

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE AMILASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp. C333 IMOBILIZADAS POR IMPRESSÃO 3D

Ana Vitória Moreira Cunha^{1*}, Raniere Ribeiro Lima¹, Brida Maria Teixeira Gonçalves¹, Bianca Chieregato Maniglia², Marcio Schmiele¹, Vivian Machado Benassi¹

¹ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina, Minas Gerais, Brasil

² Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil

E-mail: moreira.vitoria@ufvjm.edu.br

As amilases fúngicas apresentam amplo potencial biotecnológico, porém sua aplicação industrial é limitada pela baixa estabilidade operacional. Esse trabalho objetivou analisar o efeito de distintos tampões na atividade das amilases impressas, o reuso dos derivados imobilizados e o efeito da solução de manutenção das matrizes impressas. Neste trabalho foram produzidas matrizes poliméricas impressas em 3D de alginato de sódio e carragenana contendo amilases fúngicas imobilizadas. O sistema tamponante influenciou diretamente a atividade enzimática e a estabilidade das matrizes, destacando-se o tampão acetato de cálcio, que apresentou o melhor desempenho.

Palavras-chave: Alginato de sódio; Manufatura aditiva; Reticulação iônica

1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos, especialmente espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, possuem ampla relevância biotecnológica devido à elevada capacidade metabólica e à eficiente secreção de enzimas. Esses microrganismos apresentam crescimento rápido, facilidade de cultivo e grande adaptação a diferentes substratos, características que favorecem sua aplicação em processos industriais. Além disso, a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes reduz custos de produção e contribui para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis, permitindo a obtenção de extratos enzimáticos com elevada atividade catalítica (Cairns *et al.*, 2018).

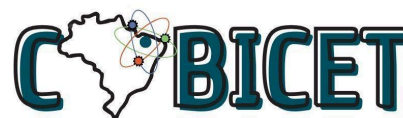
Entre as enzimas produzidas por fungos filamentosos, as amilases se destacam devido à ampla aplicação industrial. Essas enzimas catalisam a hidrólise do amido, convertendo-o em açúcares menores, como maltose e glicose, compostos fundamentais em diferentes cadeias produtivas. Sua utilização é importante nas indústrias alimentícias, têxteis, farmacêuticas e de detergentes, além de apresentar importância crescente na produção de biocombustíveis a partir de biomassa amilácea (Singh *et al.*, 2003).

Apesar do elevado potencial industrial, a aplicação de enzimas em sua forma solúvel apresenta

limitações importantes. Alterações de temperatura, pH e força iônica podem comprometer rapidamente a estabilidade estrutural da proteína, reduzindo sua atividade catalítica. Além disso, enzimas solúveis não são recuperadas ao final do processo, aumentando significativamente os custos operacionais. Nesse contexto, a imobilização enzimática surge como uma estratégia eficiente para aumentar a estabilidade operacional do biocatalisador, facilitar sua recuperação e permitir a reutilização em sucessivos ciclos reacionais (Datta *et al.*, 2013).

A imobilização consiste na retenção física ou química da enzima em um suporte insolúvel, mantendo sua atividade catalítica e promovendo maior resistência às condições do processo. Entre os materiais utilizados para a formação dessas matrizes, os biopolímeros naturais vêm recebendo destaque devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo e facilidade de processamento. O alginato de sódio, extraído de algas marrons, é amplamente utilizado na produção de hidrogéis por apresentar elevada capacidade de gelificação na presença de íons cálcio, formando estruturas tridimensionais capazes de encapsular biomoléculas de forma eficiente (Lee e Mooney, 2012).

A carragenana também apresenta potencial relevante na formação de matrizes para imobilização enzimática. Esse polissacarídeo sulfatado contribui



para o aumento da elasticidade, resistência mecânica e estabilidade estrutural dos hidrogéis, características importantes para aplicações que envolvem reutilização contínua das matrizes. A combinação entre alginato e carragenana permite a obtenção de sistemas mais estáveis, favorecendo a retenção das enzimas e redução de perdas durante os ciclos de utilização (Campo *et al.*, 2009).

Além da composição da matriz polimérica, as condições do meio reacional também exercem influência direta sobre a atividade catalítica das enzimas. Entre esses fatores, o sistema tamponante utilizado nos ensaios possui papel fundamental na manutenção do pH ideal e da estabilidade estrutural da proteína durante a reação. Alterações no pH podem provocar mudanças conformacionais na enzima, afetando a interação entre a enzima e o substrato, reduzindo a eficiência catalítica.

Diferentes sistemas tamponantes são frequentemente avaliados em estudos envolvendo amilases, buscando identificar condições mais favoráveis para a manutenção da atividade enzimática. O tampão citrato de sódio é amplamente utilizado em reações conduzidas em faixas de pH mais ácidas, apresentando elevada capacidade tamponante e boa estabilidade química (Roth *et al.*, 2019).

Por sua vez, o tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) é amplamente empregado em sistemas biológicos devido à sua eficiência na manutenção do pH em faixas próximas à neutralidade (Roth *et al.*, 2019).

Além desses sistemas, o tampão acetato de cálcio apresenta importância significativa principalmente devido à presença de íons cálcio, que podem contribuir para maior estabilidade estrutural de matrizes produzidas com alginato de sódio. Os íons Ca^{2+} atuam diretamente na formação e manutenção das ligações iônicas responsáveis pela reticulação do hidrogel, favorecendo maior resistência mecânica e estabilidade durante os ensaios catalíticos (Bolívar; Nidetzky, 2019).

O tampão ácido maleico também tem sido utilizado em sistemas enzimáticos devido à sua capacidade de atuar em faixas de pH levemente ácidas, proporcionando ambiente favorável para diversas enzimas hidrolíticas. Além disso, esse sistema apresenta boa estabilidade química e menor tendência de interação com componentes estruturais da matriz polimérica quando comparado a tampões contendo agentes quelantes ou íons capazes de interferir na reticulação do hidrogel (Bolívar; Nidetzky, 2019).

Esses sistemas tamponantes podem interferir na difusão do substrato no interior das matrizes poliméricas, na estabilidade das enzimas

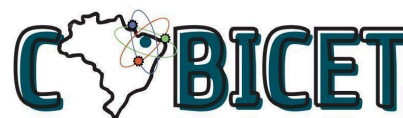
imobilizadas e na manutenção da integridade estrutural do hidrogel, tornando sua avaliação uma etapa importante no desenvolvimento de sistemas biocatalíticos eficientes (Meyer *et al.*, 2022).

Além dos fatores anteriores, as condições de reticulação influenciam diretamente o desempenho do sistema imobilizado. O tempo de exposição ao cloreto de cálcio interfere na compactação da rede polimérica, na porosidade do material e na difusão do substrato até os sítios ativos da enzima. Matrizes excessivamente rígidas podem dificultar a transferência de massa e comprometer a atividade catalítica, enquanto estruturas menos compactas tendem a favorecer a acessibilidade do substrato e a eficiência da reação (Lee e Mooney, 2012).

Nos últimos anos, a impressão 3D tem emergido como uma alternativa promissora para diversos setores industriais, especialmente nas áreas de biomateriais, engenharia tecidual e biotecnologia. Apesar do amplo crescimento dessa tecnologia, sua aplicação como suporte para imobilização enzimática ainda é relativamente recente e pouco explorada quando comparada aos métodos convencionais de encapsulamento e produção de matrizes poliméricas. Dessa forma, a utilização de estruturas produzidas por manufatura aditiva para imobilização de enzimas representa uma abordagem inovadora e em expansão no campo biotecnológico (Li *et al.*, 2016).

A impressão 3D permite a fabricação de estruturas tridimensionais, camada por camada, com elevado nível de precisão, possibilitando controle sobre geometria, tamanho de poros, área superficial e distribuição interna do material. Essas características são extremamente importantes em sistemas de imobilização enzimática, uma vez que influenciam diretamente a transferência de massa, a difusão do substrato e a estabilidade operacional do biocatalisador. Além disso, a utilização de hidrogéis em sistemas de bioimpressão possibilita o desenvolvimento de suportes personalizados e mais eficientes para aplicações biotecnológicas (Nunes *et al.*, 2022).

Estudos recentes demonstraram que hidrogéis produzidos por bioimpressão podem manter enzimas biologicamente ativas no interior das matrizes impressas, favorecendo aplicações envolvendo biocatálise e reutilização enzimática. A possibilidade de controlar parâmetros de impressão, como diâmetro do bico, espessura das camadas e composição do hidrogel, permitiu otimizar a retenção enzimática, a estabilidade estrutural e a difusão do substrato no interior das matrizes. Dessa forma, a integração entre impressão 3D e imobilização enzimática apresenta grande potencial para o desenvolvimento de processos industriais mais eficientes (Wenger *et al.*, 2022).



Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de matrizes poliméricas produzidas com alginato de sódio e carragenana tipo iota contendo amilases imobilizadas investigando a influência de diferentes sistemas tamponantes sobre a atividade catalítica e a integridade estrutural das matrizes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos (LMEDP), localizado na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* JK, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. O microrganismo utilizado neste trabalho está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A64AD93. As sementes de azevém crioulo (*Lolium multiflorum* L.) foram cultivadas e cedidas por agricultora do município de São Lourenço do Sul (coordenadas geográficas de 31°28'44"S, -52.30'29" W), no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

2.1 Obtenção do extrato enzimático contendo amilases

O extrato bruto extracelular contendo as amilases foi obtido pelo cultivo do *Aspergillus* sp. C333 em 50 mL de meio de cultura líquido contendo extrato de levedura 0,8% (m/v), $MgSO_4$ 0,05% (m/v), KH_2PO_4 0,03% (m/v) e farinha de azevém crioulo 1,5% (m/v), contidos em Erlenmeyer de 250 mL. Após o preparo dos meios de cultura, os mesmos foram autoclavados à 120 °C, 1 atm, durante 30 minutos. Após resfriar, os meios foram inoculados com dois discos de 1 polegada cada do *Aspergillus* sp. C333, cultivado anteriormente em meio de cultura sólido composto por farinha de aveia 4% (m/v) e ágar bacteriológico 2% (m/v) (Emerson, 1941). Em seguida, os meios foram mantidos durante cinco dias, à 30 °C, de forma estacionária em estufa bacteriológica. Após o crescimento do fungo em meio líquido, a massa micelial foi separada do extrato bruto contendo o coquetel enzimático por filtração a vácuo. Em seguida, quantificou-se a atividade amilolítica.

2.2 Imobilização das amilases por impressão 3D

Matrizes poliméricas foram produzidas para imobilização enzimática utilizando 0,4 g de alginato

de sódio e 0,1 g de carragenana do tipo iota, incorporados a 10 mL do extrato bruto rico em amilases.

A mistura foi submetida ao aquecimento em banho-maria à 60 °C por 15 minutos, visando promover a completa solubilização dos polímeros e formação homogênea da matriz. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o material foi utilizado no processo de impressão das matrizes.

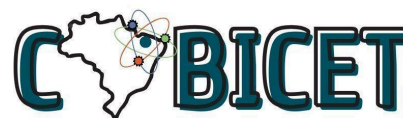
Para a etapa de impressão 3D, a solução polimérica contendo o extrato enzimático foi transferida para uma seringa plástica de 10 mL, posteriormente acoplada à impressora 3D do tipo extrusão (593ICAN). A impressão foi realizada com geometria circular (diâmetro de 2 cm), utilizando um bico metálico com diâmetro interno de 0,42 mm. As matrizes foram confeccionadas em duplicata, contendo dez camadas cada. Os parâmetros operacionais de impressão foram definidos no software Bioscaffolds, responsável pela geração do código G-code, o qual foi executado por meio do programa Repetier.

Após a impressão, as estruturas foram cuidadosamente transferidas para recipientes contendo $CaCl_2$ 6% (m/v). Etapa em que ocorreu a reticulação iônica e a estabilização da matriz.

2.3 Preparação dos sistemas tamponantes e avaliação da atividade amilolítica

Inicialmente foram preparados diferentes sistemas tamponantes na concentração de 100 mM, visando avaliar a influência do pH e da composição do meio reacional sobre a atividade amilolítica e a estabilidade das matrizes poliméricas. Os tampões utilizados foram citrato de sódio pH 5,0, acetato de cálcio pH 5,5, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) pH 7,0 e ácido maleico pH 5,5. Após o preparo dos tampões foi realizada a preparação do substrato amiláceo utilizando amido 1% (m/v) dissolvido em cada tampão.

A atividade amilolítica foi determinada pelo método sacarificante utilizando o ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS) de acordo com Miller (1959). Inicialmente, incubou-se 250 µL dos substratos com 250 µL do extrato enzimático solúvel, à 55 °C, durante 5 minutos. Ao fim do tempo de reação, alíquotas de 50 µL foram retiradas e imediatamente adicionadas a tubos contendo 50 µL do DNS. Os tubos foram,



então, submetidos à fervura por 5 minutos e, após o resfriamento, adicionou-se 500 μL de água destilada.

O branco da reação consistiu na adição imediata de 50 μL da mistura de substrato e extrato bruto enzimático a 50 μL de DNS, caracterizando o tempo zero da reação. As leituras de absorbância foram efetuadas utilizando Elisa Loccus LMR-96, em microplacas, à 540 nm.

Para realizar o cálculo de atividade enzimática foi necessário elaborar uma curva padrão de glicose, no intervalo de concentração de 0 a 0,05 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A atividade enzimática foi expressa em $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo a Unidade (U) definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

Enquanto que a quantificação da atividade das amilases imobilizadas via impressão 3D foi realizada, inicialmente, pela lavagem dos derivados com água destilada, escorridos e transferidos para um béquer contendo 7 mL do substrato. O sistema reacional foi mantido em banho-maria à 55 °C por 10, 15, 20 e 25 minutos. Ao término de cada tempo, alíquotas de 50 μL foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio contendo igual volume do DNS. Os tubos foram submetidos à fervura por 5 minutos, resfriados à temperatura ambiente e, posteriormente, adicionaram-se 500 μL de água destilada. O branco da reação foi obtido pela retirada da alíquota no tempo zero, representando a condição sem ocorrência de hidrólise enzimática. Após o preparo das amostras, realizou-se a leitura da absorbância em Elisa Loccus LMR-96, em microplacas, à 540 nm.

2.4 Avaliação da estabilidade das matrizes poliméricas em diferentes sistemas tamponantes

A estabilidade das matrizes poliméricas foi avaliada durante os ensaios de atividade enzimática realizados nos diferentes sistemas tamponantes (TRIS pH 7,0, citrato de sódio pH 5,0, acetato de cálcio pH 5,5 e ácido maleico pH 5,5), todos preparados na concentração de 100 mM.

Após a impressão 3D e a etapa de reticulação em solução de CaCl_2 6% (m/v), as matrizes contendo as amilases imobilizadas foram submetidas às reações enzimáticas utilizando amido a 1% (m/v) preparado em cada sistema tamponante, permanecendo em banho-maria a 55 °C durante 10, 15, 20 e 25 minutos.

Ao término de cada ensaio, as matrizes foram retiradas do meio reacional e avaliadas quanto à sua integridade estrutural por inspeção visual. Foram observadas alterações como deformação, inchamento, rompimento, fragmentação, perda de

massa aparente e desestruturação da rede polimérica, comparando-se as matrizes antes e após a reação enzimática. Adicionalmente, foram obtidos registros fotográficos para documentar as alterações morfológicas observadas em cada sistema tamponante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da atividade amilolítica solúvel em diferentes sistemas tamponantes

A avaliação inicial da atividade amilolítica foi realizada com o objetivo de verificar a influência de diferentes sistemas tamponantes sobre o desempenho catalítico da amilase fúngica e sobre a estabilidade das matrizes poliméricas utilizadas para imobilização enzimática. Para isso, foram avaliados os tampões TRIS, citrato de sódio, acetato de cálcio e ácido maleico, todos preparados na concentração de 100 mM e utilizados no preparo do substrato contendo amido a 1% (m/v).

Conforme apresentado na Tabela 1, observou-se que o sistema tamponante exerceu influência significativa sobre a atividade amilolítica da enzima livre. Entre os tampões avaliados, o citrato de sódio apresentou a maior atividade enzimática no tempo inicial de reação, atingindo 21,105 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ aos 10 minutos, seguido pelo ácido maleico, com 20,325 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$. O tampão acetato de cálcio apresentou atividade intermediária, variando entre 15,510 e 11,862 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto o tampão TRIS apresentou os menores valores em todos os tempos experimentais.

Tabela 1. Atividade amilolítica solúvel em diferentes sistemas tamponantes.

Tempo reação (min)	Atividade $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$			
	TRIS	Citrato de sódio	Acetato de cálcio	Ácido maleico
10	8,175	21,105	15,510	20,325
15	8,520	17,560	13,730	16,690
20	6,803	14,513	12,825	15,968
25	5,550	13,164	11,862	13,158

Fonte: Própria autora.

De maneira geral, observou-se redução da atividade enzimática no decorrer do tempo reacional para todos os sistemas tamponantes. Esse comportamento pode estar relacionado à diminuição da disponibilidade do substrato durante a reação, ao acúmulo de produtos da hidrólise do amido, que podem exercer efeito inibitório sobre a enzima, e à perda gradual da

conformação nativa ao longo do período de incubação.

O tampão citrato de sódio destacou-se por proporcionar a maior atividade amilolítica no início da reação, indicando que esse sistema oferece condições favoráveis para a atuação da amilase fúngica solúvel. Apesar da elevada atividade inicial, observou-se redução contínua nos tempos subsequentes, atingindo 13,164 U.mL⁻¹ aos 25 minutos, o que representou uma diminuição de, aproximadamente, 38% em relação ao valor inicial. Resultado semelhante foi observado para o tampão ácido maleico, que apresentou elevada atividade inicial (20,325 U.mL⁻¹) e redução gradual durante o ensaio, alcançando 13,158 U.mL⁻¹ aos 25 minutos. Esse comportamento sugere que meios levemente ácidos favoreceram inicialmente a atividade da enzima, embora o desempenho tenha diminuído conforme a reação prosseguiu.

Por sua vez, o tampão acetato de cálcio apresentou atividade inferior à observada para os tampões citrato de sódio e ácido maleico, porém superior à obtida com TRIS. Embora íons cálcio sejam frequentemente descritos na literatura como agentes estabilizadores de α -amilases, a resposta observada neste estudo indicou que a simples presença desses íons não foi suficiente para promover a maior atividade catalítica da enzima solúvel nas condições experimentais adotadas, evidenciando que fatores como pH, força iônica e composição do meio também influenciam significativamente o desempenho enzimático.

Por fim, o tampão TRIS apresentou os menores valores de atividade, indicando menor eficiência catalítica nesse sistema tamponante. A menor atividade observada pode estar relacionada às características químicas do meio, que podem não favorecer a conformação estrutural mais ativa da enzima ou reduzir sua afinidade pelo substrato.

3.2 Avaliação da estabilidade da matriz polimérica em diferentes sistemas tamponantes

Após a avaliação da atividade amilolítica da enzima solúvel foram realizados os ensaios utilizando matrizes poliméricas contendo amilases imobilizadas, com o objetivo de avaliar simultaneamente a atividade catalítica da enzima e a estabilidade estrutural das matrizes frente aos diferentes sistemas tamponantes.

As matrizes produzidas a partir de alginato de sódio e carragenana do tipo iota foram submetidas aos ensaios utilizando substratos preparados com amido a 1% (m/v) em tampão TRIS, citrato de sódio, acetato de cálcio e ácido maleico.

Conforme observado na Tabela 2 a imobilização enzimática promoveu redução significativa da atividade amilolítica quando comparada aos resultados obtidos para a enzima solúvel. Esse comportamento é esperado em sistemas de imobilização em hidrogéis, uma vez que a

incorporação da enzima na matriz polimérica pode gerar limitações difusionais, dificultando o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima e reduzindo a velocidade de reação.

Tabela 2. Atividade amilolítica das matrizes poliméricas em diferentes sistemas tamponantes.

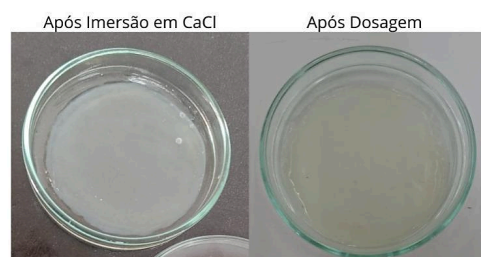
Tempo reação (min)	Atividade U.mL ⁻¹			
	TRIS	Citrato de sódio	Acetato de cálcio	Ácido maleico
10	0,0001	0,0027	0,0108	0,0050
15	0,0027	0,0062	0,0212	0,0081
20	0,0012	0,0090	0,0228	0,0121
25	0,0005	0,0098	0,0220	0,0141

Fonte: Própria autora.

Ao analisar individualmente os sistemas tamponantes, verificou-se que o tampão TRIS apresentou os menores valores de atividade amilolítica entre todos os sistemas avaliados, corroborando com os resultados obtidos pela enzima solúvel (Tabelas 1 e 2). Embora tenha ocorrido um discreto aumento da atividade aos 15 minutos, seguido de redução nos tempos subsequentes, os valores permaneceram inferiores aos observados para os demais sistemas tamponantes durante todo o período experimental.

Vale citar que, apesar da baixa atividade catalítica, as matrizes apresentaram elevada estabilidade física no tampão TRIS após o tempo reacional, sem sinais significativos de rompimento, deformação ou desestruturação do hidrogel ao longo dos ensaios. Esse comportamento indicou elevada compatibilidade entre o tampão TRIS e a rede polimérica formada pelo alginato de sódio e carragenana iota.

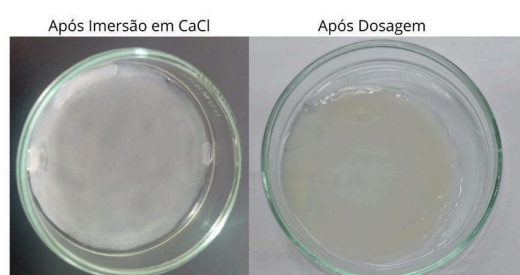
Figura 3 – Matrizes poliméricas em tampão TRIS. (A) antes da reação enzimática e (B) após os ensaios enzimáticos.



Fonte: Própria autora.

Para o tampão citrato de sódio, observou-se aumento gradual da atividade amilolítica ao longo do tempo (Tabela 2). Entretanto, diferentemente dos demais sistemas avaliados esse tampão apresentou comprometimento significativo na estabilidade estrutural das matrizes poliméricas durante os experimentos. Observou-se tendência de enfraquecimento e desestruturação das matrizes ao longo das análises, evidenciando menor resistência física nesse meio reacional (Figura 5).

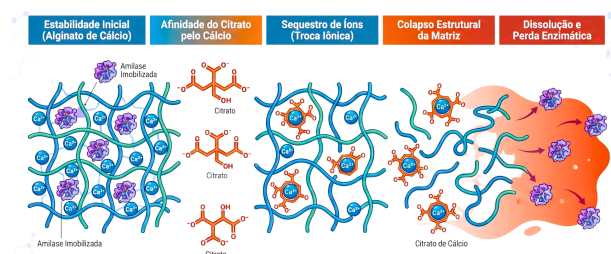
Figura 5 – Matrizes poliméricas em tampão citrato de sódio. (A) antes da reação e (B) após os ensaios enzimáticos.



Fonte: Própria autora.

Entre todos os sistemas tamponantes avaliados, o tampão citrato foi o único que apresentou instabilidade significativa nas matrizes poliméricas. Esse comportamento pode estar relacionado à elevada afinidade dos íons citrato pelos íons cálcio responsáveis pela reticulação do alginato de sódio. A interação entre os íons citrato e cálcio promove troca iônica no interior da rede polimérica, reduzindo a estabilidade estrutural do hidrogel e comprometendo sua resistência mecânica durante os ensaios experimentais. Como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Representação esquemática da desestabilização da matriz polimérica em tampão citrato.

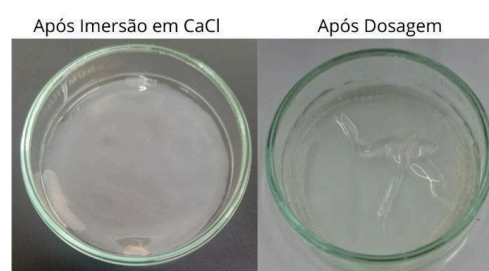


Fonte: Produzida por Ia e Adaptada pela autora.

Os melhores resultados foram observados para o tampão acetato de cálcio, que apresentou os maiores valores de atividade enzimática entre todos os sistemas avaliados (Tabela 2). Além da elevada atividade catalítica, verificou-se excelente estabilidade estrutural das matrizes durante todos os ensaios, sem ocorrência significativa de rompimento ou deformação das estruturas impressas (Figura 7).

O bom desempenho observado para o tampão acetato de cálcio pode estar relacionado à presença de íons cálcio no próprio meio reacional. Esses íons atuam diretamente na manutenção da reticulação iônica do alginato de sódio, favorecendo maior estabilidade da rede polimérica e contribuindo para preservação da estrutura ao longo dos tempos reacionais.

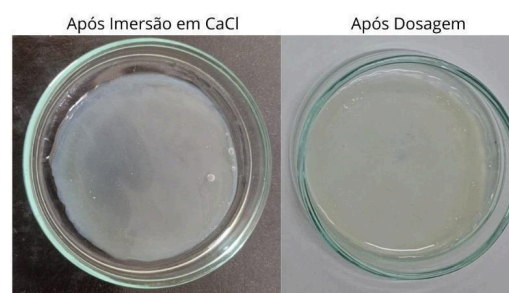
Figura 7 – Matrizes poliméricas em tampão acetato de cálcio. (A) antes reação enzimática e (B) após os ensaios enzimáticos



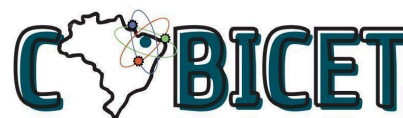
Fonte: Própria autora.

Resultados bastante semelhantes foram observados para o tampão ácido maleico, que apresentou atividade enzimática próxima aos valores obtidos para o acetato de cálcio durante praticamente todos os tempos reacionais avaliados (Tabela 2). As matrizes submetidas a esse sistema também apresentaram boa integridade estrutural, mantendo estabilidade satisfatória durante os ensaios (Figura 8).

Figura 8 – Matrizes poliméricas em tampão ácido maleico. (A) antes reação enzimática e (B) após os ensaios enzimáticos.



Fonte: Própria autora.



Outro aspecto importante observado foi a manutenção relativamente constante da atividade enzimática ao longo dos tempos reacionais para a maioria dos sistemas avaliados. Diferentemente do observado para a enzima solúvel, em que houve redução gradual da atividade ao longo do tempo, as matrizes imobilizadas apresentaram menores oscilações entre os tempos experimentais. Esse comportamento pode estar relacionado ao efeito protetor promovido pela matriz polimérica, que contribuiu para maior estabilidade conformacional da enzima durante o processo reacional.

Além disso, a estrutura do hidrogel pode atuar como barreira física parcial, reduzindo alterações bruscas no microambiente enzimático e minimizando possíveis processos de desnaturação ao longo do tempo. Dessa forma, embora a imobilização tenha reduzido os valores absolutos de atividade catalítica, observou-se ganho significativo em estabilidade operacional e resistência estrutural das matrizes.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que os sistemas tamponantes exerceram influência direta sobre a atividade amilolítica da enzima solúvel e sobre a estabilidade das matrizes poliméricas contendo amilases imobilizadas. Entre os tampões avaliados, citrato de sódio e ácido maleico apresentaram as maiores atividades enzimáticas para a enzima livre, enquanto o acetato de cálcio apresentou atividade intermediária e o tampão TRIS os menores valores ao longo dos tempos reacionais avaliados.

Nos ensaios com enzimas imobilizadas, observou-se redução da atividade amilolítica em relação à enzima solúvel, comportamento esperado em sistemas de encapsulamento enzimático devido às limitações difusionais impostas pela matriz polimérica. Apesar dessa redução, verificou-se que as matrizes apresentaram boa estabilidade operacional na maioria dos sistemas tamponantes avaliados.

O tampão citrato de sódio foi o único que comprometeu significativamente a integridade estrutural das matrizes poliméricas, evidenciando que a interação dos íons citrato com os íons cálcio responsáveis pela reticulação do alginato reduziu a estabilidade física dos hidrogéis. Em contrapartida, o acetato de cálcio apresentou o melhor desempenho para as matrizes imobilizadas, proporcionando os maiores valores de atividade amilolítica e preservando a estabilidade estrutural do material durante os ensaios. O ácido maleico também apresentou resultados satisfatórios, promovendo aumento gradual da atividade da enzima imobilizada

ao longo do tempo e mantendo a integridade física das matrizes.

Dessa forma, concluiu-se que a combinação entre alginato de sódio e carragenana tipo iota mostrou-se eficiente para a produção de matrizes poliméricas destinadas à imobilização de amilases por impressão 3D. Além disso, os resultados evidenciam que a escolha do sistema tamponante é determinante tanto para o desempenho catalítico da enzima quanto para a estabilidade operacional das matrizes. Nas condições avaliadas, o acetato de cálcio destacou-se como o sistema tamponante mais promissor para aplicações envolvendo amilases imobilizadas, por apresentar o melhor equilíbrio entre atividade enzimática e estabilidade estrutural das matrizes.

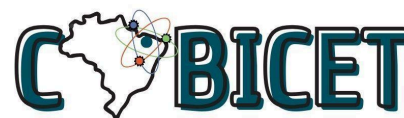
Por fim, pode-se afirmar que faz-se necessário estudos mais detalhados de matrizes e condições de ensaios visando aumento da atividade das amilases nas matrizes formuladas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), ao Instituto de Ciência e Tecnologia, ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ao Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos (LMEDP), ao Laboratório Integrado de Cereais e Lipídios (LICEL), à Universidade de São Paulo (USP) e ao Grupo de Pesquisa IDEIAS pelo apoio institucional e científico. Agradecem também às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do processo nº 421777/2021-4, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BOLIVAR, Juan M.; NIDETZKY, Bernd. *The microenvironment in immobilized enzymes: methods of characterization and its role in determining enzyme performance*. Molecules, Basel, v. 24, n. 19, p. 3460, 2019. DOI: 10.3390/molecules24193460. Disponível em: PMC – The Microenvironment in Immobilized Enzymes. Acesso em: 26 maio 2026.
- CAIRNS, T. C.; NAI, C.; MEYER, V. *How a fungus shapes biotechnology: 100 years of Aspergillus niger research*. Fungal Biology and Biotechnology, v. 5, n. 13, 2018. Disponível em: How a fungus shapes



biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. Acesso em: 07 maio 2026.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA JUNIOR, D. B.; CARVALHO, I. *Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review*. Carbohydrate Polymers, v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009. Disponível em: Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. Acesso em: 05 maio 2026.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials*. 3 Biotech, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013. Disponível em: Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. Acesso em: 04 maio 2026.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. *Alginate: properties and biomedical applications*. Progress in Polymer Science, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012. Disponível em: Alginate: properties and biomedical applications. Acesso em: 07 maio 2026.

LI, J.; CHEN, M.; FAN, X.; ZHOU, H. *Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects*. Journal of Translational Medicine, v. 14, n. 271, 2016. Disponível em: Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. Acesso em: 04 maio 2026.

NUNES, S. S.; MATOS, B. N.; PEREIRA, R. F.; *et al.* *Hydrogels for extrusion-based bioprinting: General considerations*. Bioprinting, v. 27, e00212, 2022. Disponível em: Hydrogels for extrusion-based bioprinting: General considerations. Acesso em: 07 maio 2026.

ROTH, C.; MOROZ, O. V.; TURKENBURG, J. P.; *et al.* *Structural and functional characterization of three novel fungal amylases with enhanced stability and pH tolerance*. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 19, p. 4902, 2019. Disponível em: Structural and functional characterization of three novel fungal amylases with enhanced stability and pH tolerance. Acesso em: 08 maio 2026.

SINGH, R.; KUMARI, N.; GUPTA, R. *Microbial amylases: a biotechnological perspective*. Process Biochemistry, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003. Disponível em: Microbial amylases: a biotechnological perspective. Acesso em: 07 maio 2026.

WENGER, L.; RADTKE, C. P.; GERISCH, E.; *et al.* *Systematic evaluation of agarose- and agar-based bioinks for extrusion-based bioprinting of enzymatically active hydrogels*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 10, 2022. Disponível em: Systematic evaluation of agarose-

and agar-based bioinks for extrusion-based bioprinting of enzymatically active hydrogels. Acesso em: 07 maio 2026.

YU, R.; LIU, J.; WANG, Y.; *et al.* *Aspergillus niger as a secondary metabolite factory*. Frontiers in Chemistry, v. 9, 2021. Disponível em: *Aspergillus niger* as a secondary metabolite factory. Acesso em: 09 maio 2026.