforme Equação 6.

$$U \text{ esperado} = \frac{A \times \text{Volume da enzima usado na imobilização}}{\text{Massa do derivado}} \times R \quad \text{Equação 6}$$

Em que: *A* corresponde à atividade enzimática da tanase livre e *R* ao rendimento do processo de imobilização na escala de 0-1.

3.5.4 Determinação da atividade enzimática da tanase imobilizada

Para tanase imobilizada, a reação foi composta por 2 mL de metil galato (0,2% m/v), como substrato, adicionados do derivado (1 g para enzima imobilizada em alginato de sódio e pérolas de vidro; 0,5 g do derivado Amberlite; 0,1 g do derivado DEAE-Sephadex A25). Após 5 min de reação, alíquotas de 500 µL foram transferidos para tubos reacionais e 300 µL de rodanina metanólica 0,667% (m/v) foram adicionados, conforme protocolo citado no item 3.3.

A atividade enzimática dos derivados foi calculada de acordo com a Equação 7 e expressa em U por grama de derivado.

$$U \text{ g}^{-1} = \frac{\text{Absorbância} \times \text{volume da reação (mL)}}{\varepsilon \times \text{tempo (min)} \times \text{massa do derivado (g)}} \quad \text{Equação 7}$$

3.5.5 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (0-0,1 mg mL⁻¹), e expressa como mg de proteína por mL de amostra.

3.5.6 Caracterização da atividade enzimática da tanase imobilizada

3.5.6.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica

O efeito da temperatura na atividade enzimática da tanase livre e imobilizada foi determinado conduzindo as reações enzimáticas nas temperaturas de 30 °C a 80 °C. A maior atividade foi considerada como 100% e usada como referência.

A estabilidade térmica foi realizada incubando a tanase livre e imobilizada, em solução aquosa, nas temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C por um período de 24 horas. A cada intervalo de tempo alíquotas foram retiradas, mantidas em banho de gelo e, em seguida, ensaiadas para atividade tanásica. A atividade enzimática no tempo 0 foi considerada como 100%.

3.5.6.2 *Efeito do pH na atividade tanásica e estabilidade ao pH*

O efeito do pH na atividade enzimática da tanase livre e imobilizada foi determinado nas faixas entre 3,0 e 8,0, utilizando tampão ácido cítrico 100 mmol L⁻¹ (pH 3,0 e 4,0), tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹ (pH 5,0 e 6,0), tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ (pH 7,0) e glicina 100 mmol L⁻¹ (pH 8,0). A maior atividade foi considerada 100% e usada como referência.

A estabilidade ao pH foi realizada incubando a tanase livre e imobilizada no pH 4,0, 5,0, 6,0 e pH 7,0, de acordo com as soluções tampões mencionadas acima, e mantidas em banho de gelo por 24 horas. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e a atividade enzimática foi determinada. A atividade enzimática no tempo 0 foi considerada como 100%.

3.5.6.3 *Ciclos de reutilização da tanase imobilizada*

A viabilidade da reutilização da tanase imobilizada em alginato de sódio foi analisada durante uma sequência de 10 ciclos consecutivos. A reação enzimática foi conduzida utilizando o derivado e 0,2% (m/v) de metil galato, como substrato, por 5 min nas condições ótimas de temperatura e pH. Após cada ciclo, o derivado foi recuperado por peneiramento, lavado com tampão acetato de sódio (10 mmol L⁻¹ pH 5,0) e utilizado no ciclo seguinte. A atividade enzimática do 1º ciclo foi definida como 100%.

3.5.7 Estabilidade ao armazenamento

Para avaliar a estabilidade ao armazenamento o derivado Ca-alginato, mantido em tampão acetato de sódio (100 mmol L⁻¹ pH 5,0), foi armazenado a 4 °C por 9 meses, e em seguida, a atividade enzimática foi determinada. Os resultados foram expressos em atividade relativa, considerando como 100% a atividade enzimática logo após o processo de imobilização.

3.6 Aplicações da tanase imobilizada em reator de leito fixo

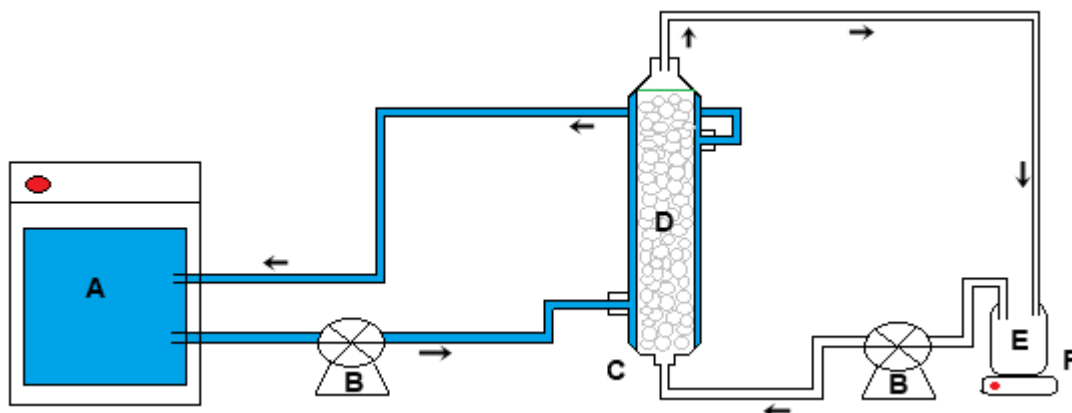
3.6.1 Reator de leito fixo

O derivado alginato de sódio contendo tanase de *A. fumigatus* CAS21 foi aplicado em reator de leito fixo para hidrólise dos taninos presentes no chá verde e no tratamento de efluentes da indústria de curtume. O aparato experimental foi constituído de um reator de vidro (diâmetro interno de 2,5 cm e comprimento de 15 cm), equipado com camisa de água externa para controle da temperatura (37 °C), conectado a um banho termostático. Uma representação esquemática é apresentada na Figura 8.

A amostra foi introduzida no reator em fluxo ascendente, com auxílio de uma bomba peristáltica, e o processo foi realizado em regime descontínuo com recirculação. O béquer de alimentação/recirculação foi mantido em temperatura ambiente (28 °C) sob agitação magnética para homogeneização da amostra. Uma tela de polietileno foi depositada na extremidade superior do reator a fim de reter o derivado.

Ao final do processo estabelecido para cada aplicação, a amostra tratada foi removida do reator, o derivado foi recuperado por peneiramento, lavado intensivamente com tampão acetato de sódio (100 mmol L⁻¹ pH 5,0), para remover substrato e produtos residuais. Em seguida, a atividade enzimática foi quantificada e expressa em atividade residual (%), considerando 100% a atividade enzimática fornecida no início do processo.

Figura 8 - Representação esquemática do reator de leito fixo com sistema de recirculação. (A) Banho termostático para manutenção da temperatura (37 °C); (B) Bomba peristáltica para controle da vazão volumétrica; (C) Reator de leito fixo com camisa de água externa; (D) Enzima imobilizada; (E) Béquer com amostra (alimentação/recirculação); (F) agitador magnético



Fonte: Autora (2021).

3.6.2 Infusão de chá verde

O chá verde (Leão Fuze®) foi adquirido no comércio local em Ribeirão Preto (SP-Brasil) e preparado como descrito por Li et al. (2018), com adaptações. Inicialmente, 16 g de folhas de chá verde foram misturadas com 400 mL de água destilada e mantidas a 100 °C por 20 min. A infusão foi rapidamente resfriada a 30 °C, em seguida, filtrada em filtro de pano e transferida para um balão volumétrico de 500 mL, completando o volume com água destilada. O chá foi armazenado a 4 °C e, posteriormente, submetido ao tratamento enzimático.

3.6.3 Tratamento do chá com tanase imobilizada

No tratamento do chá verde conduzido em PBR, o reator foi preenchido com $31,94 \pm 2,24$ g de derivado ($311,05 \pm 9,81$ U totais; diâmetro 0,40 cm) e 350 mL de chá verde foram transferidos para o béquer de alimentação/recirculação. Diferentes vazões de alimentação (0,5-5 mL/min) e tempo de operação (0-24 horas) foram analisados para determinar as melhores condições de processo. Alíquotas de 3 mL

foram coletadas a cada duas horas após preenchimento completo do reator com o chá, considerando o tempo espacial calculado para cada vazão, e utilizadas para quantificação de taninos totais e concentração de ácido gálico.

Um reator controle foi operado simultaneamente com o suporte Ca-alginato sem adição da enzima e chá verde, seguindo o mesmo procedimento citado acima. Após aplicação, as propriedades físico-químicas do chá tratado com tanase e sem tratamento foram analisadas.

3.6.3.1 *Quantificação de taninos e compostos fenólicos totais*

O teor de taninos foi quantificado pelo método de precipitação de proteínas (HAGERMAN; BUTLER, 1978) e os compostos fenólicos foram determinados seguindo metodologia de Rao et al. (2018), como descrito no item 3.4.9.2.2.1.

3.6.3.2 *Quantificação do ácido gálico*

O teor de ácido gálico foi quantificado pelo método de rodanina metanólica descrito por Sharma, Bhat e Dawra (2000). A reação foi composta por 0,5 mL de chá verde e 0,3 mL de rodanina metanólica (0,667% m/v), após 5 min a 30 °C, foram adicionados 0,2 mL de hidróxido de potássio (0,5 mol L⁻¹) para formação do cromatógeno de cor violeta. Após 5 min, 4 mL de água destilada foram adicionados e a reação foi lida em espectrofotômetro a 520 nm após 10 min. O branco da reação consistiu da substituição do chá verde por água destilada.

3.6.3.3 *Quantificação de flavonoides*

O teor de flavonoides foi determinado usando um método colorimétrico modificado, descrito por Yang, Martinson, Liu (2009). O método foi previamente padronizado por uma curva de quercetina (0-1,0 mg mL⁻¹). Alíquotas de 250 µL de chá verde e 1250 µL de água destilada foram misturados em tubos de ensaio, em seguida, 75 µL de solução de nitrito de sódio (5% m/v) foram adicionados. Após 5 min, adicionou-se 150 µL de cloreto de alumínio (10% m/v) reagindo por 6 min. 500

μL de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) foram acrescentados aos tubos e o volume da reação foi completado com água destilada até volume final de 3 mL. A reação foi conduzida em temperatura ambiente ($28 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e a absorbância foi medida imediatamente em comprimento de onda de 510 nm. O branco da reação foi constituído substituindo o chá verde por água destilada.

3.6.3.4 *Atividade antioxidante*

O chá verde tratado com tanase e sem tratamento enzimático foram analisados quanto a atividade antioxidante, determinada pela capacidade de eliminação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), de acordo com método descrito por Xu et al. (2019), com modificações. O método foi previamente padronizado por uma curva de Trolox ($0-0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) preparado em metanol. Alíquotas de $100 \mu\text{L}$ de chá foram misturadas com 1 mL de solução DPPH ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e incubado em ambiente escuro por 30 min a temperatura ambiente ($28 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Em seguida, a absorbância foi lida a 517 nm em espectrofotômetro. O controle da amostra foi composto por metanol e solução DPPH.

3.6.3.5 *Determinação da cor, clareza e pH do chá*

A cor e a clareza do chá tratado e não tratado foram determinadas pela medição da absorbância a 420 nm (Abs_{420}) e da transmitância a 660 nm ($T\%_{660}$), respectivamente, em espectrofotômetro. Água destilada foi utilizada como branco (LIMA et al., 2018a). O pH foi medido em pHmetro modelo Fisher Scientific Accumet® AB15 Basic.

3.6.3.6 *Quantificação de proteínas e carboidratos*

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), descrito anteriormente no item 3.5.5. O conteúdo de carboidratos foi estimado pelo método fenolsulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de manose (0 a $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$). A reação foi composta por 0,4 mL de chá, 1 mL de ácido sulfúrico P.A e $10 \mu\text{L}$ de fenol (80% v/v).

A mistura foi agitada e mantida em banho de gelo por 10 min e, posteriormente, incubada a 30 °C por 15 min. Em seguida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm. O branco foi composto substituindo o chá por água destilada. A concentração de carboidratos foi expressa como mg por mL da amostra.

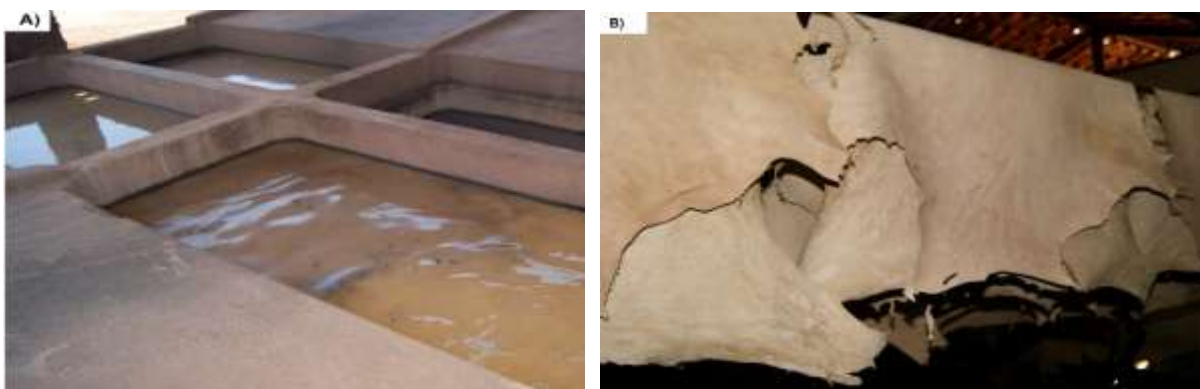
3.6.3.7 Quantificação de açúcares redutores

A quantificação de açúcar foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959), com modificação. O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de glicose (0 – 0,1 mg mL⁻¹). A reação foi composta de 0,25 mL da amostra de chá e 0,25 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), fervida por 5 min a 100 °C e, em seguida, resfriada em banho de gelo. Um volume de 2,5 mL de água destilada foi adicionado e, então, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O branco foi preparado substituindo o chá por água destilada.

3.6.4 Tratamento enzimático do efluente da indústria de curtume

A amostra de efluente da indústria de curtume foi cedida pela Cooperativa ARTEZA, localizada no distrito da Ribeira, cidade de Cabaceiras (PB), Brasil. O efluente é proveniente do processo de curtimento do couro de bode curtido com cascas de angico (*Anadenanthera colubrina* Vell.) em tanques durante 15 dias (Figura 9).

Figura 9 - Processo de tratamento do couro de bode realizado na Cooperativa ARTEZA da Ribeira de Cabaceiras – PB. (A) Processo de curtimento com casca de angico; (B) couro curtido



Fonte: Autora (2021).

3.6.4.1 Tratamento enzimático em reator PBR

O tratamento de efluente da indústria de curtume foi realizado em reator de leito fixo, no sistema descrito 3.6.1. O reator foi preenchido com $35,65 \pm 2,29$ g de derivado ($256,69 \pm 19,51$ U totais; diâmetro 0,40 cm) e 150 mL do efluente foram transferidos para o béquer de alimentação/recirculação. O processo foi iniciado após estabilização da temperatura do reator a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantida por meio da circulação de água e banho termostático. Diferentes vazões de alimentação (0,5-5 mL) e tempo de processo (0-120 horas) foram analisados para verificar as melhores condições de tratamento. Alíquotas de 2 mL foram coletadas a cada duas horas, após preenchimento completo do reator com o efluente, considerando o tempo espacial calculado para cada vazão, e empregadas para quantificação de taninos (item 3.4.9.2.2.1).

Um reator controle foi operado simultaneamente com o suporte Ca-alginato sem adição da enzima, seguindo o mesmo procedimento citado acima. Após aplicação, os efluentes foram caracterizados quanto ao teor de taninos, fenóis totais, cor, clareza e pH, como descrito anteriormente.

3.6.5 Parâmetros operacionais dos processos em PBR

3.6.5.1 Tempo espacial

O tempo espacial ou tempo de residência (τ), definido como tempo necessário para processar um volume de reator, foi calculado conforme Equação 8 (FOGLER, 2002).

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}}}{Q} \quad \text{Equação 8}$$

Em que: τ corresponde ao tempo espacial (min); $V_{\text{útil}}$: volume útil do reator (mL); Q : vazão volumétrica (mL/min).

O volume útil ($V_{\text{útil}}$) do reator foi calculado de acordo com a Equação 9:

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}} \quad \text{Equação 9}$$

Em que: V_{reator} corresponde ao volume total do reator; $V_{catalisador}$: volume ocupado pelo catalisador no interior do reator.

O $V_{catalisador}$ foi calculado pela relação entre a massa e a densidade do catalisador (Equação 10).

$$V_{catalisador} = \frac{w}{\rho} \quad \text{Equação 10}$$

Em que: w corresponde a massa do catalisador seco (g); ρ : densidade do catalisador (g/mL).

3.6.5.2 Porosidade do leito

A porosidade (ε) do leito ou fração de vazio foi definida pela razão entre o volume do leito que não está ocupado com o catalisador e o volume total do leito (Equação 11).

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_{catalisador}}{V_{reator}} \quad \text{Equação 11}$$

Em que: ε corresponde a porosidade do leito, sendo que $0 < \varepsilon < 1$.

3.6.5.3 Velocidade espacial

A velocidade espacial (S) corresponde o número de volumes de reatores que foram alimentados em condições especificadas e que podem ser tratadas em unidade de tempo (h^{-1}) (Equação 12).

$$S = \frac{1}{\tau} \quad \text{Equação 12}$$

Em que: τ : tempo espacial ou tempo de residência (min).

3.6.5.4 Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica foi calculada considerando a concentração dos produtos formados ao final do processo, a taxa de vazão do sistema e o volume útil do reator (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2011), conforme a Equação 13.

$$P = C_p \times \frac{Q}{V_{\text{útil}}} \quad \text{Equação 13}$$

Em que: C_p corresponde a concentração do produto (mg mL^{-1}).

3.6.5.5 Taxa de formação do produto

A taxa de formação do produto (R_p) corresponde a concentração do produto (C_p) final (mg mL^{-1}) e a vazão de alimentação aplicada (Q) (Equação 14), expressa em mg min^{-1} .

$$R_p = C_p \times Q \quad \text{Equação 14}$$

3.7 Análise dos experimentos

Os ensaios foram realizados em triplicata e analisados com base na média e no erro padrão. O teste de Tukey foi aplicado para comparação das médias nos experimentos de secagem e imobilização, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para análise dos dados e representações gráficas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft®), OriginPro 8 (OriginLab® Corporation - *Trial version*), BioStat 5.3 e ACD/ChemSketch *FreeWare*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão, os resultados obtidos neste estudo estão apresentados em duas partes:

- Parte I: *Spray drying* das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* e aplicação na síntese de propil galato e na ração animal;
- Parte II: Imobilização das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* e aplicação em reator de leito fixo para tratamento de chá verde e efluente da indústria de curtume.

PARTE I

***Spray drying* das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus*
e aplicação na síntese de propil galato e na ração animal**

4.1 Secagem em *spray dryer* das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus*

4.1.1 Parâmetros dos processos de secagem

Os parâmetros temperatura de saída do ar, vazão de alimentação, rendimento e atividade recuperada dos processos de secagem das tanases de *Aspergillus* na presença de diferentes adjuvantes estão apresentados na Tabela 2. Observa-se um padrão de comportamento com relação à temperatura de saída e atividade enzimática recuperada. Nos processos com farinha de soja como adjuvante foram obtidas as maiores temperaturas de saída do ar e as menores taxas de recuperação da atividade para secagem das tanases de *A. phoenicis* (59,75 °C; 48,57%), *A. ochraceus* (59,75 °C; 33,82%), *A. fumigatus* CAS21 (59,25 °C; 46,96%) e *A. niger* ANG18 (60 °C; 15,48%). Na secagem da enzima de *A. carbonarius* a maior temperatura de saída (59 °C) foi obtida no processo empregando amido Capsul® como adjuvante, neste caso também foi observada a menor atividade recuperada (9,15%). Deste modo, verifica-se que há uma relação entre alta temperatura de saída do ar e atividade recuperada nas secagens em *spray dryer*.

As temperaturas de entrada e saída do ar são os parâmetros mais estudados nos processos de *spray drying* por afetar o rendimento, qualidade, estabilidade do produto e atividade enzimática (ABDEL-MAGEED et al., 2019; GUPTA et al., 2014; LANGFORD et al., 2018). A temperatura de saída, de acordo com Cal e Sollohub (2010), é considerada como a temperatura máxima à qual o produto está exposto e é diretamente influenciada pela temperatura de entrada, velocidade de secagem e taxa de aspiração do produto (COSTA et al., 2015). Nos processos realizados para secagem da tanase, a temperatura de entrada foi fixada em 100 °C a fim de obter um produto seco com baixo teor de umidade, como também maximizar a taxa de recuperação da atividade enzimática. Baixas temperaturas de entrada não são adequadas, uma vez que a água não evapora e o material a ser seco apresenta conteúdos mais altos de umidade residual e o rendimento do processo é reduzido (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016; SCHUTYSER; PERDANA; BOOM, 2012). Por outro lado, temperaturas de entrada mais altas proporcionam temperaturas de saída mais elevadas, que podem resultar em perda ou desnaturação enzimática (LIBARDI et al., 2020; SHIGA et al.,

2014; TORRES et al., 2016). Fato que pode explicar os resultados obtidos nesta pesquisa empregando a farinha de soja como adjuvante para secagem da tanase de *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21 e *A. niger* ANG18, e amido Capsul® para tanase de *A. carbonarius*, visto que nos processos que foram observadas as maiores temperaturas de saída do ar, também foram obtidos produtos com menores atividades enzimáticas. Este resultado é semelhante ao relatado por Mohtar et al. (2019). Os autores observaram menor recuperação de atividade da lipase seca em sagu (46,8%) na temperatura de saída de 100 °C, enquanto a máxima atividade foi obtida a 55 °C (86,3%). Na secagem da xilanase de *Melanocarpus albomyces* as menores atividades enzimáticas foram obtidas nas temperaturas mais altas de saída (80,1 – 95,1 °C), enquanto que 99,5% da atividade foi recuperada a 65,2 °C (GUPTA et al., 2014). Obón et al. (2020) observaram maior retenção da atividade da α -amilase nas temperaturas mais baixas de entrada (120 °C) e saída (56 °C). O mesmo foi observado no processo de secagem da celulase com maltodextrina, sendo cerca de 40% da atividade preservada a 120 °C. No entanto, a 180 °C a atividade foi reduzida 83% (LIBARDI et al., 2020).

Tabela 2 - Efeito de diferentes adjuvantes na secagem em *spray dryer* das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus*

Adjuvantes (10% m/v)	T _{gs} (°C)	W _{real} (g/min)	Rec (%)	AR (%)
<i>Aspergillus phoenicis</i>				
Controle	-	-	-	100 ± 15,0 ^A
β -Ciclodextrina	57,75 ± 0,5	4,24	39,42	102,51 ± 6,9 ^A
Amido Capsul®	57,75 ± 0,5	4,19	48,95	82,71 ± 13,3 ^{AC}
Farinha de soja	59,75 ± 0,5	4,22	31,82	48,57 ± 5,0 ^{BC}
Lactose	55,25 ± 1,0	4,37	55,93	70,17 ± 7,7 ^C
Maltodextrina	57,75 ± 0,5	4,27	41,66	92,00 ± 5,1 ^{AC}
<i>Aspergillus ochraceus</i>				
Controle	-	-	-	100 ± 6,6 ^A
β -Ciclodextrina	58,75 ± 0,5	4,14	46,00	98,45 ± 8,6 ^A
Amido Capsul®	58,25 ± 0,5	4,15	47,54	105,67 ± 3,5 ^A
Farinha de soja	59,75 ± 0,5	3,82	34,97	33,82 ± 9,6 ^B
Lactose	56,00 ± 0,8	4,27	35,41	57,80 ± 11,8 ^C
Maltodextrina	58,00 ± 0	4,24	39,05	32,74 ± 1,9 ^B

(continua)

Adjuvantes (10% m/v)	T _{gs} (°C)	W _{real} (g/min)	Rec (%)	AR (%)
<i>Aspergillus fumigatus</i> CAS21				
Controle	-	-	-	100 ± 8,3 ^A
β-Ciclodextrina	58,00 ± 0	4,21	27,35	123,76 ± 2,6 ^B
Amido Capsul [®]	58,25 ± 0,5	4,19	32,15	69,72 ± 4,1 ^C
Farinha de soja	59,25 ± 1,0	4,18	29,78	46,96 ± 7,9 ^D
Lactose	55,75 ± 1,3	4,41	53,50	64,46 ± 6,6 ^{CD}
Maltodextrina A	57,25 ± 1,0	4,20	28,73	109,75 ± 5,0 ^{AB}
Maltodextrina B	-	-	28,36	99,71 ± 8,6 ^A
<i>Aspergillus niger</i> ANG18				
Controle	-	-	-	100 ± 11,8 ^A
β-Ciclodextrina	57,25 ± 1,3	4,12	49,21	115,87 ± 12,8 ^A
Amido Capsul [®]	57,25 ± 1,0	4,21	58,04	38,49 ± 4,5 ^{BD}
Farinha de soja	60,00 ± 0,8	4,02	26,99	15,48 ± 4,7 ^B
Lactose	56,25 ± 1,0	4,34	47,47	73,88 ± 10,5 ^C
Maltodextrina A	57,00 ± 0	4,25	26,88	61,26 ± 7,7 ^{CD}
Maltodextrina B	-	-	26,73	51,52 ± 6,4 ^{CD}
<i>Aspergillus carbonarius</i>				
Controle	-	-	-	100 ± 3,3 ^A
β- Ciclodextrina	57,75 ± 0,5	4,02	27,37	125,87 ± 10,4 ^A
Amido Capsul [®] A	59,00 ± 0,8	3,97	26,74	9,15 ± 15,9 ^B
Amido Capsul [®] B	-	-	26,00	0 ^B
Farinha de soja	58,00 ± 1,4	4,04	38,60	131,55 ± 33,5 ^A
Lactose	58,25 ± 0,5	4,23	56,48	117,35 ± 1,9 ^A
Maltodextrina	57,75 ± 0,5	4,22	54,85	108,36 ± 37,4 ^A

T_{gs}: temperatura de saída do ar; W_{real}: vazão de alimentação real; Rec: rendimento do processo; AR: atividade recuperada. 100% da atividade enzimática da tanase de *A. phoenicis* corresponde a 2,50 ± 0,1 U mL⁻¹; 100% da atividade enzimática da tanase de *A. ochraceus* corresponde a 1,01 ± 0 U mL⁻¹; 100% da atividade enzimática da tanase de *A. fumigatus* CAS21 corresponde a 23,01 ± 1,9 U mL⁻¹; 100% da atividade enzimática da tanase de *A. niger* ANG18 corresponde a 20,64 ± 2,4 U mL⁻¹; 100% da atividade enzimática da tanase de *A. carbonarius* corresponde a 2,02 ± 0,1 U mL⁻¹. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). Teste analisado separadamente para cada tanase produzida pelas espécies de *Aspergillus*.

Fonte: Autora (2021).

Outro parâmetro importante é a vazão de alimentação por influenciar na deposição de partículas na parede do ciclone, no teor de umidade e no tamanho da

partícula do produto (KESHANI et al., 2015). Nos processos realizados, as taxas de vazão de alimentação real sofreram variações de 3,82 a 4,41 g/min e foram próximas a vazão fixada no início do processo de 4 g/min. Destaca-se que esses valores foram similares aos encontrados para a secagem das enzimas fitase (SATO et al., 2014) e β -frutofuranosidase (GONÇALVES et al., 2013a), com taxas entre 3,0 e 4,6 g/min, empregando as mesmas condições operacionais.

Os rendimentos dos processos ou recuperação do produto variaram de acordo com o adjuvante empregado nas secagens. Os maiores rendimentos foram obtidos na presença de lactose (55,93% e 53,50%) e amido Capsul® (48,95% e 32,15) para secagem da tanase de *A. phoenicis* e *A. fumigatus* CAS21, em amido modificado Capsul® (58,04% e 47,54%) e β -ciclodextrina (49,21% e 46%) para as enzimas de *A. niger* ANG 18 e de *A. ochraceus*, e no processo de secagem da tanase de *A. carbonarius* na presença de lactose (56,48%) e maltodextrina (54,85%). Em geral, os rendimentos obtidos foram semelhantes aos relatados para spray drying de enzimas como, por exemplo, para secagem de lipase e savanase usando goma arábica como adjuvante, com recuperação de 39,95% e 36,86%, respectivamente (TORRES et al., 2016), de β -galactosidase empregando quitosana como adjuvante com rendimento de 30% (ESTEVINHO; RAMOS; ROCHA, 2015) e de peptidases, variando entre 35,8% e 63% dependendo das condições de secagem (HAMIN NETO; FREITAS; CABRAL et al., 2014).

Os rendimentos dos processos realizados na presença de farinha de soja foram os menores (26,99 - 38,60%) comparando com os obtidos nos demais adjuvantes. No entanto, vale ressaltar que, as taxas ainda foram superiores aos relatados por Sato et al. (2014) para secagem da fitase com farinha de soja (24 - 32,6%), empregando as mesmas condições de processo. Fatores como o tipo de secador, tempo de retenção, volume total e a geometria da câmara afetam o rendimento e desempenho do processo e, conseqüentemente, a qualidade do produto e suas propriedades físico-químicas (COSTA et al., 2015; KESHANI et al., 2015). O rendimento também é afetado pela aspiração de partículas para fora do secador ou pela sua deposição na câmara de secagem ou no ciclone (ABDEL-MAGEED et al., 2019; ESTEVINHO; RAMOS; ROCHA, 2015). Tal comportamento foi observado quando utilizada maltodextrina como adjuvante para secagem das tanases de *A. fumigatus* CAS21, com rendimento de 28,73%, e *A. niger* ANG18,

rendimento de 26,88%, e amido Capsul[®] para tanase de *A. carbonarius* (26%). Nestes processos uma parte do pó foi retida nas paredes do ciclone e, devido a isto, as amostras foram coletadas e analisadas separadamente (amostra do frasco coletor corresponde a (A) e do ciclone (B)).

A preservação da atividade enzimática após secagem é possível devido a adição de adjuvantes nas formulações. Nesta pesquisa as atividades enzimáticas foram preservadas independentemente do tipo de adjuvante empregado, observando-se perda total da atividade apenas para o produto seco coletado no ciclone obtido da secagem da tanase de *A. carbonarius* com amido Capsul[®] (B). Apenas cerca de 9% da atividade foi mantida no produto coletado no frasco coletor (amido Capsul[®] A).

Os adjuvantes atuam para reduzir a perda da atividade enzimática quando as enzimas estão submetidas a altas temperaturas (GONÇALVES et al., 2013a). Sua eficácia pode variar de acordo com amostra, concentração e as condições de processo. Na secagem das tanases produzidas por *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21 e *A. niger* ANG18 as menores atividades enzimáticas foram obtidas nas formulações com farinha de soja, como mencionado anteriormente. Além da temperatura de saída do ar, a atividade enzimática é afetada pelo adjuvante e sua concentração na formulação. Segundo Cabral et al. (2017), baixas concentrações do adjuvante não são suficientes para proteger efetivamente as enzimas do estresse térmico durante o processo de secagem. Contudo, concentrações acima do ideal podem afetar a estrutura secundária, reduzindo a atividade enzimática. Além de que, a farinha de soja pode ter provocado a redução da mobilidade da enzima e dificultado a interação entre o substrato e o sítio ativo (AMARA et al., 2016). Diferente das demais, para a enzima de *A. carbonarius* seca com farinha de soja a atividade enzimática foi totalmente recuperada, resultado semelhante ao observado por Sato et al. (2014) para a fitase de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, com maiores atividades obtidas na presença de 2%, 5% e 10% (m/v) desse adjuvante. As proteínas exibem propriedades interessantes para aplicação como adjuvante ou agente encapsulante, como a possibilidade de formar emulsão e por serem consideradas GRAS (SHISHIR et al., 2018). A soja é uma das fontes mais ricas de proteínas e um dos componentes principais nas dietas humanas e de animais (SARABANDI; GHAREHBEGLOU; JAFARI, 2020).

Dentre os adjuvantes analisados, a utilização da β -ciclodextrina promoveu a manutenção da atividade enzimática inicial para todos os produtos secos, resultado também obtido para secagem da lipase de *Cercospora kikuchii* (COSTA-SILVA et al., 2014). As CDs são relatadas na literatura pela sua capacidade de proteger a estrutura proteica da desnaturação térmica (SARABANDI; GHAREHBEGLOU; JAFARI, 2020). Outros adjuvantes eficientes na manutenção da atividade após secagem são os amidos modificados e a lactose, que já foram descritos para secagens das enzimas β -frutofuronosidase (GONÇALVES et al., 2013a), lipase (COSTA-SILVA et al., 2014) e xilanase (GUPTA et al., 2014).

A maltodextrina é um dos adjuvantes mais usados nos processos *spray drying* pela sua característica de formar uma camada externa durante a secagem, que reduz a viscosidade e melhora sua eficiência como agente microencapsulante, protegendo, deste modo, o produto de interesse (TONON; BRABET; HUBINGER, 2010; ZHANG et al., 2018a). Seu uso foi eficiente para secagem das tanases de *Aspergillus* com preservação de 51 a 100% da atividade enzimática (Tabela 2). A maltodextrina foi relatada como adjuvante para secagem de inúmeras enzimas, como para xilanase, com recuperação da atividade enzimática por volta de 90-95% (GUPTA et al., 2014), resultado também observado por Cabral e colaboradores (2017) na secagem de peptidases com manutenção de 91,7% da atividade. Contudo, baixos rendimentos foram obtidos para proteção da β -galactosidase, com redução de 60% da atividade (LIPIÄINEN et al., 2018).

Dois mecanismos foram relatados para explicar o desempenho dos carboidratos para evitar a desnaturação da proteína: (1) substituição da molécula de água nas interações com a proteína ou; (2) formação de uma matriz vítrea, que estabiliza a estrutura proteica (SCHUTYSER; PERDANA; BOOM, 2012). De acordo com Tonnis et al. (2014), as ligações de hidrogênio entre proteínas e moléculas de água são substituídas por ligações de hidrogênio entre proteínas e grupos hidroxila do açúcar, o que pode possibilitar a manutenção da estrutura enzimática e possível preservação da atividade.

4.1.2 Características físico-químicas dos produtos secos

Uma das vantagens da secagem por *spray dryer* é a obtenção de produtos secos com propriedades físico-químicas adequadas para manutenção da estabilidade e armazenamento. O conteúdo de umidade e a atividade de água estão relacionados também à eficiência de secagem e podem variar de acordo com o adjuvante empregado, devido às diferenças nas suas estruturas e propriedades (MAHDAVI et al., 2014; SARABANDI; GHAREHBEGLOU; JAFARI, 2020; SILVA et al., 2013a). Nas análises das características físico-químicas dos produtos secos (Tabela 3) verifica-se que, de forma geral, os pós contendo as tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* exibiram atividade de água e teor de umidade desejados para produtos secos. De acordo Syamaladevi et al. (2016), a atividade de água refere-se à estimativa da água termodinamicamente disponível para reações químicas e biológicas. Quanto menor, melhor o potencial de armazenamento do produto seco por evitar riscos de degradações químicas, físicas e biológicas (GHARSALLAOUI; CHAMBIN, 2007; JESUS; MACIEL FILHO, 2014). Observa-se que a atividade de água variou entre 0,24 e 0,51, sendo maior nos pós com farinha de soja para todas as secagens, assim como para o pó coletado no ciclone. Este resultado é esperado, uma vez que, geralmente, pós retidos no ciclone são mais pegajosos, portanto, tendem apresentar uma maior quantidade de água do que aqueles que foram coletados no frasco. Destaca-se que os valores de atividade de água de todos os pós foram adequados para garantir a estabilidade biológica do produto seco, visto que o valor mínimo de A_w para o crescimento de bactérias é 0,9, e para leveduras e fungos filamentosos de 0,85 e 0,70, respectivamente (GONÇALVES et al., 2013a; SATO et al., 2014).

O teor de umidade dos produtos com Capsul[®], farinha de soja, lactose e maltodextrina variou em torno de 4-6%. O maior teor de umidade foi observado no pó com β -ciclodextrina (10,96-12,48%) para todas as secagens. Destaca-se que, assim como observado para atividade de água, os produtos retidos no ciclone (B) apresentaram maior umidade se comparados aos produtos coletados nos frascos (A). Valores baixos de umidade residual ($\leq 12\%$) são recomendados por impedir a aglomeração de partículas úmidas durante o armazenamento e são essenciais para manter a estabilidade do produto (SILVA et al., 2013a). De modo geral, os valores de atividades de água e teor de umidade encontrados foram similares aos relatados

para os produtos secos contendo lipase (COSTA-SILVA et al., 2014), β -fructofuranosidase (GONÇALVES et al., 2013a), fitase (SATO et al., 2014), tripsina (ZHANG et al., 2018b) e celulase (LIBARDI et al., 2020).

Tabela 3 - Características físico-químicas dos produtos secos obtidos da secagem em *spray dryer* das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus*

Adjuvantes (10% (m/v))	Umidade (%)	Aw	DP (μ m)
<i>Aspergillus phoenicis</i>			
β -Ciclodextrina	12,48 \pm 0,1	0,27 \pm 0	4 – 8
Amido Capsul [®]	5,94 \pm 0	0,25 \pm 0	4 – 14
Farinha de soja	4,86 \pm 0,2	0,35 \pm 0	4 – 8
Lactose	5,37 \pm 0	0,32 \pm 0	4 – 10
Maltodextrina	5,64 \pm 0	0,29 \pm 0	4 – 10
<i>Aspergillus ochraceus</i>			
β -Ciclodextrina	10,96 \pm 0,2	0,28 \pm 0	4 – 10
Amido Capsul [®]	7,00 \pm 0	0,28 \pm 0	4 – 13
Farinha de soja	6,16 \pm 0,5	0,39 \pm 0	4 – 10
Lactose	5,36 \pm 0	0,28 \pm 0	4 – 10
Maltodextrina	5,40 \pm 0	0,24 \pm 0	4 – 12
<i>Aspergillus fumigatus</i> CAS21			
β -Ciclodextrina	11,49 \pm 0,4	0,28 \pm 0	4 – 33
Amido Capsul [®]	6,97 \pm 0,1	0,25 \pm 0	5 – 11
Farinha de soja	5,68 \pm 0,1	0,36 \pm 0	3 – 12
Lactose	5,63 \pm 0,0	0,33 \pm 0	2 – 14
Maltodextrina A	6,09 \pm 0,1	0,32 \pm 0	3 – 13
Maltodextrina B	7,30 \pm 0,3	0,45 \pm 0	3 – 11
<i>Aspergillus niger</i> ANG18			
β -Ciclodextrina	12,37 \pm 0,1	0,29 \pm 0	4 – 10
Amido Capsul [®]	7,67 \pm 0,2	0,37 \pm 0	5 – 10
Farinha de soja	5,62 \pm 0,1	0,41 \pm 0	4 – 10
Lactose	5,46 \pm 0	0,34 \pm 0	4 – 10
Maltodextrina A	6,58 \pm 0,2	0,34 \pm 0	4 – 13
Maltodextrina B	7,22 \pm 0,3	0,51 \pm 0	4 – 10
<i>Aspergillus carbonarius</i>			
β -Ciclodextrina	12,15 \pm 0,0	0,27 \pm 0	4 – 8
Amido Capsul [®] A	5,86 \pm 0,4	0,32 \pm 0	4 – 10

(contua)

Adjuvantes (10% (m/v))	Umidade (%)	Aw	DP (μm)
Amido Capsul [®] B	7,02 \pm 0,2	0,41 \pm 0	4 – 10
Farinha de soja	5,64 \pm 0,1	0,4 \pm 0	4 – 8
Lactose	5,65 \pm 0,0	0,32 \pm 0	4 – 10
Maltodextrina	4,19 \pm 0,6	0,28 \pm 0	4 – 10

Aw: Atividade de água; DP: diâmetro da partícula.

Fonte: Autora (2021).

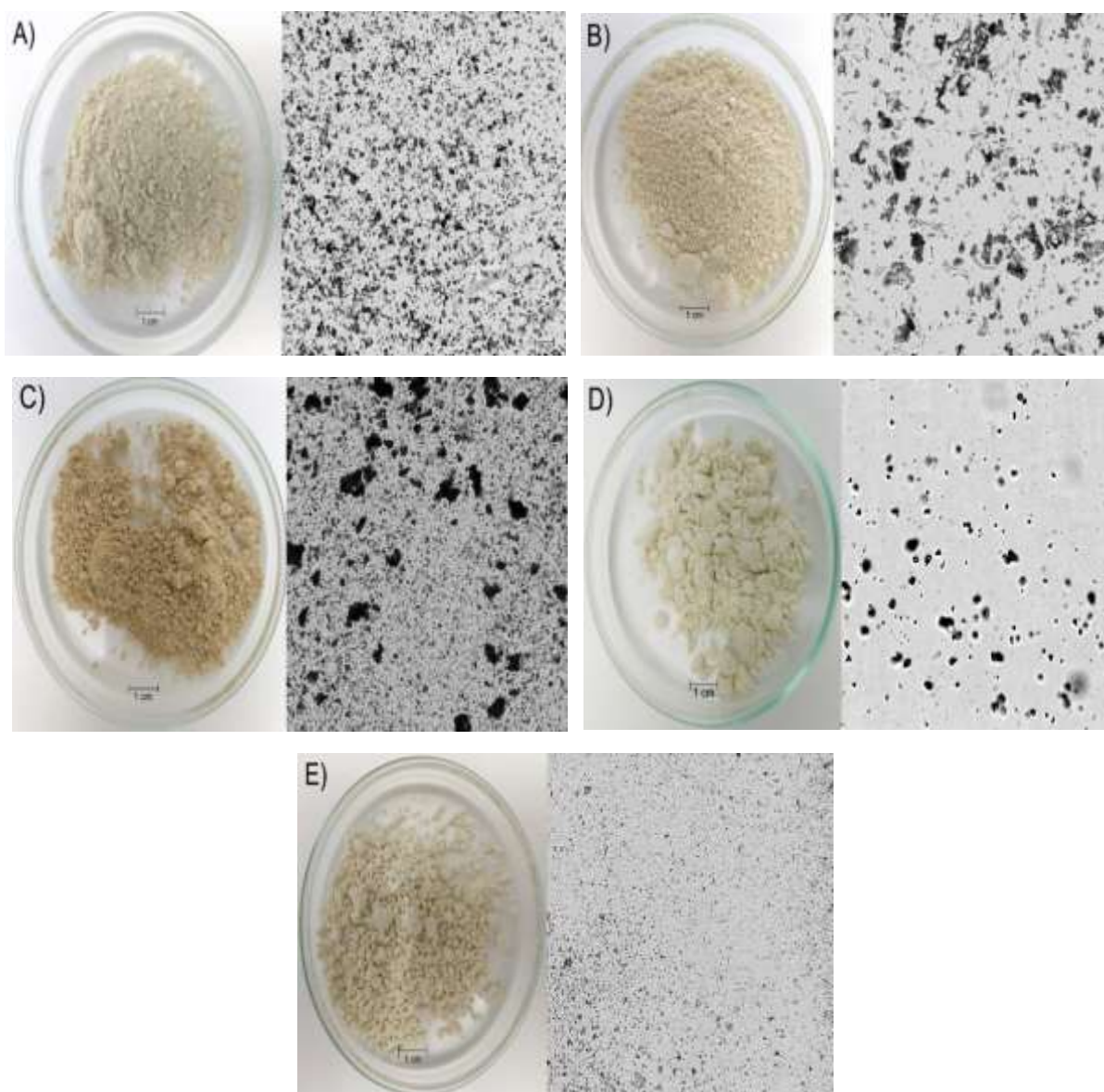
O tamanho das partículas é outra característica afetada pelas condições de secagem, sendo influenciado principalmente pela pressão de atomização, tamanho e posição do bico de pulverização (MAHDAVI et al., 2014; SCHUTYSER; PERDANA; BOOM, 2012). De acordo com Abdel-Mageed et al. (2019), os adjuvantes de secagem também afetam o tamanho da partícula do produto seco. Os autores descreveram que o tipo e concentração de adjuvante influenciaram significativamente o tamanho das partículas secas contendo α -amilase. Neste estudo, os diâmetros das partículas variaram entre 2 e 14 μm , com exceção do produto seco na presença de β -ciclodextrina (33 μm) contendo tanase de *A. fumigatus* CAS21. Vale ressaltar, que esta faixa de variação significa que o produto seco apresenta maior concentração de partículas variando entre os valores de diâmetros que estão apresentados na Tabela 3. Os resultados apresentados estão dentro da faixa relatada para enzimas secas por pulverização e foram próximos aos descritos para os pós secos contendo β -frutofuranosidase (GONÇALVES et al., 2013a), lipase (COSTA-SILVA et al., 2014), fitase (SATO et al., 2014) e celulase (LIBARDI et al., 2020), empregando como adjuvantes a lactose, maltodextrina ou β -ciclodextrina.

4.1.2.1 Aspectos micro e macroscópicos dos produtos secos

Na Figura 10 são visualizados os aspectos micro e macroscópicos dos pós obtidos da secagem da tanase de *A. phoenicis*. As partículas secas com β -ciclodextrina, amido Capsul[®] e farinha de soja não apresentaram formas definidas, sendo possível notar a presença de partículas com tamanhos e formas variadas, distinguindo-se dos formatos arredondados encontrados nos produtos

secos com lactose e maltodextrina. Os pós com amido Capsul[®] e farinha de soja apresentaram coloração marrom devido a cor dos adjuvantes.

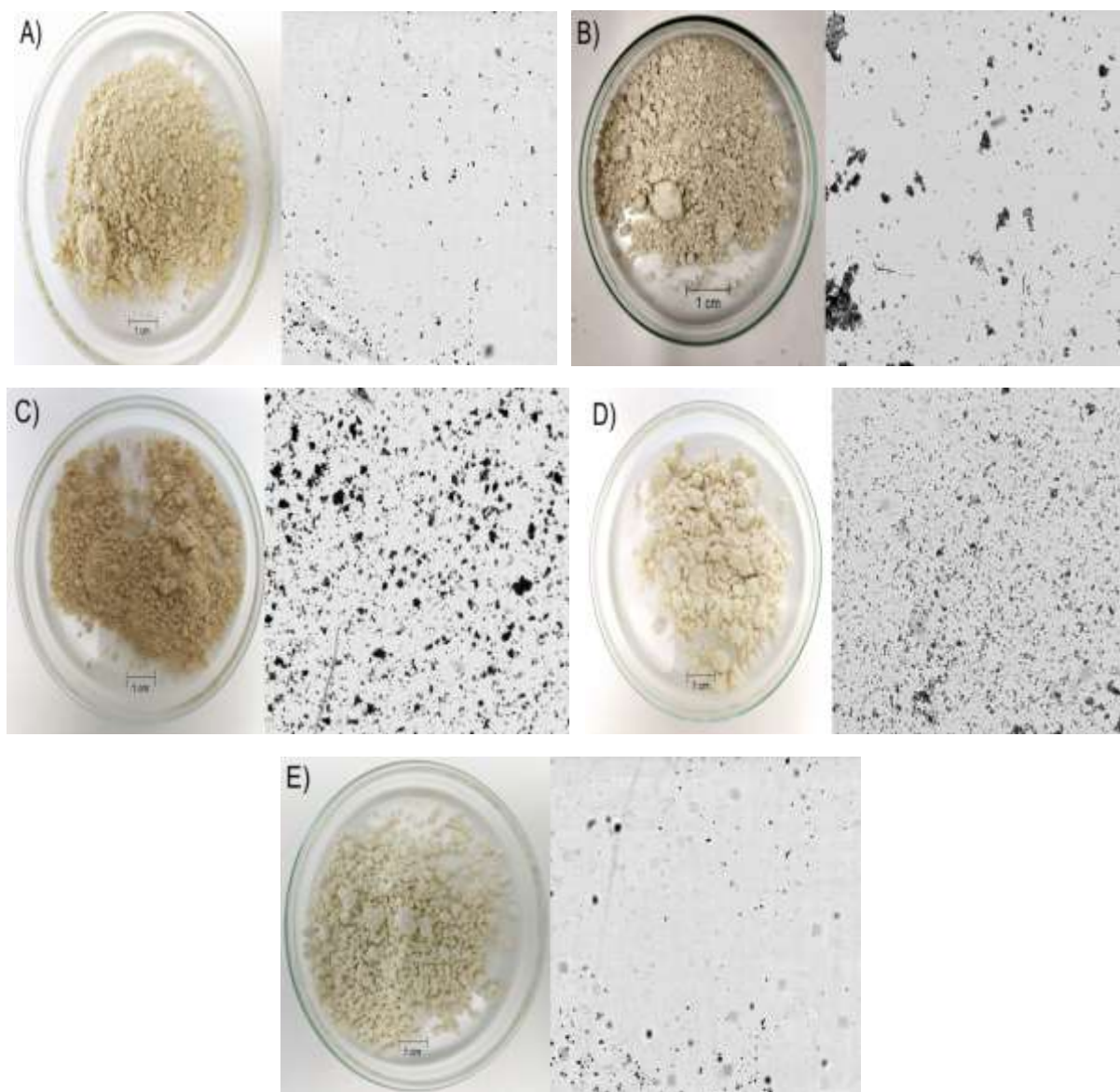
Figura 10 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos na presença de diferentes adjuvantes obtidos do processo em *spray dryer* da tanase de *A. phoenicis*. A) β -ciclodextrina; B) amido modificado Capsul[®]; C) Farinha de soja; D) Lactose; E) Maltodextrina.



Fonte: Autora (2021).

Na Figura 11 verificam-se os produtos secos de *A. ochraceus*. As partículas com amido Capsul[®] e farinha de soja formaram aglomerados com formas diferentes. O formato arredondado foi visualizado nos produtos com β -ciclodextrina e maltodextrina, enquanto com lactose as partículas foram visivelmente amorfas.

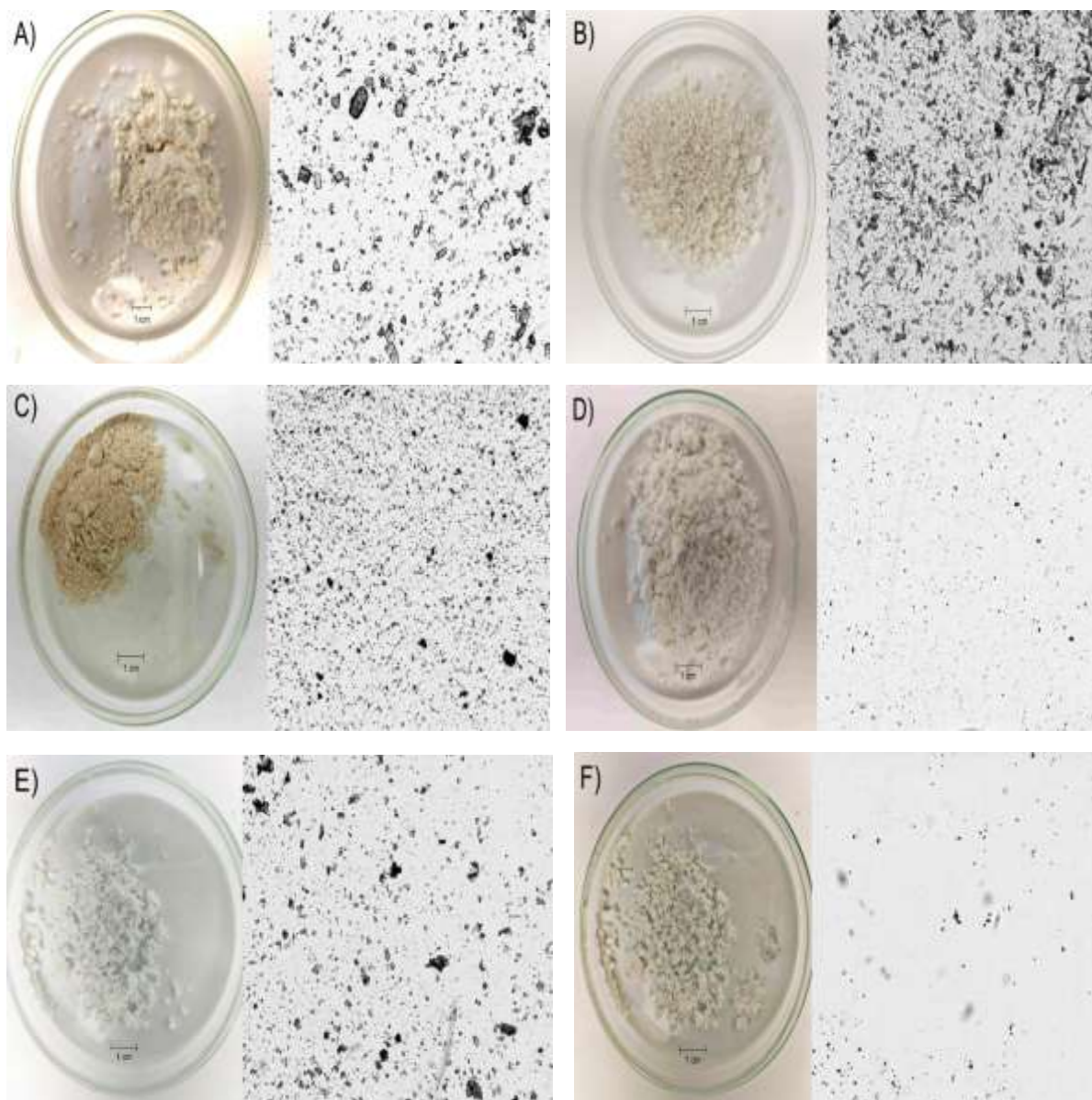
Figura 11 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos na presença de diferentes adjuvantes obtidos do processo em *spray dryer* da tanase de *A. ochraceus*. A) β -ciclodextrina; B) amido Capsul®; C) Farinha de soja; D) Lactose; E) Maltodextrina.



Fonte: Autora (2021).

Para os produtos secos de *A. fumigatus* CAS 21 é possível visualizar, na Figura 12, que as partículas com farinha de soja, maltodextrina B, lactose e amido Capsul® são visivelmente arredondas. No entanto, não foi possível visualizar uma forma definida para partículas das amostras com β -ciclodextrina e maltodextrina A.

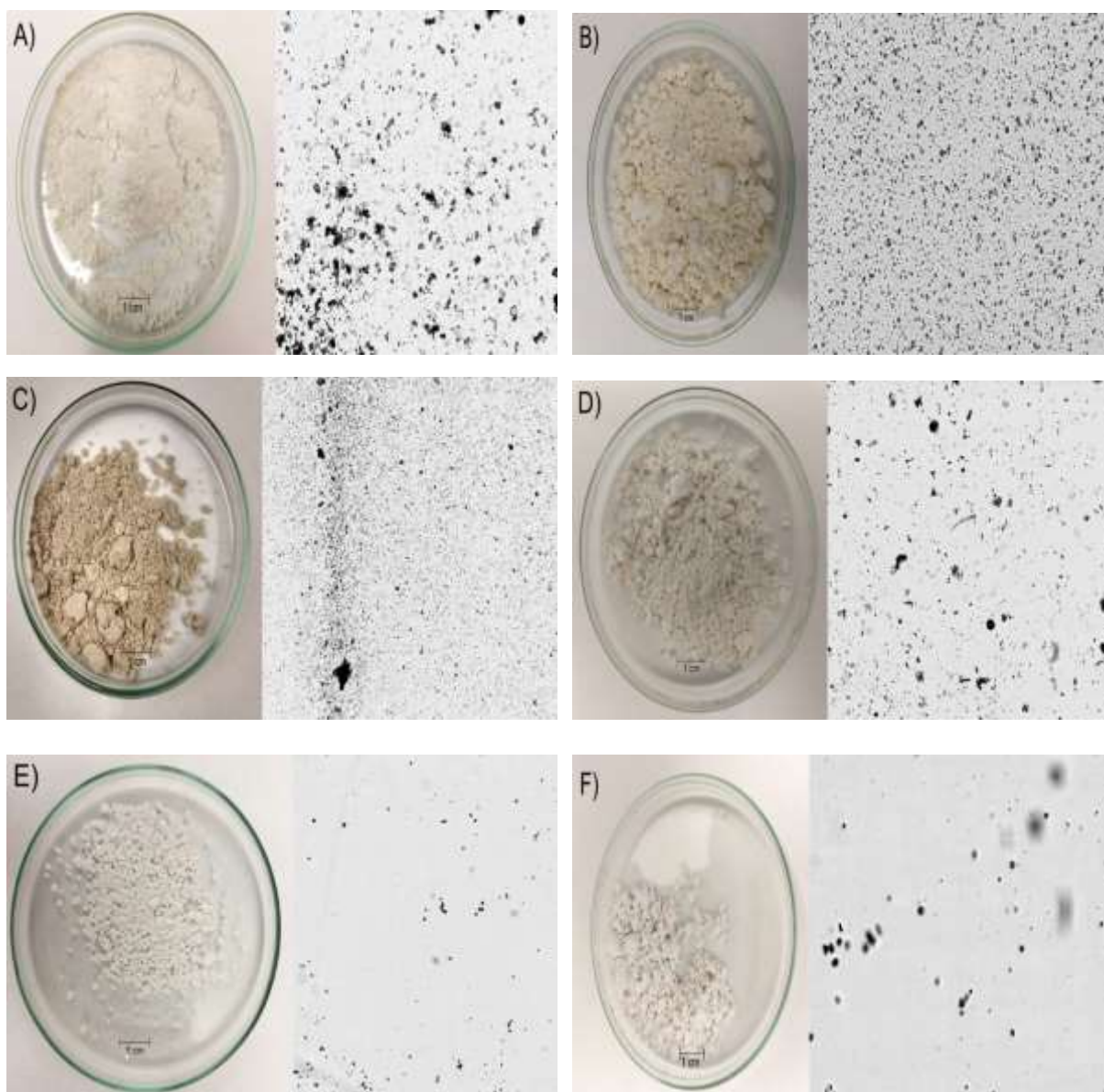
Figura 12 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos na presença de diferentes adjuvantes obtidos do processo em *spray dryer* da tanase de *A. fumigatus* CAS21. A) β -ciclodextrina; B) amido modificado Capsul[®]; C) Farinha de soja; D) Lactose; E) Maltodextrina A; F) Maltodextrina B.



Fonte: Autora (2021).

Na Figura 13 observam-se os produtos secos obtidos a partir da secagem em *spray dryer* da tanase de *A. niger* ANG18. O pó com β -ciclodextrina foi visivelmente amorfo, enquanto que o uso da farinha de soja, maltodextrina (A e B), e amido Capsul[®] proporcionaram partículas com formatos arredondados. A presença de aglomerados dificultou a visualização da morfologia das partículas do pó seco com lactose.

Figura 13 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos na presença de diferentes adjuvantes obtidos do processo em *spray dryer* da tanase de *A. niger* ANG18. A) β -ciclodextrina; B) amido modificado Capsul[®]; C) Farinha de soja; D) Lactose; E) Maltodextrina A; F) Maltodextrina B.

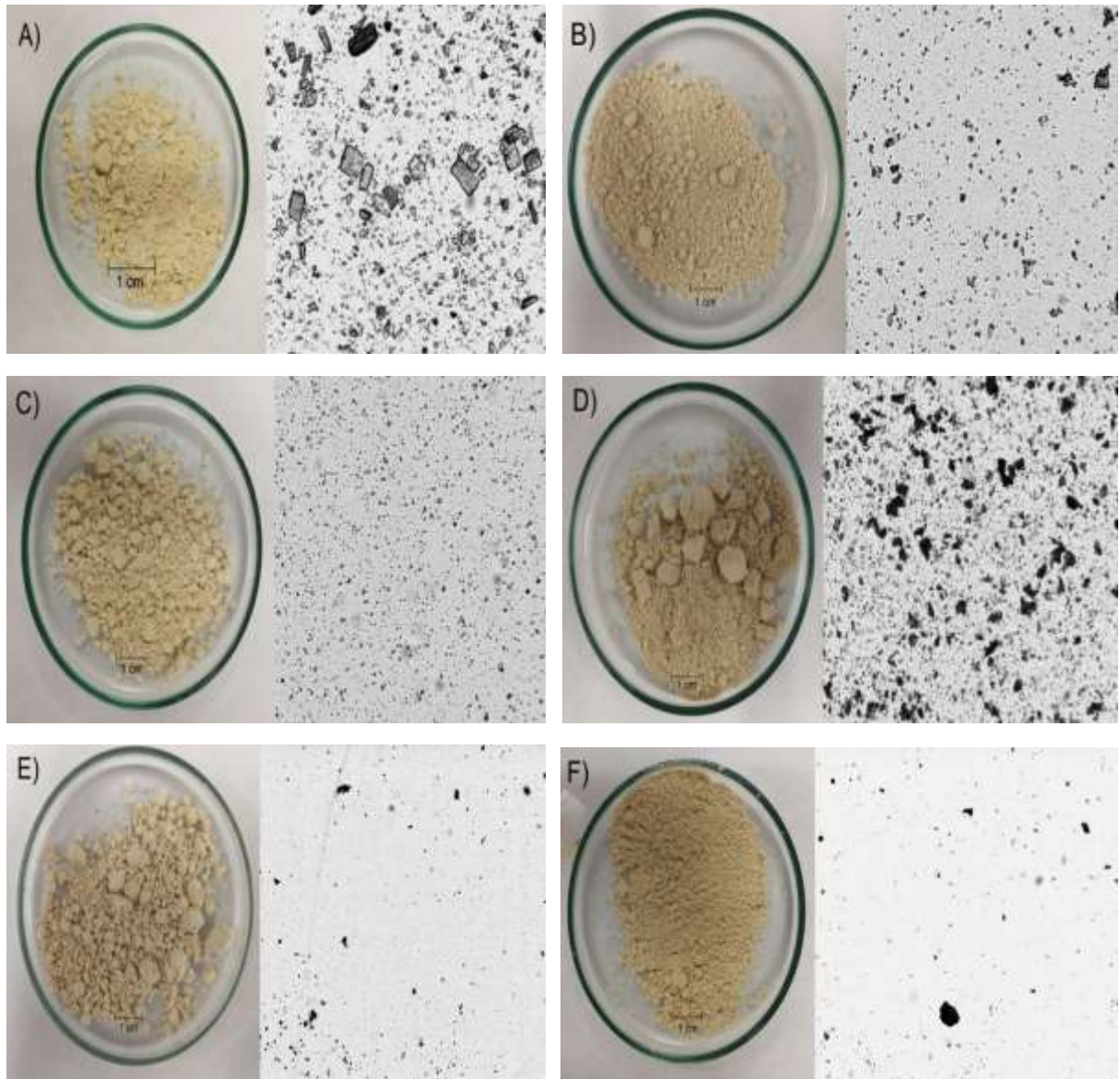


Fonte: Autora (2021).

Os aspectos macro e microscópicos dos produtos obtidos da secagem do filtrado de *A. carbonarius* com diferentes adjuvantes é visualizado na Figura 14. A coloração marrom dos pós é devido ao uso do chá verde como substrato sólido para o cultivo do fungo e produção de tanase. O uso dos adjuvantes β -ciclodextrina e farinha de soja proporcionaram obtenção de partículas com tamanhos e formatos diferentes. Com lactose, amido Capsul[®] e maltodextrina foram visualizadas

partículas arredondadas.

Figura 14 - Aspectos macro e microscópicos dos produtos secos com diferentes adjuvantes obtidos do processo de *spray dryer* da tanase de *A. carbonarius*. A) β -ciclodextrina; B) amido Capsul[®] A; C) amido Capsul[®] B; D) Farinha de soja; E) Lactose; F) Maltodextrina.



Fonte: Autora (2021).

Segundo Libardi et al. (2020), os pós obtidos do processo de secagem em *spray dryer* podem assumir formas e estruturas distintas de acordo com as condições de secagem. No presente estudo morfologias diferentes foram observadas de acordo com as tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* e conforme o adjuvante empregado. Por exemplo, o uso de β -ciclodextrina permitiu

obtenção de partículas arredondas para o produto seco de *A. ochraceus*, no entanto formas variadas foram observadas na presença deste mesmo adjuvante para as tanases de *A. phoenicis*, *A. fumigatus* CAS21 e *A. carbonarius*. O pó contendo a enzima de *A. niger* ANG18 apresentou formas arredondas utilizando os adjuvantes amido Capsul[®], farinha de soja e maltodextrina. Por outro lado, foi visivelmente amorfo em β -ciclodextrina. Constatação semelhante foi relatada por Abdel-Mageed et al. (2019). De acordo com os autores três tipos de morfologias foram observados para α -amilase seca com TweenRV80, sacarose e Pluronic F127. Costa-Silva et al. (2014) visualizaram formatos diferentes para a lipase seca com lactose, maltodextrina e β -ciclodextrina, sendo que as partículas foram amorfas neste último adjuvante. Gonçalves et al. (2013a) descreveram que a β -frutofuranosidase seca em amido Capsul[®] apresentou partículas amorfas, distinguindo-se da forma arredonda observada para a enzima seca com trealose.

Partículas arredondadas e aglomeradas, similares às relatadas para o produto seco contendo tanase, também foram visualizadas para peptidases de *A. niger* (CABRAL et al., 2017) e para o complexo lisozima/pectina (AMARA et al., 2016), ambos secos com maltodextrina. Na secagem de celulase, a concentração de maltodextrina e a temperatura de entrada influenciaram significativamente a morfologia das partículas, que foram visivelmente arredondadas na presença de 12,5% de maltodextrina na temperatura de processo de 150 °C (LIBARDI et al., 2020). Deste modo, a morfologia pode ser alterada e manipulada de acordo com o desejado para o produto final.

4.1.2.2 *Análise espectrométrica em FTIR dos produtos secos contendo tanase*

Os grupos químicos presentes nas estruturas das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* foram avaliados por FTIR para verificar possíveis mudanças após o processo secagem. Os picos de absorção referentes à tanase solúvel e presente nos produtos secos, utilizando diferentes adjuvantes, podem ser visualizados a partir dos espectros do FTIR. Na Figura 15 verifica-se que os espectros de infravermelho apresentaram picos semelhantes nas regiões de 3300,

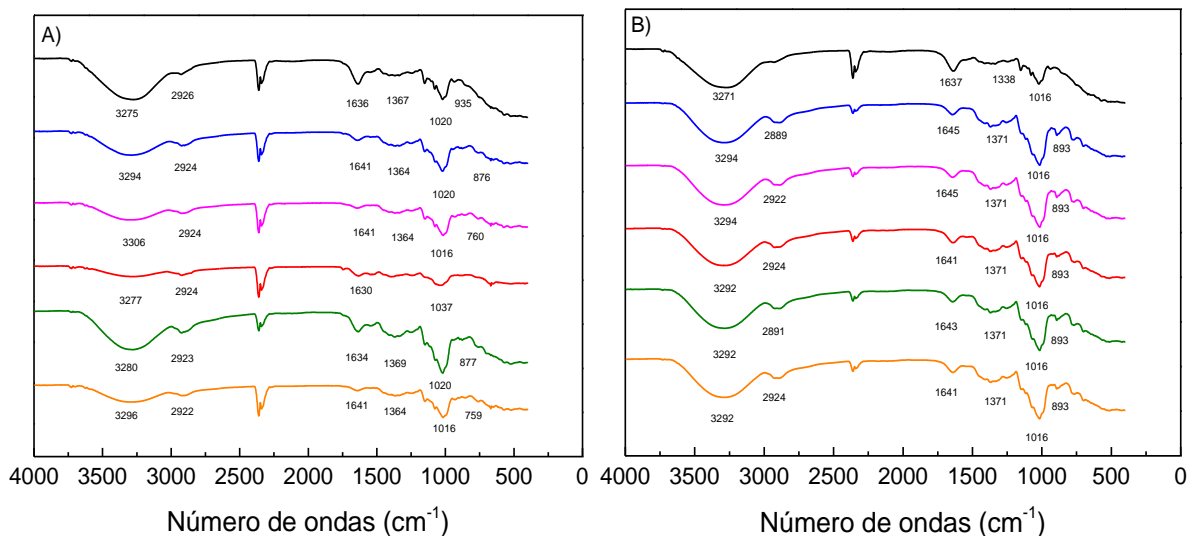
1630-1640, 1360 e 1020 cm^{-1} (para visualização mais detalhada verificar Apêndice B).

Bandas características encontradas nos espectros de enzimas incluem a Amida I e Amida II. A absorção associada à Amida I leva a vibrações de estiramento da ligação C = O, enquanto que absorção associada à amida II leva a vibrações dobradas da ligação N-H. Nos espectros da tanase solúvel e dos produtos secos contendo tanase verifica-se uma banda larga e, especificamente, no caso das tanases solúveis e secas na presença de lactose, alongada na região entre 3330 e 3270 cm^{-1} , que indica combinação de vibração de alongamento de (N-H) (Amida II) e (O-H) (moléculas de água). A frequência da amida I é exibida nos picos aproximadamente a 1630 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} , correspondentes às vibrações das ligações C=O e C-N, respectivamente (WU et al., 2016), com picos menores e mais fracos comparados a Amida II. Os espectros da tanase solúvel e seca também apresentaram picos na região próxima a 1020 cm^{-1} , atribuídos à ligação C-O de ésteres. As regiões dos picos atribuídas a tanase relatadas na pesquisa foram descritas também para a enzima produzida por *A. ficuum* (LAROSA et al., 2018; ONG; ANNUAR, 2018), *A. tubingensis* CICC 2651 (WU et al., 2016), *A. nidulans* (HIDAYATHULLA et al., 2018), *Serratia marcescens* IMBL5 (THIYONILA et al., 2020) e *Talaromyces verruculosus* (AHARWAR; PARIHAR, 2021). Por exemplo, Thiyonila et al. (2020) descreveram que a tanase purificada de *S. marcescens* IMBL5 apresentou picos de absorção a 3435, 1600, 1408 e 1020 cm^{-1} . Aharwar e Parihar (2021) observaram picos nas regiões de 3328,36, 1625,57, 1383,03 e 1032,97 cm^{-1} nos espectros de infravermelho da tanase de *T. verruculosus*.

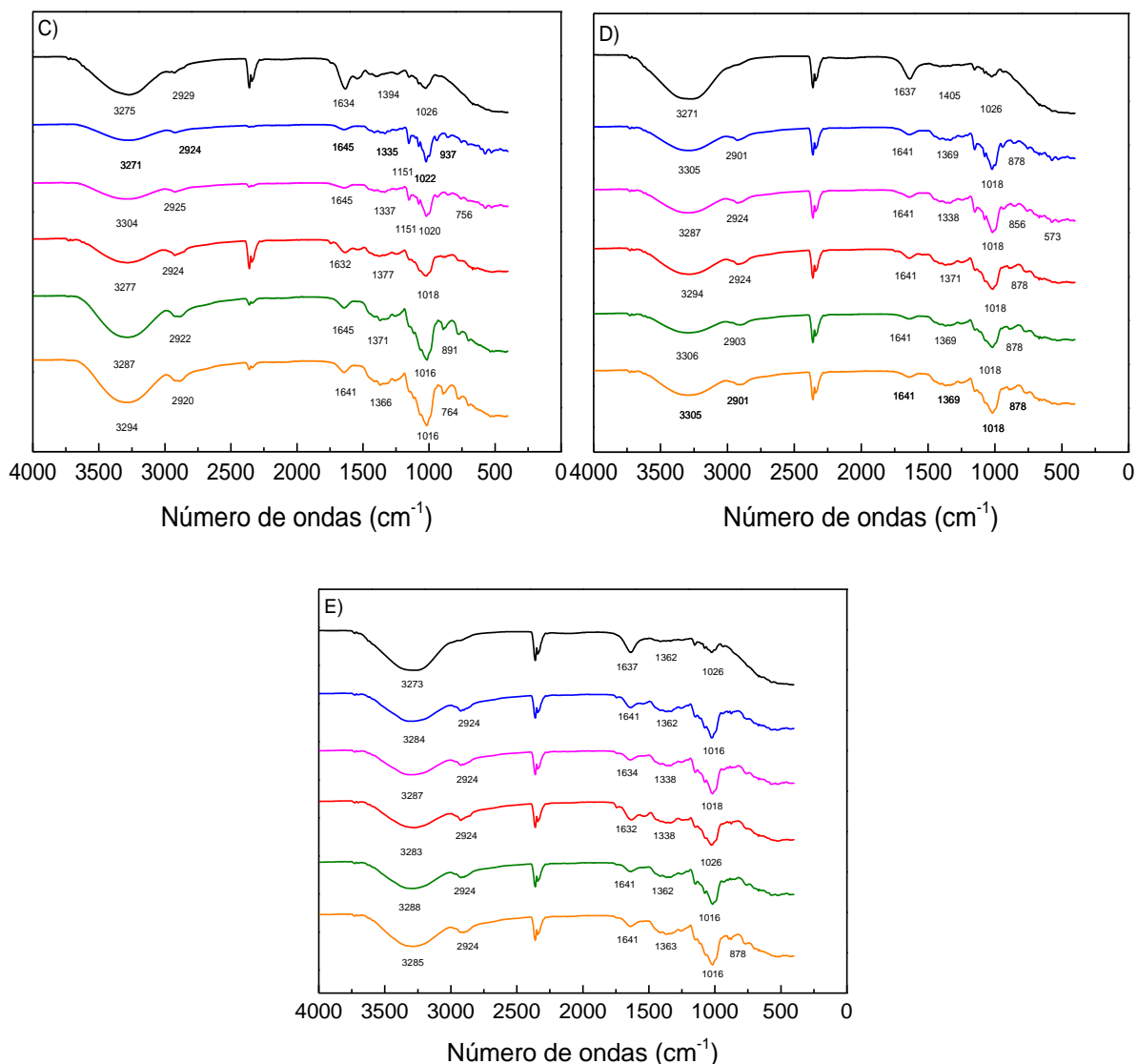
A similaridade entre os espectros de FTIR obtidos para a enzima solúvel e as tanases secas explica a manutenção da atividade enzimática nos produtos secos após processo de secagem em *spray dryer* (Tabela 2), sendo observadas, em alguns casos, apenas diferenças nas intensidades dos picos. Por exemplo, verifica-se que a intensidade na região 1020 cm^{-1} aumenta consideravelmente nos produtos secos, enquanto que no pico próximo a 3300 e 1630 cm^{-1} diminuiu. De acordo com Zhang et al. (2018b), as alterações na intensidade ou pequenas variações de deslocamento podem indicar uma reorganização estrutural, possivelmente por causa da desidratação ou da interação da enzima com o adjuvante.

A interação da tanase com os adjuvantes é evidente quando se observa picos característicos desses compostos³ presentes nos espectros da tanase seca e ausentes na enzima solúvel. Por exemplo, os adjuvantes apresentaram espectros com bandas nas regiões 2920, 900 e 500 cm^{-1} que, posteriormente, foram identificados nos espectros apenas das tanases secas. Adicionalmente, os espectros dos adjuvantes exibiram banda na região de 1020 cm^{-1} , que também é característica da tanase solúvel. Por sua vez, nos produtos secos, essa banda é majoritariamente maior comparada a tanase solúvel, possivelmente devido a interação da enzima com os adjuvantes.

Figura 15 - Espectros de FTIR característicos das tanases de *A. phoenicis* (A), *A. ochraceus* (B), *A. fumigatus* CAS21 (C), *A. niger* ANG18 (D) e *A. carbonarius* (E) nas formas solúveis (—) e secas em *spray dryer* na presença de β -ciclodextrina (—), amido Capsul® (—), farinha de soja (—), lactose (—) e maltodextrina (—)



³ Verificar Apêndice A – Espectros de infravermelho dos adjuvantes utilizados nos processos de secagens.



Fonte: Autora (2021).

4.1.3 Caracterização enzimática dos produtos secos contendo tanase

A temperatura e o pH de atuação das enzimas, assim como a estabilidade, influenciam a definição dos parâmetros de processo para sua aplicação industrial (SATO et al., 2014). Portanto, os pós secos contendo as tanases de *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21 e *A. niger* ANG18 foram caracterizados quanto a atividade enzimática em função da temperatura e do pH de reação, estabilidade térmica e ao pH. A partir deste ponto, o pó seco contendo a tanase de *A. carbonarius* não foi caracterizado por apresentar instabilidade da atividade enzimática após instantes iniciais de armazenamento.

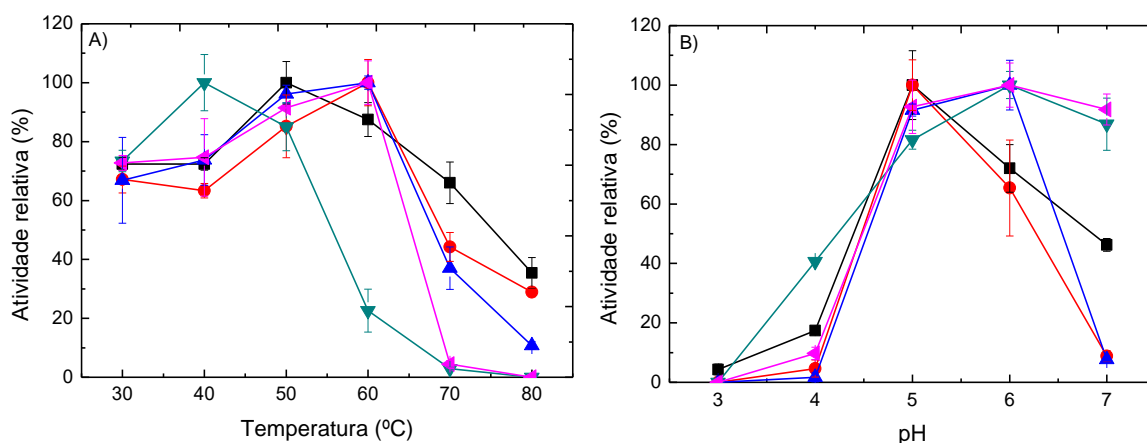
4.1.3.1 Caracterização da atividade enzimática da tanase produzida por *A. phoenicis*

Para prosseguimento da pesquisa foram selecionados os produtos secos de *A. phoenicis* que apresentaram atividade enzimática superior a 50%: β -ciclodextrina (102,51%), amido modificado Capsul[®] (82,71%), lactose (70,17%) e maltodextrina (92%).

Os perfis de atividade enzimática da tanase (solúvel e seca) de *A. phoenicis* em função da temperatura e pH de reação estão apresentados na Figura 16. A maior atividade tanásica para a enzima solúvel foi observada a 50 °C. A secagem com os adjuvantes β -ciclodextrina, amido modificado Capsul[®] e maltodextrina promoveu a obtenção de um produto com maior atividade a 60 °C. Por outro lado, a tanase seca na presença de lactose apresentou maior atividade na temperatura de 40 °C e declínio em temperaturas mais elevadas, chegando a zero a 70 °C.

Com relação ao pH, verifica-se que a tanase de *A. phoenicis* na forma solúvel e seca atua em uma faixa estreita de pH. A enzima solúvel e a presente no produto seco com β -ciclodextrina apresentaram maior atividade no pH 5,0, enquanto na presença de amido Capsul[®] a atividade enzimática foi maior no pH 6,0. Por outro lado, a enzima seca com lactose e maltodextrina atuou na faixa de pH mais ampla, com maior atividade entre o pH 5,0 e 7,0.

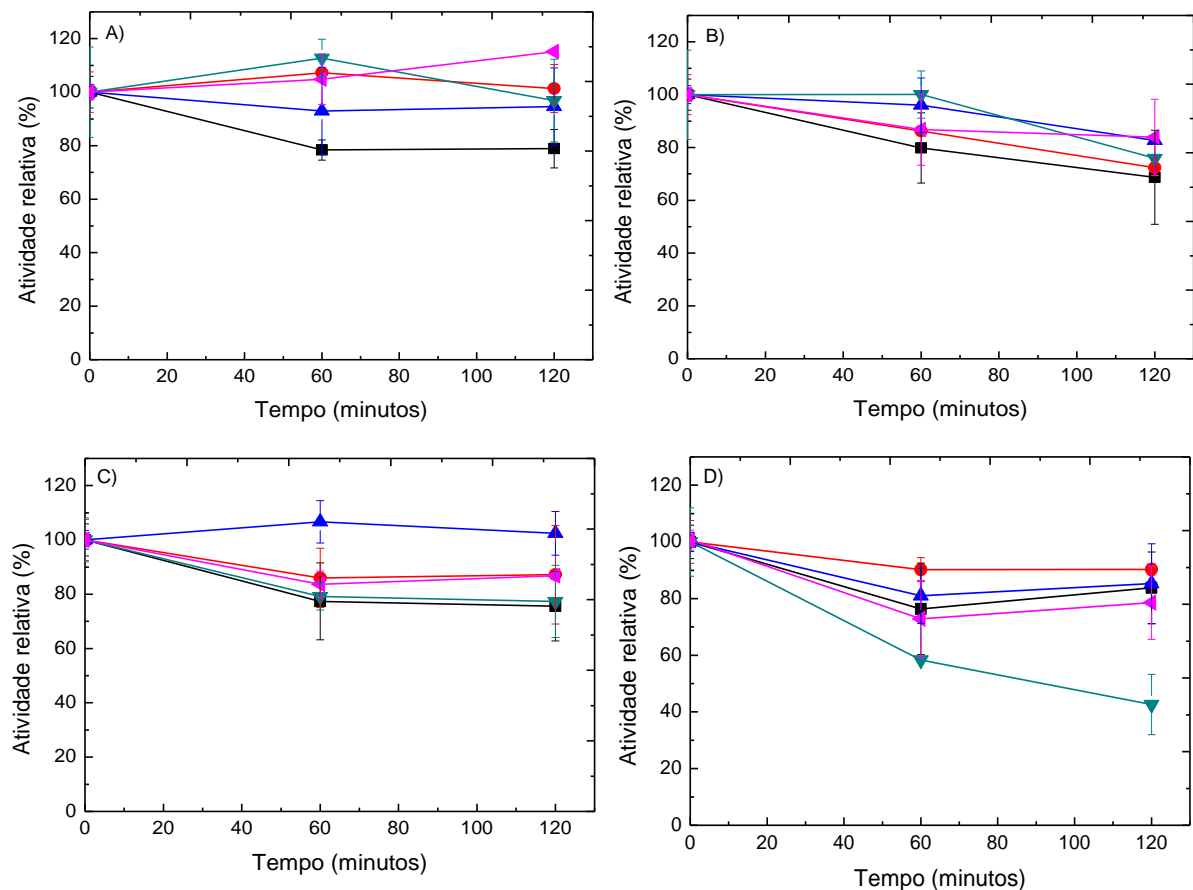
Figura 16 - Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade da tanase produzida por *A. phoenicis* para as formas solúvel (■) e seca com β -ciclodextrina (●), amido modificado Capsul[®] (▲), lactose (▼) e maltodextrina (◄).



Fonte: Autora (2021).

O perfil da estabilidade enzimática dos produtos secos nas temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C é apresentada na Figura 17. A tanase solúvel perdeu cerca de 20% de atividade após incubação por 120 min em todas as temperaturas analisadas. A enzima seca com β -ciclodextrina, amido Capsul[®], lactose e maltodextrina apresentou estabilidade térmica a 30 °C, preservando a atividade inicial por 120 min. É importante ressaltar que a tanase seca com amido Capsul[®] manteve-se estável também nas temperaturas de 40 °C e 50 °C. A enzima seca com lactose perdeu cerca de 40% da atividade inicial quando incubada por 60 min a 60 °C. Os demais produtos permaneceram com atividade superior a 72% nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C por 120 min.

Figura 17 - Estabilidade térmica a 30 °C (A), 40 °C (B), 50 °C (C) e 60 °C (D) da tanase produzida por *A. phoenicis* para as formas solúvel (■) e seca em *spray dryer* na presença de β -ciclodextrina (●), amido modificado Capsul[®] (▲), lactose (▼) e maltodextrina (◄)

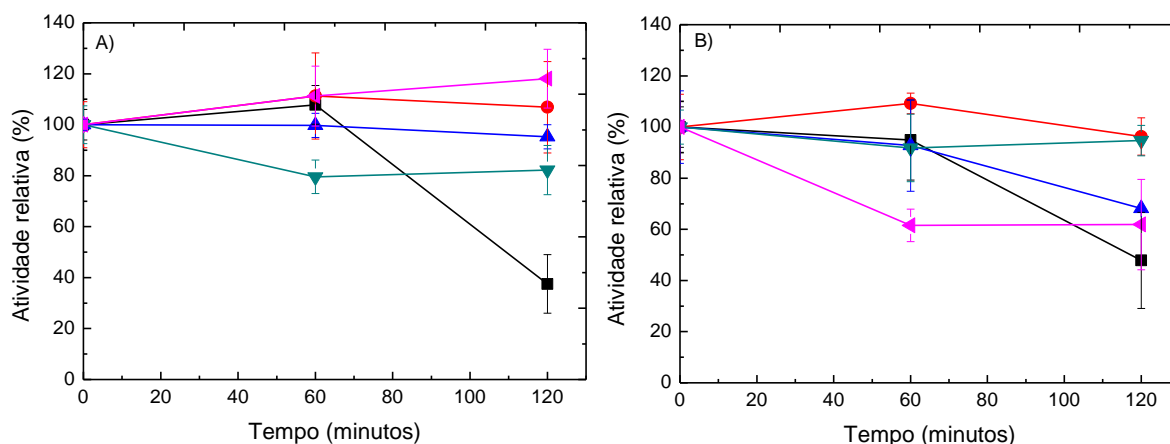


Fonte: Autora (2021).

O uso dos adjuvantes no processo de secagem proporcionou melhorias na estabilidade da tanase frente ao pH 5,0 e 6,0 por 120 min de incubação, comparado

com a forma solúvel. Na Figura 18 observa-se que a atividade enzimática foi preservada para as enzimas secas com os adjuvantes β -ciclodextrina e amido modificado Capsul[®] no pH 5,0 por 120 min. Diferentemente, a tanase solúvel teve atividade reduzida após 60 min quando incubada no pH 5,0 e 6,0. A enzima seca com β -ciclodextrina e lactose foi estável no pH 6,0 durante o período analisado, mantendo sua atividade inicial. Na presença de amido Capsul[®] e maltodextrina a atividade foi reduzida cerca de 30% e 40% após 120 min, respectivamente.

Figura 18 - Estabilidade ao pH 5,0 (A) e pH 6,0 (B) para a da tanase produzida por *A. phoenicis* na forma solúvel (■) e seca em *spray dryer* na presença de β -ciclodextrina (●), amido modificado Capsul[®] (▲), lactose (▼) e maltodextrina (◄)



Fonte: Autora (2021).

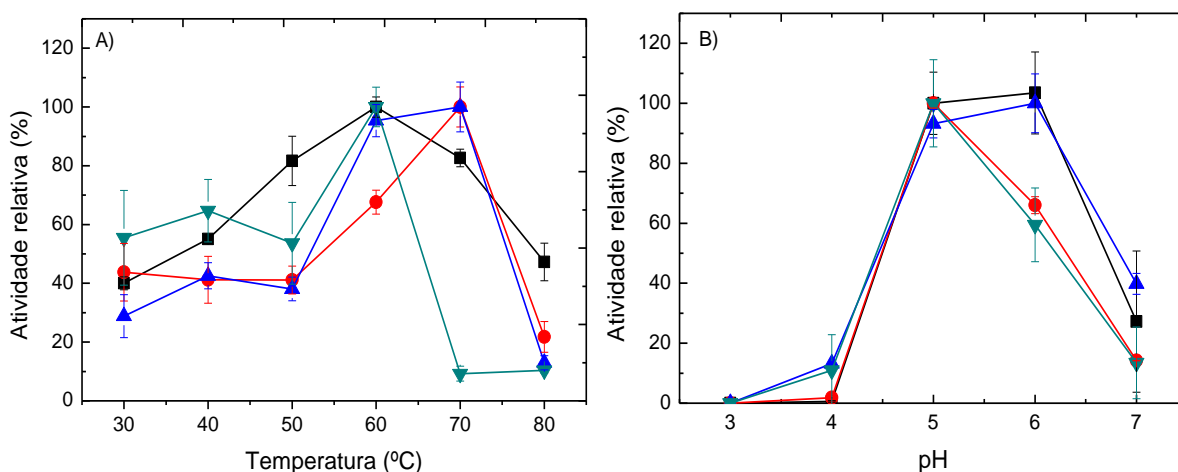
4.1.3.2 Caracterização da atividade enzimática da tanase produzida por *A. ochraceus*

Os produtos secos contendo a tanase produzida por *A. ochraceus* obtidos na presença de β -ciclodextrina (98,45%), amido modificado Capsul[®] (105,67%) e lactose (57,80%) foram caracterizados por preservarem a atividade enzimática acima de 50%. O efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da enzima solúvel e seca de *A. ochraceus* é visualizado na Figura 19. A tanase solúvel exibiu maior atividade enzimática a 60 °C. Observa-se que para as formas secas, as temperaturas de maior atividade variaram de acordo com o adjuvante usado no processo de secagem. A tanase presente no produto seco com lactose manteve temperatura de reação similar à forma solúvel (60 °C), já na presença de β -

ciclodextrina apresentou maior atividade a 70 °C e com amido Capsul® na faixa de 60 a 70 °C.

Com relação ao perfil de atividade em função do pH, a tanase de *A. ochraceus* atuou em uma faixa estreita, com atividade enzimática variando entre o pH 5,0 e 6,0. As enzimas solúvel e presente no produto seco com amido Capsul® apresentou maior atividade na faixa de pH 5,0 a 6,0, enquanto que a mudança de pH 5,0 para 6,0 provocou declínio da atividade nos produtos secos com β -ciclodextrina e lactose.

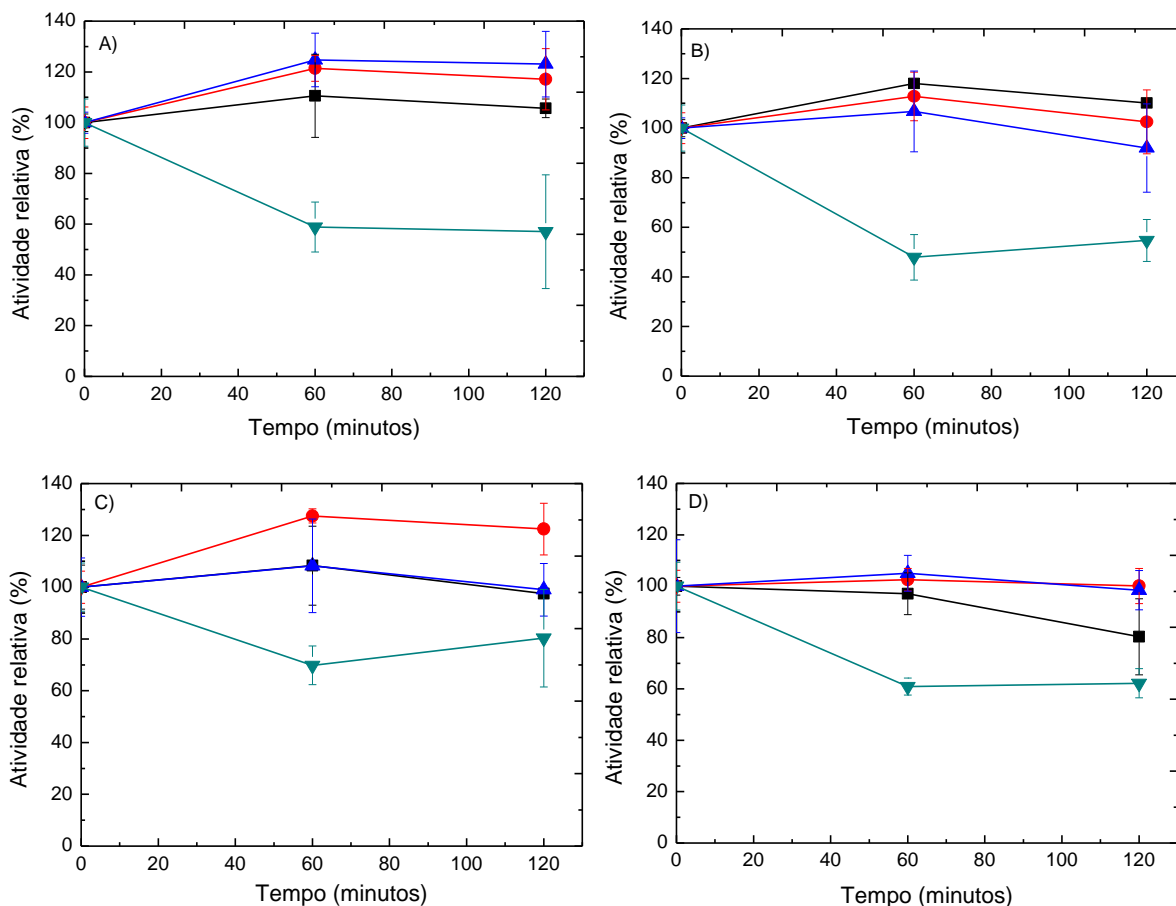
Figura 19 - Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade da tanase produzida por *A. ochraceus* para as formas solúvel (■) e seca com β -ciclodextrina (●), amido modificado Capsul® (▲) e lactose (▼)



Fonte: Autora (2021).

Com relação ao perfil de estabilidade térmica, verifica-se na Figura 20 que a tanase solúvel manteve-se estável a 30 °C, 40 °C e 50 °C por 120 min. Na temperatura de 60 °C foi observada redução de 20% na atividade enzimática após 120 min de incubação. Em contrapartida, a enzima presente no produto seco com β -ciclodextrina e amido Capsul® foi totalmente estável em todas as temperaturas analisadas. Comportamento diferente foi observado para tanase seca na presença de lactose, visto que a atividade foi reduzida quando incubada por 60 min em todas as temperaturas.

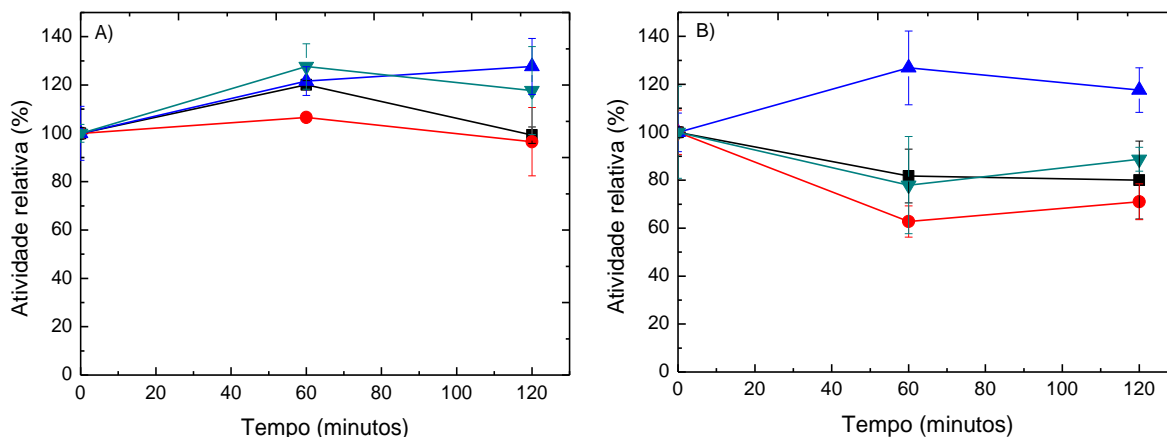
Figura 20 - Estabilidade térmica em (A) 30 °C, (B) 40 °C, (C) 50 °C, e (D) 60 °C da tanase produzida por *A. ochraceus* para as formas solúvel (■) e seca em *spray dryer* na presença de β -ciclodextrina (●), amido modificado Capsul[®] (▲) e lactose (▼)



Fonte: Autora (2021).

Na estabilidade ao pH (Figura 21), observa-se que a tanase seca, assim como a forma solúvel, foram totalmente estáveis por 120 min no pH 5,0. No entanto, quando considerado o pH 6,0 visualizou-se redução superior a 20% da atividade a 60 min para a enzima seca com os adjuvantes β -ciclodextrina e lactose, enquanto a atividade enzimática da tanase seca com o amido Capsul[®] foi totalmente estável no pH 6,0 por todo o período analisado.

Figura 21 - Estabilidade ao pH 5,0 (A) e pH 6,0 (B) para a tanase produzida por *A. ochraceus* nas formas solúvel (■) e seca em *spray dryer* na presença β -ciclodextrina (●), amido modificado Capsul® (▲) e lactose (▼)



Fonte: Autora (2021).

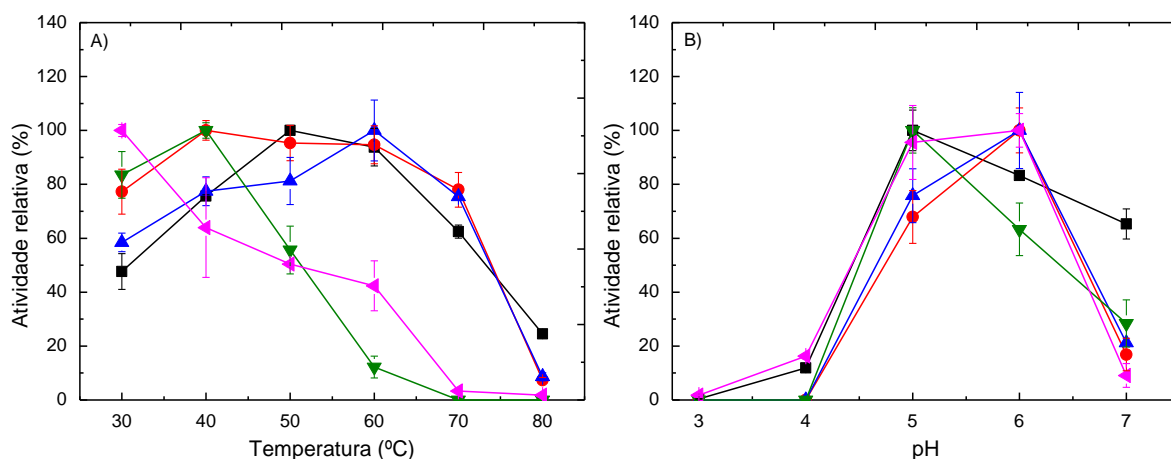
4.1.3.3 Caracterização da atividade enzimática da tanase produzida por *A. fumigatus* CAS21

Estatisticamente os produtos secos de *A. fumigatus* CAS21 com maltodextrina A e B não diferem entre si com relação à atividade enzimática (Tabela 2) e, portanto, foram reunidos e caracterizados bioquimicamente, assim como os pós obtidos com β -ciclodextrina, amido modificado Capsul® e lactose que apresentaram atividade relativa acima de 50%.

A Figura 22 apresenta a influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da tanase solúvel e seca. Com relação ao efeito da temperatura, a tanase solúvel de *A. fumigatus* CAS21 apresentou maior atividade a 50 °C e 60 °C, enquanto para os produtos secos as máximas atividades variaram de acordo com o adjuvante empregado no processo de secagem. Observa-se que a tanase seca com β -ciclodextrina apresentou maior atividade enzimática na faixa de 40 °C a 60 °C e com amido modificado Capsul® a 70 °C. Para as enzimas secas com maltodextrina e lactose as maiores atividades foram observadas em temperaturas mais brandas, de 30 °C e 40 °C, respectivamente. Nesses adjuvantes, temperaturas mais elevadas ocasionaram diminuição da atividade da tanase, com perda total da atividade a 80 °C.

O efeito do pH na atividade enzimática foi similar para a tanase solúvel e seca com lactose, com maior atividade no pH 5,0, em faixas superiores ocorreu a diminuição da atividade tanásica (Figura 23 B). A enzima presente nos produtos com β -ciclodextrina, amido Capsul[®] e maltodextrina apresentou comportamento semelhante, visto que a maior atividade foi observada no pH 6,0. Destaca-se que em todos os produtos secos as atividades enzimáticas foram drasticamente reduzidas no pH 7,0.

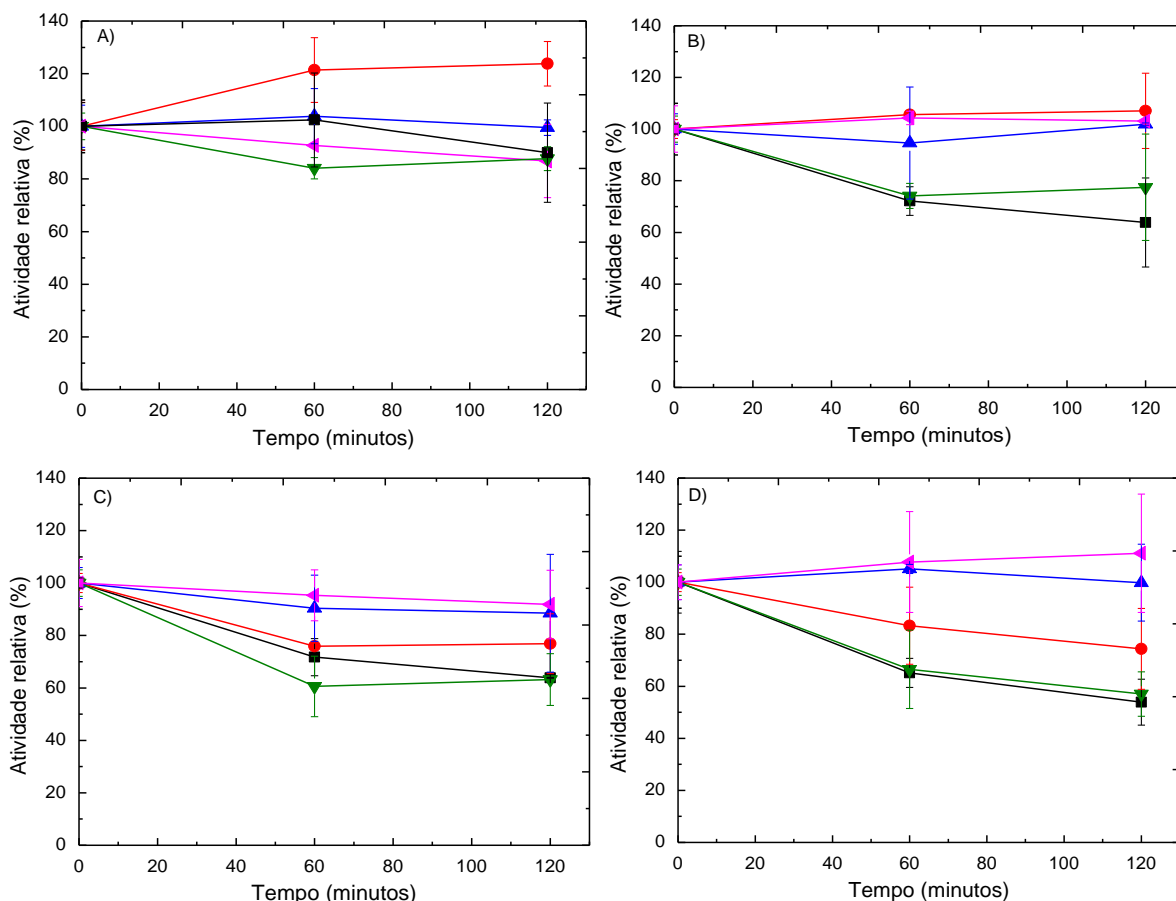
Figura 22 - Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade da tanase produzida por *A. fumigatus* CAS21 para as formas solúvel (■) e seca com β -ciclodextrina (●), amido modificado Capsul[®] (▲), lactose (▼) e maltodextrina (◄)



Fonte: Autora (2021).

Considerando a estabilidade térmica, pode-se observar que a enzima solúvel e a presente nos produtos secos permaneceram estáveis a 30 °C por 120 min (Figura 23). Na forma solúvel observou-se uma redução em torno de 30% na atividade quando incubada a 40 °C, 50 °C e 60 °C no instante de 120 min. Por outro lado, a enzima seca com β -ciclodextrina manteve-se estável também a 40 °C por 120 min, e manteve cerca de 80% de sua atividade inicial a 50 °C e 60 °C. A tanase contida nos produtos secos com amido Capsul[®] e maltodextrina foram estáveis em todas as temperaturas durante 120 min, enquanto que com lactose teve sua atividade reduzida nas temperaturas de 40 °C, 50 C e 60 °C com 60 min de incubação.

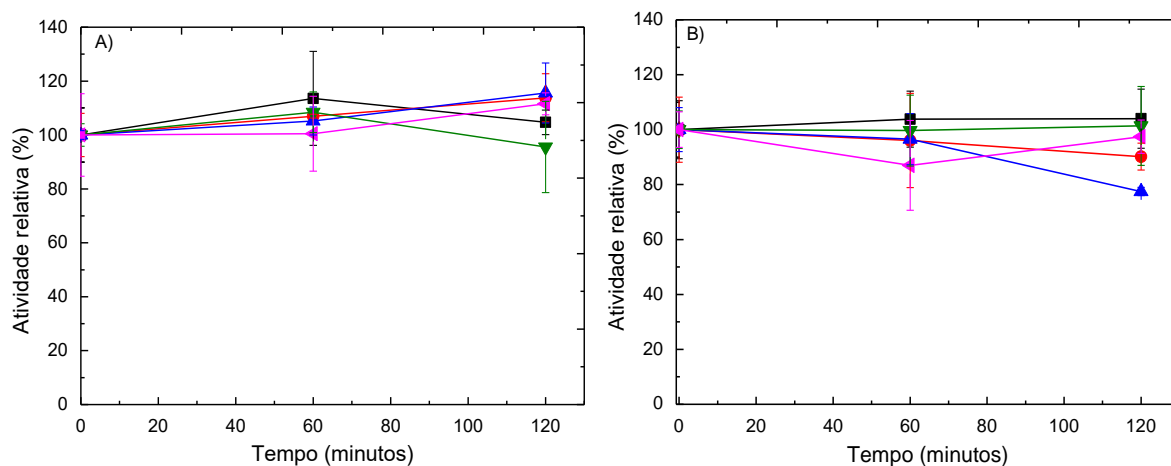
Figura 23 - Estabilidade térmica a 30 °C (A), 40 °C (B), 50 °C (C) e 60 °C (D) da tanase de *A. fumigatus* CAS21 para as formas solúvel (■) e seca em *spray dryer* na presença de β-ciclodextrina (●), amido modificado Capsul® (▲), lactose (▼) e maltodextrina (◄)



Fonte: Autora (2021).

Na Figura 24 podem ser observados os perfis de estabilidade enzimática nos pH 5,0 e 6,0 por 120 min de incubação. A tanase solúvel e a contida nos produtos secos foram estáveis nos valores de pH analisados por 120 min, exibindo comportamentos semelhantes. Apenas foi observada uma redução (-20%) na atividade enzimática para a tanase seca com amido modificado Capsul® em pH 6,0 após 120 min.

Figura 24 - Estabilidade ao pH 5,0 (A) e 6,0 (B) da tanase de *A. fumigatus* CAS21 para as formas solúvel (■) e seca em *spray dryer* na presença de β -ciclodextrina (●), amido modificado Capsul® (▲), lactose (▼) e maltodextrina (◄)



Fonte: Autora (2021).

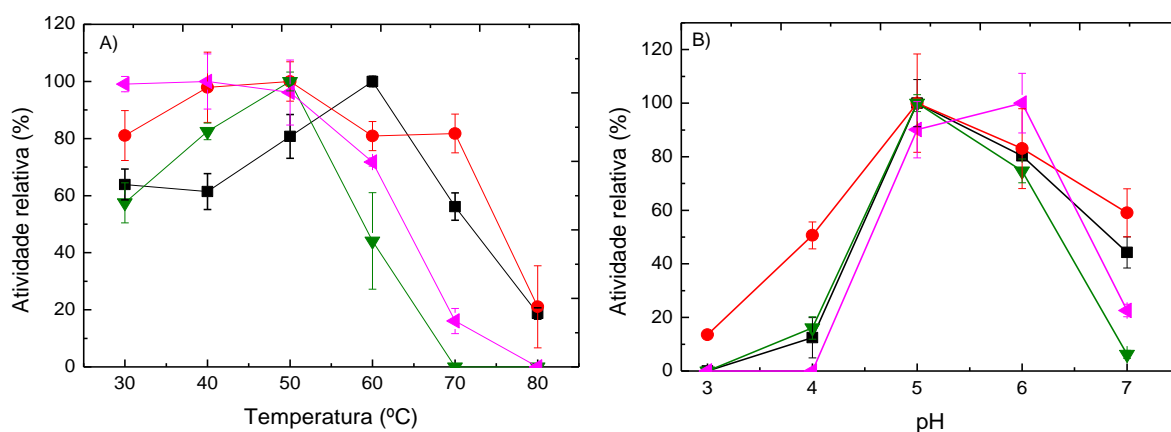
4.1.3.4 Caracterização da atividade enzimática da tanase produzida por *A. niger* ANG18

Assim como observado para secagem da tanase de *A. fumigatus* CAS21, uma porção do produto seco com maltodextrina contendo tanase de *A. niger* ANG18 ficou retida no ciclone, sendo coletada separadamente e denominada de maltodextrina B. No entanto, com relação à atividade enzimática, verificou-se que as amostras A e B são estatisticamente iguais (Tabela 2). Deste modo, foram reunidas e, assim como os pós que preservaram atividade enzimática superior a 50%, foram caracterizados quanto ao efeito da temperatura e pH, e estabilidade. Portanto, foram selecionados os produtos secos com β -ciclodextrina (115,87%), lactose (73,88%) e maltodextrina (54,75%).

Os perfis de atividade tanásica para a enzima solúvel e seca em função da temperatura e do pH podem ser visualizados na Figura 25. Observa-se que na forma solúvel e seca com lactose a enzima exibiu maior atividade enzimática a 60 °C e 50 °C, respectivamente. Nos produtos com β -ciclodextrina e maltodextrina as máximas atividades foram observadas na faixa de temperatura entre 30 °C e 50 °C. Constatou-se também que o aumento para 70 °C e 80 °C para a enzima contida no pó com lactose e maltodextrina, respectivamente, ocasionou a perda total da atividade enzimática.

Em relação ao pH, verifica-se que a tanase de *A. niger* ANG18 atuou em uma faixa estreita. Para a enzima solúvel e seca utilizando β -ciclodextrina e lactose como adjuvantes, as maiores atividades foram observadas no pH 5,0, e com maltodextrina no pH 6,0. O aumento do pH provocou o declínio drástico da atividade enzimática para tanase presente nos produtos secos com lactose e maltodextrina.

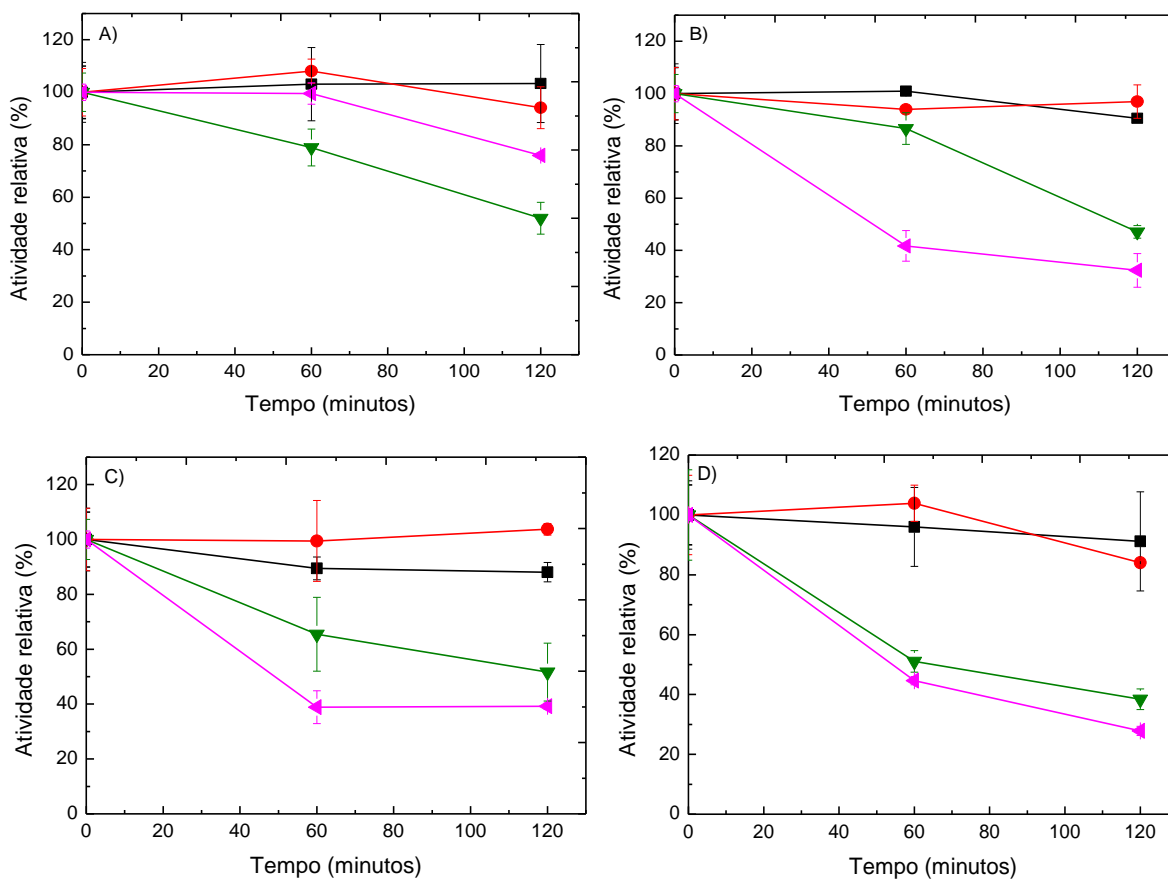
Figura 25 - Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade da tanase produzida por *A. niger* ANG18 para as formas solúvel (■) e seca com β -ciclodextrina (●), lactose (▼) e maltodextrina (◄)



Fonte: Autora (2021).

Os perfis de estabilidade térmica nas temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C são apresentados na Figura 26. A enzima solúvel e a presente no produto seco com β -ciclodextrina apresentaram comportamentos semelhantes, sendo estáveis nas temperaturas analisadas por 120 min. Entretanto, no produto seco com lactose observou-se declínio da atividade tanásica em todas as temperaturas após 120 minutos de incubação. A 30 °C a tanase seca com maltodextrina manteve 76% da sua atividade inicial por 120 minutos. No entanto, nas demais temperaturas (40 °C, 50 °C e 60 °C) sua atividade foi drasticamente reduzida após incubação por 60 minutos.

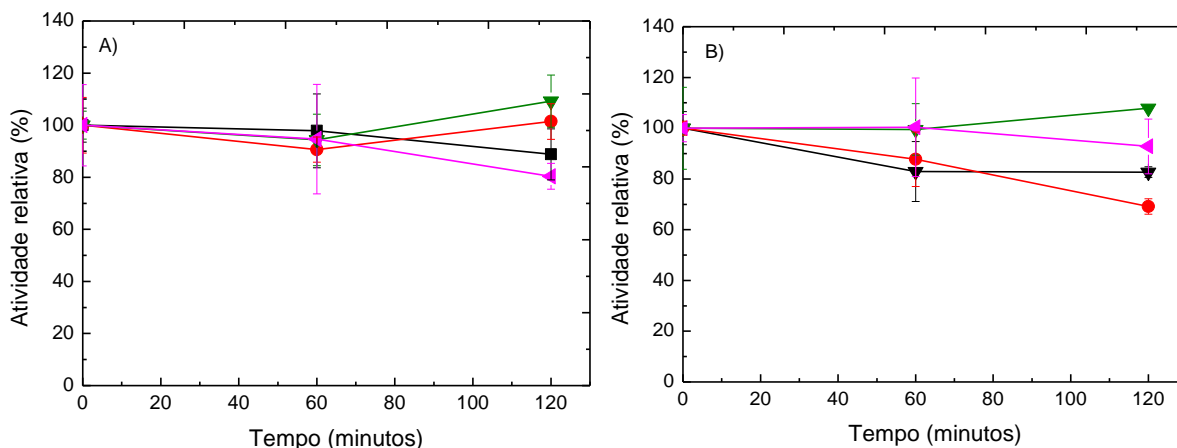
Figura 26 - Estabilidade térmica a 30 °C (A), 40 °C (B), 50 °C (C) e 60 °C (D) da tanase de *A. niger* ANG18 para as formas solúvel (■) e seca com β-ciclodextrina (●), lactose (▼) e maltodextrina (◄)



Fonte: Autora (2021).

Na estabilidade ao pH da tanase de *A. niger* ANG18 verifica-se, na Figura 27, que a enzima solúvel e a presente nos produtos secos com β-ciclodextrina e lactose foram estáveis no pH 5,0 por 120 min. No pH 6,0 a enzima seca com lactose e maltodextrina foi estável por 120 min de incubação, enquanto o produto seco com β-ciclodextrina teve atividade enzimática reduzida cerca de 30% se comparada a atividade inicial neste mesmo período.

Figura 27 - Estabilidade ao pH 5,0 (A) e pH 6,0 (B) para a da tanase produzida por *A. niger* ANG18 na forma solúvel (■) e seca com β -ciclodextrina (●), lactose (▼) e maltodextrina (◄)



Fonte: Autora (2021).

As interações entre a enzima e os adjuvantes utilizados no processo de secagem em *spray dryer* influenciam características como temperatura e pH de atividade, assim como a estabilidade (SATO et al., 2014). Além da interação adjuvante-enzima, segundo Hamin Neto, Freitas e Cabral (2014), o método de secagem, as variáveis do processo e as propriedades do adjuvante também exercem influências nas características e na estabilidade enzimática. Deste modo, podem ser observadas diferenças nas características da mesma enzima de acordo com o adjuvante empregado, como verificado nesta pesquisa.

As tanases microbianas são caracterizadas por apresentarem temperaturas ideais de atividade entre 30 °C e 60 °C e são, geralmente, enzimas ácidas, com maior atividade no pH em torno de 5,0-6,0 (KUMAR et al., 2018; YAO et al., 2014b). Riul et al. (2013) descreveram tanase purificada de *A. phoenicis* com maior atividade a 60 °C e pH 5,5, e estabilidade térmica em 40 °C e 50 °C por 60 min. Por outro lado, esta mesma enzima seca, como descrito neste estudo, exibiu características diferentes de acordo com o adjuvante empregado no processo de secagem. Ressalta-se que os produtos contendo tanase seca na presença de β -ciclodextrina e amido modificado Capsul[®] proporcionaram estabilidade superior quando comparada a tanase purificada (RIUL et al., 2013), com manutenção da atividade enzimática a 50 °C e 60 °C por 120 min.

A tanase purificada de *A. ochraceus* apresentou maior atividade na faixa de temperatura de 30 a 45 °C, e no pH 5,5, e estabilidade a 40 °C, 50 °C e 60 °C por 60 min (GONÇALVES et al., 2012). Diferentemente, esta mesma enzima seca na

presença de amido modificado Capsul[®] e β -ciclodextrina apresentou máxima atividade entre 60 °C - 70 °C e permaneceu estável nas temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C por 120 min, exibindo, portanto, maior resistência térmica comparada com a forma solúvel descrita por Gonçalves et al. (2012). Cavalcanti, Jorge e Guimarães (2018) descreveram a tanase purificada de *A. fumigatus* CAS21 com maior atividade na temperatura de 30 a 40 °C e no pH 5,0, além de estabilidade a 30 °C por 60 min. No presente estudo, a tanase de *A. fumigatus* CAS21 seca com amido modificado Capsul[®] e β -ciclodextrina exibiu características diferentes das descritas na literatura para a forma purificada. As temperaturas de atividade foram superiores, com a enzima seca atuando entre 40 °C - 70 °C e estabilidade térmica por 120 min nas temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C.

Outras enzimas secas pelo processo de *spray drying* apresentaram características bioquímicas superiores às encontradas para sua forma solúvel, como observado para as enzimas fitase seca com farinha de soja (SATO et al., 2014), β -frutofuronosidase seca com maltodextrina, β -ciclodextrina, trealose e celulose (GONÇALVES et al., 2013a) e tripsina seca na presença de trealose (ZHANG et al., 2018b). Abdel-Mageed et al. (2019) relataram que a estabilidade térmica das enzimas na forma sólida é melhorada devido à evaporação da água, o que proporciona maior rigidez na estrutura da enzima, uma vez que a presença de água pode proporcionar degradações químicas, físicas e biológicas. Outra hipótese é que carboidratos, utilizados como adjuvantes, substituem as ligações de hidrogênio da água com a enzima, formando uma matriz vítrea que impede o contato direto da enzima com o meio externo (GONÇALVES et al., 2013a).

4.1.4 Estabilidade ao armazenamento das tanases secas

A secagem em *spray dryer* é uma alternativa para minimizar os efeitos negativos da umidade presente nas soluções aquosas, como instabilidade ao armazenamento por longos períodos (HAMIN NETO et al., 2014). Portanto, a tanase solúvel e a presente nos produtos secos foram ensaiadas quanto a manutenção das atividades enzimáticas após 1 ano de armazenamento. Na Tabela 4 verifica-se que as atividades das tanases presentes no meio aquoso foram reduzidas em todos os casos. A 28 °C a atividade foi completamente perdida para as enzimas de *A. phoenicis* e *A. carbonarius* e reduzida cerca de 90% para as amostras de *A.*

fumigatus CAS21 e *A. ochraceus*. Na temperatura de 4 °C as tanases de *A. phoenicis* e *A. carbonarius* mantiveram apenas 19,57% e 26,50% da atividade, respectivamente. Além disso, foi possível visualizar crescimento microbiano nas amostras estocadas a 28 °C e partículas sólidas aglomeradas naquelas mantidas a 4 °C. Possivelmente, a perda de atividade nestes casos foi provocada pela presença de água nos extratos enzimáticos. De acordo com Libardi et al. (2020), moléculas de água facilitam modificações químicas na estrutura da proteína durante o armazenamento, o que acarreta em perda da atividade enzimática, além de favorecer a contaminação microbiana como aqui relatada. Conseqüentemente, produtos secos são frequentemente desenvolvidos para proporcionar maior estabilidade ao armazenamento (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

Tabela 4 - Estabilidade da atividade enzimática das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* na forma líquida e seca em diferentes adjuvantes após armazenamento por 1 ano a 4 °C e 28 °C

Adjuvantes (10% m/v)	Atividade relativa (%)	
	28 °C	4 °C
<i>Aspergillus phoenicis</i>		
Solúvel	0	19,57 ± 3,7
β-ciclodextrina	125,45 ± 7,2	122,98 ± 2,4
Amido Capsul®	91,29 ± 13,1	149,54 ± 6,6
Farinha de soja	80,50 ± 4,1	88,98 ± 7,8
Lactose	114,78 ± 1,8	151,48 ± 3,9
Maltodextrina	83,07 ± 2,6	128,25 ± 10,3
<i>Aspergillus ochraceus</i>		
Solúvel	8,60 ± 0,4	58,71 ± 6,5
β-ciclodextrina	100,90 ± 3,2	129,48 ± 8,3
Amido Capsul®	114,02 ± 4,8	113,09 ± 5,2
Farinha de soja	121,80 ± 6,4	130,19 ± 10,4
Lactose	95,69 ± 13,0	102,76 ± 10,3
Maltodextrina	115,82 ± 5,0	139,05 ± 2,3
<i>Aspergillus fumigatus</i> CAS21		
Solúvel	10,00 ± 1,0	78,37 ± 1,5
β-ciclodextrina	101,75 ± 11,6	146,34 ± 14,8
Amido Capsul®	111,90 ± 10,7	118,96 ± 14,3

(continua)

Adjuvantes (10% m/v)	Atividade relativa (%)	
	28 °C	4 °C
Farinha de soja	62,53 ± 0,3	121,84 ± 12,2
Lactose	122,19 ± 0,7	121,85 ± 0,2
Maltodextrina	110,97 ± 2,1	122,09 ± 13,1
<i>Aspergillus niger</i> ANG18		
Solúvel	84,42 ± 3,9	84,17 ± 0,6
β-ciclodextrina	93,04 ± 8,0	128,72 ± 5,1
Amido Capsul®	99,52 ± 4,4	101,08 ± 11,3
Farinha de soja	105,28 ± 13,3	108,18 ± 10,7
Lactose	92,16 ± 6,4	118,29 ± 5,2
Maltodextrina	120,04 ± 5,5	108,39 ± 2,7
<i>Aspergillus carbonarius</i>		
Solúvel	0	26,50 ± 0
β-ciclodextrina	48,12 ± 1,1	45,11 ± 3,2
Amido Capsul®	0	54,42 ± 3,4
Farinha de soja	131,25 ± 5,0	129,50 ± 3,7
Lactose	0	0
Maltodextrina	0	0

Fonte: Autora (2021).

Diferente do observado para a forma solúvel, os produtos secos de *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21 e *A. niger* ANG18 quando armazenados por 1 ano a 28 °C e 4 °C preservaram a atividade enzimática (+62%) independente do adjuvante empregado no processo de secagem. Destaca-se que a temperatura de 4 °C, em geral, foi mais eficiente para manutenção das atividades destes produtos, visto que as atividades após 1 ano foram superiores a 89%. No entanto, não se descarta a possibilidade de armazenamento a temperatura ambiente (28 °C).

Apenas os produtos secos contendo tanase de *A. carbonarius* exibiram redução expressiva e perda da atividade ao longo do armazenamento, com exceção do pó contendo farinha de soja. Nos produtos secos com lactose e maltodextrina as atividades enzimáticas foram totalmente perdidas quando armazenadas a 28 °C e 4 °C ao longo de 1 ano. Enquanto que o produto seco com β-ciclodextrina manteve

cerca de 50% da atividade a 28 °C e 4 °C. Ressalta-se que o pó contendo a enzima não apresentou crescimento microbiano ao longo do armazenamento e não foram observadas mudanças visuais, como mudança na coloração ou aglomeração de partículas úmidas. Este resultado corrobora os valores adequados de atividade de água e teor de umidade descritos na Tabela 3, garantindo a estabilidade química, física e biológica dos produtos secos.

A estabilidade ao armazenamento foi relatada para inúmeras enzimas secas. Hamin Neto et al. (2017) relataram que o uso de maltodextrina como adjuvante preservou a atividade da protease e colagenase por 180 dias quando armazenados a 30 °C, enquanto a solução de extrato enzimático armazenada nas mesmas condições sofreu desnaturação. A α -amilase seca na presença de sacarose reteve 72% da atividade inicial após o armazenamento por 2 meses a 5 °C (ABDEL-MAGEED et al., 2019). A lipase seca com lactose, maltodextrina e β -ciclodextrina reteve 70% de sua atividade inicial após armazenamento a 5 °C por 6 meses (COSTA-SILVA et al., 2014). A enzima β -frutofuronosidase seca em *spray dryer* na presença de β -ciclodextrina manteve sua atividade acima de 60% após 1 ano de armazenamento a 25 °C (GONÇALVES et al., 2013a). Libardi et al. (2020) observaram manutenção de 91% da atividade da celulase seca com maltodextrina após 2 meses de armazenamento a 4 °C. A lipase seca com sagu exibiu maior estabilidade ao armazenamento comparada a forma solúvel, mantendo-se 50% de sua atividade por 9 meses a 10 °C (MOHTAR et al., 2019). Resultados superiores foram aqui relatados para os produtos secos contendo tanase. As atividades foram preservadas tanto a 28 °C como a 4 °C, assim como por maior tempo do que descrito em alguns estudos.

A estabilidade ao armazenamento por longo prazo é fator importante para futuras aplicações e uso comercial das tanases. No entanto, apesar de inúmeras pesquisas voltadas para secagem de enzimas, não há, até o presente momento, relatos na literatura sobre secagem de tanase em *spray dryer*, sendo este o primeiro estudo realizado na área.

4.2 Aplicação da tanase presente nos produtos secos de *A. fumigatus* CAS21 na síntese de propil galato

A tanase purificada de *A. fumigatus* CAS21 foi anteriormente relatada pelo seu potencial de sintetizar propil galato em meio com solvente orgânico. No entanto, esta aplicação foi executada com a enzima na forma solúvel (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018). Assim, uma nova análise foi realizada a fim de verificar se, após a secagem, o potencial da tanase para sintetizar este composto era mantido. Destaca-se que a tanase seca apresenta maior estabilidade térmica e ao armazenamento comparada com a enzima solúvel purificada (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018).

A tanase destaca-se pelo seu amplo potencial de aplicação nas indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas. Para algumas dessas aplicações é necessário que a enzima seja capaz de exercer sua atividade catalítica na presença de solventes orgânicos, já que estes são constantemente empregados em diversos bioprocessos como, por exemplo, para síntese de propil galato (SHARMA, 2019). Portanto, os produtos secos contendo tanase de *A. fumigatus* CAS21 foram ensaiados quanto à influência de solventes orgânicos na atividade enzimática visando aplicação na síntese de PG.

4.2.1 Influência de solventes orgânicos na atividade tanásica

Na Tabela 5 observa-se que enzima solúvel apresentou aumento da atividade enzimática (+53%) na presença de 1% (v/v) de acetonitrila e permaneceu estável em acetona, butanol e isopropanol. No entanto, a adição de etanol e metanol no meio reacional provocou redução na atividade (-23,2% e -10,9%, respectivamente). Considerando os pós obtidos com diferentes adjuvantes, comportamentos variados foram observados de acordo com o solvente utilizado. A atividade enzimática foi reduzida na presença de todos os solventes testados para tanase seca em maltodextrina, principalmente em butanol e etanol, com redução de 49% e 57%, respectivamente. O uso de β -ciclodextrina permitiu a manutenção da atividade na presença de acetonitrila e aumento em metanol (+ 28%). No produto seco com amido Capsul® a atividade da tanase foi mantida sem alteração significativa na presença de isopropanol e metanol, superando a atividade obtida

para a enzima solúvel. A lactose, como adjuvante, proporcionou a manutenção da atividade da tanase em todos os solventes adicionados no meio reacional, com atividade relativa superior a 90%. Na presença de acetonitrila e butanol foi observado aumento de 34,7% e 45,3%, respectivamente.

A interação enzima-adjuvante pode influenciar positivamente ou negativamente a atividade da tanase na presença de solventes. Em geral, os solventes atuam inibindo a atividade enzimática por meio da quebra de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, essenciais para a conformação nativa da enzima, ou pela remoção de água em torno da molécula (KUMAR et al., 2016). De acordo com Lima e Agnes (1999), esses compostos podem reduzir a atividade catalítica por provocar alterações na estrutura terciária e secundária. Por outro lado, apesar dos efeitos inibitórios, alguns solventes podem melhorar a solubilidade do substrato ou modificar a conformação nativa da enzima apenas pelo ajuste do meio de reação (GONÇALVES et al., 2011; YU; LI; WU, 2004).

Tabela 5 - Influência de diferentes compostos na atividade enzimática da tanase solúvel de *A. fumigatus* CAS21 e seca em *spray dryer* na presença de adjuvantes

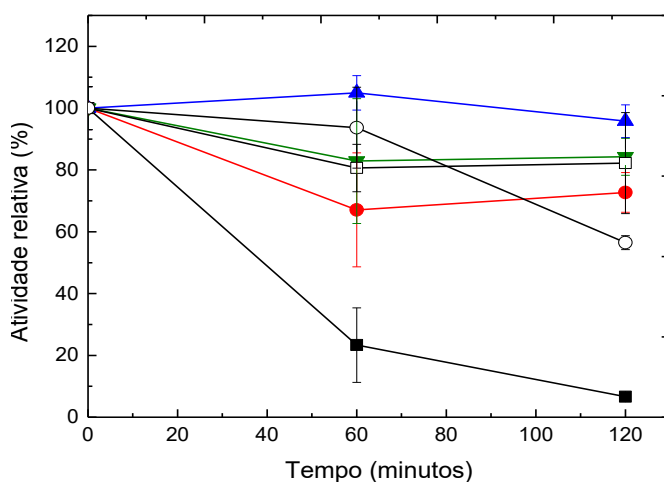
Solventes orgânicos (1% v/v)	Atividade relativa (%)				
	Tanase solúvel	β - Ciclodextrina	Amido Capsul [®]	Lactose	Maltodextrina
Controle	100 \pm 2,0 ^{AC}	100 \pm 6,2 ^A	100 \pm 13,0 ^A	100 \pm 8,8 ^{AC}	100 \pm 14,4 ^A
Acetona	107,65 \pm 13,3 ^A	86,50 \pm 13,4 ^A	69,17 \pm 2,6 ^{BC}	100,56 \pm 4,6 ^{AC}	57,95 \pm 8,4 ^{BC}
Acetonitrila	153,11 \pm 13,0 ^B	105,13 \pm 11,5 ^{AC}	73,08 \pm 4,2 ^{BC}	134,72 \pm 11,5 ^B	81,21 \pm 16,6 ^{AB}
Butanol	96,74 \pm 13,4 ^{AC}	75,11 \pm 6,2 ^B	64,00 \pm 9,9 ^B	145,28 \pm 6,3 ^B	50,99 \pm 13,0 ^C
Etanol	76,76 \pm 13,3 ^C	60,38 \pm 8,4 ^B	90,68 \pm 5,6 ^{AC}	98,51 \pm 4,4 ^{AC}	83,43 \pm 12,2 ^{AB}
Isopropanol	107,72 \pm 7,1 ^A	47,17 \pm 11,2 ^B	99,67 \pm 13,0 ^A	112,90 \pm 8,7 ^A	70,25 \pm 6,3 ^{BC}
Metanol	89,15 \pm 4,9 ^{AC}	128,79 \pm 14,9 ^C	104,45 \pm 6,8 ^A	91,38 \pm 6,6 ^C	42,92 \pm 7,8 ^C

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). 100% da atividade enzimática da tanase solúvel corresponde a $28,10 \pm 1,0$ U mL⁻¹; 100% da atividade enzimática da tanase seca com β -Ciclodextrina corresponde a $24,64 \pm 0,9$ U mL⁻¹; 100% da atividade enzimática da tanase seca com Capsul[®] corresponde a $23,39 \pm 3,1$ U mL⁻¹; 100% da atividade enzimática da tanase seca com lactose corresponde a $19,07 \pm 1,7$ U mL⁻¹; 100% da atividade enzimática da tanase seca com maltodextrina corresponde a $18,65 \pm 1,3$ U mL⁻¹.

Fonte: Autora (2021).

Por manter atividade enzimática acima de 90%, a estabilidade da atividade enzimática da tanase seca com lactose foi analisada em diferentes solventes (50% v/v) de polaridade variada (expressa em $\log P$), por 120 min. Na Figura 28 observa-se que a enzima permaneceu estável por 60 min em metanol ($\log P = -0,76$). Contudo, em períodos mais longos houve redução de 43% na atividade. A incubação em acetona ($\log P = -0,23$) reduziu drasticamente a atividade (- 94%) após 120 min. Em contrapartida, a enzima foi completamente estável na presença de butanol ($\log P = 0,8$), e nos solventes etanol ($\log P = -0,24$), acetonitrila ($\log P = -0,33$) e isopropanol ($\log P = 0,05$) a atividade tanásica foi mantida em torno de 70-80%. É relatado que a polaridade crescente dos solventes orgânicos influencia na estrutura da molécula enzimática, promovendo a redução ou perda da atividade pela remoção da água de hidratação presente na sua superfície (LIMA; ANGNES, 1999). De acordo com Lima e Angnes (1999), em solventes com $\log P < 2$ a atividade enzimática é relativamente mais baixa. No entanto, no presente estudo não há correlação entre a função $\log P$ e a atividade tanásica obtida após incubação da enzima seca em lactose nos solventes orgânicos estudados.

Figura 28 - Estabilidade enzimática do produto seco com lactose contendo tanase de *A. fumigatus* CAS21 nos solventes orgânicos acetona (■), acetonitrila (●), butanol (▲), etanol (▼), isopropanol (□) e metanol (○)



Fonte: Autora (2021).

No que diz respeito a estabilidade, a lactose pode ter atuado como agente protetor da molécula enzimática, evitando a desnaturação pela ação dos solventes. Possivelmente, este mecanismo é o mesmo envolvido para explicar maior estabilidade de enzimas microencapsuladas. De acordo com Yu, Li e Wu (2004), a

microencapsulação cria uma barreira para evitar a desnaturação enzimática pelo contato direto com os solventes. Stepankova et al. (2013) descreveram que enzimas secas na presença de açúcares são mais estáveis em solventes orgânicos devido ao fortalecimento das interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos não polares, o que acarreta estruturas proteicas mais rígidas. A maioria das enzimas é menos ativa e estável na presença de solventes orgânicos, o que restringe a aplicação industrial (KUMAR et al. 2016). Assim, a estabilidade das tanases na presença de solventes sugere sua adequação para reações de esterificação e transesterificação, por exemplo, para síntese de propil galato a partir de ácido tânico em meio orgânico (GONÇALVES et al., 2011). Deste modo, a tanase seca com lactose, por permanecer estável na presença de diferentes solventes orgânicos, foi aplicada na síntese de propil galato.

4.2.2 Síntese de propil galato pela ação da tanase seca com lactose

A Figura 29 apresenta o perfil cromatográfico em TLC para os produtos da reação de transesterificação do ácido tânico pela ação da tanase seca com lactose na presença de 1-propanol. A enzima catalisou a síntese de propil galato (banda superior) em meio orgânico a partir da hidrólise do ácido tânico (banda inferior) e, posteriormente, esterificação do ácido gálico (banda do meio). Destaca-se que, a medida que a reação foi conduzida por períodos mais longos, houve intensificação da banda correspondente ao propil galato (tempo de 96 horas).

Figura 29 - Perfil cromatográfico em CCD dos produtos obtidos a partir da reação de transesterificação do ácido tânico (raia 1) na presença de 1-propanol pela ação da tanase de *A. fumigatus* CAS21 seca com lactose. Raias: (2) Ácido gálico; (3) Propil galato; (4) reação de 48 horas; (5) reação de 72 horas; (6) reação de 96 horas



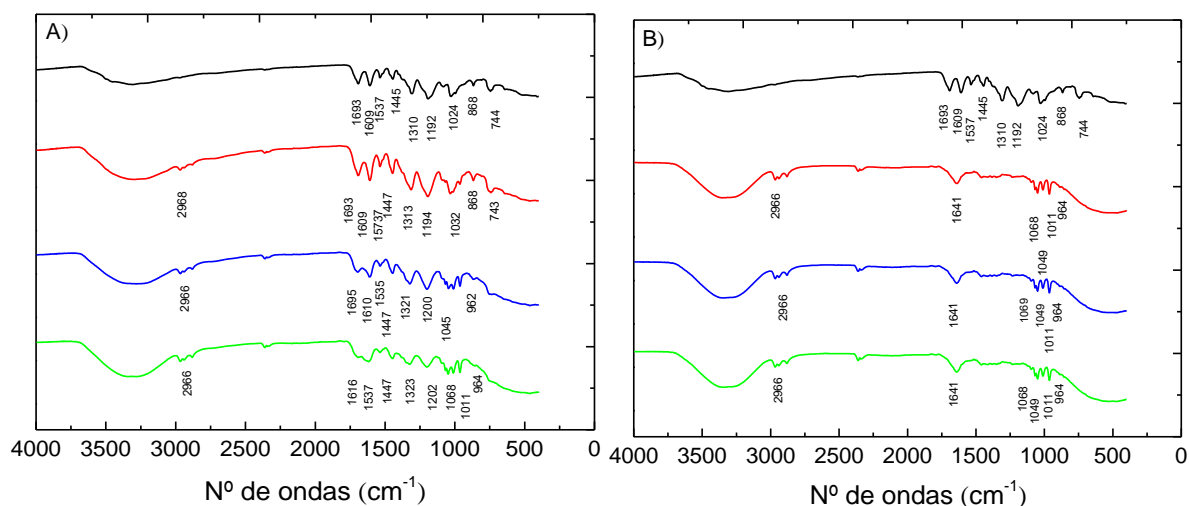
Fonte: Autora (2021).

Os espectros em FTIR das reações enzimáticas comprovam a produção de propil galato pela tanase, uma vez que o perfil dos picos obtidos foi semelhante ao obtido para o propil galato comercial utilizado como padrão (Figura 30). Os picos entre 2960 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} indicam a presença dos grupos CH_2 e CH_3 , enquanto picos próximos a 1700 cm^{-1} correspondem aos grupos éster carbonílicos ($\text{C}=\text{O}$). Na região de 1600 a 1500 cm^{-1} as vibrações de alongamentos são características da ligação $\text{C}=\text{C}$ presentes no benzeno (LYU et al., 2019), picos entre 1300 e 1000 cm^{-1} foram observados e correspondem à vibração ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), ambos característicos da molécula de propil galato.

Na presença de propanol, o pó contendo tanase seca com lactose não foi dissolvido. Deste modo, foi possível, após aplicação, a sua recuperação por centrifugação e posterior análise de mais um ciclo de síntese de PG. Na Figura 30 observa-se que picos semelhantes ao primeiro ciclo de aplicação foram exibidos nos espectros, como na região de 2960 cm^{-1} e próximos a 2850 cm^{-1} . Picos na região de

1500 cm^{-1} foram observados com menor intensidade quando comparado ao primeiro ciclo.

Figura 30 - Espectros de FTIR do propil galato padrão (—) e sintetizado pela ação da tanase de *A. fumigatus* CAS21 seca com lactose após 48 h (—), 72 h (—), e 96 h (—) de reação de transesterificação (A) 1º ciclo; 2º (B) ciclo de reação



Fonte: Autora (2021).

A produção de propil galato por catalisadores químicos emprega temperaturas altas ($>100\text{ }^{\circ}\text{C}$) e condições ácidas (ácido sulfúrico). Neste estudo, o PG foi produzido por via enzimática em temperatura branda de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 6,0, adicionalmente, a utilização de tanase seca por *spray dryer* na reação de transesterificação possibilitou a recuperação da enzima e reutilização para um novo ciclo de aplicação. Os espectros obtidos para o propil galato (controle) e para as amostras das reações conduzidas por 48 h, 72 h e 96 h apresentaram picos semelhantes entre si e similares aos relatados para o PG produzido pela tanase livre de *A. awamori* BTMFW032 (BEENA et al., 2011) e de *A. ochraceus* (ARACRI; CAVALCANTI; GUIMARÃES, 2019). Adicionalmente, Bouaziz et al. (2010), Gálico et al. (2015) e Lyu et al. (2019) relataram picos característicos da molécula de PG comercial e sintetizada por lipase, analisado por FTIR, similares ao PG sintetizado pela tanase de *A. fumigatus* CAS21.

4.3 Aplicação da tanase seca na ração animal

A farinha de soja foi utilizada como adjuvante não-convencional para secagem das tanases das espécies de *Aspergillus* com o objetivo de aplicar a enzima na ração animal, uma vez que este componente já é utilizado na nutrição bovina, suína e de aves. Os produtos secos com farinha de soja contendo tanase de *A. niger* ANG18, *A. ochraceus* e *A. carbonarius* foram selecionados para aplicação na farinha de sorgo, ração de peixe e bagaço de uva por preservarem suas atividades iniciais após armazenamento de 1 ano a 28 °C e 4 °C. Portanto, inicialmente, as enzimas secas com farinha de soja foram caracterizadas quanto ao efeito da temperatura e pH na atividade enzimática e estabilidade térmica. Em seguida, foram aplicadas nas rações.

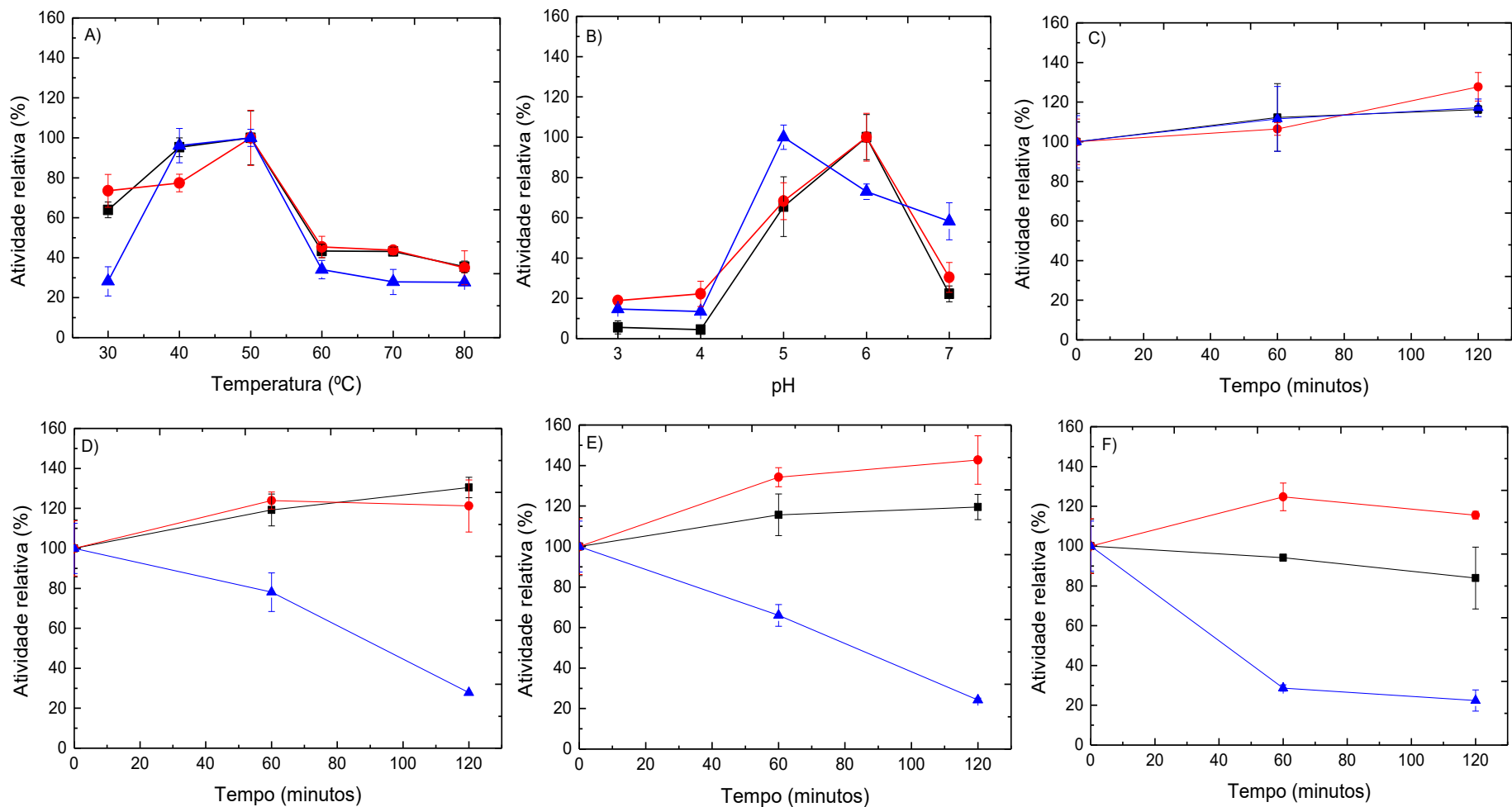
4.3.1 Influência da temperatura e do pH na atividade tanásica do pó seco com farinha de soja

A Figura 31 exhibe o efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática do produto seco com farinha de soja. A enzima seca produzida por *A. ochraceus* e *A. carbonarius* apresentou máxima atividade entre 40 °C e 50 °C, e a tanase de *A. niger* ANG18 a 50 °C. Em todos os casos o aumento da temperatura provocou redução da atividade. Com relação ao pH, de forma geral, observa-se que as enzimas exibiram atividade baixa em valores de pH mais ácidos (3,0-4,0). Para as tanases de *A. ochraceus* e *A. niger* ANG18, os perfis de atividade em função do pH foram similares, com atividade enzimática maior no pH 6,0. De acordo com Valera, Jorge e Guimarães (2015), a tanase purificada de *A. carbonarius* apresentou maior atividade a 60 °C, no pH 5,0 e 6,0. A enzima seca exibiu perfil de pH similar a tanase purificada, com máxima atividade no pH 5,0 com retenção de cerca de 60% da atividade até pH 7,0.

Com relação à estabilidade térmica verifica-se que a 30 °C as tanases secas de *A. ochraceus*, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius* mantiveram suas atividades iniciais após incubação por 120 min. Quando incubada a 40 °C e 50 °C a enzima de *A. carbonarius* perdeu aproximadamente 22% e 34% de sua atividade enzimática, respectivamente, após 60 min. No instante de 120 min a atividade foi

drasticamente reduzida (- 70%) a 40 °C, 50 °C e 60 °C. Em contrapartida, as tanases secas de *A. ochraceus* e *A. niger* ANG18 mantiveram-se estáveis em todas as temperaturas analisadas por 120 min.

Figura 31 - Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade enzimática das tanases de *A. ochraceus* (■), *A. niger* ANG18 (●) e *A. carbonarius* (▲) secas em farinha de soja e estabilidade térmica a 30 °C (C), 40 °C (D), 50 °C (E) e 60 °C (F)



Fonte: Autora (2021).

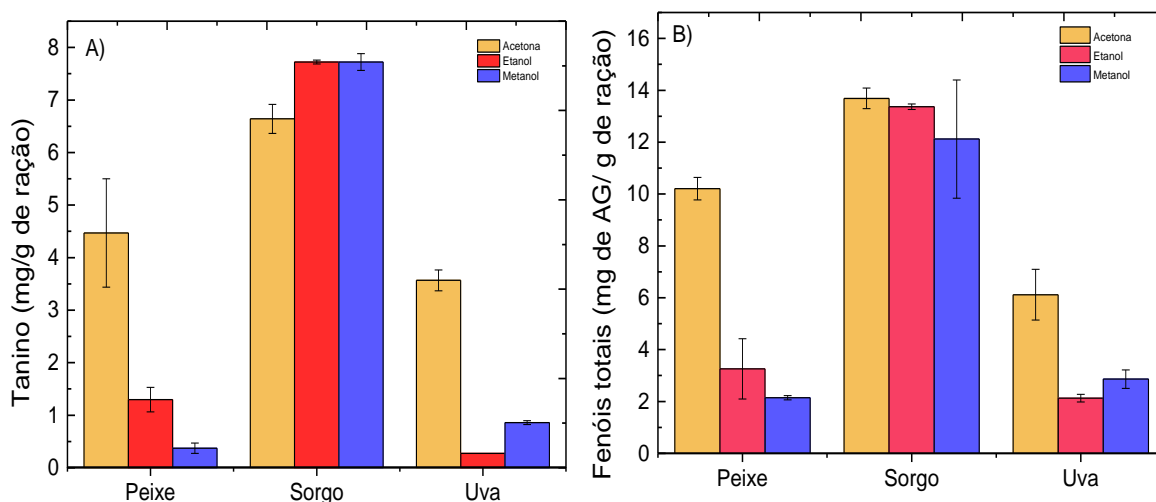
4.3.2 Extração de taninos e demais compostos fenólicos com solventes orgânicos

Os taninos e compostos fenólicos presentes nas rações foram extraídos empregando etanol, metanol e acetona para determinar qual melhor solvente de extração. Todos os solventes foram testados na concentração de 70%, uma vez que, de acordo com Do et al. (2014), misturas aquosas com etanol, metanol e acetona, por exemplo, são mais eficientes para extração de compostos polifenólicos. A adição de água cria um ambiente mais polar e facilita a extração de polifenóis (DREVELEGKA; GOULA, 2020). Além da concentração, o tipo do solvente e a temperatura do processo são fatores que influenciam na etapa de extração. Nesta pesquisa, o experimento foi realizado a 25 °C a fim de preservar as moléculas de taninos e fenóis, compostos tipicamente sensíveis a hidrólise por altas temperaturas (MENESES et al., 2013).

Na Figura 32 verifica-se que a extração com acetona possibilitou a obtenção de uma maior concentração de taninos a partir da ração de peixe (4,47 mg/g de ração) e de bagaço de uva (3,57 mg/g de ração), enquanto para o sorgo, etanol (7,72 mg/g de ração) e metanol (7,72 mg/g de ração) foram mais eficazes. O conteúdo de fenóis totais (expresso como equivalentes de ácido gálico - AG) nos extratos de ração de peixe, farelo de sorgo e bagaço de uvas variou de 2,14 a 13,68 mg de AG/g de ração de acordo com o solvente utilizado. Observa-se que acetona foi o melhor solvente para extração de compostos fenólicos para todas as rações, principalmente nas rações de peixe e de bagaço de uva, com rendimentos de extração até 3 vezes maior quando comparado ao uso do etanol. Destaca-se que no caso do sorgo, tanto acetona como etanol foram eficientes para extração de 13,68 mg de AG/g de ração e 13,37 mg de AG/g de ração, respectivamente. Estes resultados corroboram os descritos por Do et al. (2014). Os autores descreveram que as misturas etanol/água e acetona/água foram mais eficientes para extração dos fenóis, flavonoides e antioxidantes de *Limnophila aromática*. A extração de compostos polifenólicos presentes nos grãos de sorgo com etanol/água, metanol/água e acetona/água foi anteriormente relatado por Barros et al. (2013). Meneses et al. (2013) observaram que acetona e etanol foram os melhores solventes de extração para compostos fenólicos e flavonoides presentes em grãos usados na cervejaria quando comparado com metanol, hexano e acetato de etila.

O metanol é caracterizado pela sua toxicidade e, deste modo, preferiu-se seguir a pesquisa empregando acetona 70% (v/v) para extração dos taninos e compostos fenólicos da ração de peixe e do bagaço de uva, e etanol 70% (v/v) para sorgo.

Figura 32 - Extração de taninos (A) e compostos fenólicos totais (B) presentes na ração de peixe, farelo de soja e bagaço de uva



Fonte: Autora (2021).

4.3.3 Tratamento enzimático da ração animal

O efeito do tratamento com tanase de *A. carbonarius*, *A. niger* ANG18 e *A. ochraceus* seca com farinha de soja nas rações de peixe, sorgo e bagaço de uva na concentração de taninos e compostos fenólicos é apresentado na Tabela 6. O uso da tanase de *A. ochraceus* foi eficaz para reduzir aproximadamente 95% dos taninos presentes na ração de peixe, 94% no bagaço de uva e 90% no sorgo. O maior índice de redução de compostos fenólicos foi observado na ração de peixe (- 90%), seguido por bagaço de uva (- 42%) e sorgo (- 28%). O tratamento com tanase seca de *A. niger* ANG18 também demonstrou ser efetivo, com redução do teor de taninos acima de 90%. Ainda foram observadas maiores reduções de fenóis comparadas àquelas obtidas com o uso da tanase de *A. ochraceus*, cerca de 90% na ração de peixe, 70% no bagaço de uva e 48% no sorgo. O uso da tanase de *A. carbonarius* promoveu a menor diminuição do teor de taninos presentes no bagaço de uva comparado aos demais tratamentos. No entanto, vale salientar que, o tratamento foi

efetivo, com redução acima de 62%. Nas demais rações, a adição da tanase seca de *A. carbonarius* promoveu reduções semelhantes às citadas para o tratamento com a enzima de *A. ochraceus* e *A. niger* ANG18, com hidrólise de 90% dos taninos e redução acima de 42% dos compostos fenólicos.

Sorgo, cevada e palha de trigo são comumente utilizados na alimentação animal de frangos e ruminantes. O tratamento enzimático da ração animal a base de trigo e sorgo com tanase, tal como proposta neste estudo, foi relatada anteriormente por Raghuwanshi, Misra e Saxena (2014) e Aracri, Cavalcanti e Guimarães (2019) empregando tanase liofilizada e o extrato bruto. Raghuwanshi, Misra e Saxena (2014) observaram redução de 91,1% no teor de taninos da palha de trigo após o tratamento com tanase de *Penicillium charlesii*. Aracri et al. (2019) descreveram uma tanase, produzida por biofilme de *A. ochraceus*, capaz de hidrolisar 61,31% dos taninos e 17,49% dos compostos fenólicos presentes na farinha de sorgo.

Tabela 6 - Aplicação da tanase seca em farinha de soja para tratamento enzimático da ração animal

Tanase	Ração para Peixe		Sorgo		Bagaço de Uva	
	Taninos (%)	Fenóis (%)	Taninos (%)	Fenóis (%)	Taninos (%)	Fenóis (%)
Controle	100 ± 6,0 ^A	100 ± 4,3 ^A	100 ± 2,4 ^A	100 ± 11,2 ^A	100 ± 5,6 ^A	100 ± 11,3 ^A
<i>A. carbonarius</i>	4,75 ± 0,4 ^B	9,87 ± 3,8 ^B	8,45 ± 1,1 ^B	43,13 ± 4,7 ^B	37,73 ± 1,8 ^B	60,96 ± 8,4 ^B
<i>A. niger</i> ANG18	9,50 ± 2,9 ^B	5,84 ± 0,1 ^B	10,56 ± 1,1 ^B	51,86 ± 3,3 ^{BC}	6,25 ± 1,0 ^C	30,00 ± 1,2 ^C
<i>A. ochraceus</i>	4,47 ± 2,0 ^B	10,20 ± 1,7 ^B	10,04 ± 2,8 ^B	73,38 ± 11,2 ^C	5,79 ± 1,1 ^C	57,65 ± 7,1 ^B

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Teste analisado separadamente para cada tanase produzida pelas espécies de *Aspergillus*.

Fonte: Autora (2021).

A suplementação com tanase visa melhorar o valor nutricional da ração animal por promover o aumento da biodisponibilidade dos nutrientes, geralmente, diminuída devido à presença de taninos e demais compostos fenólicos (MANDAL; GHOSH, 2013; RAGHUWANSHI; MISRA; SAXENA, 2014). Algumas enzimas já foram adicionadas em rações de peixe, como a celulase, amilase e protease presentes na ração da Alcon® Basic (Tabela 1). No entanto, apesar da presença de compostos antinutricionais, como taninos e fenóis, a tanase ainda não é encontrada nessas formulações.

O bagaço de uva vem sendo incorporado na ração de ruminantes e efeitos positivos e negativos são bem descritos na literatura (MUHLACK; POTUMARTHI; JEFFERY, 2017). Esse resíduo é caracterizado por conter açúcares não fermentados, polifenóis, taninos, pigmentos e outros compostos. De acordo com Muhlack, Potumarthi e Jeffery (2018), diversos estudos apontam que a presença de polifenóis reduziu a emissão de metano mas, por outro lado, outros estudos relatam redução na produção de leite e na utilização dos nutrientes devido à presença de taninos e fenóis na ração. Ebrahimzadeh et al. (2017) relataram que a suplementação de tanase na ração de frango com bagaço de uva melhorou a ingestão e aumentou o valor nutritivo da ração. Chamorro et al. (2017) descreveram que a adição de tanase hidrolisou as catequinas menores da ração animal suplementada com bagaço de uva. Neste estudo foi relatada a eficiência das tanases secas com farinha de soja em reduzir 90% do teor de taninos e compostos fenólicos de três rações usualmente utilizadas na alimentação de peixes, ruminantes e frangos demonstrando, portanto, a aplicabilidade, eficiência e versatilidade da aplicação do produto seco contendo tanase.

**Imobilização das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus*
e aplicação em reator de leito fixo para tratamento de chá verde e
efluente da indústria de curtume**

4.4 Imobilização das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* em diferentes suportes

As tanases parcialmente purificadas de *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius* foram imobilizadas pelas técnicas de aprisionamento, ligação covalente e iônica. Os parâmetros dos processos de imobilização são apresentados na Tabela 7. Verifica-se que os menores índices de eficiência e atividade para imobilização da tanase de *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21 e *A. niger* ANG18 foram obtidos na imobilização por ligação covalente nos suportes alginato de sódio, Amberlite e pérolas de vidro ativadas com glutaraldeído. Este método, apesar de oferecer maior rigidez/estabilidade estrutural, promove alterações conformacionais que podem acarretar na redução ou perda da atividade enzimática (WU et al., 2016). Na imobilização covalente são adicionados agentes responsáveis por formar “braços espaçadores”, como o glutaraldeído, utilizado neste estudo, que auxiliam na ligação suporte-agente-enzima (PAUL; KHANUM, 2011). A formação de ligações covalentes entre a enzima e o glutaraldeído garantem maior estabilidade estrutural. Contudo, a estrutura enzimática é alterada pela formação destas ligações, resultando, em alguns casos, em menor atividade (WU et al., 2016). Nas imobilizações com glutaraldeído, em que os rendimentos e eficiências foram altos (> 70%) e as atividades enzimáticas foram inferiores comparadas com os demais métodos, entende-se que a ligação do suporte-glutaraldeído-enzima ocorreu na região próxima ao sítio ativo, o que, possivelmente, dificultou o acesso ao substrato, ou essa ligação promoveu mudança da enzima para uma conformação menos ativa (ONG; ANNUAR, 2018), diminuindo, portanto, a atividade catalítica. Resultado similar foi observado por Aharwar e Parihar (2021) na imobilização da tanase de *Talaromyces verruculosus*. Os autores justificaram que, apesar do rendimento de 79,6%, eficiência de 49,5%, a atividade recuperada de 39,4% no suporte alginato ativado com GA foi devido, possivelmente, ao bloqueio do sítio ativo ou lixiviação da enzima.

Tabela 7 - Imobilização das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* empregando diferentes métodos e suportes

Métodos/Suportes	Rendimento (%)	Eficiência (%)	AR (%)
<i>Aspergillus phoenicis</i>			
<i>Aprisionamento</i>			
Ca-alginato	100 ± 0	77,10 ± 3,0	49,05 ± 0,6 ^A
Mn-alginato	100 ± 0	100 ± 0	78,66 ± 3,7 ^B
<i>Ligação covalente</i>			
GA-alginato	100 ± 0	68,70 ± 5,2	68,46 ± 4,2 ^C
GA-Amberlite	93,04 ± 2,0	75,19 ± 7,6	7,57 ± 0,5 ^D
GA-Pérolas de vidro	74,18 ± 5,4	74,81 ± 9,8	21,71 ± 6,2 ^E
<i>Ligação iônica</i>			
DEAE-Sephadex A25	92,81 ± 3,3	100 ± 0	4,71 ± 1,8 ^D
<i>Aspergillus ochraceus</i>			
<i>Aprisionamento</i>			
Ca-alginato	100 ± 0	92,97 ± 2,8	32,26 ± 3,8 ^A
Mn-alginato	100 ± 0	100 ± 0	73,84 ± 11,2 ^B
<i>Ligação covalente</i>			
GA-alginato	94,43 ± 1,5	19,49 ± 7,7	47,31 ± 11,0 ^A
GA-Amberlite	13,13 ± 5,7	39,49 ± 2,2	0,89 ± 0,4 ^C
GA-Pérolas de vidro	74,34 ± 0,2	11,58 ± 2,2	5,12 ± 0,5 ^C
<i>Ligação iônica</i>			
DEAE-Sephadex A25	92,75 ± 2,9	94,18 ± 1,1	72,26 ± 13,4 ^B
<i>Aspergillus fumigatus CAS21</i>			
<i>Aprisionamento</i>			
Ca-alginato	100 ± 0	98,80 ± 1,7	94,32 ± 3,8 ^A
Mn-alginato	100 ± 0	98,19 ± 2,7	81,29 ± 6,1 ^B
<i>Ligação covalente</i>			
GA-alginato	100 ± 0	86,06 ± 6,5	20,58 ± 1,7 ^C
GA-Amberlite	85,40 ± 1,0	71,58 ± 3,3	17,20 ± 1,5 ^C
GA-Pérolas de vidro	73,89 ± 3,1	95,71 ± 4,3	22,35 ± 1,3 ^C
<i>Ligação iônica</i>			
DEAE-Sephadex A25	81,58 ± 0,8	99,73 ± 0,5	36,87 ± 1,8 ^D
<i>Aspergillus niger ANG18</i>			
<i>Aprisionamento</i>			
Ca-alginato	100 ± 0	95,43 ± 4,0	47,26 ± 3,1 ^A

(continua)

Métodos/Suportes	Rendimento (%)	Eficiência (%)	AR (%)
Mn-alginato	100 ± 0	99,28 ± 1,2	78,25 ± 1,5 ^B
<i>Ligação covalente</i>			
GA-alginato	89,89 ± 2,8	38,89 ± 6,2	39,22 ± 7,2 ^A
GA-Amberlite	46,81 ± 9,6	58,24 ± 1,3	10,34 ± 1,5 ^C
GA-Pérolas de vidro	59,53 ± 3,8	34,77 ± 4,2	4,86 ± 2,2 ^C
<i>Ligação iônica</i>			
DEAE-Sephadex A25	82,04 ± 0,5	78,32 ± 2,7	63,45 ± 0,9 ^D
<i>Aspergillus carbonarius</i>			
<i>Aprisionamento</i>			
Ca-alginato	100 ± 0	100 ± 0	82,29 ± 7,4 ^A
Mn-alginato	100 ± 0	100 ± 0	85,00 ± 9,7 ^A
<i>Ligação covalente</i>			
GA-alginato	100 ± 0	43,67 ± 3,5	55,56 ± 9,8 ^B
GA-Amberlite	72,84 ± 5,4	73,20 ± 1,3	13,79 ± 0,4 ^C
GA-Pérolas de vidro	95,98 ± 3,5	45,18 ± 4,0	86,02 ± 10,3 ^A
<i>Ligação iônica</i>			
DEAE-Sephadex A25	91,42 ± 4,6	92,98 ± 2,1	43,06 ± 5,9 ^B

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Teste analisado separadamente para cada tanase produzida pelas espécies de *Aspergillus*. AR: atividade recuperada. 100% da atividade enzimática da tanase de *A. phoenicis* corresponde a $22,09 \pm 0,6$ U totais; 100% da atividade enzimática da tanase de *A. ochraceus* corresponde a $38,41 \pm 5,0$ U totais; 100% da atividade enzimática da tanase de *A. fumigatus* CAS21 corresponde a $84,26 \pm 5,1$ U totais¹; 100% da atividade enzimática da tanase de *A. niger* ANG18 corresponde a $56,96 \pm 1,5$ U totais; 100% da atividade enzimática da tanase de *A. carbonarius* corresponde a $5,31 \pm 0,1$ U totais. Fonte: Autora (2021).

Na resina DEAE-Sephadex as tanases das espécies de *Aspergillus* se ligaram ao suporte por meio de ligações iônicas, obtendo-se rendimento superior a 80% e eficiência acima de 78%. Estes resultados foram superiores aos relatados por Kumar et al. (2015). Os autores observaram rendimentos inferiores a 50% na imobilização da tanase de *A. awamori* nas resinas DEAE-Sephadex e Sephadex 25-40. A DEAE-Sephadex é uma resina aniônica, ou seja, carregada positivamente, portanto, os aminoácidos carregados negativamente da molécula de tanase são responsáveis pela imobilização (GONÇALVES et al., 2013b). Na presente pesquisa as atividades recuperadas variaram entre 36,87% e 72,26%. Apenas a tanase de *A. phoenicis* exibiu atividade de 4,71% quando imobilizada em DEAE-Sephadex. Este resultado indica que apesar da tanase ter sido eficientemente imobilizada na resina,

provavelmente, esta ligação promoveu mudança conformacional na sua estrutura ou ocorreu próxima ao sítio ativo, o que afetou a ligação enzima-substrato e, conseqüentemente, reduziu a atividade enzimática.

Dentre os métodos e suportes estudados, observa-se que os maiores índices de rendimentos (100%), eficiências (+92,97%) e atividades recuperadas (entre 32,26 e 94,32%) foram obtidos na imobilização por aprisionamento nos suportes Ca-alginato ou Mn-alginato. Neste método não há ligações iônicas ou covalentes com o suporte, portanto, a enzima não sofre nenhum tipo de modificação na sua estrutura (WONG et al., 2019). Soma-se ainda que a imobilização é realizada, frequentemente, em condições brandas de temperatura e pH (LAROSA et al., 2018). O alginato de sódio é relatado na literatura para imobilização de inúmeras enzimas, incluindo tanase (LAROSA et al., 2018; LIMA et al., 2018a; ROBERTO et al., 2016; YAO et al., 2014a), por empregar metodologia usualmente simples e de baixo custo. Adicionalmente, apresenta propriedades físico-químicas favoráveis, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade, características importantes para aplicação industrial (BRUS et al., 2017).

É possível observar que a imobilização em Mn-alginato proporcionou maiores atividades recuperadas comparadas ao uso do suporte Ca-alginato para imobilização das tanases de *A. phoenicis* (49,05% e 78,66%), *A. ochraceus* (32,26% e 73,84%) e *A. niger* ANG18 (47,26 e 78,25%), com diferenças estatisticamente significativas entre as médias, e *A. carbonarius* (82,29 e 85%), com médias estatisticamente iguais. A atividade reduzida no derivado Ca-alginato pode ser explicada pela influência negativa que o CaCl_2 exerce na atividade da tanase de *A. phoenicis* e *A. ochraceus*, como descrito por Riul et al. (2013) e Gonçalves et al. (2012). De acordo com os autores, o íon CaCl_2 reduz mais de 22% da atividade catalítica de ambas as tanases. Enquanto que na presença de MnCl_2 foi observada manutenção da atividade para a enzima de *A. phoenicis* (RIUL et al., 2013) e aumento de 33% para a tanase produzida por *A. ochraceus* (GONÇALVES et al., 2012).

Considera-se neste ponto que, comparado com todos os métodos e suportes de imobilização das tanases de *Aspergillus*, os maiores índices de rendimento (100%), eficiência (98,80%) e atividade recuperada (94,32%) foram obtidas para a imobilização da tanase de *A. fumigatus* CAS21 em Ca-alginato. De modo geral, os

índices relatados foram superiores aos descritos para maioria dos estudos empregando alginato como suporte (ANDRADE et al., 2020; JANA et al., 2015; LIMA et al., 2018a). Por exemplo, Lima et al. (2018a) imobilizaram a tanase comercial de *A. ficuum* em esferas de Ca-alginato e observaram eficiência de 70% e 75% da atividade enzimática foi recuperada. Após processo de otimização das melhores condições para imobilização de tanase, Jana et al. (2015) observaram maior rendimento (82%) e retenção da atividade tanásica (67%) em alginato de sódio reticulado em cloreto de cálcio e adicionado de quitina.

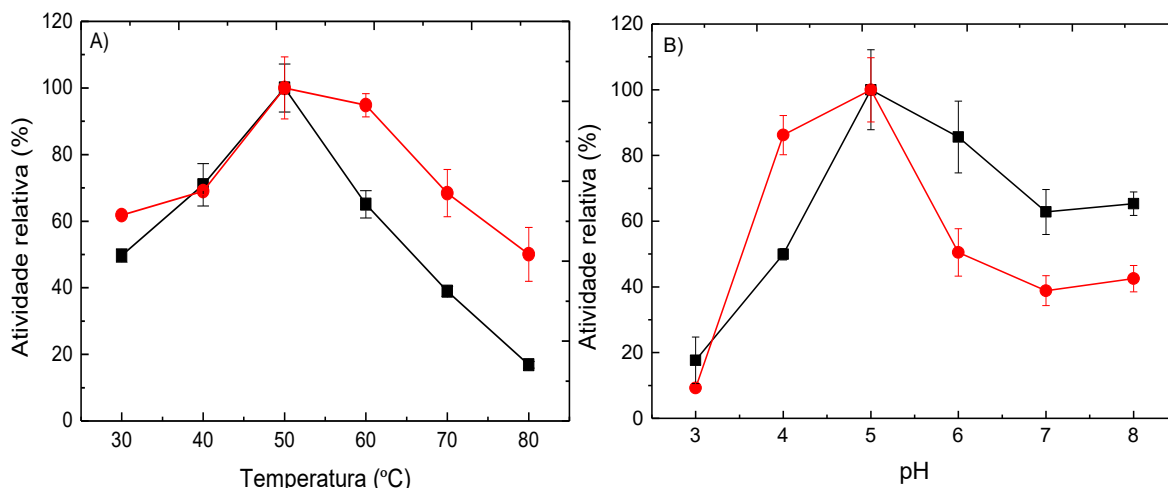
Para aplicação industrial é preferível métodos e suportes simples e econômicos. O uso de biopolímeros como suportes para imobilização, como alginato, oferece maior desempenho biocatalítico e estabilidade aprimorada (BILAL; IQBAL, 2019). O alginato é essencialmente um material de baixo custo e o processo de imobilização é simples e rápido. Portanto, devido a essas vantagens, bem como a maior atividade recuperada (94,32%) comparada aos demais suportes e métodos, o alginato de sódio reticulado com CaCl_2 foi selecionado como suporte ideal para imobilização da tanase de *A. fumigatus* CAS21. A enzima imobilizada foi caracterizada quanto a temperatura e pH de atividade enzimática, ciclos de reutilização, estabilidade térmica, ao pH e ao armazenamento, e em sequência, foi aplicada em reator PBR.

4.4.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato

A Figura 33 apresenta os efeitos da temperatura e do pH na atividade enzimática da tanase livre e imobilizada em Ca-alginato. Observa-se que a enzima livre exibiu maior atividade a 50 °C, em seguida, a atividade foi reduzida de acordo com o aumento da temperatura, com diminuição de 83% observada a 80 °C. Por outro lado, o derivado obtido apresentou maior atividade a 50 °C e 60 °C, e maior resistência a altas temperaturas comparadas com a forma livre, com 50% de atividade a 80 °C. Este resultado está de acordo com relatado para enzimas imobilizadas pelo método de aprisionamento, uma vez que, de acordo com Souza et al. (2016), o aprisionamento protege a enzima do contato direto com fatores externos, o que reduz os efeitos de inativação por pH, temperatura e solventes orgânicos.

O efeito do pH na atividade foi diferente para enzima livre e imobilizada. A tanase livre apresentou maior atividade em pH 5,0, e em pH mais ácido (3,0 e 4,0) a atividade foi drasticamente reduzida, enquanto manteve cerca de 60% em pH neutro. O pH ideal para a atividade do derivado Ca-alginato foi na faixa de 4,0-5,0. Em pH neutro a atividade foi reduzida para 42%. O tipo de suporte e o método de imobilização podem exercer influência nas propriedades bioquímicas das enzimas imobilizadas (ENEMUOR; ODIBBO, 2011; YAO et al., 2014a). De acordo com Li et al. (2018), mudanças no pH de atividade podem ser explicadas por meio de alterações conformacionais ou devido a interação suporte-enzima. Jana et al. (2015) observaram que a tanase imobilizada em Ca-alginato adicionado de quitina apresentou o mesmo pH e temperatura de atividade que a forma livre. Por outro lado, a enzima de *A. awamori* imobilizada em Amberlite apresentou temperatura (55 °C) e pH (4,0) diferentes da sua forma livre (30 °C e pH 5,5) (KUMAR et al., 2015). Li et al. (2018) descreveram que a imobilização da tanase em nanopartículas magnéticas não afetou a temperatura de reação, no entanto o pH foi deslocado para faixa mais ácida (4,5). Tanase imobilizada em nanopartículas de terra de diatomácea exibiu temperatura superior (40 °C) a forma livre (30 °C) e manutenção da atividade em pH 6,0 (LIMA et al, 2018b). Resultados similares aos descritos nesta pesquisa foram relatados por Wu et al. (2016) e Ong e Annuar (2018). Wu et al. (2016) observaram que a tanase imobilizada em nanopartículas de óxido férrico foi mais resistente a variações de pH se comparada com a forma livre. A tanase imobilizada em nanotubos de carbono exibiu maior atividade na temperatura semelhante à sua forma livre, contudo, a imobilização conferiu maior resistência a temperaturas elevadas (ONG; ANNUAR, 2018).

Figura 33 - Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da tanase de *A. fumigatus* CAS21 livre (■) e imobilizada em Ca-alginato de sódio (●)



Fonte: Autora (2021).

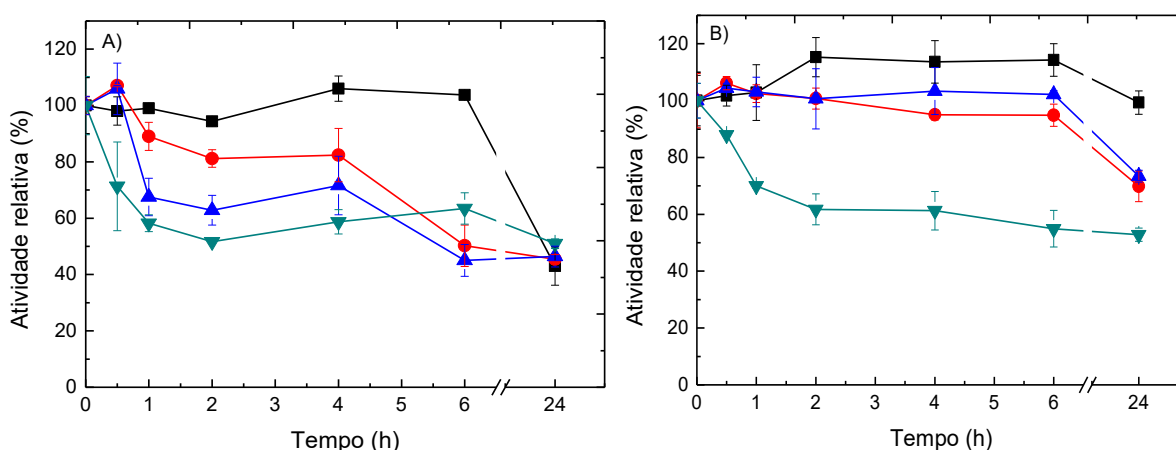
4.4.2 Estabilidade térmica e ao pH da tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato

Os perfis de estabilidade térmica da tanase livre e do derivado Ca-alginato, após incubação por 24 horas nas temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C, são apresentados na Figura 34. É possível visualizar que enzima livre permaneceu estável a 30 °C após 6 horas de incubação, mas com 24 horas 57% da atividade foi reduzida. Nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, no instante de 6 horas, cerca de 50% da atividade foi reduzida e mantida com este percentual até 24 horas. Diferentemente do observado para a forma livre, o derivado Ca-alginato permaneceu estável mesmo após 24 horas de incubação a 30 °C. A imobilização também permitiu maior resistência térmica quando a enzima foi incubada a 40 °C e 50 °C, com preservação de 70% da atividade (tempo de 24 h). Na temperatura de 60 °C a atividade foi reduzida logo após 2 horas de incubação, mantendo-se estável com até 50% da atividade inicial até 24 horas.

Os perfis de estabilidade sugerem que a imobilização em Ca-alginato possibilitou o aumento da resistência térmica da tanase de *A. fumigatus* CAS21. De acordo com Basso e Serban (2019), enzimas imobilizadas apresentam potencial para operar em temperaturas por volta de 10 °C mais altas do que as relatadas para forma livre. Adicionalmente, destaca-se que enzimas termoestáveis são preferidas para aplicações industriais (GOVINDARAJAN et al., 2016). Resultados semelhantes

aos relatados aqui foram observados na imobilização da tanase de *A. awamori* em Amberlite, uma vez que a enzima imobilizada reteve 87,6% de sua atividade inicial a 70 °C após 30 min, percentual 25% maior que a enzima livre (KUMAR et al., 2015). Lima et al. (2018a) destacaram que a tanase de *A. ficuum* imobilizada em Ca-alginato apresentou estabilidade a 60 °C superior à enzima livre após 120 min de incubação. Andrade et al. (2020) relataram que a enzima de *Penicillium rolsii* CCMB 714, imobilizada em esferas de alginato, manteve 80% de atividade após incubação por 16 h a 40 °C e 50 °C, exibindo maior estabilidade do que a tanase livre.

Figura 34 - Estabilidade térmica a 30 °C (■), 40 °C (●), 50 °C (▲) e 60 °C (▼) da tanase de *A. fumigatus* CAS21 livre (A) e imobilizada em Ca-alginato (B).

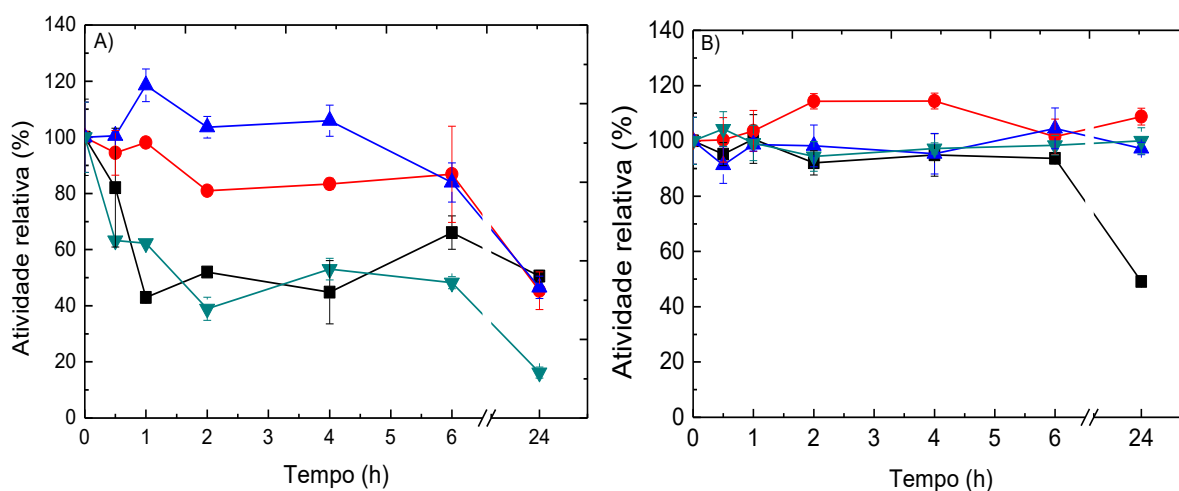


Fonte: Autora (2021).

Na estabilidade ao pH, como pode ser analisada na Figura 35, de forma geral, a tanase livre foi mais estável em valores próximos ao pH ideal. A enzima livre manteve-se estável no pH 5,0 e 6,0 por 6 horas, mantendo em torno de 80% da atividade inicial, e após 24 horas a atividade foi reduzida 50%. No pH 4,0 e 7,0 a atividade foi reduzida com 2 horas de incubação. Assim como observado para estabilidade térmica, a imobilização também conferiu maior resistência a mudanças de pH. Verifica-se que o derivado Ca-alginato exibiu estabilidade superior em diferentes valores de pH por longos períodos de incubação, preservando sua atividade inicial quando incubado em pH 5,0, 6,0 e pH 7,0 após 24 horas. No pH 4,0 manteve-se estável até 6 horas de incubação, contudo, após 24 horas a atividade foi reduzida cerca de 50%. O aumento da estabilidade térmica e ao pH após a imobilização é esperado, uma vez que, de acordo com Sondhi et al. (2018), a imobilização por aprisionamento protege os aminoácidos presentes no sítio ativo e

na superfície da enzima, o que possibilita aumentar a estabilidade térmica e ao pH. Jana et al. (2015) relataram aumento da estabilidade ao pH (3,0-8,0) por 60 min após imobilização da tanase no suporte alginato-quitina. Andrade et al. (2020) descreveram que a tanase imobilizada em alginato foi mais estável do que a enzima livre, em uma ampla faixa de pH (2,0-5,0), por 16 horas. Aharwar e Parihar (2021) observaram aumento da estabilidade da tanase em pH 8,0 e 9,0 por 12 horas após imobilização em esferas de alginato. De acordo Li et al. (2018) enzimas que apresentam pH ideal e estabilidade em pH mais ácidos são preferíveis para aplicação em sucos e chás, por apresentar mais resistência ao ambiente ácido desses produtos.

Figura 35 - Estabilidade ao pH 4 (■), 5 (●), 6 (▲) e 7 (▼) da tanase de *A. fumigatus* CAS21 na forma livre (A) e imobilizada em Ca-alginato (B)



Fonte: Autora (2021).

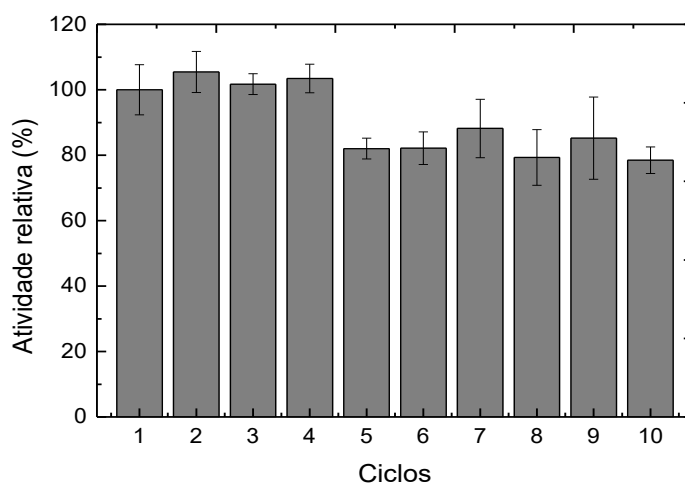
4.4.3 Estabilidade operacional e ao armazenamento

Uma das vantagens da imobilização é a redução do custo de processos enzimáticos pela possibilidade de reutilização do derivado por repetidos ciclos, atrativo importante para aplicação em escala industrial (SONDHI et al., 2018). A reutilização promove economia de enzima, tempo, investimento e mão de obra (ANDRADE et al., 2020). Portanto, o derivado Ca-alginato foi analisado quanto ao ciclo de reutilização e os ensaios foram conduzidos na temperatura e pH que possibilitaram maior atividade enzimática (50 °C e pH 5,0). Na Figura 36, observa-se que a enzima imobilizada reteve sua atividade por diferentes ciclos catalíticos,

mantendo 100% da atividade inicial até o 4º ciclo de reutilização. Após 10 ciclos aproximadamente 78% da atividade enzimática foi preservada. A diminuição da atividade pode ser devida à lixiviação e/ou vazamento da enzima durante as reações após repetidos ciclos. É importante ressaltar que, além de preservar a atividade inicial, não foram observadas mudanças visuais, como danos físicos (quebra) ou de coloração, no derivado ao longo dos 10 ciclos de reutilização. Adicionalmente, esferas de alginato permitem recuperação rápida e custo reduzido, por empregar apenas o processo de peneiramento.

Destaca-se que os resultados apresentados foram superiores aos encontrados na literatura. Por exemplo, a tanase de *A. ficuum* imobilizada em alginato reteve apenas 35% da atividade no 9º ciclo (LIMA et al., 2018a). A enzima de *P. rolfii* CCMB 714 apresentou retenção de 50% ao longo de 6 ciclos (ANDRADE et al., 2020), e a tanase de *T. verruculosus* manteve 42,9% da atividade inicial após 10 ciclos de reutilização (AHARWAR; PARIHAR, 2021), ambas imobilizadas em esferas de alginato. Os resultados aqui relatados também foram superiores aos descritos para outros tipos de suportes. Wu et al. (2016) descreveram retenção de 60% da atividade tanásica após 6 ciclos de reutilização da enzima imobilizada em nanopartículas magnetizadas. Li et al. (2018) observaram que 50% da atividade tanásica foi preservada após 8 ciclos de utilização das nanopartículas magnéticas de quitosana. A tanase de *A. awamori* imobilizada em Amberlite reteve 52,1% da atividade inicial após 8 ciclos (KUMAR et al., 2015).

Figura 36 - Ciclos de reutilização da tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato

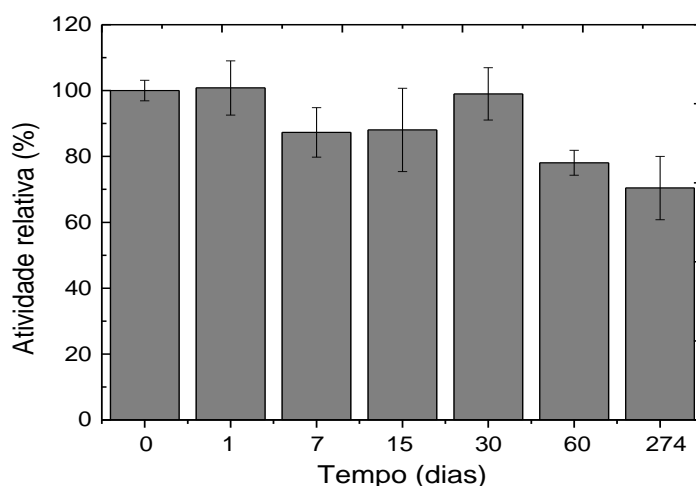


Fonte: Autora (2021).

Além da reutilização, a imobilização pode promover maior estabilidade ao armazenamento, uma vez que, enzimas presentes em soluções são, em sua maioria, instáveis após longo período de estocagem devido a reações com o oxigênio e com o solvente no qual foi armazenada (JANA et al., 2015). Por outro lado, a imobilização por encapsulamento evita o contato direto da enzima com o meio externo, o que pode acarretar a manutenção da atividade enzimática por longos períodos. Deste modo, a estabilidade ao armazenamento da tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato foi verificada por 9 meses (274 dias) a 4 °C e os resultados são apresentados na Figura 37. O derivado demonstrou estabilidade após 30 dias de armazenamento, preservando 99% da atividade enzimática. Após 274 dias (9 meses) de estocagem foi capaz de preservar cerca de 70% da sua atividade inicial.

A estabilidade ao armazenamento para tanases imobilizadas foi relatada anteriormente. Por exemplo, a tanase de *A. tubingensis* CICC 2651 imobilizada em nanopartículas magnetizadas manteve 96% da atividade inicial após 30 dias de armazenamento a 4 °C (WU et al., 2016). Jana et al. (2015) descreveram que o derivado alginato-quitina preservou 83% da atividade inicial após 90 dias de armazenamento a 4 °C. Quando imobilizada em terra de diatomácea magnetizada, a tanase de *A. ficuum* perdeu aproximadamente 29% da atividade após armazenamento a 4 °C por 90 dias (LIMA et al., 2018b). Lima et al. (2018a) demonstraram que a enzima imobilizada em alginato reteve 50% da atividade após 105 dias a 4 °C. Resultados superiores foram apresentados no presente estudo.

Figura 37 - Estabilidade ao armazenamento da tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato



Fonte: Autora (2021).

4.5 Tratamento do chá verde em reator de leito fixo com tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato

A tanase é caracterizada pela sua capacidade de impedir a formação de precipitados insolúveis durante o processamento de chás por atuar, especificamente, na hidrólise de taninos. Diante disto, inúmeras pesquisas surgiram na tentativa de limitar a presença desses compostos por meio do tratamento enzimático, empregando essencialmente a tanase (SIRVEN; NEGRETE; TALCOTT, 2019). No entanto, até o presente momento, não há publicações na literatura sobre aplicações dessa enzima em reatores enzimáticos do tipo leito fixo. Em sua maioria, os estudos já relatados utilizaram pequenos volumes de chá ou suco e, geralmente, conduzidos em tubos de ensaio ou frascos de pequeno volume.

4.5.1 Influência da vazão de alimentação e tempo espacial no tratamento enzimático do chá verde

No presente estudo, a tanase imobilizada em esferas de Ca-alginato foi aplicada para tratamento do chá verde e o processo realizado em reator de leito fixo durante 24 horas, conduzido, inicialmente, em diferentes vazões de alimentação para investigar a melhor condição operacional. A Tabela 8 apresenta os parâmetros do processo realizado com sistema de reciclo do chá verde. O maior tempo espacial, ou seja, tempo necessário para processar um volume de alimentação, foi detectado na vazão de 0,5 mL/min. Entende-se, portanto que, a cada 87,26 min o volume útil do reator foi tratado, ou seja, 43,60 mL de chá verde foram tratados. Verifica-se que, quanto maior a vazão menor o tempo espacial, por outro lado, maior a velocidade espacial. A velocidade espacial na vazão de 5 mL/min significa que 7,36 volumes de reator, em condições específicas, foram alimentados no reator por hora. Enquanto que a 0,5 mL/min esse valor é de 0,69. A porosidade indica o grau de compactação do leito e depende do tamanho e forma das partículas. Nos processos, as esferas de alginato apresentaram tamanhos e formas similares, portanto, a porosidade calculada foi praticamente a mesma e próxima a relatada por Oliveira et al. (2018)

para partículas esféricas aplicadas em PBR. Neste ponto, é importante ressaltar que não ocorreu entupimento do sistema nas operações realizadas, fato este, que pode ser relacionado com o tamanho da partícula dos derivados. Segundo Poppe et al. (2015), para evitar entupimento e queda acentuada de pressão, os suportes usados para imobilizar enzimas não devem ter tamanhos menores que 0,05 mm. Neste estudo, as partículas apresentaram diâmetros em torno de 0,40 cm.

Com relação a redução do teor de taninos, observa-se que o menor índice foi obtido no processo com vazão de 0,5 mL/min, com 40% dos taninos hidrolisados após 24 horas de operação. Nas demais vazões foram observadas variações próximas, entre 18 e 24%. No entanto, quando se considera os parâmetros produtividade volumétrica e taxa de formação dos produtos ácido gálico (AG) e flavonoides (FL) verifica-se que esses índices aumentaram de acordo com a vazão e o tempo espacial. No processo com vazão de 5,0 mL/min, o teor de taninos foi reduzido cerca 82%, a produtividade volumétrica foi de 4,97 mg mL⁻¹ h e a taxa de formação do AG foi 2,43 mg de ácido gálico por min, cerca de 5 vezes maior comparado com o experimento conduzido a 2 mL/min. Comportamento semelhante foi observado quando considerada a produtividade e a taxa de formação de flavonoides, com aumento de 7 vezes comparado aos índices calculados para vazão 2 mL/min. Apesar do menor tempo de contato da enzima com o chá verde na vazão de 5 mL/min (8,15 min), deve-se considerar que, devido ao sistema de recirculação, a amostra percorre diversas vezes o reator e, após 1 hora de processo, o volume útil do reator (43,60 mL) já foi tratado pelo menos 7 vezes (considerando a velocidade espacial). Por outro lado, na vazão de 2,0 mL/min, apenas 3 volumes do reator foi tratado após 1 hora. Possivelmente, o sistema de recirculação possibilitou maximizar a conversão do substrato em produto devido ao contato repetido do biocatalisador com a amostra.

Ao final de cada processo a atividade enzimática do derivado foi calculada e observa-se que, apesar de 24 horas de operação, as atividades foram mantidas acima 76%, considerando como 100% a atividade fornecida no início do processo. A redução na atividade é esperada e pode ser causada pelo bloqueio dos poros do derivado ou lixiviação (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2011). De acordo com Basso e Serban (2019), as indústrias, geralmente, substituem os biocatalisadores quando a atividade residual está entre 50% e 10% da atividade inicial. Portanto, independente

da vazão empregada, a tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em alginato pode ser reutilizada e aplicada para mais ciclos de operação em PBR.

Tabela 8 - Parâmetros calculados do processo conduzido em reator de leito fixo para tratamento enzimático do chá verde com tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em esferas de alginato em um período de 24 horas

Q (mL/min)	τ (min)	ϵ	S (h⁻¹)	T (%)	P_{AG} (mg/ml h)	P_{FL} (mg/ml h)	R_p AG (mg/min)	R_p FL (mg/min)	AR (%)
0,5	87,26	0,59	0,69	40,41 ± 1,5	0,22	1,56	0,10 ± 0,0	0,29 ± 0,0	79,27 ± 5,6
1,0	43,63	0,59	1,38	20,87 ± 0,4	0,44	2,72	0,15 ± 0,0	0,56 ± 0,0	90,36 ± 15,1
2,0	20,36	0,55	2,95	24,43 ± 7,9	1,18	4,72	0,49 ± 0,1	0,58 ± 0,2	76,58 ± 9,6
5,0	8,15	0,55	7,36	18,01 ± 6,0	4,97	16,57	2,43 ± 0,2	3,98 ± 0,8	88,34 ± 7,5

Q: Vazão de alimentação; τ : Tempo espacial; ϵ : porosidade do leito; S: velocidade espacial; T: conteúdo de tanino; P_{AG}: Produtividade de ácido gálico; P_{FL}: Produtividade de flavonoides; R_p AG: Taxa de formação do produto (ácido gálico); R_p FL: Taxa de formação do produto (Flavonoide); AR: Atividade residual. Fonte: Autora (2021).

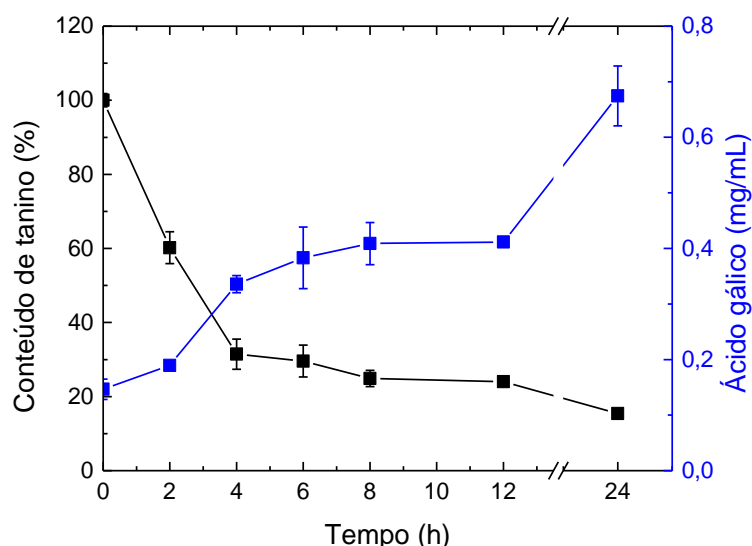
4.5.2 Efeito do tempo de tratamento enzimático na hidrólise dos taninos do chá verde

A concentração de taninos e AG foi monitorada por 24 horas para analisar qual o melhor tempo de operação do PBR operando na vazão de 5 mL/min e tempo espacial de 8,15 min. Na Figura 38 verifica-se que, após preenchimento completo do reator com chá verde e estabilização do processo, com 2 horas de operação o teor de taninos foi reduzido cerca 40%. Ao longo do processo, o conteúdo de taninos diminuiu gradativamente, enquanto que conseqüentemente, a concentração de ácido gálico aumentou. Após 24 horas, cerca de 85% dos taninos foram hidrolisados e a concentração de ácido gálico aumentou 256%. Ressalta-se que o processo foi conduzido no tempo máximo de 24 horas para evitar contaminação microbiana. De acordo com Li et al. (2017), há uma correlação entre a hidrólise dos taninos do chá e o tempo de tratamento enzimático. Os autores observaram que maior tempo de tratamento do chá *Tieguanyin oolong* com tanase proporcionou maior redução do conteúdo de taninos e aumento na concentração de AG. Há inúmeros relatos na literatura sobre o uso da tanase em bebidas para hidrólise dos taninos, denominada também de processo de detanificação. Lima et al. (2018a) descreveram que o tratamento do chá de boldo com tanase imobilizada em alginato reduziu 31% do teor de taninos após 2 horas. Jana et al. (2015) relataram o uso eficiente da tanase imobilizada em esferas de alginato-quitina para reduzir cerca de 60 e 51% dos taninos presentes no suco de jamun e caju, respectivamente, após 2 horas de aplicação. A tanase de *T. verruculosus* imobilizada em alginato de cálcio reduziu 59% dos taninos presentes no chá verde (AHARWAR; PARIHAR, 2021). Os estudos citados foram conduzidos empregando volumes de chá e suco de aproximadamente 5 - 10 mL e os experimentos realizados em tubos. Como dito anteriormente, este é o primeiro relato da aplicação de reator tipo leito fixo operando com tanase imobilizada para o tratamento de bebidas.

A tanase imobilizada em alginato atende aos requisitos desejados para biocatalisadores utilizados na indústria alimentícia em processos conduzidos em PBR, uma vez que apresenta estabilidade operacional, possibilidade de reutilização do biocatalisador por repetidos ciclos e potencial de operação em fluxo contínuo (BASSO; SERBAN, 2019). Destaca-se ainda, que o uso da tanase ocasionou o aumento significativo da concentração de ácido gálico no decorrer do tratamento. De

acordo com Hong et al. (2020), o aumento da concentração do ácido gálico após tratamento enzimático é fator essencial, visto os benefícios que este composto apresenta, como atividades antioxidante, anti-inflamatória, e antimicrobiana, entre outras. Kim et al. (2020) investigaram o potencial do chá verde tratado com tanase para melhorar o metabolismo dos adipócitos e observaram que a tanase exerce efeitos benéficos sobre a regulação da diferenciação e no metabolismo dos adipócitos, devido a hidrólise de EGCG em EGC e AG. De acordo com os autores, a biotransformação de chá verde mediada por tanase fornece à bebida propriedades antiobesidade aprimoradas. Hong et al. (2020) demonstraram o potencial do ácido gálico e outros compostos fenólicos, convertido pela ação da tanase no chá verde, em modular as vias de sinalização intracelular para prevenir ou tratar a atrofia muscular. Os autores relatam que o alto conteúdo de CE, ECG e AG, devido a ação da tanase, pode ser usado como um complemento para aliviar a perda muscular nas células musculares esqueléticas. Hwang et al. (2019) descreveram que o chá verde tratado com tanase apresentou potencial efeito terapêutico no tratamento de dermatite atópica. Os autores observaram que a administração oral do chá verde tratado com a enzima suprimiu a inflamação da pele e os sintomas de lesões cutâneas do tipo dermatite atópica em camundongos.

Figura 38 - Efeito do tratamento enzimático do chá verde com tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato em reator de leito fixo operando a taxa de vazão de 5,0 mL/min, 37 °C por 24 horas no teor de taninos (■) e na concentração de ácido gálico (■)



Fonte: Autora (2021).

4.5.3 Propriedades físico-químicas do chá verde após tratamento enzimático

A Tabela 9 apresenta as propriedades físico-químicas do chá verde não-tratado e após tratamento com tanase imobilizada, empregando as melhores condições operacionais. O tratamento enzimático possibilitou uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de qualidade do chá. O teor de taninos foi reduzido 84,56% e, em decorrência da hidrólise desses compostos, observou-se aumento de ácido gálico (3,6 vezes), flavonoides (1,55 vez) e glicose (1,2 vez). Os fenóis totais foram reduzidos aproximadamente 41% e a concentração de antioxidante aumentou 25%. De acordo com Govindarajan et al. (2016), estes resultados são esperados, uma vez que, a tanase libera monômeros dos taninos e potencializa as propriedades nutricionais das bebidas pelo aumento da concentração de ácido gálico e antioxidantes. Jana et al. (2015) descreveram aumento significativo do teor de flavonoides, concentração de glicose e compostos antioxidantes dos sucos de jamun e caju após tratamento com tanase. Xu et al. (2019) relataram que a adição da tanase no chá verde melhorou a biotransformação dos polifenóis presentes no chá, além de aumentar as atividades antioxidantes dos compostos, como ácido gálico.

Após tratamento enzimático, a concentração de proteínas foi reduzida. No entanto, é perceptível que não houve alteração significativa no teor de carboidratos. Adicionalmente, o pH foi levemente deslocado de uma faixa mais ácida (4,37) para menos ácida (5,28). A aplicação da tanase também promove melhorias na cor e clareza, parâmetros importantes para comercialização e consumo de bebidas (JANA et al., 2015). A ligação dos taninos com macromoléculas promove a formação de partículas coloidais suspensas, o que acarreta um aumento na turbidez e diminuição da clareza do chá (LI et al., 2018). Nesta pesquisa, após tratamento com tanase, a clareza do chá aumentou de 54,80% para 84,75% e a cor foi reduzida cerca de 52%. Lima et al. (2018a) também relataram que o tratamento com tanase, além de reduzir o conteúdo de taninos e elevar a concentração de AG, proporcionou aumento na clareza, diminuição de 10% na cor do chá de boldo e não promoveu alteração no pH. Li et al. (2018) descreveram maior grau de clareza para o chá verde e o chá preto após tratamento enzimático utilizando a tanase imobilizada em nanopartículas. De acordo com autores, este resultado indica que há menos partículas coloidais no chá tratado, possivelmente, devido a hidrólise dos taninos.

Tabela 9 - Propriedades físico-químicas do chá verde não tratado e após tratamento enzimático

Parâmetros	Não tratado (controle 24h)	Tratado (24 h)
Tanino (%)	100 ± 0,8 ^A	15,44 ± 0,5 ^B
Ácido gálico (mg mL ⁻¹)	0,19 ± 0 ^A	0,68 ± 0 ^B
Flavonoides (mg mL ⁻¹)	1,45 ± 0 ^A	2,25 ± 0,12 ^B
Fenóis (mg de AG mL ⁻¹)	1,82 ± 0 ^A	1,07 ± 0,1 ^B
Antioxidante (mg de trolox mL ⁻¹)	0,52 ± 0 ^A	0,65 ± 0,1 ^B
Cor (A _{420nm})	9,43 ± 0 ^A	4,49 ± 0 ^B
Clareza (T _{660%})	22,6 ± 2,4 ^A	59,00 ± 9,5 ^B
pH	4,47	5,28
Carboidratos (mg mL ⁻¹)	2,82 ± 0,1 ^A	2,83 ± 0 ^A
Proteínas (mg mL ⁻¹)	0,53 ± 0,0 ^A	0,11 ± 0 ^B
Glicose (mg mL ⁻¹)	0,51 ± 0 ^A	0,60 ± 0 ^B

* Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: Autora (2021).

4.6 Tratamento de efluente da indústria de curtume em reator de leito fixo com tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato

Todas as etapas da indústria de couro são caracterizadas pela geração de grandes volumes de efluentes, constituído, principalmente, por solventes, sulfetos, ácidos, álcalis, sais de cromo, íons metálicos, fenóis, taninos vegetais, corantes, surfactantes e outros (LOFRANO et al., 2013; TENG et al., 2016). Os taninos são moléculas de natureza recalcitrante e tóxica para alguns microrganismos, portanto, quando estão presentes em altas concentrações podem dificultar ou diminuir a eficiência dos tratamentos biológicos. Deste modo, os processos biológicos convencionais podem não ser capazes de melhorar a qualidade do efluente o suficiente para atender aos critérios de descarte (ZHANG et al., 2015). O tratamento enzimático, como etapa primária, pode ser útil na redução da poluição ambiental causada pelos taninos e compostos fenólicos. Na literatura há poucos relatos sobre aplicação de tanase para tratamento de efluentes. Deste modo, um sistema de pré-tratamento enzimático com tanase imobilizada foi desenvolvido em PBR para reduzir a concentração de taninos e fenóis dos efluentes de curtume, afim de minimizar os

problemas causados pela presença desses compostos durante o tratamento biológico.

4.6.1 Influência da vazão de alimentação e tempo espacial no tratamento enzimático do efluente de curtume

Na Tabela 10 são apresentados os parâmetros dos processos conduzidos em diferentes vazões de alimentação por 24 horas. É possível analisar que o tempo espacial foi maior (69,64 min) quando o sistema foi operado a 0,5 mL/min e decresceu de acordo com o aumento da vazão aplicada. Processo inverso foi observado para a velocidade espacial. Por exemplo, no reator operando a 5 mL/min a velocidade espacial foi de 7,79 h⁻¹, deste modo, entende-se que 7,79 volumes de reator foram alimentados por hora. Já na vazão de 0,5 mL/min, apenas 0,86 do volume de reator foi tratado com 1 hora de processo. Portanto, apesar de menor tempo de contato entre a enzima e o efluente, considerando o tempo espacial de 7,70 min, na vazão de 5,0 mL/min, maior volume de amostra foi submetida ao tratamento. Este resultado corrobora com os índices de teor de taninos ao final de 24 horas, uma vez que, a menor porcentagem de taninos (18,29%) foi obtida no processo com reator operando a 5 mL/min, tempo espacial de 7,70 min e velocidade espacial de 7,79 h⁻¹. Com relação a porosidade do leito, ou espaço de vazio, verifica-se que variou entre 0,47 e 0,55, similares aos descritos para o tratamento do chá verde. No final do processo as atividades enzimáticas foram mantidas acima de 64%, o que possibilita a reutilização do derivado para mais um ciclo de aplicação.

Tabela 10 - Parâmetros calculados do processo conduzido em reator de leito fixo para tratamento enzimático do efluente da indústria de curtume com tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em esferas de alginato

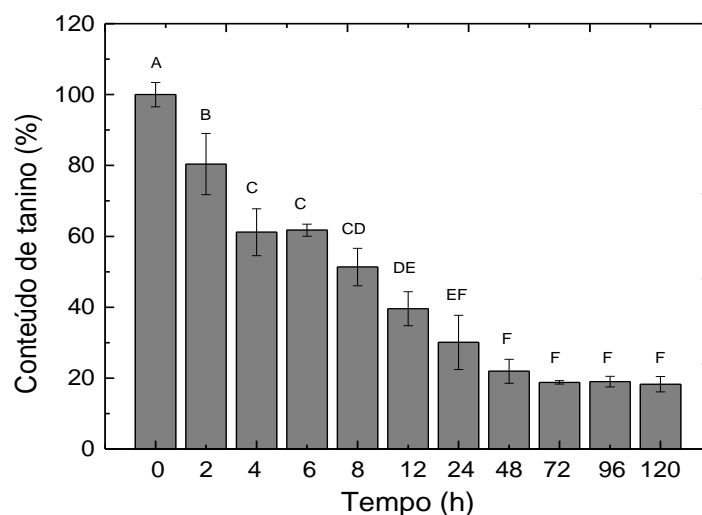
Q (mL/min)	T̄ (min)	ε	S (h ⁻¹)	T (%)	AR (%)
0,5	69,64	0,47	0,86	41,27 ± 8,8	93,44 ± 7,0
1,0	39,51	0,54	1,52	31,32 ± 2,3	64,55 ± 16,6
2,0	20,39	0,55	2,94	27,67 ± 7,7	92,44 ± 1,9
5,0	7,70	0,52	7,79	18,29 ± 2,1	96,78 ± 1,5

Q: Vazão de alimentação; T̄: Tempo espacial; ε: porosidade do leito; S: velocidade espacial; T: conteúdo de tanino; AR: Atividade residual.
Fonte: Autora (2021).

4.6.2 Efeito do tempo de tratamento enzimático na hidrólise dos taninos presentes no efluente

A influência do tempo no tratamento enzimático do efluente industrial foi investigada no reator operando com vazão de alimentação de 5 mL/min e tempo espacial 7,70 min, por exibir o menor índice de teor de taninos, ao final de 24 horas, comparado com os demais processos. A Figura 39 apresenta o perfil de detanificação do efluente no decorrer de 120 horas em PBR. Neste ponto, é importante ressaltar que este processo foi realizado por maior tempo por não necessitar de controle asséptico. Verifica-se que nos primeiros instantes ($t = 2$ horas) 20% dos taninos foram hidrolisados e após 8 horas a taxa de redução foi em torno de 50%. Nos tempos de 48 a 120 horas não foram observadas variações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no teor de taninos, mantendo-se na faixa de 20%. É importante ressaltar que, o tratamento enzimático com tanase fornece como produtos de hidrólise moléculas de ácido gálico e glicose, compostos atóxicos e biodegradáveis, mais suscetíveis ao tratamento subsequente (MURUGAN; AL-SOHAIBA, 2010).

Figura 39 - Detanificação do efluente da indústria de curtume pela ação da tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato em reator de leito fixo operando com vazão de 5,0 mL/min, 37 °C por 120 horas



* Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autora (2021).

Ao final do processo, a atividade enzimática foi preservada 79,32%. Algumas enzimas podem ser inibidas na presença dos produtos de hidrólise, principalmente quando este produto é glicose (RIUL et al., 2013). De acordo com Cavalcanti, Jorge e Guimarães (2018), a atividade da tanase de *A. fumigatus* CAS21 é inibida em altas concentrações de ácido gálico (10 mmol L⁻¹) e estável em 50 mmol L⁻¹ de glicose. Deste modo, o ácido gálico, oriundo da hidrólise dos taninos, pode ter interferido na atividade enzimática, por isso a partir de 48 horas o teor de taninos manteve-se constante. Adicionalmente, outra hipótese para este comportamento é a presença de taninos não hidrolisáveis no efluente. A casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) ou angico vermelho é amplamente utilizada como agente curtidor nas indústrias de curtume do nordeste brasileiro (PAES et al., 2010), sendo o único agente utilizado na etapa de curtimento do couro de bode da Cooperativa Arteza, local onde foi coletado o efluente utilizado neste estudo. Paes et al. (2010) e Martins et al. (2020) detectaram a presença de taninos condensados e hidrolisáveis na casca de angico da espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.). Os taninos condensados são caracterizados pela resistência a hidrólise por ação enzimática devido as ligações carbono-carbono presentes nas suas estruturas.

Alguns estudos apontam a eficiência da enzima livre para detanificação dos efluentes industriais. A tanase comercial de *A. ficuum* foi suplementada em reator aeróbico para aumentar a biodegradabilidade dos taninos. Balakrishnan, Sri Bala e Kalyanaraman (2018) relataram que a enzima removeu 57% dos taninos presentes nos efluentes do processo de curtimento após 24 horas, este resultado acarretou no aumento da eficiência do tratamento biológico. Sharma e Saxena (2012) descreveram que as tanases de *A. niger* e *P. variable* degradaram 45 e 36% dos taninos presentes no efluente do curtume após 48 horas, respectivamente. Aracri, Cavalcanti e Guimarães (2019) relataram o potencial da tanase produzida por biofilmes de *A. ochraceus* para o tratamento de efluente da indústria de curtume, com remoção de aproximadamente 83% dos taninos e 64% dos compostos fenólicos. A tanase de *A. fumigatus* CAS21 foi anteriormente relatada pela sua capacidade de hidrólise dos compostos polifenólicos presentes nos efluentes da indústria de curtume (CAVALCANTI; JORGE; GUIMARÃES, 2018). No entanto, a maioria dos estudos citados acima foi conduzido em tubos de ensaio, com volumes

de efluentes inferiores aos utilizados neste estudo e aplicando a tanase na forma livre.

O tratamento enzimático aqui apresentado exibiu maior eficácia na remoção dos taninos quando comparado com os tratamentos biológicos já relatados. No sistema de lodo ativado, aproximadamente 34% dos taninos presentes nos efluentes da indústria de couro foram removidos com 72 horas de processo (BALAKRISHNAN; SRI BALA; KALYANARAMAN, 2018). De acordo Vashi, Iorhemen e Tay (2018), 97% dos taninos do efluente da indústria de papel e celulose foram removidos após 10 dias de tratamento empregando o método de lodo granular, técnica que favorece o tratamento de moléculas recalcitrantes como fenóis. Verifica-se, então, que o tratamento com tanase é mais eficaz para remoção dos taninos em menor tempo de processo comparado com as metodologias usualmente utilizadas.

4.6.3 Caracterização físico-química do efluente de curtume após tratamento enzimático

As propriedades físico-químicas dos efluentes não-tratado e após tratamento enzimático por 48 horas são apresentadas na Tabela 11. Além do teor de taninos, o uso de tanase promoveu redução de 70% dos compostos fenólicos presentes no efluente. Cavalcanti, Jorge e Guimarães (2018) e Aracri, Cavalcanti e Guimarães (2019) também observaram que, além de hidrolisar os taninos presentes nos efluentes de curtume, a tanase foi eficiente em reduzir o teor de compostos fenólicos totais.

A cor e a clareza são parâmetros importantes que indicam o grau de qualidade de águas residuais (MULLINS et al., 2018). A cor intensa dos efluentes da indústria de curtimento é considerada um problema para o tratamento dessas amostras. Geralmente, as águas residuais são caracterizadas pela aparência turva e coloração escura, de cor verde quando usado cromo ou castanha escura no curtimento com tanino (DURAI; RAJASAIMMAN, 2011). A coloração escura impede a penetração da luz solar, o que provoca redução da fotossíntese e inibe o crescimento da biota (CARPENTER et al., 2013). Nesta pesquisa a cor dos efluentes foi reduzida aproximadamente 48,76% e a clareza aumentou 6,65 vezes. Quanto maior o grau clareza de um efluente, menor seu índice de turbidez, ou seja, menor

concentração de sólidos presentes. Portanto, a hidrólise dos taninos pela ação da tanase permitiu menor concentração de sólidos insolúveis nos efluentes, o que proporcionou aumento da clareza. No que diz respeito ao pH, não foi observada mudança significativa. Similares aos resultados descritos, Murugan e Al-Sohaiba (2010) descreveram que, além da remoção de 58% dos taninos presentes nos efluentes da indústria de suco de manga, o tratamento enzimático com tanase teve impacto significativo na redução da cor dos efluentes.

Tabela 11 - Características físico-químicas do efluente vegetal não tratado e após tratamento enzimático conduzido em reator de leito fixo por 24 e 48 horas

Parâmetros	Não tratado	Efluente tratado (48 h)
Tanino (%)	100 ± 5,5 ^A	21,93 ± 3,4 ^B
Fenóis (mg de AG/mL)	0,64 ± 0 ^A	0,19 ± 0 ^B
Cor (A _{420nm})	20,10 ± 0,2 ^A	10,30 ± 0,1 ^B
Clareza (T _{660%})	7,65 ± 0,4 ^A	50,85 ± 0,4 ^B
pH	7,22	7,83

* Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autora (2021).

É importante ressaltar que a hidrólise de taninos é primordial para reduzir o grau de toxicidade que os efluentes da indústria de curtume apresentam. Hansen et al. (2020), ao estudarem a citotoxicidade dos produtos químicos presentes nos efluentes da indústria de couro em fibroblastos V79-4, verificaram que os taninos vegetais apresentaram 60,1% de toxicidade aguda e 50 a 60% de toxicidade nos ensaios crônicos. Adicionalmente, os autores afirmaram também que esses compostos são responsáveis pela maior carga de poluição das águas residuais.

Estes resultados demonstram, portanto, que o tratamento dos efluentes da indústria de curtume com tanase pode contribuir para reduzir o teor de taninos e compostos fenólicos, além de melhorar as propriedades físico-químicas dos efluentes, como cor e clareza.

5. CONCLUSÕES

Os estudos desenvolvidos propiciaram a secagem eficiente em *spray dryer* da tanase de *A. phoenicis*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* CAS21, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius*, com manutenção da atividade enzimática após armazenamento por 1 ano. Os produtos secos de *A. fumigatus* CAS21, *A. ochraceus*, *A. niger* ANG18 e *A. carbonarius* apresentaram potencial de aplicação na síntese de propil galato e na ração animal.

Adicionalmente, demonstrou que as tanases de *Aspergillus* podem ser imobilizadas em diferentes suportes pelos métodos de encapsulação, ligação covalente e iônica. Destaca-se que a enzima de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato apresentou maiores taxas de rendimento, eficiência e atividade recuperada, com potencial de aplicação em reator de leito fixo para tratamento do chá verde e de efluente da indústria de curtume. Os resultados alcançados em escala de bancada são promissores para escalonamento dos processos até os níveis de planta piloto e industrial.

A seguir, são listadas as conclusões de forma pontual:

- As tanases das diferentes espécies de *Aspergillus* foram capazes de manter suas atividades catalíticas após o processo de *spray dryer* na presença dos adjuvantes β -Ciclodextrina, amido Capsul®, farinha de soja, lactose e maltodextrina;
- Os produtos secos apresentaram características importantes para futuras aplicações e uso comercial, como valores adequados de atividade de água e teor de umidade que garantem sua estabilidade física, química e biológica;
- A secagem em *spray dryer* permitiu a manutenção da atividade tanásica após armazenamento por 1 ano em temperatura ambiente (28 °C) e a 4 °C, importante qualidade para sua comercialização;
- As interações enzima-adjuvante melhoraram as características bioquímicas das tanases secas quando comparadas a sua forma solúvel, como resistência a diferentes temperaturas e pH por longos períodos.
- A tanase seca de *A. fumigatus* CAS21 em lactose exibiu potencial para aplicação na síntese de propil galato e, adicionalmente, permitiu a reutilização da enzima seca.

- O uso de farinha de soja como adjuvante possibilitou a aplicação da tanase seca de *A. carbonarius*, *A. niger* ANG18 e *A. ochraceus* na ração animal. A formulação pode ser aplicada em ração de peixes, ruminantes e aves a base de subprodutos vegetais para reduzir o teor de taninos e compostos fenólicos totais;
- O alginato de sódio reticulado com $MnCl_2$ é uma matriz adequada para imobilização de tanase;
- A tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato é resistente a altas temperaturas e estáveis em diferentes faixas de pH por 24 horas. Além disso, permite reutilização por diferentes ciclos reacionais, mantendo atividade enzimática superior a 78%, e apresenta estabilidade ao armazenamento por 9 meses a 4 °C. A enzima imobilizada mostrou desempenho superior à sua forma livre;
- O derivado Ca-alginato é adequado para operações em PBR e atende as exigências necessárias para aplicação na indústria alimentícia;
- O PBR, operando com sistema de recirculação, foi eficiente para uso da tanase imobilizada de *A. fumigatus* CAS21 no tratamento do chá verde e de efluente da indústria de curtume;
- A aplicação da tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em esferas de alginato foi eficiente para reduzir o teor de taninos do chá verde, aumentar a concentração de AG e atividade antioxidante, melhorando, portanto, o valor nutricional da bebida;
- A tanase imobilizada em Ca-alginato possibilitou reduzir os taninos, compostos fenólicos e melhorar a cor e clareza das águas residuais oriundas da indústria de curtume, indicando seu potencial como tratamento primário e uma estratégia para maximizar a eficiência dos tratamentos biológicos subsequentes.
- A tanase de *A. fumigatus* CAS21 imobilizada em Ca-alginato apresenta potencial biotecnológico e versatilidade para diferentes aplicações.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para aprimorar a aplicação das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus* sugere-se como pesquisas futuras:

- Otimizar as condições de secagem, afim de analisar as variáveis do processo em *spray dryer*;
- Analisar as melhores condições de temperatura, pH e tempo de reação para síntese de propil galato e determinar a atividade antimicrobiana, toxicidade e atividade antioxidante do PG produzido por via enzimática;
- Aplicar a ração tratada com tanase na alimentação animal;
- Escalonar os experimentos de aplicação da tanase imobilizada em PBR para escala piloto.

REFERÊNCIAS

- ABD EL TAW, A. M.; KHATTAB, M. S. A. Utilization of polyethylene glycol and tannase enzyme to reduce the negative effect of tannins on digestibility, milk production and animal performance. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 13, n. 3, p. 201-209, 2018.
- ABDEL-MAGEED, H. M.; FOUAD, S. A.; TEAIMA, M. H.; ABDEL-ATY, A. M.; FAHMY, A. S.; SHAKER, D. S.; MOHAMED, S. A. Optimization of nano spray drying parameters for production of α -amylase nanopowder for biotherapeutic applications using factorial design. **Drying Technology**, v. 37, n. 16, p. 2152–2160, 2019.
- ABDULLA, J.; ROSE, S. P.; MACKENZIE, A.M.; MIRZA, W.; PIRGOZLIEV, V. Exogenous tannase improves feeding value of a diet containing field beans (*Vicia faba*) when fed to broilers. **British Poultry Science**, v. 57 (2), p. 246-250, 2016.
- ADHIKARI, S.; PRAMANIK, N. Application of immobilized enzymes in the food industry. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 711-721, 2019.
- AGUILAR, C. N.; GUTIERREZ-SANCHE, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 5, p. 373-382, 2001.
- AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES E, PRADO-BARRAGAN, L. A.; RAMÍREZ-CORONEL, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL. Microbial tannases: Advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 47–59, 2007.
- AHARWAR, A.; PARIHAR, D. K. *Talaromyces verruculosus* tannase immobilization, characterization, and application in tea infusion treatment. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021.
- AHARWAR, A.; PARIHAR, D. K. Tannases: Production, properties, applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 322-334, 2018.
- AMARA, C. B.; EGHBAL, N.; DEGRAEVE, P.; GHARSALLAOUI, A. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray- drying. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 50-57, 2016.
- ANDRADE, P. M. L.; BAPTISTA, L.; BEZERRA, C. O.; PERALTA, R. M.; GÓES-NETO, A.; UETANABARO, A. P. T.; COSTA, A. M. da. Immobilization and characterization of tannase from *Penicillium rolsii* CCMB 714 and its efficiency in apple juice clarification. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 2020.
- ANGELUCCI, D.; STAZI, V.; DAUGULIS, A. J.; TOMEI, M. C. Treatment of synthetic tannery wastewater in a continuous two-phase partitioning bioreactor: Biodegradation of the organic fraction and chromium separation. **Journal of Cleaner Production**, v. 152, p. 321–329, 2017.
- ARACRI, F. M.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARÃES, L. H. S. Extracellular Tannase from *Aspergillus ochraceus*: Influence of the culture conditions on biofilm formation, enzyme production, and application. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 1749–1759, 2019.

- ARBIGE, M. V.; SHETTY, J. K.; CHOTANI, G. K. Industrial enzymology: the next Chapter. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1355–1366, 2019.
- AZZAZ, H. H.; KHOLIF, A. E.; ABD EL TAWAB, A. M.; KHATTAB, M. S. A.; MURAD, H. A.; OLAFADHAN, O. A. A newly developed tannase enzyme from *Aspergillus terreus* versus commercial tannase in the diet of lactating Damascus goats fed diet containing pomegranate peel. **Livestock Science**, v. 241, n. August, p. 104228, 2020.
- BALAKRISHNAN, A.; SRI BALA, K. K.; KALYANARAMAN, C. Assessment of aerobic biodegradability for vegetable tanning process wastewater generated from leather industry. **Water Quality Management**, v. 79, p. 151–160, 2018.
- BARROS, F.; DYKES, L.; AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 2, p. 305–312, 2013.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, n. March, p. 110607, 2019.
- BEENA, P. S.; BASHEER, S. M.; BHAT, S. G.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Propyl gallate synthesis using acidophilic tannase and simultaneous production of tannase and gallic acid by marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 164, 612-628, 2011.
- BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial production of tannase: State of the art. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 25-40, 2011.
- BENIWAL, V.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; CHHOKAR, V. Recent advances in industrial application of tannases: A review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 7, n. OCTOBER, p. 228–233, 2013.
- BILAL, M.; ASGHER, M.; IQBAL, H. M. N.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X. Bio-catalytic performance and dye-based industrial pollutants degradation potential of agarose-immobilized MnP using a Packed Bed Reactor System. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 582–590, 2017.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 462–482, 2019.
- BOUAZIZ, A. HORCHANI, H.; SALEM, N. B.; CHAARI, A.; CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Enzymatic propyl gallate synthesis in solvent-free system : Optimization by response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 67, n. 3–4, p. 242–250, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUS, J.; URBANOVA, M.; CZERNEK, J.; PAVELKOVA, M.; KUBOVA, K.; VYSLOUZIL, J.; ABBRENT, S.; KONEFAL, R.; HORSKY, J.; VETCHY, D.; VYSLOUZ, J.; KULICH, P. Structure and dynamics of alginate gels cross-linked by polyvalent ions probed via solid state NMR spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 18, p. 2478–2488, 2017.

Business Communication Company (Bcc) Research. Enzyme market size, share & trends analysis report by application (industrial enzymes, specialty enzymes), by product (carbohydrase, proteases, lipases), by source, by region, and segment forecasts, 2020 – 2027. Disponível: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> Acesso: 12 de março de 21.

CABRAL, T. P. F. BELLINI, N. C.; TEIXEIRA, C. C. C.; LANCHOTE, A. D.; CABRAL, H.; FREITAS, L. A. P. Microencapsulate *Aspergillus niger* peptidases from agroindustrial waste wheat bran: spray process evaluation and stability. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 6, p. 560–570, 2017.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray drying technique I: hardware and process parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 575–586, 2010.

CAO, Q. Q.; ZOU, C.; ZHANG, Y. H.; DU, Q. Z.; YIN, J. F.; SHI, J.; XUE, S.; XU, Y. Q. Improving the taste of autumn green tea with tannase. **Food Chemistry**, v. 277, p. 432–437, 2019.

CARAVANTE, A. L. C. **Uso de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho para produção de açúcar invertido.** 2014. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). UNESP, Araraquara, 88 f.

CARPENTER, J.; SHARMA, S.; SHARMA, A. K.; VERMA, S. Adsorption of dye by using the solid waste from leather industry as an adsorbent. **International Journal of Engineering Science Invention**, v. 2, n.1, p. 64- 69, 2013.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 24, p. 270-276, 1939.

CAVALCANTI, R. M. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of *Aspergillus fumigatus* CAS-21 tannase with potential for propyl gallate synthesis and treatment of tannery effluent from leather industry. **3 Biotech**, v. 8, n. 6, p. 0, 2018.

CAVALCANTI, R. M. F.; ORNELA, P. H. O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Screening , selection and optimization of the culture conditions for tannase production by endophytic fungi isolated from Caatinga. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 5, n. 01, p. 1–9, 2017.

CHAMORRO, S.; VIVEROS, A.; REBOLÉ, A.; ARIJA, I.; ROMERO, C.; ALVAREZ, I.; REY, A.; BRENES, A. Addition of exogenous enzymes to diets containing grape pomace: Effects on intestinal utilization of catechins and antioxidant status of chickens. **Food Research International**, v. 96, p. 226–234, 2017.

CHANG, F.; Chen, P., Chen, R. L. C., Lu, F., & Cheng, T. Real-time assay of immobilized tannase with a stopped-flow conductometric device. **Bioelectrochemistry**, v. 69, p. 113–116, 2006.

CHANG, Z.; ZHANG, Q.; LIANG, W.; ZHOU, K. JIAN, P.; SHE, G.; ZHANG, L. A. A Comprehensive review of the structure elucidation of tannins from *Terminalia Linn.* **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

CHÁVEZ GONZÁLEZ, M. L. et al. Tannases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**, p. 471–489, 2016.

CHEONG, A. M.; NYAM, K. L. Improvement of physical stability of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions by addition of β -cyclodextrin to primary emulsion containing sodium caseinate and Tween 20. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 24–31, 2016.

CHOUBEY, S.; GOYAL, S.; VARUGHESE, L. R.; KUMAR, V.; SHARMA, A. K.; BENIWAL, V. Probing gallic acid for its broad spectrum applications. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1283–1293, 2018.

COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 399-404. 2008.

COSTA, S. S. MACHADO, A. S.; MARTIN, A. R.; BAGNARA, F.; RAGADALLI, S. A.; ALVEZ, A. R. C. Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 9, p. 462–470, 2015.

COSTA-SILVA, T. A.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; SAID, S. Characterization and spray drying of lipase produced by the endophytic fungus *Cercospora kikuchii*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 849-858, 2014.

CRESTINI, C.; LANGE, H. A novel and efficient immobilised tannase coated by the layer-by-layer technique in the hydrolysis of gallotannins and ellagitannins. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 139–147, 2015.

DAI, X. LIU, Y.; ZHUANG J., YAO, S. LIU, L.; JIANG, X.; ZHOU, K.; Wang, Y.; Xie, D.; BENNETZEN, J. L.; GAO, L.; XIA, T. Discovery and characterization of tannase genes in plants: roles in hydrolysis of tannins. **New Phytologist**, v. 226, n. 4, p. 1104–1116, 2020.

DAL MAGRO, L. PESSOA, J. P. S.; KLEIN, M. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Enzymatic clarification of orange juice in continuous bed reactors: Fluidized-bed versus packed-bed reactor. **Catalysis Today**, n. February, 2020.

DE NICOLA, E. MERIÇ, S., GALLO, M., IACCARINO, M., DELLA ROCCA, C., LOFRANO, G., RUSSO, T., PAGANO, G. Wastewater toxicity of tannin- versus chromium-based leather tanneries in Marrakesh, Morocco. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 3, p. 321–328, 2007.

DHIMAN, S.; MUKHERJEE, G.; SINGH, A. K. Recent trends and advancements in microbial tannase-catalyzed biotransformation of tannins: a review. **International Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 175–195, 2018.

DIXIT, S.; YADAV, A.; DWIVEDI, P. D.; DAS, M. Toxic hazards of leather industry and technologies to combat threat: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 87, n. C, p. 39-49, 2015.

DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E., TRAN-NGUYEN, P. L., HUYNH, L. H., SOETAREDJO, F. E., ISMADJI, S., & JU, Y. H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 296–302, 2014.

DREVELEGKA, I.; GOULA, A. M. Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 149, n. January, p. 107845, 2020.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DURAI, G.; RAJASAIMMAN, M. Biological treatment of tannery wastewater – A Review. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, p. 1-17, 2011.

EBRAHIMZADEH, S. K.; NAVIDSHAD, B.; FARHOOMAND, P.; MIRZAEI AGHJEHGHEHLAGH, F. The metabolizable energy content and effect of grape pomace with or without tannase enzyme treatment in broiler chickens. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 7, n. 3, p. 479–486, 2017.

ENEMUOR, S. C.; ODIBO, F. J. C. Characterization of immobilized tannin acyl hydrolase of *Aspergillus tamaris* IMI388810 (B). **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 3, p. 160–168, 2011.

ESTEVINHO, B. N. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, 2013.

ESTEVINHO, B. N.; RAMOS, I.; ROCHA, F. Effect of the pH in the formation of β -galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 3–7, 2015.

FLOGER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 3^o ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos S.A., 2002.

FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, p. 191–202, 2004.

GÁLICO, D. A.; NOVA, C. V.; GUERRA, R. B.; BANNACH, G. Thermal and spectroscopic studies of the antioxidant food additive propyl gallate. **Food Chemistry**, 2015.

GARRIDO, J.; GARRIDO, E. M.; BORGES, F. Studies on the Food Additive Propyl Gallate: Synthesis, structural characterization, and evaluation of the antioxidant activity. **Journal of Chemical Education**, p. 130–133, 2012.

GHARSALLAOUI, A.; CHAMBIN, O. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients : An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R. F.; GUIMARÃES, L. H. S. Extracellular β -fructofuranosidase from *Fusarium graminearum*: stability of the spray-dried enzyme in the presence of different carbohydrates. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 7, p. 624–631, 2013a).

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; PESSELA, B. C.; LORENTE, G. F.; GUISÁ, J. M.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a tannase from *Emericella nidulans* immobilized on ionic and covalent supports for propyl gallate synthesis. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 4, p. 591-598, 2013b).

GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; QUIAPIN, A. C.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 4, 2012.

GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; TERENCE, H. F. JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Extracellular tannase from *Emericella nidulans* showing hypertolerance to temperature and organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 1–2, p. 29–35, 2011.

GOVINDARAJAN, R. K.; REVATHI, S.; RAMESHKUMAR, N.; KRISHNAN, M. KAYALVIZHI, N. Microbial tannase: Current perspectives and biotechnological advances. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 168–175, 2016.

GUERRAND, D. Economics of food and feed enzymes: Status and perspectives. Status and perspectives. In: NUNES, C. S.; KUMAR, V. (Org.). **Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives**. 1 ed. Orxford: Elsevier, 2018. Cap. 26, p. 487-514.

GUPTA, G.; SAHAI, V.; MISHRA, S.; GUPTA, R. K. Spray-drying of xylanase from thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces* – Effect of carriers and binders on enzyme stability. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 21, p. 89–95, 2014.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 809–812, 1978.

HAMIN NETO, Y. A. A.; COITINHO, L. B.; FREITAS, L. A. P.; CABRAL, H. Box–Behnken analysis and storage of spray-dried collagenolytic proteases from *Myceliophthora thermophila* submerged bioprocess. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 473–480, 2017.

HAMIN NETO, Y. A. A.; FREITAS, L. A. P.; CABRAL, H. Multivariate analysis of the stability of spray-dried *Eupenicillium javanicum* peptidases. **Drying Technology: An International Journal**, v. 32, p. 614-621, 2014.

HANSEN, É.; MONTEIRO DE AQUIM, P.; HANSEN, A. W.; CARDOSO, J. K.; ZIULKOSKI, A. L.; GUTTERRES, M. Impact of post-tanning chemicals on the pollution load of tannery wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 269, n. May, 2020.

HASSOUNE, J.; TAHIRI, S.; AARFANE, A.; EL KRATI, M.; SALHI, A.; AZZI, M. Removal of hydrolyzable and condensed tannins from aqueous solutions by electrocoagulation process. **Journal Environmental Engineering**, v. 143, n. 2009, p. 1–8, 2017.

HE, Q.; YAO, K.; SUN, D.; SHI, B. Biodegradability of tannin-containing wastewater from leather industry. **Biodegradation**, v. 18, n. 4, p. 465-472, 2007.

HIDAYATHULLA, S.; SHAHAT, A. A.; ALSAID, M. S.; AL-MISHARI, A. A. Optimization of physicochemical parameters of tannase post-purification and its versatile bioactivity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 12, 2018.

HONG, K. B.; LEE, H. S.; SHONG, J. S.; KIM, D. H.; MOON, J. M.; PARK, Y. Effects of tannase-converted green tea extract on skeletal muscle development. **BMC**

complementary medicine and therapies, v. 20, n. 1, p. 47, 2020.

HOYOS-LEYVA, J. D.; BELLO-PÉREZ, L. A.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; GARCIA, H. S. Microencapsulation using starch as wall material: A review. **Food Reviews International**, v. 34, n. 2, p. 148–161, 2018.

HOYOS-MARTÍNEZ, P. L. MERLE, J.; LABIDI, J.; CHARRIER – EL BOUHTOURY, F. Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. **Journal of Cleaner Production**, v. 206, p. 1138–1155, 2019.

HWANG, Y. S.; CHANG, B.; KIM, T.; KIM, S. Ameliorative effects of green tea extract from tannase digests on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, n. 2, p. 109–120, 2019.

IIBUCHI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase of *Asp. oryzae* no. 7. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 9, p. 1553–1562, 1972.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C. Enzyme reactors. In: ILLANES, A. (Org.). **Enzyme Biocatalysis: Principles and applications**. United Kingdom: Springer, 2008, p. 205-251.

JANA, A.; HALDER, S. K.; GLOSH, K.; PAUL, T.; VÁGVÖLGYI, C.; MONDAL, K. C.; MOHAPATRA, P. K. das. Tannase Immobilization by chitin-alginate based adsorption-entrapment technique and its exploitation in fruit juice clarification. **Food Bioprocess Technology**, p. 2319–2329, 2015.

JESUS, S. S. DE; MACIEL FILHO, R. Drying of α -amylase by spray drying and freeze-drying – a comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 03, p. 625–631, 2014.

KANAGARAJ, J.; SENTHILVELAN, T.; PANDA, R. C.; KAVITHA, S. Eco-friendly waste management strategies for greener environment towards sustainable development in leather industry: A comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 89, p. 1–17, 2015.

KESHANI, S. DAUD W. R. W.; NOUROUZI, M. M.; NAMVAR, F.; GHASEMI, M. Spray drying : An overview on wall deposition , process and modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 152–162, 2015.

KHANNA, P.; SUNDARIL, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KIM, H. S.; JEON, D. Y.; JAVAID, H. M. A.; SAHAR, N. E.; LEE, H. N.; HONG, S. J.; HUH, J. Y.; KIM, Y. M. Bio-transformation of green tea infusion with tannase and its improvement on adipocyte metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 135, 2020.

KRISHNAMOORTHY, G.; SADULLA, S., SEHGAL, P. K., & MANDAL, A. B. Greener approach to leather tanning process: D-Lysine aldehyde as novel tanning agent for chrome-free tanning. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 277–286, 2013.

KUMAR, A.; DHAR, K.; KANWAR, S. S.; ARORA, P. K. Lipase catalysis in organic

- solvents: advantages and applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, 2016.
- KUMAR, S. S.; SREEKUMAR, R.; SABU, A. Tannase and its applications in food processing. In: PARAMESWARAN, B.; VARJANI, S.; RAVEENDRAN, S. (Org.) **Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability**. Singapore: Springer, 2018. Cap. 19, p. 357-381.
- KUMAR, S.; BENIWAL, V.; KUMAR, N.; KUMAR, A.; CHHOKAR, V.; KHAKET, T. P.; Biochemical characterization of immobilized tannase from *Aspergillus awamori*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p 398-403, 2015.
- KUMARI, A.; KAYASTHA, A. M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads : optimization and characterization. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 69, n. 1–2, p. 8–14, 2011.
- LANGFORD, A. BHATNAGAR, B.; WALTERS, R.; TCHESALOV, S.; OHTAKE, S. Drying technologies for biopharmaceutical applications: Recent developments and future direction. **Drying Technology**, v. 36, n. 6, p. 677–684, 2018.
- LAROSA, C. SALERNO, M.; DE LIMA, J. S.; MERIJS MERI, R.; da SILVA M. F.; de CARVALHO L. B.; CONVERTI, A. Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 900–906, 2018.
- LATA, S.; RANI, P. Tannin degradation efficiency and production of tannase enzyme from *Penicillium duclauxii* by using natural tannin rich agro-residues, its applications and biochemical properties. **Pelagia Research Library**, 6, n. 12, p. 114–123, 2015.
- LAURENTI, R.; REDWOOD, M.; PUIG, R.; FROSTELL, B. Measuring the environmental footprint of leather processing technologies. **Journal of Industrial Ecology**, v. 21, n. 5, p. 1180–1187, 2017.
- LEE, J. K. M.; TAIP, F. S.; ABDULLA, H. Z. Effectiveness of additives in spray drying performance: a review. **Food Research**, v. 2, n. 6, p. 486–499, 2018.
- LI, J.; XIAO, Q.; HUANG, Y.; NI, H. WU, C.; XIAO, A. Tannase application in secondary enzymatic processing of inferior Tieguanyin oolong tea. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 87–94, 2017.
- LI, R.; FU, G.; LIU, C.; MCCLEMENTS, D. J.; WAN, Y.; WAN, S.; LIU, T. Tannase immobilisation by amino-functionalised magnetic Fe₃O₄ - chitosan nanoparticles and its application in tea infusion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1134–1143, 2018.
- LIBARDI, N.; SOCCOL, C. R.; TANOBE, V. O. A.; VANDENBERGHE, L. P. S. Definition of liquid and powder cellulase formulations using domestic wastewater in bubble column reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 1, p. 113–128, 2020.
- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, 1999.
- LIMA, J. S. CABRERA, M. P.; MOTTA, C. M. S.; CONVERTI, A.; CARVALHO JR, L. B. Hydrolysis of tannins by tannase immobilized onto magnetic diatomaceous earth

nanoparticles coated with polyaniline. **Food Research International**, v. 107, p. 470-476, 2018b).

LIMA, J. S.; CABRERA, M. P.; CASAZZA, A. A.; da SILVA, M. f.; PEREGO, P.; de CARVALHO, L. B. Jr.; CONVERTI, A. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018a)

LIPIÄINEN, T.; RÄIKKÖNEN, H.; KOLU, A. M.; PELTONIEMI, M.; JUPPO, A. Comparison of melibiose and trehalose as stabilising excipients for spray-dried β -galactosidase formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1–2, p. 21–28, 2018.

LOFRANO, G.; MERICİ, S.; EMEL, G.; ORHON, D. Science of the total environment chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters : A review. **Science of the Total Environment**, v. 462, p. 265-281, 2013.

LORENZEN, E.; LEE, G. Anomalous redispersibility behavior of glycerophosphate dehydrogenase microparticles dried in an acoustic levitator or bench-top spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 498, n. 1–2, p. 316–317, 2016.

LYU, F.; GAO, J.; SUN, N.; LIU, R.; SUN, X.; CAO, X.; WANG, L.; SUN, W. Adsorption mechanism of propyl gallate as a flotation collector on scheelite: A combined experimental and computational study. **Minerals Engineering**, v. 133, n. January, p. 19–26, 2019.

MAHDAVI, S. A.; JAFARI, S. M.; GHORBANI, M.; ASSADPOOR, E. Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. **Drying Technology**, v. 32, n. 5, p. 509–518, 2014.

MAHENDRAN, B.; RAMAN, N.; KIM, D. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 445-451, 2006.

MANDAL, S.; GHOSH, K. Optimization of Tannase production and improvement of nutritional quality of two potential low-priced plant feedstuffs under solid state fermentation by *Pichia kudriavzevii* isolated from fish gut. **Food Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 86–103, 2013.

MARTINS, R. O.; GOMES, I. C.; MENDONÇA TELLES, A. D.; KATO, L.; SOUZA, P. S.; CHAVES, A. R. Molecularly imprinted polymer as solid phase extraction phase for condensed tannin determination from Brazilian natural sources. **Journal of Chromatography A**, v. 1620, p. 460977, 2020.

MENESES, N. G. T.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separation and Purification Technology**, v. 108, p. 152–158, 2013.

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

MOHTAR, N. S.; RAHMAN, M. B. A.; MUSTAFA, S.; ALI, M. S. M.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.. Spray-dried immobilized lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM in sago.

PeerJ, v. 2019, n. 5, 2019.

MUHLACK, R. A.; POTUMARTHI, R.; JEFFERY, D. W. Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. **Waste Management**, v. 72, p. 99–118, 2018.

MULLINS, D.; JONES, E.; GLAVIN, M.; COBURN, D.; HANNON, L.; CLIFFORD, E. A novel image processing-based system for turbidity measurement in domestic and industrial wastewater. **Water Science and Technology**, v. 77, n. 5, p. 1469–1482, 2018.

MURUGAN, K.; AL-SOHAIBA, S. A. Biocompatible removal of tannin and associated color from tannery effluent using the biomass and tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) enzymes of mango industry solid waste isolate *Aspergillus candidus* MTTC 9628. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 262–271, 2010.

NATH, S.; SATPATHY, G. R. Drying Technology : An international journal a systematic approach for investigation of spray. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 37–41, 1998.

NIE, G.; ZHENG, Z.; YUE, W.; LIU, Y.; LIU, H.; WANG, P.; ZHAO, G.; CAI, W.; XUE, Z. One-pot bio-synthesis of propyl gallate by a novel whole-cell biocatalyst. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 277–282, 2014.

OBÓN, J. M.; LUNA-ABAD, J. P.; BERMEJO, B.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thermographic studies of cocurrent and mixed flow spray drying of heat sensitive bioactive compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 268, n. September 2019, 2020.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.

OLIVEIRA, R. L. de; DIAS, J. L.; DA SILVA, O. S.; PORTO, T. S. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 9–18, 2018.

OMNES, M. H.; LE GOASDUFF, J.; LE DELLIOU, H.; LE BAYON, N.; QUAZUGUEL, P.; ROBIN, J. H. Effects of dietary tannin on growth, feed utilization and digestibility, and carcass composition in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 21–27, 2017.

ONEM, E.; GULUMSER, G.; RENNER, M.; YESIL-CELIK TAS, O. High pressure vegetable tanning of sheepskins using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, p. 259–264, 2015.

ONG, C.; ANNUAR, M. S. M. Immobilization of cross-linked tannase enzyme on multiwalled carbon nanotubes and its catalytic behavior. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 181–187, 2018.

PAES, J. B.; SANTANA, G. M.; DE AZEVEDO, T. K. B.; DE MORAIS, R. M.; CALIXTO, J. T. Substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Veil.) Brenan. var. *cebil* (Gris.) Alts.). **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, n. 87, p. 441–447, 2010.

- PAL, A.; KHANUM, F. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology : Characterization of immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1315–1322, 2011.
- POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; DE FREITAS, V. O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; ZÁCHIA AYUB, M. A. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511–525, 2015.
- RAGHUWANSHI, S.; MISRA, S.; SAXENA, R. K. Treatment of wheat straw using tannase and white-rot fungus to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2014.
- RAO, S.; SANTHAKUMAR, A. B.; CHINKWO, K. A.; WU, G.; JOHNSON, S. K.; BLANCHARD, C. L. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity in sorghum grains. **Journal of Cereal Science**, v. 84, p. 103–111, 2018.
- RAUF, A.; IMRAN, M.; ABU-IZNEID, T.; AHTISHAM-UL-HAQ; PATEL, S.; PAN, X.; NAZ, S.; SANCHES SILVA, A.; SAEED, F. RASUL SULERIA, H. A. Proanthocyanidins: A comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 116, n. May, 2019.
- RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Food Bioscience An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016.
- REN, B.; WU, M.; WANG, Q.; PENG, X.; WEN, H.; MCKINSTRY, W. J.; CHEN, Q. Crystal structure of tannase from *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 15, p. 2737-2751, 2013.
- RIUL, A. GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a glucose and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 86, p. 126–133, 2013.
- ROBERTO, B. S.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; MARTINS, I. M.; NAKAJIMA, V. M.; ALLWOOD, J. W.; DEREK STEWART, D.; MCDUGALL, G. J. Immobilized tannase treatment alters polyphenolic composition in teas and their potential anti-obesity and hypoglycemic activities *in vitro*. **Food & Function**, v. 9, 2016.
- ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 37–42, 2012.
- RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V. VALDIVIA-URDIALES, B.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Novel strategies for upstream and downstream processing of tannin acyl hydrolase. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.
- ROMERO-DONDIZ, E. M.; ALMAZÁN, J. E.; RAJAL, V. B.; CASTRO-VIDAURRE, E. F. Removal of vegetable tannins to recover water in the leather industry by ultrafiltration polymeric membranes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 93, n. June, p. 727–735, 2015.
- SARABANDI, K.; GHAREHBEGLOU, P.; JAFARI, S. M. Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. **Drying**

Technology, v. 38, n. 5–6, p. 577–595, 2020.

SATO, V. S.; COSTA, C. M.; CRISCI, A. R.; SOUZA, L. H. The active role of spray-dried phytase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm in feeding broiler chickens. **Insights in Enzyme Research**. p. 1-8, 2017.

SATO, V. S.; JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R.; GUIMARÃES, L. H. S. Phytase Production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: Characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants. **Journal Microbiology and biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 177–187, 2014.

SAXENA, G.; CHANDRA, R.; BHARAGAVA, R. N. Environmental pollution, toxicity profile and treatment approaches for tannery wastewater and its chemical pollutants. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 240, p. 31-69, 2017.

SCHONS, P. F.; BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Fermentation and enzyme treatments for sorghum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43 (1), p. 89-97, 2012.

SCHUTYSER, M. A. I.; PERDANA, J.; BOOM, R. M. Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. **Trends in Food Science Technonology**, v. 27, n. 2, p. 73-82, 2012.

SHARMA, A.; GUPTA, G.; AHMAD, T.; MANSOOR, S.; KAUR, B. Enzyme engineering: current trends and future perspectives. **Food Reviews International**, v. 37, n. 2, p. 121-154, 2021.

SHARMA, A.; Kumar, A., Meena, K. R., Rana, S., Singh, M., & Kanwar, S. S. Fabrication and functionalization of magnesium nanoparticle for lipase immobilization in n-propyl gallate synthesis. **Journal of King Saud University - Science**, v. 29, n. 4, p. 536–546, 2017.

SHARMA, K. P. Tannin degradation by phytopathogen's tannase: A Plant's defense perspective. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, n. September, p. 101342, 2019.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical biochemistry**, v. 279, n. 1, p. 85–89, 2000.

SHARMA, S.; SAXENA, R. K. Evaluation of the versatility of the tannases produced from *Aspergillus niger* and *Penicillium variable* with respect to gallic acid production , gallate ester synthesis , animal feed improvement , tannery effluent degradation and tannin stain removal. **Research in Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 9–20, 2012.

SHIGA, H.; JOREAU, H.; NEOH, T. L.; FURUTA, T.; YOSHII, H. Encapsulation of alcohol dehydrogenase in mannitol by spray drying. **Pharmaceutics**, v. 6, p. 185-194, 2014.

SHISHIR, M. R. I. XIE, L.; SUN, C.; ZHENG, X.; CHEN, W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, n. December 2017, p. 34–60, 2018.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 65, p. 49–67, 2017.

SIENIAWSKA, E.; BAJ, T. Tannins. In: BADAL, S.; DELGODA, R. (Org.). **Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies**. Elsevier, 2018. Cap. 10, p. 199-232.

SILVA, F. C. FONSECA, C. R.; ALENCAR, S. M. de; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; PITTIA, P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried *propolis*, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 1, p. 28–36, 2013a.

SILVA, I. P. STRINGHETA, P. C.; TEOFILO, R. F.; DE OLIVEIRA, I. R. N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaborcaba (*Myrciaria jaborcaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 538–544, 2013b.

SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Continuous hydrolysis of pullulan using covalently immobilized pullulanase in a packed bed reactor. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 672–675, 2011.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 79, p. 179–211, 2016.

SIRVEN, M. A.; NEGRETE, M.; TALCOTT, S. T. Tannase improves gallic acid bioaccessibility and maintains the quality of mango juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1523–1529, 2019.

SMERIGLIO, A. BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1244–1262, 2017.

SONDHI, S.; KAUR, R.; KAUR, S.; KAUR, P. S. Immobilization of laccase-ABTS system for the development of a continuous flow packed bed bioreactor for decolorization of textile effluent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1093–1100, 2018.

SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Powder properties and system behavior during Spray Drying of *Bauhinia forficata* link extract. **Drying Technology**, v. 24, p. 735–749, 2006.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. (Org.). **Biotecnologia aplicada à agroindústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2016. Cap. 15, p. 529-568.

STEPANKOVA, V. BIDMANOVA, S.; KOUDELAKOVA, T.; PROKOP, Z.; CHALOUPKOVA, R.; DAMBORSKY, J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823–2836, 2013.

SYAMALADEVI, R. M.; TANG, J.; VILLA-ROJAS, R.; SABLANI, S.; CARTER, B.; CAMPBELL, G. Influence of water activity on thermal resistance of microorganisms in low-moisture foods: a Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 353–370, 2016.

TABATABAEI, M.; AGHBASHLO, M.; DEHHAGHI, M.; PANAHI, H. K. S.; MOLLAHOSSEINI, A.; HOSSEINI, M.; SOUFIYAN, M. M. Reactor technologies for biodiesel production and processing: A review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 74, p. 239–303, 2019.

TENG, B.; JIAN, X.; GAO, Y.; CHEN, W. Comparison of polyflavonoids in bayberry tanning effluent and commercial bayberry tannin: Prerequisite information for vegetable tanning effluent recycling. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 972–979, 2016.

THIYONILA, B.; KANNAN, M.; PAULIN RENEETA, N.; RAMYA, T.; KAYALVIZHI, N.; KRISHNAN, M. Influence of tannase from *Serratia marcescens* strain IMBL5 on enhancing antioxidant properties of green tea. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, n. May, p. 101675, 2020.

TONNIS, W. F.; AMORIJ, J. P.; VREEMAN, M. A.; FRIJLINK, H. W.; KERSTEN, G. F.; HINRICHS, W. L. J. Improved storage stability and immunogenicity of hepatitis B vaccine after spray-freeze drying in presence of sugars. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, n. 1, p. 36–45, 2014.

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, n. 3, p. 907–914, 2010.

TORRES, A.; FERRÁNDIZ, M.; CAPABLANCA, L.; FRANCO, E.; MIRA, E.; MOLDOVAN, S. Microencapsulation of lipase and savinase enzymes by spray drying using arabic gum as wall material. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, p. 161–173, 2016.

VALERA, L. S.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a multi-tolerant tannin acyl hydrolase II from *Aspergillus carbonarius* produced under solid-state fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 464–470, 2015.

VASHI, H.; IORHEMEN, O. T.; TAY, J. H. Degradation of industrial tannin and lignin from pulp mill effluent by aerobic granular sludge technology. **Journal of Water Process Engineering**, v. 26, n. September, p. 38–45, 2018.

VASTA, V.; DAGHIO, M.; CAPPUCCI, A.; BUCCIONI, A. SERRA, A.; VITI, C.; MELE, M. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 3781–3804, 2019.

WATSON, M. A.; LEA, J. M.; BETT-GARBER, K. L. Spray drying of pomegranate juice using maltodextrin/cyclodextrin blends as the wall material. **Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 820–826, 2017.

WONG, J. K. H.; TAN, H. K.; LAU, S. Y.; YAP, P. S.; DANQUAH, M. K. Potential and

challenges of enzyme incorporated nanotechnology in dye wastewater treatment: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 4, 2019.

WU, C.; XU, C.; NI, H.; YANG, Q.; CAI, H.; XIAO, A. Preparation and characterization of tannase immobilized onto carboxyl-functionalized superparamagnetic ferroferric oxide nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 67-74, 2016.

XU, X. Y.; MENG, J. M.; MAO, Q. Q.; SHANG, A.; LI, B. Y.; ZHAO, C. N.; TANG, G. Y.; CAO, S. Y.; WEI, X. L.; GAN, R. Y.; CORKE, H.; LI, H. BIN. Effects of tannase and ultrasound treatment on the bioactive compounds and antioxidant activity of green tea extract. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, 2019.

YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 332–339, 2009.

YAO, J.; CHENG, Q.; ZHONG, G.; CAO, W.; YU, A.; LIU, Y. Immobilization and characterization of tannase from a metagenomic library and its use for removal of tannins from green tea infusion. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 80–86, 2014a.

YAO, J. GUO, G. S.; REN, G. H.; LIU, Y. H. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 137–147, 2014b.

YU, X.; LI, Y.; WU, D. Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: Effect of organic solvents and enzyme specificity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 69–73, 2004.

ZHANG, L.; ZENG, X.; FU, N.; TANG, X.; SUN, Y.; LIN, L. Maltodextrin: A consummate carrier for spray-drying of xylooligosaccharides. **Food Research International**, v. 106, n. 2017, p. 383–393, 2018a.

ZHANG, S.; CUI, F. C.; CAO, Y. Li, Y. Q. Sequence identification, structure prediction and validation of tannase from *Aspergillus niger* N5-5. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 7, p. 1087–1090, 2016a.

ZHANG, S.; GAO, X.; HE, L.; QIU, Y.; ZHU, H.; CAO, Y. Novel trends for use of microbial tannases. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 221-232, 2015.

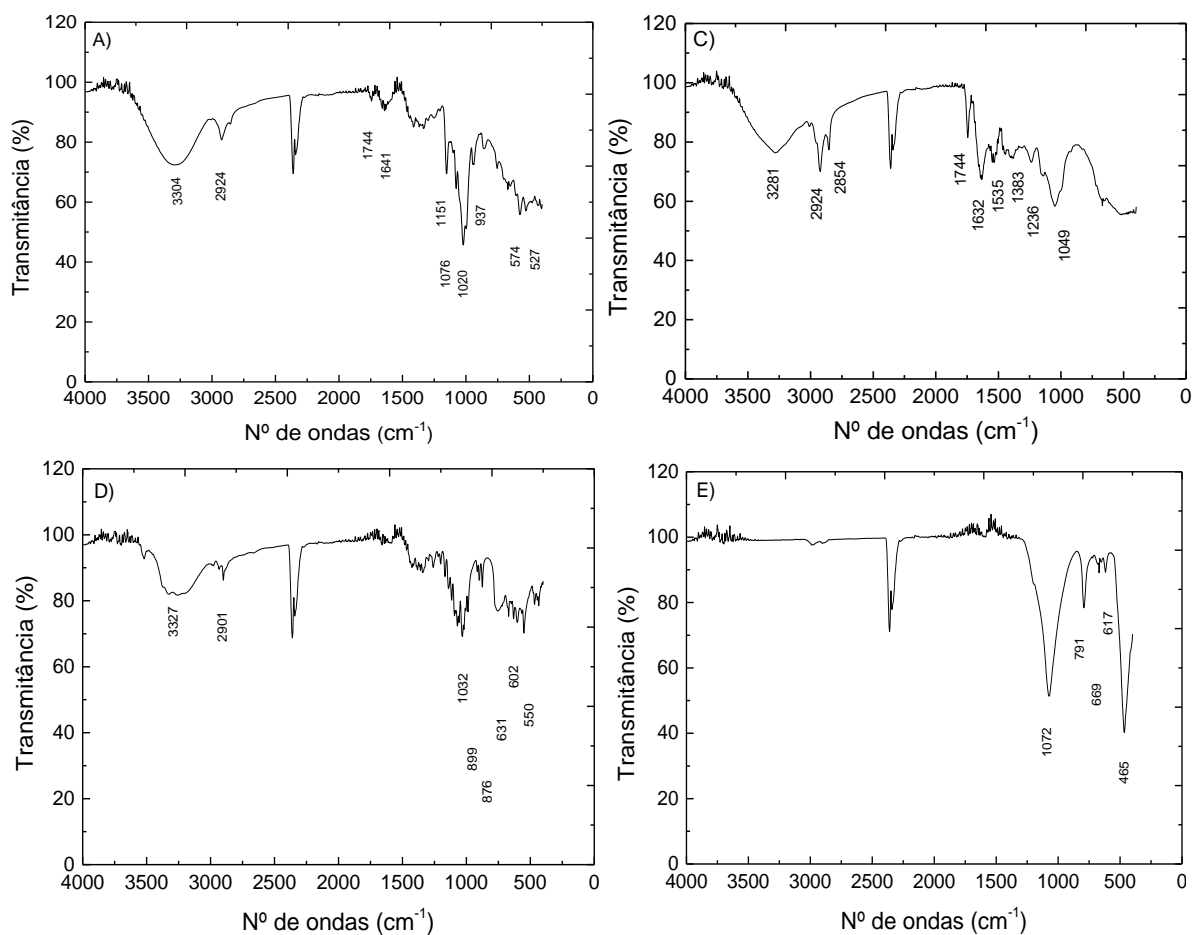
ZHANG, S.; LEI, H.; GAO, X.; XIONG, X.; WU, W. D.; WU, Z.; CHEN, X. D. Fabrication of uniform enzyme-immobilized carbohydrate microparticles with high enzymatic activity and stability via spray drying and spray freeze drying. **Powder Technology**, v. 330, p. 40–49, 2018b.

ZHANG, Y. N.; ZHANG, Y. N.; YIN, J. F.; CHEN, J. X.; WANG, F.; DU, Q. Z.; JIANG, Y. W.; XU, Y. Q. Improving the sweet aftertaste of green tea infusion with tannase. **Food Chemistry**, v. 192, p. 470–476, 2016b.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Espectros em FTIR dos adjuvantes empregados no processo de secagem das tanases produzidas pelas espécies de *Aspergillus*

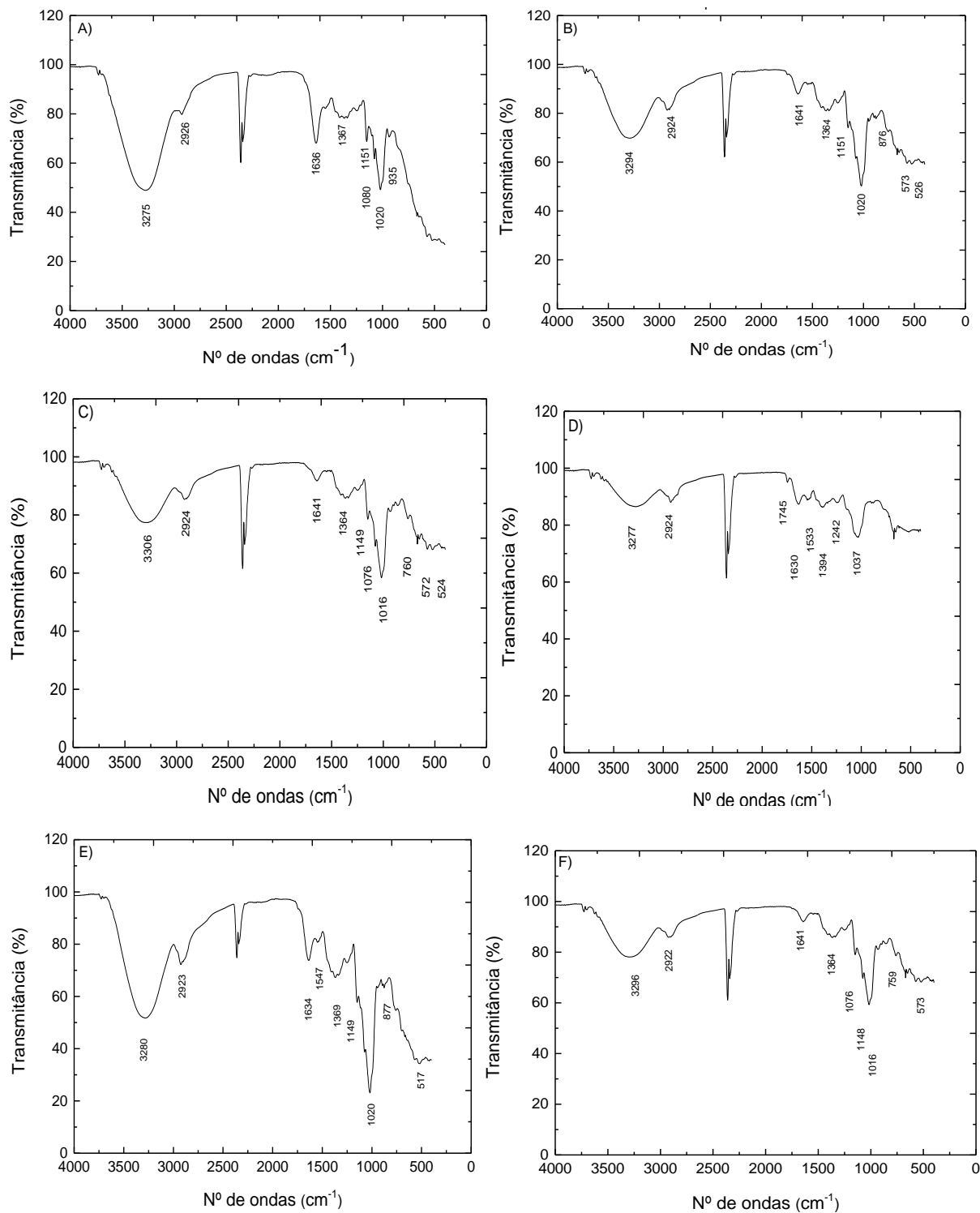
Espectros dos adjuvantes β -Ciclodextrina (A), amido Capsul[®] (B), Farinha de soja (C) Lactose (D) e Maltodextrina (E).



Fonte: Autora.

APÊNDICE B – Espectros em FTIR da tanase solúvel e seca de *A. phoenicis*

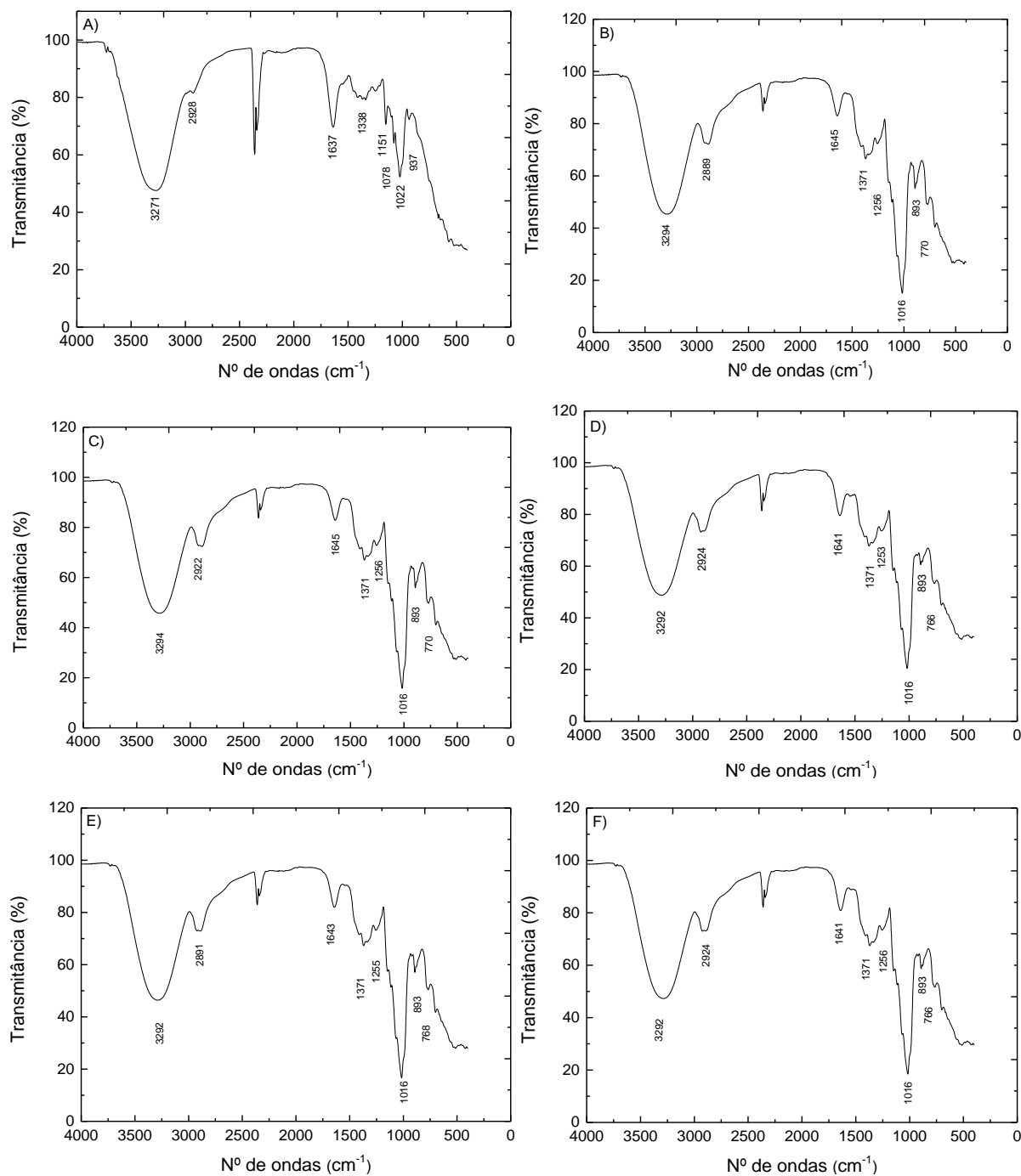
Espectros da tanase solúvel (A) e seca de *A. phoenicis* nos adjuvantes β -Ciclodextrina (B), amido Capsul® (C), Farinha de soja (D) Lactose (E) e Maltodextrina (F).



Fonte: Autora.

APÊNDICE C – Espectros em FTIR da tanase solúvel e seca de *A. ochraceus*

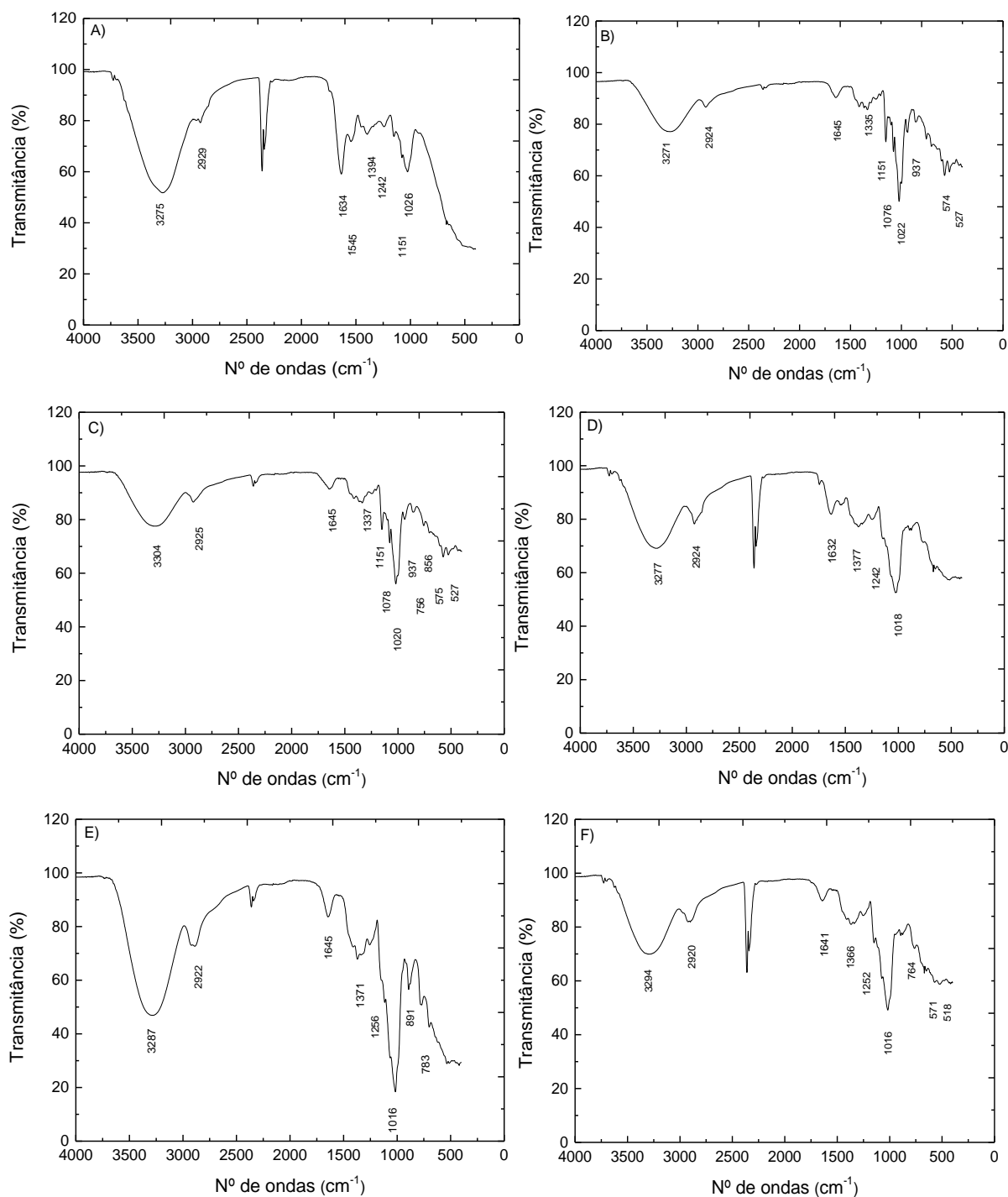
Espectros da tanase solúvel (A) e seca de *A. ochraceus* nos adjuvantes β -Ciclodextrina (B), amido Capsul[®] (C), Farinha de soja (D) Lactose (E) e Maltodextrina (F).



Fonte: Autora.

APÊNDICE D – Espectros em FTIR da tanase solúvel e seca de *A. fumigatus* CAS21

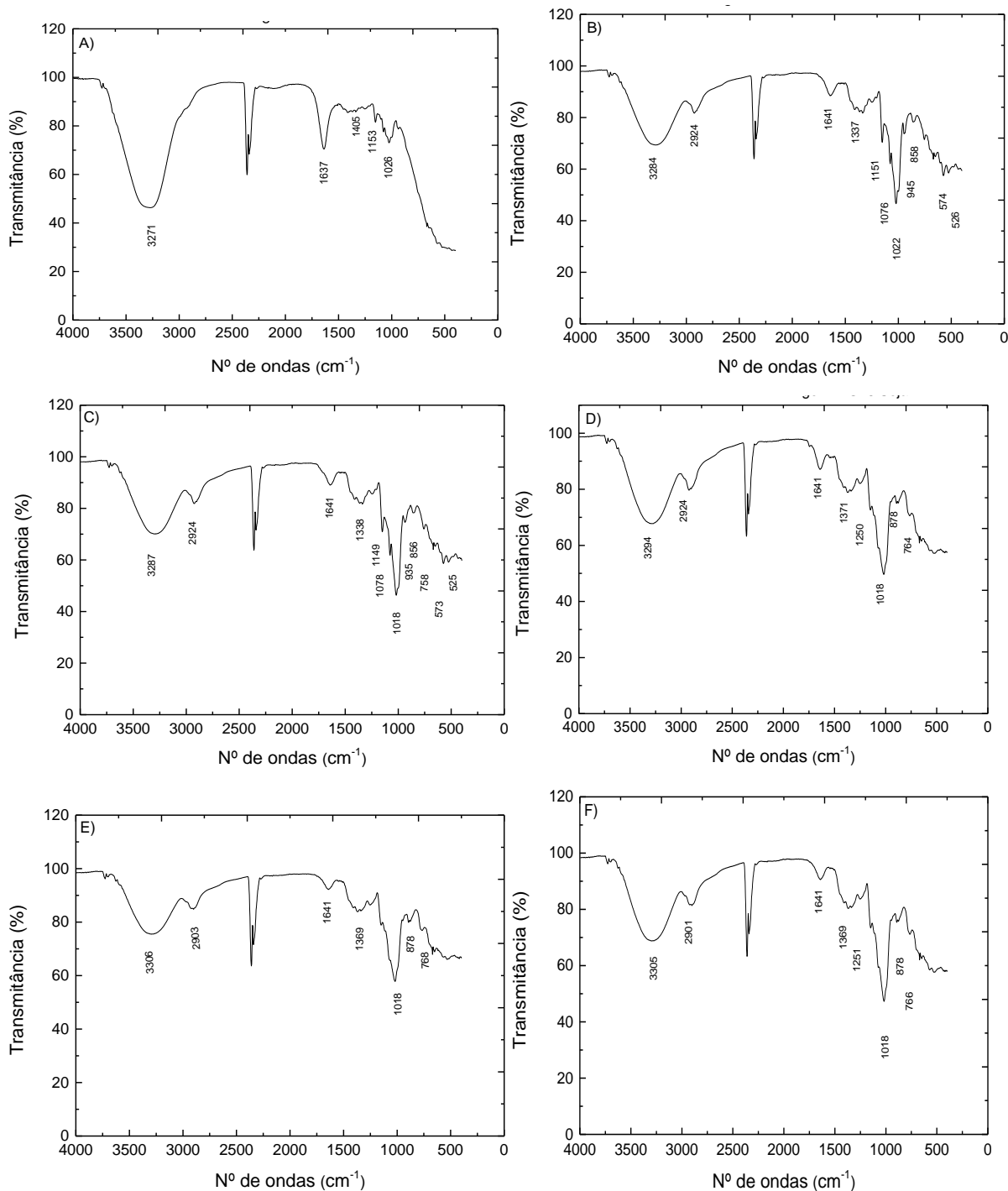
Espectros da tanase solúvel (A) e seca de *A. fumigatus* CAS21 nos adjuvantes β -Ciclodextrina (B), amido Capsul[®] (C), Farinha de soja (D) Lactose (E) e Maltodextrina (F).



Fonte: Autora.

APÊNDICE E – Espectros em FTIR da tanase solúvel e seca de *A. niger* ANG18

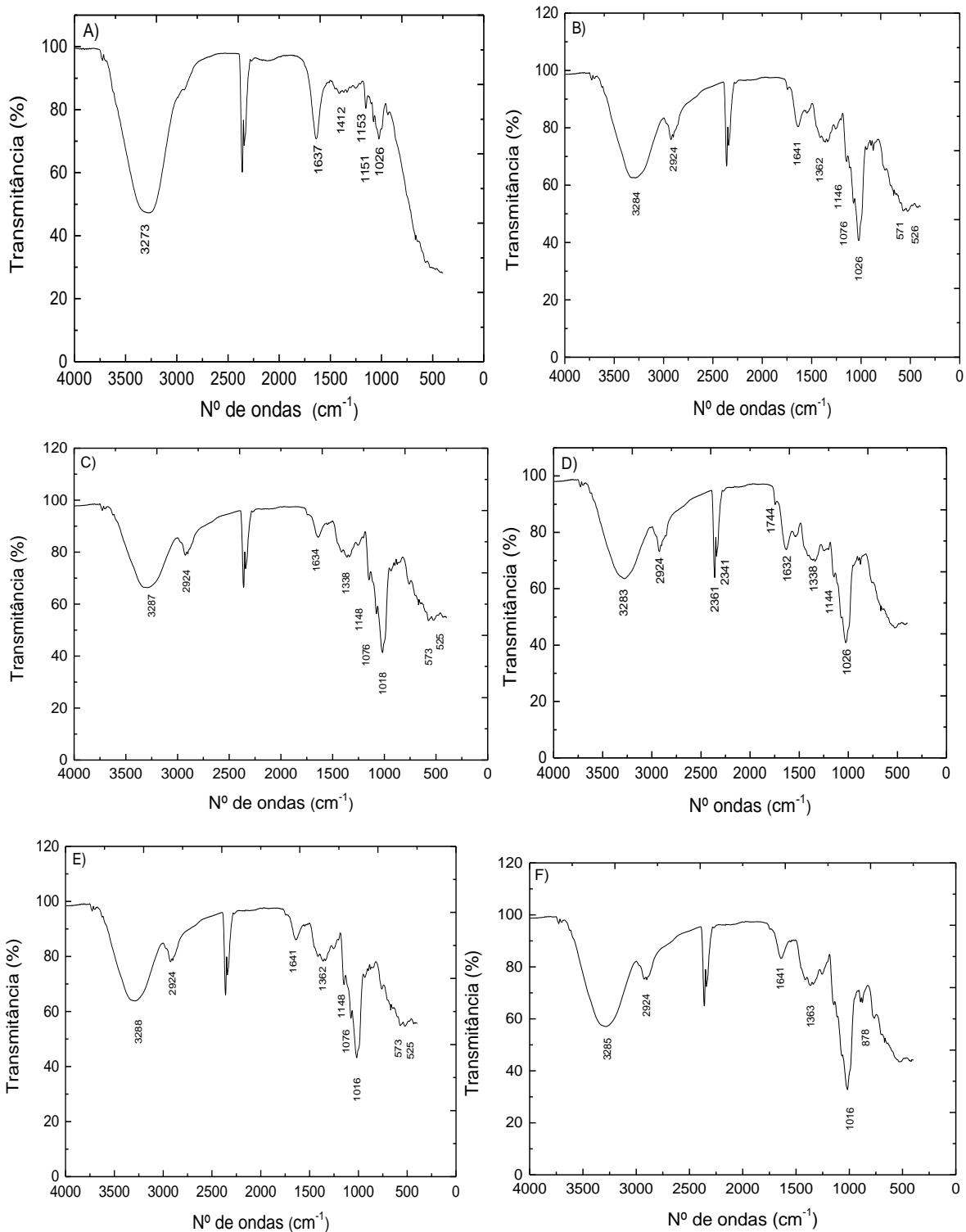
Espectros da tanase solúvel (A) e seca de *A. niger* ANG18 nos adjuvantes β -Ciclodextrina (B), amido Capsul[®] (C), Farinha de soja (D) Lactose (E) e Maltodextrina (F).



Fonte: Autora.

APÊNDICE F – Espectros em FTIR da tanase solúvel e seca de *A. carbonarius*

Espectros da tanase solúvel (A) e seca de *A. carbonarius* nos adjuvantes β -Ciclodextrina (B), amido Capsul® (C), Farinha de soja (D) Lactose (E) e Maltodextrina (F).



Fonte: Autora.

ANEXOS

Meio Khanna (KHANNA; SUNDARIL; KUMAR, 1995)

- Solução de sais Khanna [20x]5 mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Solução de sais Khanna [20x]

- NH_4NO_32g
- KH_2PO_41,3g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,362g
- KCl0,098g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,007g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,0138g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,0066g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0,0062g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Meio Mineral (COSTA et al., 2008)

- KH_2PO_40,1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,2g
- CaCl_20,1g
- NH_4Cl0,3g
- Extrato de levedura.....0,1g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Meio para cultivo de *A. carbonarius*

- Folhas de chá verde.....5,0 g
- Água da torneira.....5,0 mL