

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AGRONOMIA

**Imobilização e caracterização da α -amilase de *Aspergillus oryzae* em
nanopartículas magnéticas de δ -FeOOH**

SILVIA CECILIA SANTANA



Silvia Cecilia Santana

**IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA α -AMILASE DE *ASPERGILLUS*
ORYZAE EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE δ -FeOOH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof^ª Bruna Mara A. de Carvalho

Montes Claros

2020

Silvia Cecilia Santana. Imobilização e caracterização da α -amilase de *Aspergillus oryzae* em nanopartículas magnéticas de δ -FeOOH

Aprovada pela banca examinadora constituída por:

MSc. Ederson Paulo Xavier Guilherme - UNICAMP

MSc. Flávia Echila Ribeiro Batista- ICA/UFMG

Bruna Mara Aparecida de Carvalho

Profª Drª Bruna Mara Aparecida de Carvalho - Orientadora ICA/UFMG

Montes Claros, 30 de setembro de 2020.

Montes Claros

2020

Dedico aos meus pais, Juvenal e Dora, e às minhas irmãs, Samara e Sara, que, durante toda a vida, trabalharam duro para que eu pudesse ter uma educação de qualidade.

AGRADECIMENTO

À Deus e ao Meu Anjo da Guarda pelo dom da vida e por permitir que eu estivesse sob segurança e proteção em cada passo de minha jornada.

Aos meus pais, Juvenal Santana e Maria das Dores Santana pela educação, amor, cuidados e apoio que recebi ao longo de toda a minha vida; aos meus irmãos Samara, Sara e Gustavo, por me apoiarem e estarem sempre dispostos a me ajudar e ao meu sobrinho, Miguel, por ser luz na minha vida. Sem vocês, jamais conseguiria chegar até aqui.

À Universidade Federal de Minas Gerais por estar de portas abertas e permitir que eu realizasse o meu grande sonho de ingressar em uma Universidade Federal. À Fundação Mendes Pimentel (FUMP) e Moradia Cyro dos Anjos pelo suporte financeiro e pessoal e ser o meu segundo lar durante todos os anos em que eu estive estudando. Sem vocês minha caminhada seria muito mais difícil.

Á Ederson Paulo pela amizade, lealdade e companheirismo durante todo esse tempo. Obrigada por estar ao meu lado nos piores momentos; por me incentivar e acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava e por permitir a minha participação neste projeto que, sem você não teria sido concretizado.

Á professora Bruna Carvalho, pela orientação e por me dar a oportunidade de trabalhar no projeto de Iniciação Científica ao qual deu origem a este trabalho e à FAPEMIG pela concessão da bolsa de IC.

Agradeço aos professores Renato Dourado Maia, por ter um papel fundamental na evolução da minha concepção de estudante e aprendizado; Junio Cota pela orientação e apoio no projeto Startup Universitário e no Núcleo de Empreendedorismo Universitário os quais me abriram muitas outras portas; Germano L.D. Leite, pela amizade e orientação durante o meu estágio no Insetário do Instituto de Ciências Agrárias e por me apresentar com tanto entusiasmo a beleza do mundo científico.

Aos meus queridos amigos Silvanete Neves, Reivinson Soares, Lud' Milla Melúcio, Josué Rocha e Ana Paula Chaves agradeço a amizade e carinho e por me estenderam a mão em cada momento que precisei, durante os anos que estive em Montes Claros. Muito obrigada!

“O mais difícil é a decisão de agir, o resto não é mais do que tenacidade. Os medos são tigres de papel. Você pode fazer qualquer coisa que decidir fazer. Pode agir para mudar e controlar a sua vida; e o processo é a sua própria recompensa.”

(Amelia Earhart)

RESUMO

As enzimas são polímeros de aminoácidos altamente específicas que catalisam reações químicas e bioquímicas com grande especificidade no metabolismo dos seres vivos. A α -amilase é uma enzima conhecida, que atua sobre o amido e é amplamente utilizada nas indústrias de alimentos, papel e celulose, produtos químicos, detergentes, entre outras. A imobilização enzimática é um dos processos mais utilizados para otimizar o uso de catalisadores enzimáticos nas aplicações industriais facilitando a separação do produto final e pode garantir maior estabilidade da enzima ao pH e temperatura. Com o desenvolvimento da nanotecnologia, as nanopartículas magnéticas (MNPs), tem sido amplamente utilizada nos setores químico, ambiental, médico e biotecnológico. Embora existam muitas partículas de óxido de ferro na natureza, as MNPs mais populares são óxido de ferro (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Entre elas, a magnetita (Fe_3O_4), que é um óxido de ferro ferromagnético de cor preta, que tem sido a mais estudada em vários processos de imobilização de enzimas. Sendo assim a associação de biomoléculas com nanopartículas magnéticas (MNPs) fornece uma separação fácil do sistema biocatalítico pelo uso de um campo magnético externo, devido à grande área superficial e à presença de grupos hidroxila em sua superfície, o que permite sua fácil funcionalização e forte ligação à molécula enzimática. Diversos estudos de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas de óxido vêm sendo investigados por vários autores que relataram uma alta capacidade de remoção de ácido ferúlico usando a ferroxita ($\delta\text{-FeOOH}$) quando imobilizaram uma peroxidase de soja. No entanto, $\delta\text{-FeOOH}$ não foi estudado até o momento para imobilização da α -amilase. Neste trabalho, a α -amilase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada covalentemente na superfície de nanopartículas de ferroxita ($\delta\text{-FeOOH}$) revestidas com tetraetoxissilano (TEOS) e 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) e ativada com glutaraldeído. A imobilização apresentou eficiência de 57% e rendimento de 96%. O sucesso da síntese de nanopartículas magnéticas e a imobilização foram analisados por FT-IR e DRX. A imobilização não alterou o pH ótimo (6,0) da enzima α -amilase, mas resultou em um aumento, de 50 para 60 °C, a temperatura ótima da enzima livre e imobilizada, respectivamente. Quando o biocatalisador imobilizado foi aplicado em ciclos consecutivos de uso, foi possível manter mais de 80% de sua atividade inicial por 5 ciclos. Todos os resultados estão de acordo com outras α -amilases imobilizadas em suportes semelhantes e sugerem a imobilização em nanopartículas magnéticas $\delta\text{-FeOOH}$ como uma boa escolha de metodologia.

Palavras chaves: Nanomateriais. Ferroxita. Nanopartículas magnéticas. Imobilização covalente. Biocatálise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: NPMs de δ -FeOOH	16
Figura 2: Mecanismo de imobilização da α -amilase em NPMs de δ -FeOOH.....	20
Figura 3: Difratoograma das NPMs em diferentes estágios.....	21
Figura 4: Espectrograma de FTIR de NPMs.....	23
Figura 5: Efeito do pH na atividade relativa da α -amilase livre e imobilizada	24
Figura 6: Efeito da temperatura na atividade relativa da α -amilase livre e imobilizada.....	25
Figura 7: Reciclo da α -amilase imobilizada em NPMs de δ -FeOOH.	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	Enzimas	9
2.2	α -amylase	10
2.3	Aplicação industrial da α -amilase	11
2.3.3	Hidrólise do amido	11
2.3.2	Indústria de detergentes	11
2.3.3	Indústria alimentícia	12
2.3.4	Indústria têxtil.....	12
2.3.5	Industria de papel.....	13
2.4	Imobilização	13
2.5	Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas	14
2.6	Ferroxita δ -FeOOH	15
3	MATÉRIAL E MÉTODOS	16
3.1	Materiais.....	16
3.2	Métodos.....	17
3.2.1	Síntese e funcionalização de δ - FeOOH MNP	17
3.2.2	Imobilização da α -amilase.....	17
3.2.3	Determinação da atividade enzimática	18
3.2.4	Parâmetros de imobilização.....	18
3.2.5	Aspectos morfológicos e estruturais.....	19
3.2.6	Efeito do pH na atividade da α -amilase livre e imobilizada.....	19
3.2.7	Efeito da temperatura na atividade da α -amilase livre e imobilizada.....	19
3.2.8	Reutilização da α -amilase imobilizada.....	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Síntese do MNP e imobilização da α -amilase.....	20
4.2	Caracterização e análise do MNP.....	21
4.2.1	Análise de Difração de Raios-X (DRX)	21
4.2.2	Análise por Espectrômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	22
4.2.3	Parâmetros de imobilização.....	23
4.2.4	Efeito do pH na α -amilase livre e imobilizada	24
4.2.5	Efeito da temperatura da reação na atividade da α -amilase livre e imobilizada	24
4.2.6	Reutilização da α -amilase imobilizada.....	26

5	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas funcionais altamente específicas em relação a seus substratos, biocatalisadores eficazes na natureza e também em processos industriais (ARSALAN et al., 2018; SOHRABI et al., 2014). Devido a essas características citadas, em comparação com catalisadores químicos, as enzimas foram objeto de intensos estudos e aplicações industriais (ANTONY et al., 2016; GUILHERME et al., 2017). Como exemplo de uma enzima amplamente conhecida, existe a α -amilase, que é aplicada com sucesso em diferentes processos industriais, como alimentos, papel e celulose, produtos químicos, detergentes, etc. α -amilases (1,4- α -glucan-4 -glucanoidrolase) podem hidrolisar a molécula de amido em moléculas menores, como glicose, maltose e maltotriose, e seu peso molecular varia de 28 a 78 KDa, dependendo de sua origem (GUILHERME et al., 2017). Como qualquer outra enzima, elas são sensíveis às variações de pH e temperatura e, portanto, esses parâmetros precisam ser cuidadosamente selecionados para garantir a integridade e atividade da enzima. Foi relatado para atividades ótimas de α -amilases de *Aspergillus oryzae* uma faixa de pH de 6,5 a 7,5 e temperaturas em torno de 45 a 50 ° C (SAHNOUN et al., 2015).

Para uma enzima industrial, especialmente para um processo de larga escala, é importante considerar sua forma de aplicação (livre ou imobilizada) pois, na sua forma livre, o processo para purificação é mais elaborado (e dispendioso) do que quando se aplica uma forma imobilizada (GUO et al., 2016; SOHRABI et al., 2014; TAVARES et al., 2018) . Imobilização é um termo genérico usado para descrever a retenção de uma biomolécula em diferentes matrizes ou sistemas (MENDES et al., 2011). A literatura relata que, para as enzimas, a imobilização pode melhorar diferentes aspectos de seu desempenho catalítico, como aumentar sua estabilidade, prolongar sua meia-vida e permitir sua aplicação por vários ciclos consecutivos (GUO et al., 2016; MENDES et al., 2011). Diferentes técnicas e suportes sólidos estão disponíveis para imobilização enzimática, mas é importante enfatizar que cada um tem suas vantagens e suas desvantagens e a escolha deve ser feita com base em mais de um aspecto (TAVARES et al., 2018). Na imobilização da α -amilase foram relatados alguns suportes, como: criogel (GUILHERME et al., 2017), nanomateriais magnéticos (DEFAEI et al., 2018; GUO et al., 2016; SOHRABI et al., 2014), fosfo-silicato (PERWEZ et al., 2017) e quitosana-montmorilonita (MARDANI et al., 2018). Entre esses suportes, as nanopartículas magnéticas (NPMs) são interessantes, principalmente por causa da vantagem que apresentam em separar-se facilmente no final do processo, simplesmente usando um ímã (CAO et al.,

2016). Entretanto, como as nanopartículas magnéticas são oxidadas quando expostas ao ar - levando a uma perda de magnetismo e dispersibilidade e, conseqüentemente, uma separação menos eficaz- é necessário o revestimento da sua superfície com agentes químicos específicos [ortossilicato de tetraetila (TEOS) e 3-aminopropil triethoxisilane (ATPES)] resultando assim em nanopartículas muito mais eficazes e funcionalizadas (WU et al., 2008).

O óxido de ferro (δ -FeOOH) é uma estrutura de NPM semelhante à hematita (α -Fe₂O₃) e apresenta algumas características interessantes como alta estabilidade e área superficial específica, propriedades do supermagnetismo (PEREIRA et al., 2011), e uma síntese mais simples em comparação com outros óxidos ferromagnéticos. Com base nas informações relatadas na literatura (PEREIRA et al., 2011; PINTO et al., 2012; TAVARES et al., 2018), o óxido de ferro é um suporte promissor para a imobilização enzimática. Tavares (2018), por exemplo, relatou uma alta capacidade de remoção de ácido ferúlico, usando nanopartículas δ -FeOOH ao imobilizarem a peroxidase de soja. No entanto, a literatura não apresenta até o atual momento estudos sobre o uso da ferroxita na imobilização da α -amilase.

Assim, no presente estudo tem como objetivo imobilizar a α -amilase de *Aspergillus oryzae* em nanopartícula de δ -FeOOH@SiO₂-NH₂GL; caracterizar o sistema formado em relação aos aspectos morfológicos e estruturais; estudar a influência do pH e Temperatura na atividade das enzimas livres e imobilizados; estudar a reutilização do biocatalisador.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enzimas

A palavra "enzima" deriva das palavras gregas en (que significa "dentro") e zume (que significa "fermento"), foi usada pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne em 1878, quando descrevia a capacidade do fermento de produzir álcool a partir do açúcar (ROBINSON, 2015). As enzimas são definidas como polímeros de aminoácidos que catalisam reações químicas e bioquímicas com grande especificidade no metabolismo dos seres vivos. Essas reações catalisadas por esses polímeros são a base do metabolismo de todos os organismos vivos e oferecem enormes oportunidades para conversões biocatalíticas altamente eficientes (BEILEN et al., 2002).

Como catalisadores, as enzimas são necessárias em concentrações muito baixas, diminuindo a energia de ativação de uma reação e como consequência acelerando as reações sem serem consumidas durante o processo. Elas fazem isso ligando-se a um substrato e

mantendo-o de uma maneira que permita que a reação aconteça com mais eficiência (LEHNINGER et al., 2005). Sua atividade é afetada por vários fatores, como temperatura, pH e concentração do substrato.

As enzimas funcionam melhor dentro de faixas específicas de temperatura e pH, e condições abaixo do ideal podem fazer com que uma enzima perca sua capacidade de se ligar a um substrato. O aumento da temperatura geralmente acelera a reação e a redução da temperatura diminui a velocidade da reação. No entanto, temperaturas extremamente altas podem fazer com que uma enzima perca sua forma (desnaturação) e pare de funcionar. Cada enzima possui uma faixa ideal de pH. Contudo alterar o pH fora desse intervalo reduzirá a atividade enzimática, com valores extremos, podendo causar desnaturação das enzimas. O aumento da concentração enzimática acelerará a reação, desde que haja substrato disponível para ligação. Uma vez que todo o substrato esteja ligado, a reação não acelerará mais, pois não haverá nada ao qual enzimas adicionais possam se ligar (ROBINSON, 2015).

Enzimas são extraídas de algumas fontes específicas, como vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo), animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e microrganismos (amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulases, fitases, glicose-isomerases), de origem fúngica ou bacteriana (SPIER, 2005). A maioria das enzimas industriais utilizadas na indústria de origem microbiana (HOFFMAM et al., 2016), podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas). Como, por exemplo, as enzimas extracelulares que degradam o amido consistem na conversão do amido em monossacarídeos como a glucose, em dissacarídeos como a maltose e em oligossacarídeos como as dextrinas (SPIER, 2005).

2.2 α -amylase

As enzimas amilolíticas são biomoléculas que atuam sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%). As amilases geralmente são divididas em três grupos: as α -amilases, que são responsáveis por romper as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que são responsáveis por hidrolisar as extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglicosidases), as quais liberam unidades de glucose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (SPIER, 2005).

α -amilase (1,4- α -glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.) é definida como sendo uma enzima responsável pela quebra as ligações $\alpha(1,4)$ dos polissacarídeos que

possuem três ou mais unidades de D-glucose em união α -1,4. A hidrólise ocorre em vários pontos da cadeia do amido de forma não seletiva, produzindo oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose (GUILHERME et al., 2017). A enzima apresenta uma estrutura tridimensional capaz de se ligar ao amido, pela ação de grupos catalíticos altamente específicos, promover a quebra dos elos glicosídeos (DE SOUZA et al., 2010). Como qualquer outra enzima, ele é sensível a variações de pH e temperatura e, portanto, esses parâmetros precisam ser cuidadosamente selecionados. α -amilases de *Aspergillus oryzae* apresenta uma faixa de atividades ótimas de pH de 6,5 a 7,5 e temperaturas em torno de 45 a 50°C (SAHNOUN et al., 2015).

2.3 Aplicação industrial da α -amilase

2.3.1 Hidrólise do amido

As aplicações industriais mais comuns da α -amilase são na indústria de liquefação do amido, que ocorre através da conversão do amido em xaropes de frutose e glicose. A conversão enzimática de todo amido inclui a etapa de gelatinização, que envolve a dissolução de grânulos de amido, formando assim uma suspensão viscosa; liquefação que envolve hidrólise parcial e perda de viscosidade; e sacarificação, envolvendo a produção de glicose e maltose por meio de mais hidrólise (DE SOUZA et al., 2010). Por sua alta propriedade adoçante, a glicose e a frutose são usadas como adoçantes na indústria de bebidas carbonatadas (refrigerantes). O processo de liquefação do amido requer o uso de α -amilase juntamente com a glucoamilase que necessariamente devem apresentar elevada termoestabilidade.

2.3.2 Indústria de detergentes

A indústria de detergente é o principal consumidor de enzima, em termos de volume e valor. O uso de enzimas nas formulações de detergentes aumenta a capacidade destes em removerem manchas difíceis e torná-los ambientalmente seguro. As amilases são o segundo tipo de enzimas usadas na formulação de detergente enzimático e 90% de todos os detergentes líquidos contêm essas enzimas. Tais enzimas são utilizadas em detergentes para a lavanderia e lavagem automática de louças para degradar os resíduos de alimentos ricos em amido, como batatas, molhos, creme, chocolate etc., em dextrinas e outros oligossacarídeos menores. As amilases têm atividade em temperaturas mais baixas e pH alcalino, mantendo a

estabilidade necessária sob condições de detergente e a estabilidade oxidativa das amilases é um dos critérios mais importantes para seu uso em detergentes onde o ambiente de lavagem é muito oxidante. A remoção de amido das superfícies também é importante para proporcionar um benefício de branqueamento, uma vez que o amido pode ser um atrativo para muitos tipos de solos particulados (DE SOUZA et al., 2010).

2.3.3 Indústria alimentícia

As amilases são amplamente empregadas na indústria de alimentos processados como panificação, fabricação de cerveja, produção de bolos, sucos de frutas. As α -amilases têm sido amplamente utilizadas na indústria de panificação. Essas enzimas podem ser adicionadas à massa de pão para degradar o amido da farinha em dextrinas menores, que são posteriormente fermentadas pela levedura. A adição de α -amilase à massa resulta no aumento da taxa de fermentação e na redução da viscosidade da massa, resultando em melhorias no volume e na textura do produto. Além disso, gera açúcar adicional na massa, o que melhora o sabor, a cor da crosta e as qualidades de tostagem do pão. Além de gerar compostos fermentáveis, as α -amilases também têm um efeito antiestático na panificação, e melhoram a retenção da maciez dos produtos de panificação, aumentando a vida útil desses produtos. As amilases também são usadas para clarificação de sucos de cerveja ou de frutas ou para o pré-tratamento de ração animal para melhorar a digestibilidade das fibras (DE SOUZA et al., 2010).

2.3.4 Indústria têxtil

As amilases são usadas na indústria têxtil para o processo de separação. Agentes de dimensionamento como amido são aplicados ao fio antes da produção do tecido para garantir um processo de tecelagem rápido e seguro. O amido é um tamanho muito atraente, porque é barato, facilmente disponível na maioria das regiões do mundo e pode ser removido com bastante facilidade. O amido é posteriormente removido do tecido em um processo úmido na indústria de acabamentos têxteis. A separação envolve a remoção do amido do tecido, que serve como agente de fortalecimento para impedir a quebra do fio da urdidura durante o processo de tecelagem. As α -amilases removem seletivamente o tamanho e não atacam as fibras (DE SOUZA et al., 2010).

2.3.5 Indústria de papel

Na indústria de papel celulose, α -amilase é utilizada na produção de amido de baixa viscosidade e alto peso molecular, com seu uso no revestimento do papel. O tratamento de revestimento serve para tornar a superfície do papel suficientemente lisa e forte, o que melhora a qualidade de escrita no papel. Nesta aplicação, a viscosidade do amido natural é muito alta para o tamanho do papel e isso pode ser alterado pela degradação parcial do polímero com α -amilases em lotes ou processos contínuos. O amido é um bom agente de dimensionamento para o acabamento do papel, melhorando a qualidade e a capacidade de apagamento, além de conferir um bom revestimento de superfície, aumentando a rigidez e a resistência do papel (DE SOUZA et al., 2010).

No entanto, aplicações das enzimas em alguns casos são altamente limitantes devido a sua baixa estabilidade operacional e a impossibilidade de reutilização o que torna sua aplicação bastante desfavorável. A técnica de imobilização, desenvolvida pela primeira vez em 1916, ampliou as aplicações das enzimas pois permitiu contornar esses problemas.

2.4 Imobilização

O processo de imobilização de enzimas é caracterizado como a ligação de uma enzima em um suporte resultando em um biocatalizador reutilizável. A imobilização é uma das abordagens mais comuns para aumentar ou melhorar o uso de catalisadores enzimáticos para inúmeras aplicações industriais. Essa técnica já foi amplamente adotada na biotecnologia para recuperar eficientemente o catalisador e o produto, a repetibilidade de enzimas e desenvolver os biocatalisadores nativos mais robustos e altamente estáveis. A imobilização apresenta inúmeras vantagens para a indústria, dentre elas a utilização da atividade catalítica por maior período, facilidade de separação do produto final e, em alguns casos, maior estabilidade da enzima ao pH e temperatura (MENDES et al., 2011).

O método de imobilização é uma questão-chave para o uso das enzimas, que geralmente são imobilizadas pelos métodos de aprisionamento, adsorção, covalente e reticulação (BILAL et al., 2018). O aprisionamento e a adsorção podem ser atribuídos como métodos de imobilização física, uma vez que nenhuma interação covalente está envolvida entre as moléculas da enzima e os transportadores. Além disso, a ligação covalente e a reticulação pertencem aos métodos de imobilização química, uma vez que moléculas enzimáticas são imobilizadas nos transportadores por ligações covalentes (LIU et al., 2020).

O tipo de suporte utilizado na imobilização também é uma questão fundamental, e deve atender às seguintes condições: boa estabilidade em relação as variações de temperatura, pH, alguns solventes orgânicos além de ter que apresentar uma boa separação para o processo de reutilização do biocatalisador imobilizado; uma grande área superficial específica ou estrutura porosa para aumentar a quantidade de imobilização das enzimas; superfície de modificação ou revestimento fácil para facilitar a imobilização de enzimas; baixo custo e fonte abundante e ambientalmente sustentável (BILAL et al., 2018).

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, os nanomateriais têm sido amplamente utilizados em medicina, farmácia, química, monitoramento ambiental e microeletrônica. Nanomateriais podem atender aos requisitos dos portadores de imobilização; embora alguns possam não ser muito adequados para imobilização de enzimas, pois as enzimas tendem a formar agregados com propriedades alteradas (PERWEZ et al., 2017).

2.5 Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas

O interesse em nanotecnologias e materiais em nanoescala, particularmente nanopartículas magnéticas (MNPs), cresceu recentemente e suas aplicações atraíram a atenção das comunidades de pesquisa e industrial nos setores químico, ambiental, médico e biotecnológico (PERWEZ et al., 2017). Embora existam muitas partículas de óxido de ferro na natureza, as MNPs mais populares são Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Entre elas, a magnetita (Fe_3O_4), que é um óxido de ferro ferromagnético de cor preta, que sido a mais estudada em vários processos de imobilização de enzimas (BILAL et al., 2018).

A separação de biocatalisadores imobilizados da mistura do meio reacional enzimático é um dos principais desafios que precisam ser superados no processo de imobilização. Nesta conjuntura, a associação de biomoléculas com nanopartículas magnéticas (MNPs) fornece uma separação fácil do sistema biocatalítico pelo uso de um campo magnético externo. Nas últimas décadas, as MNPs têm atraído muita atenção como promissores portadores de suporte na imobilização de enzimas, devido à grande área superficial e à presença de grupos hidroxila em sua superfície, o que permite sua fácil funcionalização e forte ligação à molécula enzimática. Baixa porosidade e excepcional estabilidade mecânica são as características, que reduzem os obstáculos estéricos e são importantes para o desenvolvimento de um sistema catalítico enzimático-matriz estabilizado. Todas essas características levaram a uma melhoria substancial na capacidade de carga de enzimas ou biomoléculas. As propriedades magnéticas desses materiais de suporte podem prometer a separação fácil de enzimas encapsuladas dos meios de reação e, portanto, finalizar

rapidamente as reações enzimáticas e recuperar as enzimas para seu uso contínuo. Dessa forma, o tedioso processo de centrifugação pode ser contornado, o que simplifica bastante os procedimentos de imobilização e recuperação de enzimas.

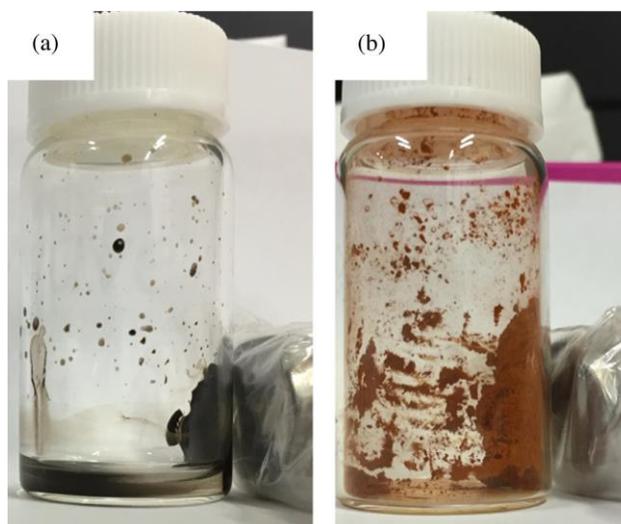
Geralmente, as nanopartículas magnéticas tendem a se agregar devido à sua alta energia superficial desencadeada pela grande área superficial específica. Além disso possuem alta atividade química e são facilmente oxidadas no ar, levando à perda de magnetismo e dispersibilidade. Esses fatores tornam a separação magnética menos eficaz, resultando na incompetência das nanopartículas nuas para fixação direta de enzimas (BILAL et al., 2018). Nesse contexto, o revestimento da superfície com sílica pode auxiliar na prevenção da agregação e oxidação, melhora a estabilidade química, protegendo os núcleos magnéticos da agregação e da oxidação. Também pode melhorar as características de hidrofobicidade e biocompatibilidade. A introdução de grupos silano substanciais nas superfícies dos núcleos magnéticos após a modificação fornece a base subjacente para outras modificações com reagentes funcionais para imobilização de enzimas (BILAL et al., 2018).

2.6 Ferroxita δ -FeOOH

O ferro é elemento mais abundante na natureza e compõe 35% da massa total do planeta. Ele é encontrado na crosta terrestre em todos os tipos de rocha e solos nas formas de óxido de ferro, com as valências Fe^{2+} e Fe^{3+} (CORREA, 2016).

A Ferroxita (δ -FeOOH) (Figura 1) é um óxido de ferro relativamente raro, polimorfo, com vários oxi-dróxidos de ferro conhecidos, apresentando magnetização significativa em temperatura ambiente, com a mesma estrutura cristalográfica que CdI_2 , com grande área superficial (GOTIC ET AL., 1994) (GOTIC; POPOVIC; MUSK2, 1993). O ferrimagnetismo observado no δ -FeOOH é causado pelos planos alternados do Fe na sua estrutura e/ou devido ao efeito de tamanho finito observado neste material na dimensão em nanoescala (CHAGAS et al., 2013). Nanopartículas de δ -FeOOH são tipicamente preparadas pela rápida oxidação de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ com H_2O_2 e são formadas como placas grandes ou agulhas na ausência de um reagente de proteção de superfície (NISHIDA et al., 2016). Sua síntese (δ -FeOOH) é mais simples e viável economicamente para aplicação tecnológicas em comparação com as outras nanopartículas de óxido de ferro (BILAL et al., 2018; CHAGAS et al., 2013).

Figura 1- NPMs de δ -FeOOH: a) imediatamente após a preparação; b) após a lavagem com etanol e água



Fonte: Adaptado de NISHIDA, 2016.

Diversos estudos de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas de óxido vêm sendo investigados por vários autores (CHO et al., 2012; VERMA et al., 2013). A escolha do suporte deve ocorrer em função da área superficial e à presença de grupos hidroxila em sua superfície, o que permite sua fácil funcionalização e forte ligação da molécula da enzima (BILAL et al., 2018; TAVARES et al., 2018) por exemplo, relataram uma alta capacidade de remoção de ácido ferúlico: 93% no primeiro ciclo e 46,5% respectivamente nos 7 ciclos usando δ -FeOOH quando imobilizaram uma peroxidase de soja. No entanto, δ -FeOOH não foi estudado até o momento para imobilização da α -amilase.

3 MATÉRIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

O estudo foi realizado no Laboratório de Processos e Compostos Nutracêuticos e Funcionais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no município de Montes Claros, Minas Gerais. Foram utilizados α -amilase (EC 3.2.1.1) de *Aspergillus oryzae*, gluteraldeído (25% v / v, solução aquosa), ortossilicato de tetraetil (TEOS), (3-aminopropil) triethoxysilane (ATPES), sulfato de ferro amônio (II) hexahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, > 99%), solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 30% (v / v) e solução aquosa de hidróxido de amônio a 30% (v/v), adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese e funcionalização de δ - FeOOH MNP

A síntese da ferroxita (δ -FeOOH) MNP foi realizada como descrito por Pereira et al., (2011), com algumas modificações. Na realização da síntese foram utilizados 5,6 g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ solubilizados em 200 mL de água ultrapura e misturados com 100 mL de NaOH (2M) sob agitação constante por um período de 10 min até a formação de um precipitado esverdeado ($\text{Fe}(\text{OH})_2$). Em seguida, foram adicionados 10 mL de H_2O_2 (30% v/v) sob agitação por 10 min. A solução final apresentou formação de um precipitado de coloração marrom avermelhada (δ -FeOOH). O precipitado foi lavado com água destilada por 5 vezes e seco por um período de 12 horas a 60°C em estufa de circulação.

A modificação da superfície da ferroxita MNP foi realizada como descrito por Tavares et al., (2018) com algumas modificações. Para o procedimento, 4,0 g de nanopartículas de ferroxita sintetizadas, como descrito acima, foram misturadas com 200 mL de etanol e 20 mL de água destilada e, em seguida, foram agitadas constantemente por 1 h. Foram acrescentadas 10 mL de solução de hidróxido de amônio (30% v/v) e 12 mL de TEOS foram adicionados à solução de ferroxita sob agitação contínua por 3 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 8 mL de APTES e a mistura foi agitada por 12 h também à temperatura ambiente. Finalmente, as partículas de δ -FeOOH@SiO₂-NH₂ foram coletadas por separação magnética, seguida por lavagem com água destilada e depois secas durante 16 horas em estufa a 60°C.

3.2.2 Imobilização da α -amilase

A imobilização da α -amilase em δ -FeOOH@SiO₂-NH₂ MNP foi realizada com base na metodologia de Tavares et al., (2018). A ativação foi promovida através da adição de 2,9 g de δ -FeOOH@SiO₂-NH₂ em uma solução de 100 mL de glutaraldeído (1,6% v/v), seguido de agitação à temperatura ambiente por 4 h. As partículas foram coletadas por separação magnética e lavadas cinco vezes com água destilada e novamente com tampão fosfato (0,1 mM, pH 7,0) e depois secas a 60°C por 24 h. Para imobilização, 2,83±1,85 g de nanopartículas funcionalizadas foram adicionadas a 25 mL de solução enzimática de α -amilase (14,68 mg; 5182 U, 0,1 mM, pH 7,0) e agitadas suavemente por 4 h a 15°C. Após o período de 4 horas alíquotas do sobrenadante foram retiradas para a determinação da proteína

não ligada e atividade não ligada durante a imobilização. Todos os ensaios enzimáticos de atividade e teor de proteína foram realizados em triplicata.

3.2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da α -amilase, livre e imobilizada, foi realizada com base na hidrólise do amido (FUWA, 1954). Uma quantidade 0,001 mg de α -amilase livre foi adicionada a 1 mL de solução de amido (50 mg/mL) em tampão acetato de sódio (0,1 mM pH 6,0) e incubada por 10 min a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de HCl a 20% (v/v) e 200 μ L de solução de iodo Fuwa (solução de iodo-etanol a 1%, 10% de iodeto de potássio e água ultrapura 1:1:3) e 2,1 mL de água ultrapura. Para atividade da enzima imobilizada 0,001 mg de α -amilase ligada as nanopartículas foram adicionada a 1 mL de solução de amido (50 mg/mL) em tampão acetato de sódio (0,1 mM pH 6,0) e incubada por 10 min a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de HCl a 20% (v/v) e 200 μ L de solução de iodo Fuwa (solução de iodo-etanol a 1%, 10% de iodeto de potássio e água ultrapura 1:1:3) e 2,1 mL de água ultrapura. Absorbância de ambas as formas foi medida a 660 nm em um espectrofotômetro UV Mini 1240 Shimadzu. Uma unidade (U) de atividade da α -amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto nas condições do ensaio. A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de amido de 50 mg/mL. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e relatados como valor médio \pm desvio padrão.

3.2.4 Parâmetros de imobilização

A eficiência da imobilização (E , %), expressa a quantidade de atividade enzimática retida no suporte e o rendimento da imobilização (Y , %), representa a proporção da proteína ligada ao suporte (AGRAWAL et al., 2016). Conhecendo a atividade enzimática (α_f , U / mL) e o teor total de proteínas (P_i , mg/mL) oferecido para imobilização, a atividade imobilizada (α_i , U/mL) e o conteúdo de proteínas da solução de lavagem (P_w , mg/mL) e sobrenadante (P_s , mg / mL), foi possível determinar E (Equação 1) e Y (Equação 2).

$$E = \left(\frac{\alpha_i}{\alpha_f} \right) \cdot 100\% \quad (1)$$

$$Y = \left[\frac{P_i - (P_w + P_s)}{P_i} \right] \cdot 100\% \quad (2)$$

3.2.5 Aspectos morfológicos e estruturais

A MNP e a α -amilase imobilizada foram caracterizadas por Difração de raios-X e Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. A técnica de difração de raios X foi utilizada para determinar as fases cristalinas do suporte durante o processo de imobilização, com análise realizada em um Shimadzu XRD-7000 com uma fonte de Cu ($K\alpha = 1,54184 \text{ \AA}$) entre os ângulos (2θ) $20-70^\circ$ e varredura de $0,5^\circ/\text{min}$. Os grupos químicos presentes na superfície das nanopartículas antes e após o processo de imobilização foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 2000 com faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.2.6 Efeito do pH na atividade da α -amilase livre e imobilizada

O efeito do pH para a α -amilase imobilizada e livre, foi determinado à temperatura de 40°C usando condições padrão de ensaio em tampão acetato de sódio (100 mM), para valores de pH de $3,0-6,0$ e tampão fosfato de potássio (100 mM) para valores de pH: $7,0-8,0$. O valor de pH onde houve a atividade máxima da enzima foi escolhido como o pH ideal para a enzima. A atividade relativa (%) da α -amilase foi calculada em cada pH considerando a atividade 100% no pH ótimo.

3.2.7 Efeito da temperatura na atividade da α -amilase livre e imobilizada

O efeito da temperatura na α -amilase livre e imobilizada foi determinado variando a temperatura na faixa de $20 - 80^\circ\text{C}$. A temperatura onde houve atividade enzimática máxima foi escolhida como a temperatura ideal para a enzima.

3.2.8 Reutilização da α -amilase imobilizada

A reutilização da α -amilase imobilizada foi analisada submetendo o mesmo biocatalisador a ciclos sequenciais de hidrólise do amido. A α -amilase imobilizada foi aplicada a 1 mL de uma solução de amido a 50 mg / mL em tampão acetato de sódio ($0,1 \text{ mM / pH } 6,0$) e incubada por 10 min a 50°C sob agitação. Após esse período de reação, o biocatalisador foi recuperado, lavado com água destilada e submetido a uma nova solução de amido para um novo ciclo. O sobrenadante de cada ciclo foi analisado para o amido hidrolisado; a atividade inicial da α -amilase foi definida como 100% e as atividades

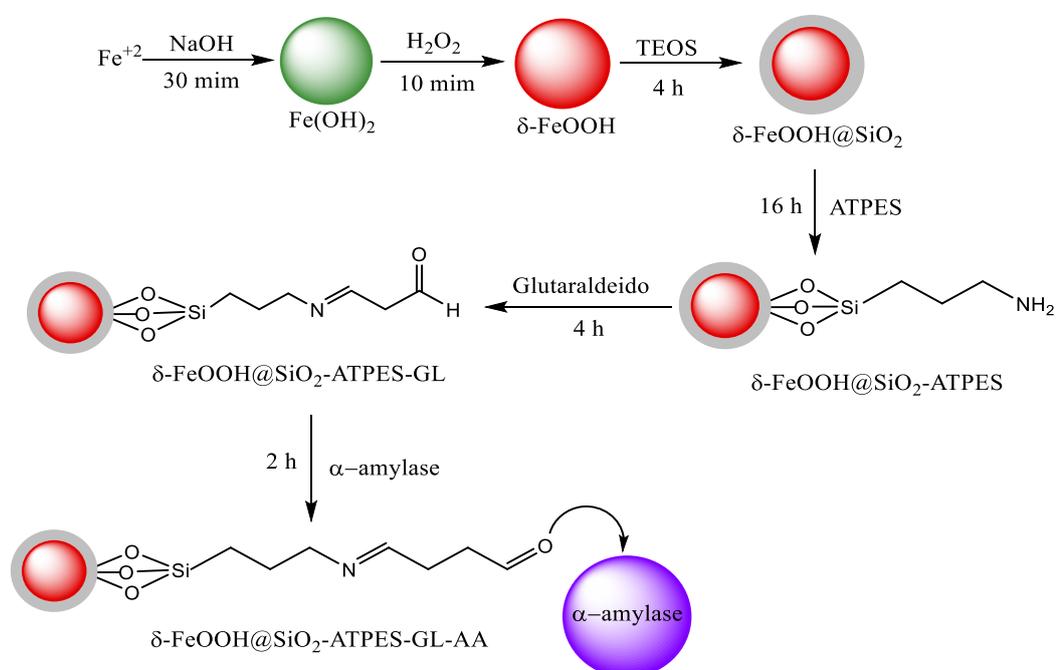
sequenciais obtidas foram comparadas a esta como um valor residual. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata relatados como: valores médios \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do MNP e imobilização da α -amilase

O processo esquemático para a síntese das nanopartículas de δ -FeOOH seguido da imobilização da α -amilase é apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo de imobilização da α -amilase em NPMs de δ -FeOOH



Fonte: Do Autor, 2020.

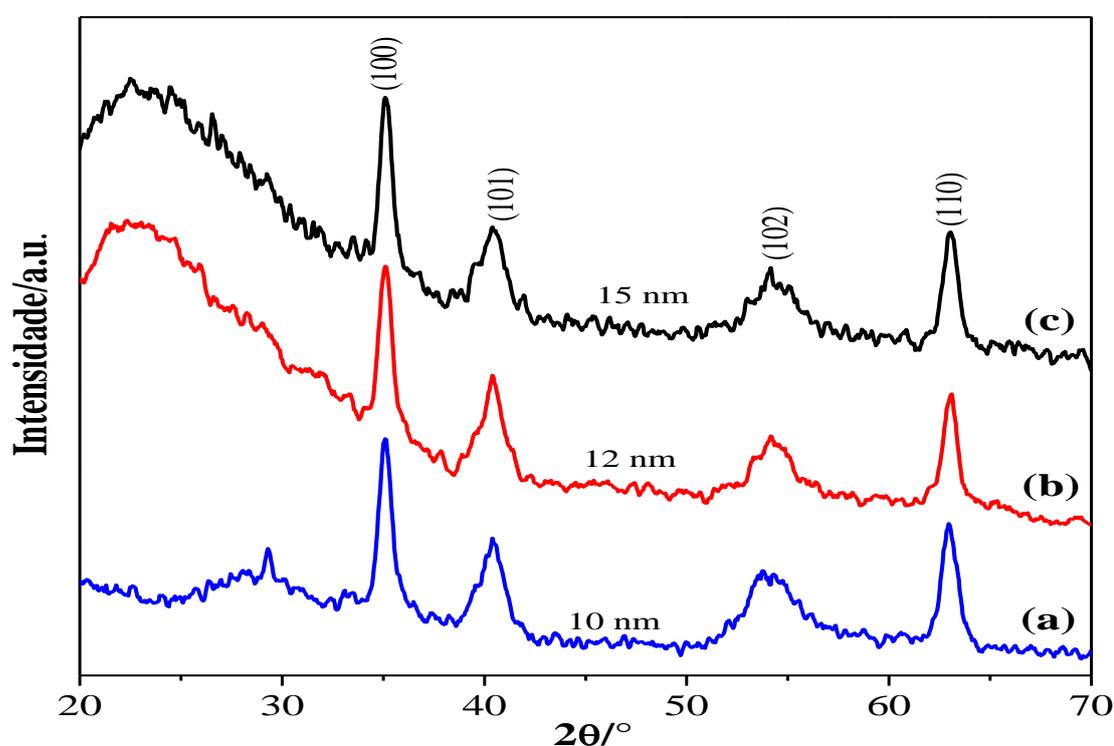
As NPMs δ -FeOOH foram preparadas misturando a solução de Fe^{2+} com NaOH , formando um precipitado verde escuro que oxidou rapidamente através do uso de H_2O_2 , o que leva diretamente ao produto, δ -FeOOH. Após a funcionalização com TEOS, o MNP mostrou boa hidrofiliabilidade. A superfície funcionalizada do MNP foi ligada a grupos amino e carboxil de cadeia longa através do uso de TEOS e glutaraldeído. A ligação da α -amilase no suporte foi realizada por meio da ligação covalente do grupo amina presente na enzima com o grupo carbóxima da $\delta\text{-FeOOH@SiO}_2\text{-NH}_2\text{-GL}$.

4.2 Caracterização e análise da MNP

4.2.1 Análise de Difração de Raios-X (DRX)

Os resultados da análise de DRX, apresentados na Figura 3, indicam que todas as amostras exibiram planos de reflexão correspondentes a (100) (101) (102) (110), que são equivalentes à fase δ -FeOOH de acordo com GOTIC et al.,(1993) e TAVARES et al., (2018).

Figura 3 - Difratoograma das NPMs em diferentes estágios. a) δ -FeOOH; b) δ -FeOOH@SiO₂ ATPES-GL; c) δ -FeOOH@SiO₂-ATPES-GL-Amy.



Fonte: Do Autor, 2020

Pinto et al. (2012) e Madsen et al. (1985), ao analisar partículas sintéticas de δ -FeOOH por DRX, observaram os mesmos planos de reflexão encontrados no presente estudo. É possível ver, no Figura 3, que os picos de difração característicos de todas as partículas modificadas eram muito semelhantes entre si, o que pode ser explicado pelo fato de que o FeOOH é o núcleo magnético das três amostras analisadas. O tamanho médio de cristalino das nanopartículas magnéticas foi estimado a partir da largura do pico na meia altura do plano de reflexão mais forte (100) e calculado com a ajuda da equação de Scherrer (Muniz, 2016). A partir dos dados obtidos, calculou-se o tamanho médio cristalino de δ -FeOOH como 10 nm (FIGURA 3,a).

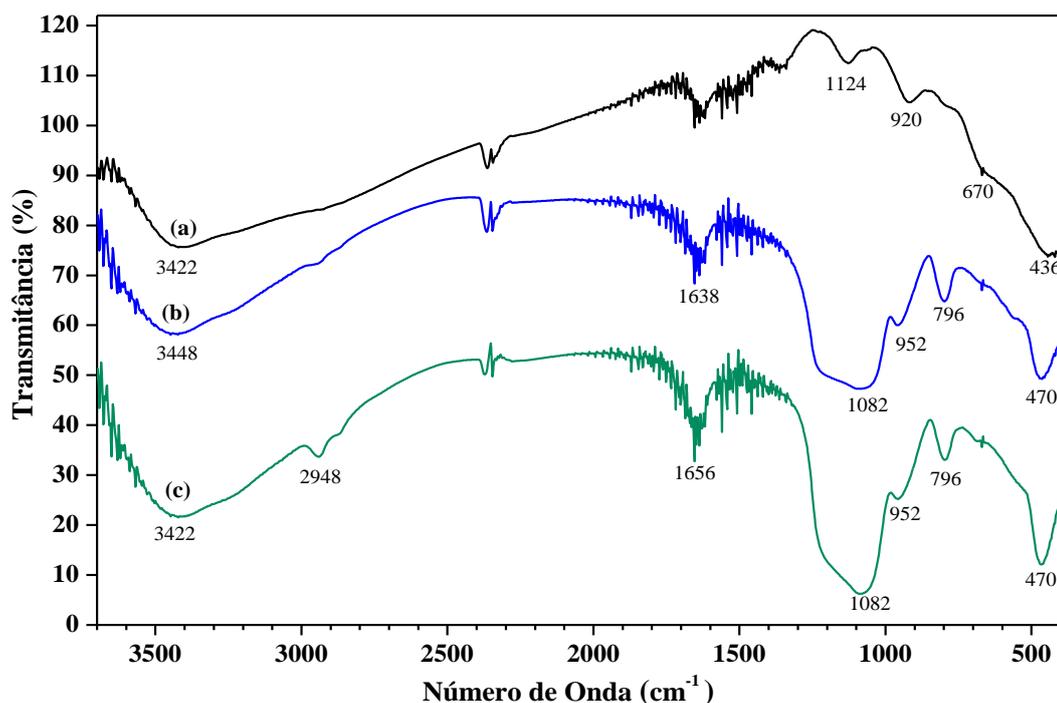
Nishida et al. (2016) obtiveram valores para o tamanho médio das nanopartículas δ -FeOOH, que exibiram comportamento supermagnético, abaixo de 10 nm, isso pode ser explicado pela síntese de nanopartículas superparamagnéticas δ -FeOOH como resultado de um método químico. Após a funcionalização e ativação com glutaraldeído (FIGURA 3, b), o tamanho médio do cristalino atingiu aproximadamente 12 nm e, após a imobilização da α -amilase (FIGURA 3, c), o valor obtido foi de 15 nm, o que indica um aumento no cristalito médio provavelmente causado pela funcionalização, ativação e imobilização. Embora o tamanho do cristalito tenha aumentado após a salinização, a imobilização não foi suficiente para a mudança de fase de δ -FeOOH. Tavares et al. (2018), ao imobilizar uma peroxidase de soja em δ -FeOOH, obteve um valor médio de tamanho de cristalito de 15 nm para δ -FeOOH antes da imobilização e valores entre 18 e 19 nm após a imobilização, observando o mesmo comportamento mostrado neste estudo.

4.2.2 Análise por Espectrômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A adição de grupos químicos na nanopartícula magnética δ -FeOOH e também a imobilização da α -amilase neste suporte modificado foram confirmadas por análise de FTIR. O Gráfico 2 apresenta o espectrograma de FTIR de δ -FeOOH, δ -FeOOH@SiO₂-ATPES-GL, δ -FeOOH@SiO₂-ATPES-GL-Amy.

No espectrograma obtido (FIGURA 4, a) é possível observar uma banda muito forte e larga a 3422 cm^{-1} , que pode ser atribuída aos modos de estiramento de OH superficial e bandas largas fracas em 1124 , 920 e 670 cm^{-1} devido à flexão de Fe-OH; a banda em 436 cm^{-1} pode ser atribuída a ligações Fe-O. Este espectrograma está, de acordo com o espectrograma encontrado por Carlson et al., (1980) para amostras sintéticas de δ -FeOOH. Na Figura 4a e 4c, a banda de absorção a 1082 cm^{-1} e 796 , 952 cm^{-1} foi atribuída à vibração de alongamento das ligações Si-OH e Si-O-Si, além disso, a banda de absorção a cerca de 3448 cm^{-1} foram relacionados à vibração de alongamento NH, vibração OH e pico de água (GUO et al., 2016). A banda de absorção a 1654 cm^{-1} com as partículas funcionalizadas e ativadas (FIGURA 4, c), foi associada à vibração característica de flexão N-H (ANTONY et al., 2016). Para as NPMs δ -FeOOH@SiO₂-ATPES-GL-Amy, o espectrograma obtido (FIGURA 4, c) indica a imobilização bem-sucedida da α -amilase com uma banda de absorção a 1656 cm^{-1} equivalente à vibração C=O na ligação -CONH e a banda a 2948 cm^{-1} representando a vibração de CH da molécula enzimática (ANTONY et al., 2016).

FIGURA 4- Espectrograma de FTIR de NPMs. a) δ -FeOOH; b) δ -FeOOH@SiO₂-ATPES-GL; c) δ -FeOOH@SiO₂-ATPES-GL-Amy.



Fonte: Do Autor, 2020.

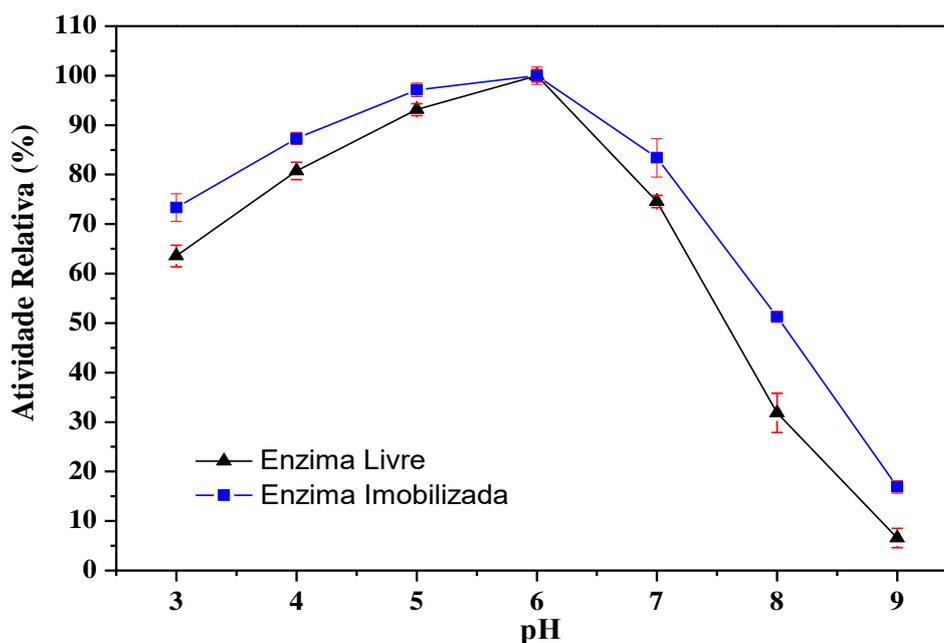
4.2.3 Parâmetros de imobilização

A eficiência e o rendimento obtidos para imobilização da α -amilase em nanopartículas magnéticas de δ -FeOOH foram, respectivamente, $57,19 \pm 0,13\%$ e $95,94 \pm 0,13\%$, ambos superiores aos obtidos por Guo et al., (2016), (43,9% e 28,7%, respectivamente) com partículas de Fe₃O₄ como suporte para α -amilase. No entanto, quando comparado à imobilização em nanopartículas de óxido de zinco (ANTONY et al., 2016), a eficiência foi 46% maior, mas o rendimento foi 12% menor. Em relação às proteínas, no presente trabalho foi obtida imobilização de $4,84 \pm 1,21$ mg / g (com uma atividade de $1048,06 \pm 1,43$ U / g), 26% inferior à imobilização proteica alcançada por Antony et al., (2016) com nanopartículas de óxido de zinco, como mencionado acima. Estes resultados indicam que uma associação entre a enzima e as nanopartículas δ -FeOOH ocorreu sem grande perda de integridade e imobilização da enzima tornando esta, uma metodologia promissora.

4.2.4 Efeito do pH na α -amilase livre e imobilizada

Os resultados da influência do pH na α -amilase livre e imobilizada, estão apresentados na Figura 5.

Figura 5- Efeito do pH na atividade relativa da α -amilase livre e imobilizada realizada no uso de condições padrão de ensaio à temperatura de 45°C.



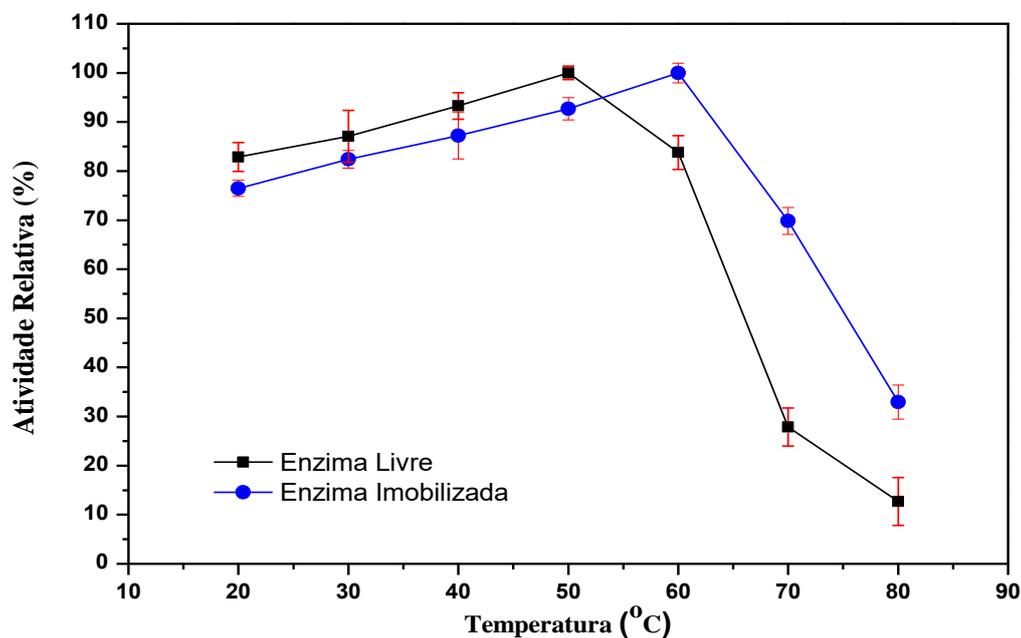
Fonte: Do Autor, 2020.

De acordo com os resultados, as maiores atividades relativas foram observadas em pH 6,0 para ambas as formas, α -amilase livre e imobilizada. Entretanto, para os demais pHs investigados, a forma imobilizada apresentou atividades relativas de 4 a 20% mais altas, indicando que a imobilização foi capaz de melhorar a resistência biocatalítica em ambas as condições, mais ácidas e alcalinas, do que o pH ideal em comparação à enzima livre. Da mesma forma, Sohrabi et al. (2014) observaram o mesmo pH ótimo 6,5 para a α -amilase livre e imobilizado em nanopartículas de Fe_3O_4 , porém, diferentemente do obtido neste trabalho, o perfil de pH imobilizado foi menor para os demais pHs avaliados que a forma livre.

4.2.5 Efeito da temperatura da reação na atividade da α -amilase livre e imobilizada

Os resultados dos perfis de temperatura da α -amilase livre e imobilizada no suporte $\delta\text{-FeOOH@SiO}_2\text{-ATPES-GL}$, podem ser observados no Figura 6.

Figura 6 - Efeito da temperatura na atividade relativa da α -amilase livre e imobilizada realizada utilizando condições padrão de ensaio a pH 6 (tampão de acetato de sódio 100 mM)



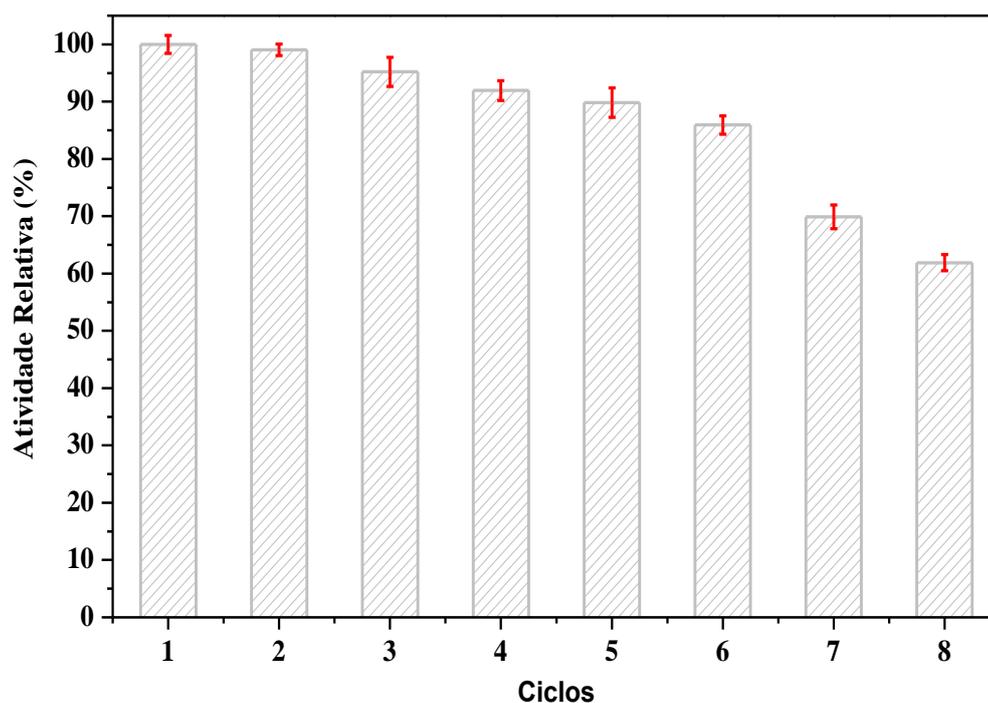
Fonte: Do Autor, 2020.

De acordo com os resultados a temperatura máxima de atividade relativa encontrada foi de 50°C para a α -amilase livre, mas, com a imobilização, a temperatura ótima foi aumentada em 10°C. Além disso, após a imobilização, a fase de ativação (antes de 60°C) resultou em atividades residuais mais baixas do que para a enzima livre, mas, para a fase de desativação (após 60°C), as atividades residuais foram maiores que a enzima livre, indicando que a imobilização foi capaz de aumentar a resistência térmica a temperaturas superiores ao ideal. Sohrabi et al., (2014) observaram o mesmo comportamento com uma amilase imobilizada em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 e maiores estabilidades térmicas após a imobilização foram explicadas como resultado da perda de flexibilidade devido à ligação covalente formada durante a imobilização (MARDANI et al., 2018). A variação na temperatura relativa máxima pode ser devida à formação das ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na enzima e na superfície do suporte, o que aumenta a rigidez da estrutura da enzima e reduz o efeito da temperatura na desnaturação da proteína (ABDEL WAHAB et al., 2018). A imobilização covalente entre as técnicas utilizadas para fixação de enzimas em suportes catalíticos é uma das mais utilizadas, para melhorar a atividade das enzimas em temperaturas elevadas (ABDEL WAHAB et al., 2018; DANIAL et al., 2010).

4.2.6 Reutilização da α -amilase imobilizada

De acordo com a Figura 7, os resultados obtidos para ciclos repetidos de uso da α -amilase imobilizada revelaram que, por 5 ciclos consecutivos (a pH 6,0, 50°C e 10 min), o biocatalisador manteve mais de 80% de sua atividade inicial e com mais de 8 ciclos, observou-se que mais de 50% da atividade foi perdida; por esse motivo, seria aconselhável trabalhar com esse biocatalisador entre 5 e 8 ciclos. Foi relatado, com 6 ciclos consecutivos de uso, a manutenção de quase 80% (GUO et al., 2016) e mais de 85% (SOHRABI et al., 2014) de suas enzimas α -amilases imobilizadas iniciais, que representam apenas um ciclo a mais do que o observado no presente trabalho. A diminuição da atividade enzimática pode ser devido à perda de separação magnética ou a perda de atividade foi atribuída à inativação da enzima devido ao seu uso contínuo (ANTONY et al., 2016). Tavares et al., (2018), relataram que o uso de δ -FeOOH como suporte mostrou-se eficiente e estável, no primeiro ciclo apresentou alta capacidade de remoção de ácido ferúlico (93%), mantendo sua capacidade de remoção de ácido ferúlico em 46,5% no sexto e sétimo ciclo respectivamente. Os resultados obtidos por Tavares et al., (2018) mostraram grande potencial de uso de ferroóxido a ser aplicado industrialmente na imobilização de enzimas e além de apresentar baixos custos de produção de suporte.

Figura 7- Reciclo da α -amilase imobilizada em NPMs de δ -FeOOH.



Fonte: Do Autor, 2020.

5 CONCLUSÃO

Através do presente trabalho foi possível imobilizar alfa amilase em nanopartículas magnéticas de ferroxita com a confirmação sendo feita através da técnica de infra vermelho. As nanopartículas magnéticas após a imobilização não apresentaram alteração na sua fase cristalina, comprovadas através das técnicas de DRX.

A eficiência e o rendimento da imobilização mostraram que esta ocorreu sem grande perda de integridade da enzima. A imobilização aumentou a estabilidade da amilase nas variações de pH e deixou a enzima mais termoestável a altas temperaturas em comparação com a amilase livre.

A amilase imobilizada também indicou grande eficiência de reciclagem em termos de viabilidade econômica. Com base nos resultados apresentados, sugerimos que a amilase na forma imobilizada é adequada para aplicação bioindustrial envolvendo biocatálise, bioengenharia e biofarmacêutico.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL WAHAB, W. A. et al. Optimization of pectinase immobilization on grafted alginate-agar gel beads by 24 full factorial CCD and thermodynamic profiling for evaluating of operational covalent immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 159–170, 2018.
- AGRAWAL, R.; VERMA, A. K.; SATLEWAL, A. Application of nanoparticle-immobilized thermostable β -glucosidase for improving the sugarcane juice properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 472–482, 2016.
- ANTONY, N.; BALACHANDRAN, S.; MOHANAN, P. V. Immobilization of diastase α -amylase on nano zinc oxide. **Food Chemistry**, v. 211, p. 624–630, 2016.
- ARSALAN, A.; YOUNUS, H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1833–1847, 2018.
- BEILEN, J. B. VA.; LI, Z. Enzyme technology: An overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 338–344, 2002.
- BILAL, M. et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530–2544, 2018.
- CARLSON, L.; SCHWERTMANN, U. Natural occurrence of ferroxhyte (d' -FeOOH). **Clays and Clay Minerals**, v. 28, n. 4, p. 272–280, 1980.
- CHAGAS, P. et al. δ -FeOOH: A superparamagnetic material for controlled heat release under AC magnetic field. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 4, 2013.
- CHO, E. J. et al. Co-immobilization of three cellulases on Au-doped magnetic silica nanoparticles for the degradation of cellulose. **Chemical Communications**, v. 48, n. 6, p. 886–888, 2012.
- CORREA, S. Síntese , Caracterização Estrutural E Propriedades Térmicas Do Material Híbrido Poli (Metilmetacrilato)/ Ferroxitita : Um Estudo Experimental E Teórico. 2016.
- DANIAL, E. N.; ELNASHAR, M. M. M.; AWAD, G. E. A. Immobilized inulinase on grafted alginate beads prepared by the one-step and the two-steps methods. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 7, p. 3120–3125, 2010.
- DE SOUZA, P. M.; E MAGALHÃES, P. DE O. Application of microbial α -amylase in industry - a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850–861, 2010.
- DEFAEI, M. et al. Improvement of stability and reusability of α -amylase immobilized on naringin functionalized magnetic nanoparticles: A robust nanobiocatalyst. **International**

Journal of Biological Macromolecules, v. 113, p. 354–360, 2018.

FUWA, H. A NEW METHOD FOR MICRODETERMINATION modified method of that described by Mc Cready. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, 1954.

GOTIĆ, M.; POPOVIĆ, S.; MUSIĆ, S. Formation and characterization of δ -FeOOH. **Materials Letters**, v. 21, n. 3–4, p. 289–295, 1994.

GOTIC, M.; POPOVIC, S.; MUSK2, S. Formation and characterization of δ -FeOOH. **Materials Letters**, v. 21, n. November, p. 289–295, 1993.

GUILHERME, E. P. X. et al. Synthesis of supermacroporous cryogel for bioreactors continuous starch hydrolysis. **Electrophoresis**, v. 38, n. 22–23, p. 2940–2946, 2017.

GUO, H. et al. Covalent immobilization of α -amylase on magnetic particles as catalyst for hydrolysis of high-amylose starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 537–544, 2016.

HOFFMAM, Z. B. et al. Xylan-specific carbohydrate-binding module belonging to family 6 enhances the catalytic performance of a GH11 endo-xylanase. **New Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 467–472, 2016.

LIU, D. M.; DONG, C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. **Process Biochemistry**, v. 92, n. February, p. 464–475, 2020.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6^a Edição, 2014. Ed. Artmed.

MARDANI, T. et al. Immobilization of α -amylase on chitosan-montmorillonite nanocomposite beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 354–360, 2018.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

NISHIDA, N. et al. Synthesis of superparamagnetic δ -FeOOH nanoparticles by a chemical method. **Applied Surface Science**, v. 387, p. 996–1001, 2016.

PEREIRA, M. C. et al. Nanostructured δ -FeOOH: A novel photocatalyst for water splitting. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 28, p. 10280–10282, 2011.

PERWEZ, M.; AHMAD, R.; SARDAR, M. A reusable multipurpose magnetic nanobiocatalyst for industrial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 16–24, 2017.

PINTO, I. S. X. et al. Nanostructured δ -FeOOH: An efficient Fenton-like catalyst for the oxidation of organics in water. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 119–120, p. 175–182, 2012.

- ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015.
- SAHNOUN, M. et al. Aspergillus oryzae S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 73–80, 2015.
- SOHRABI, N.; RASOULI, N.; TORKZADEH, M. Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe₃O₄ nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 240, p. 426–433, 2014.
- SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido. **Curitiba: Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná**, 2005.
- TAVARES, T. S. et al. Soybean peroxidase immobilized on Δ -FeOOH as new magnetically recyclable biocatalyst for removal of ferulic acid. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 1, p. 97–106, 2018.
- VERMA, M. L. et al. Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 2–6, 2013.
- WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397–415, 2008.
- XIAO, A. et al. Preparation and characterization of κ -carrageenase immobilized onto magnetic iron oxide nanoparticles. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2016.