



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**  
Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE AMILASES DE *ASPERGILLUS NIGER* ATCC POR  
TROCA IÔNICA UTILIZANDO ADSORVENTES MONOLÍTICOS MACROPOROSOS**

**Autora:** Débora Lemos da Silva

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

ITAPETINGA  
BAHIA-BRASIL  
Março de 2023

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE AMILASES DE *ASPERGILLUS NIGER* ATCC POR  
TROCA IÔNICA UTILIZANDO ADSORVENTES MONOLÍTICOS MACROPOROSOS**

**DÉBORA LEMOS DA SILVA**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. *DSc.* Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**Co-orientadores:** Prof<sup>a</sup>. *DSc.* Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof<sup>o</sup>. *DSc.* Marcelo Franco

ITAPETINGA  
BAHIA-BRASIL  
Março de 2023

660.634  
S579p

Silva, Débora Lemos da.

Purificação parcial de amilases de *Aspergillus niger* ATCC por troca iônica utilizando adsorventes monolíticos macroporosos. / Débora Lemos da Silva. – Itapetinga-BA: UESB, 2023.

63f.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e coorientação da Prof.<sup>a</sup> D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof. D. Sc. Marcelo Franco.

1. Enzima – Purificação. 2. Amilase. 3. *Aspergillus niger*. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Franco, Marcelo. V. Título.

**CDD(21): 660.634**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5<sup>a</sup> Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Adsorventes monolíticos macroporosos



**PPGECAL**  
ENGENHARIA E  
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB  
Recredenciada pelo Decreto Estadual  
Nº 16.825, de 04.07.2016



Governo do  
Estado da Bahia

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

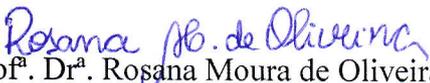
**Título:** “PURIFICAÇÃO PARCIAL DE AMILASE DE *ASPERGILLUS NIGER* ATCC POR TROCA IÔNICA UTILIZANDO ADSORVENTES MONOLÍTICOS MACROPOROSOS.”

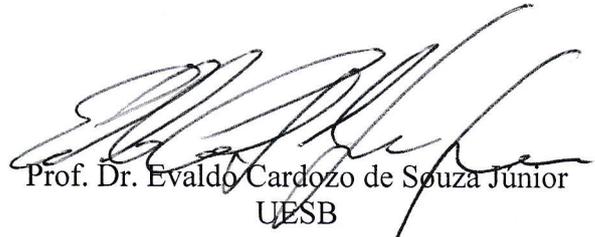
**Autor (a):** DÉBORA LEMOS DA SILVA

**Orientador (a):** Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**Coorientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Cristina Ferreira Bonomo  
Prof. Dr. Marcelo Franco

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de *MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS*, pela Banca Examinadora.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Moura de Oliveira  
Membro Externo - IF BAIANO

  
Prof. Dr. Eivaldo Cardozo de Souza Junior  
UESB

  
Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan  
Orientador - UESB  
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 10 de março de 2023.

*“Sou o resultado de todas as vezes  
que não me permiti desistir”*

*Autor desconhecido*

*Dedico este trabalho, em primeiro lugar, a Deus por me dar forças para não desistir do meu objetivo e sabedoria para seguir firme, e em segundo lugar, à minha família que nunca deixou de me amparar nos momentos difíceis ao longo dessa trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus pela oportunidade de estar onde há acolhimento e fortaleza.*

*Aos meus Pais, Luciene e Antoniel, e minha irmã Ana pelo apoio em todos os momentos. Obrigado por todo amor dado, vocês são os maiores vencedores dessa luta.*

*A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL) e alunos do Laboratório de Engenharia e Processos (LEP) pelo suporte, apoio no trabalho, alegrias e por ter me permitido fazer parte dessa família por tantos anos.*

*Ao professor Rafael pelos anos de orientação, paciência, amizade e disponibilidade. Agradeço infinitamente por todo conhecimento que me foi dado.*

*Aos professores Renata Bonomo e Marcelo Franco pela co-orientação.*

*Aos meus amigos e colegas que me ajudaram a enfrentar essa jornada, em especial Arthur, Izabella, Ana Luiza, Jéssica, Annie, Jonathan, Ivonea, Renatinha, Gabriela, Carol, Lorena, Núbina, Lílian, Yara e Bia.*

*À Boa Terra Chips pelo resíduo doado.*

*A todos do Laboratório de Resíduos Agroindustriais (LABRA), em especial professor Nívio, Jabson, Monique e Mari pela ajuda e palavras de incentivo.*

*Aos professores presentes na banca avaliadora, Rosana Moura e Evaldo Cardoso pela disponibilidade e sugestões.*

*À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade em desenvolver esse projeto.*

*À FAPESB e CAPES pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.*

*Aos meus familiares, agradeço a todos os meus tios, em especial Tio Juninho, Tia Dag, Tia Eliene, Tia Jane, e a todos meus primos. Obrigada pelo incentivo.*

*A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse momento, meus sinceros agradecimentos.*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis e variáveis estudadas para avaliação da produção de amilase. ....	36
Tabela 2. Resultados da caracterização estrutural das matrizes produzidas. ....	42
Tabela 3. Composição físico-química do farelo do resíduo de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz). .....	47
Tabela 4. Atividade específica da $\alpha$ -amilase em função do tempo de fermentação (TF) e pH. ....	47
Tabela 5. Resultados da análise de regressão para a atividade específica da $\alpha$ -amilase para DCCR 2 <sup>2</sup> .....	48
Tabela 6. Estimativa dos parâmetros do modelo completo no DCCR.....	48
Tabela 7. Resultados referentes à purificação $\alpha$ -amilase obtida por FES por cromatografia de troca iônica na coluna monolítica produzida. ....	49
Tabela 8. Resultados referentes à purificação parcial em batelada da $\alpha$ -amilase por troca iônica. ...	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de $\alpha$ -amilase e seus domínios. ....	20
Figura 2. Imagem do fungo <i>Aspergillus niger</i> ampliado em 400 vezes. ....	22
Figura 3. Reação de formação do criogel de poliacrilamida.....	24
Figura 4. Representação esquemática da produção de criogéis. ....	24
Figura 5. Imagem por microscopia eletrônica de varredura: (a) Criogel sintetizado a -20 °C e (b) gel sintetizado a 20 °C. ....	25
Figura 6. Estrutura molecular da arginina.....	26
Figura 7. Cromatógrafo Akta Pure para purificação de proteínas. ....	37
Figura 8. Imagem do criogel controle desidratado (A) e hidratado (B).....	41
Figura 9. Dados experimentais referentes a variação de pressão ( $\Delta P$ ) em função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel no leito de troca catiônica.....	43
Figura 10. Distribuição dos tempos de residência para pulsos de acetona em diferentes velocidades superficiais de escoamento no leito monolítico produzido.....	44
Figura 11. Altura equivalente dos pratos teóricos da coluna de criogel produzida em função da velocidade superficial de escoamento, para pulsos de acetona.....	45
Figura 12. Análise do Ponto de carga zero para o criogel produzido. (A) Controle; (B) Funcionalizado.....	46
Figura 13. Perfil de adsorção da purificação parcel $\alpha$ -amilase por meio do extrato bruto, utilizando a coluna de monolítica em sistema cromatográfico Akta Pure.....	49
Figura 14. Gel de eletroforese (SDS-PAGE) a 12%, para $\alpha$ -amilase parcialmente purificada. (A) Padrões BSA; Bromelina; Lipase e Lisozima; (B) extrato bruto; (C) sobrenadante (batelada); (D) eluído (batelada); e (E) Eluído (coluna monolítica).....	51

## **RESUMO**

SILVA, D. L. **Purificação parcial de amilases de *Aspergillus Niger* ATCC por troca iônica utilizando adsorventes monolíticos macroporosos. 63p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2023.

As amilases são biomoléculas importantes para aplicação na indústria alimentícia, bem como para produção de detergentes, biocombustíveis, papel, produtos farmacêuticos, etc. Essas enzimas são produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, uma vez que são considerados GRAS (reconhecido como de uso seguro) na produção de alimentos, principalmente. Para extração enzimática, são realizadas pesquisas utilizando a fermentação em estado sólido com posterior purificação. Técnicas cromatográficas mostram-se como uma importante estratégia de purificação, sendo constante o desenvolvimento de novos adsorventes, e as colunas monolíticas poliméricas (criogel) são uma proposta promissora, pois conferem versatilidade no uso, bem como possibilidade de funcionalização e aplicação na purificação de enzimas/proteínas. Sendo assim, objetivou-se purificar amilases obtidas por fermentação em estado sólido utilizando novos trocadores monolíticos funcionalizados com arginina. O *A. niger* foi inoculado na concentração  $10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> de meio sólido, e a melhor condição para a produção da  $\alpha$ -amilase foi no tempo de fermentação de 48 horas e pH de extração de 7,4 obtida utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Em relação à caracterização estrutural, os criogéis apresentaram porosidade de 92%, grau de expansão de 20,36 L.kg<sup>-1</sup>, capacidade de inchamento de 21,36 kg.kg<sup>-1</sup> e ponto de carga zero em torno de pH 9,2. A funcionalização com arginina não apresentou resultados esperados para purificação em leito monolítico, entretanto o criogel funcionalizado com arginina mostrou-se eficiente para retirada de compostos indesejáveis no extrato bruto enzimático, elevando a atividade enzimática do mesmo, e conseqüentemente a atividade específica da  $\alpha$ -amilase no sobrenadante, indicando que compostos que interferiam na atividade enzimática foram adsorvidos do meio pela matriz polimérica, havendo a purificação parcial do extrato contendo  $\alpha$ -amilase.

**Palavras-chave:** arginina; criogel; extração; fermentação em estado sólido.

## ***ABSTRACT***

SILVA, D. L. **Partial purification of amylases from *Aspergillus Niger* ATCC by ion exchange using macroporous monolithic adsorbents. 63p.** Dissertation - Master's in Engineering and Food Science), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2023.

Amylases are biomolecules that have significant applications in multiple industries, including food, detergents, biofuels, paper, and pharmaceuticals. These enzymes are typically produced by fungi belonging to the genus *Aspergillus*, as they are recognized as safe to use in food production. To extract these enzymes, researchers use solid-state fermentation followed by purification, with chromatographic techniques being a popular choice. Novel adsorbents are continuously being developed, with polymeric monolithic columns (cryogels) being a promising option due to their versatility, functionalization potential, and ability to purify enzymes and proteins effectively. The objective of this study was to purify amylases that were obtained through solid-state fermentation using new monolithic exchangers functionalized with arginine. The *A. niger* than inoculated at a concentration of  $10^7$  spores.g<sup>-1</sup> of solid medium, and found that the optimal conditions for the production of  $\alpha$ -amylase were a fermentation time of 48 hours and an extraction pH of 7.4, as determined by the Central Composite Rotational Design (CCRD). The cryogels that were used in the study had a porosity of 92%, a degree of expansion of 20.36 L.kg<sup>-1</sup>, a swelling capacity of 21.36 kg.kg<sup>-1</sup>, and a zero charge point around pH 9.2. The use of arginine for functionalization in a monolithic bed did not yield expected purification results. However, the use of arginine-functionalized cryogel effectively eliminated undesirable compounds from the crude enzyme extract, thereby increasing the enzymatic activity and specific activity of  $\alpha$ -amylase in the supernatant. This suggests that the polymeric matrix adsorbed compounds that interfered with the enzymatic activity, resulting in partial purification of the extract containing  $\alpha$ -amylase.

**Key words:** arginine; cryogel; extraction; solid state fermentation.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1. Enzimas .....	19
2.2. $\alpha$ -Amilase .....	19
2.3. Fermentação em estado sólido .....	21
2.1. Resíduo de Mandioca .....	21
2.1.1. <i>Aspergillus niger</i> .....	22
2.2. Técnicas cromatográficas para purificação de proteínas Cromatografia de troca-iônica ...	22
2.2.1. Colunas cromatográficas: criogel.....	23
2.3. Modificação da superfície dos criogéis .....	25
3. OBJETIVOS .....	28
3.1. Objetivo Geral .....	28
3.2. Objetivos Específicos .....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
4.1. Local do experimento .....	29
4.2. Principais Reagentes.....	29
4.3. Síntese do Criogel .....	29
4.4. Funcionalização dos criogéis para troca iônica.....	29
4.5. Caracterização estrutural e hidrodinâmica do leito monolítico.....	30
4.5.1. Caracterização estrutural.....	30
4.5.2. Capacidade de Inchamento e Grau de Expansão (ED) .....	30
4.5.3. Análise de ponto de carga zero (PCZ) .....	31
4.5.4. Porosidade dos criogéis.....	31
4.1. Caracterização hidrodinâmica .....	32
4.1.1. Permeabilidade ao Escoamento .....	32
4.1.2. Distribuição dos tempos de residência (DTR) .....	33
4.1.3. Altura equivalente de pratos teóricos (AEPT) .....	33
4.2. Preparo do substrato .....	33
4.3. Caracterização química e físico do farelo do resíduo de mandioca .....	34
4.3.1. Análise de umidade, cinzas e proteínas do farelo do resíduo de mandioca .....	34

4.3.2.	Teor de amido total no farelo do resíduo de mandioca.....	34
4.3.3.	Teor de amilose aparente e amilopectina do farelo do resíduo de mandioca .....	35
4.4.	Condições de cultivo do microrganismo .....	35
4.5.	Fermentação em estado sólido (FES).....	36
4.6.	Preparo do extrato enzimático .....	36
4.7.	Purificação da $\alpha$ -amilase obtida por FES em leito monolítico.....	36
4.8.	Purificação da $\alpha$ -amilase obtida por FES em batelada.....	38
4.9.	Determinação da atividade enzimática.....	38
4.9.1.	Atividade específica e Fator de purificação .....	39
4.9.2.	Teor de proteína no extrato enzimático.....	39
4.10.	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições desnaturante (SDS – PAGE) .....	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	41
5.1.	Síntese do criogel .....	41
5.2.	Caracterização estrutural dos criogéis controle e funcionalizado .....	41
5.1.	Caracterização hidrodinâmica do monólito: Permeabilidade ao Escoamento; a Distribuição dos Tempos de Residência; e Altura Equivalente de Pratos Teóricos.....	43
5.2.	Análise do ponto de carga zero .....	46
5.3.	Composição centesimal do resíduo de mandioca.....	46
5.4.	Atividade Enzimática .....	47
5.5.	Purificação da $\alpha$ -amilase obtida por FES em coluna monolítica .....	49
5.6.	Purificação parcial da $\alpha$ -amilase obtida por FES em processo em batelada .....	50
5.7.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante (SDS – PAGE) .....	50
6.	CONCLUSÕES .....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## INTRODUÇÃO

A produção comercial de enzimas amilolíticas teve início no começo do século 20 em decorrência do interesse industrial para a produção de glicose a partir de materiais amiláceos (Ravindran et al., 2018). As amilases (1,4- $\alpha$ -D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) fazem parte de um grupo conhecido como enzimas amilolíticas. As  $\alpha$ -amilases são endoenzimas capazes de clivarem as ligações  $\alpha$ - 1,4 encontradas no interior nas moléculas de amilose e amilopectina produzindo oligossacarídeos de 6-7 unidades de glicose e, posteriormente, açúcares redutores (Torres et al., 2012).

Os produtos gerados através da ação da  $\alpha$ -amilase sob o substrato são os mais encontrados no ramo alimentício devido a sua utilização no processamento do amido e a vasta aplicabilidade na indústria de panificação, visando o crescimento da massa e a qualidade do pão, além de contribuir para retardar o seu processo de envelhecimento (Pereira et al., 2018; Wang et al., 2024); além do uso na fabricação de cerveja, processos fermentativos das indústrias farmacêuticas (Han et al., 2021; Wang et al., 2024).

Desde então, a busca por tecnologias que possam suprir demandas e reduzir custos nesse segmento é crescente, sendo as técnicas fermentativas algumas das mais utilizadas. A busca por substratos para a fermentação, que não comprometam outras cadeias produtivas é um grande desafio atual. Resíduos de agroindústrias podem gerar problemas ambientais tornando-se potenciais poluentes. Nesse sentido, estes resíduos podem se tornar matérias-primas para os processos fermentativos, pois além de reduzirem o impacto industrial, permitem a sua utilização como substratos principais dos métodos de produção de enzimas (Raina et al., 2022).

A fermentação em estado sólido (FES) apresenta-se como método mais tradicional e favorável para aproveitamento dos resíduos agroindustriais (Pandey et al., 2005), uma vez que é exigido em seu processo baixo volume de água; o crescimento do microrganismo é favorecido em condições mais próximas ao ambiente natural; além de maiores rendimentos e concentração mais alta do produto desejado (Meghavarnam & Janakiraman, 2017; Putri et al., 2020).

Os resíduos agroindustriais como, polpa de café, bagaço de cana, batata, farinhas de cereais, mandioca e outros, tem como principal característica uma estrutura porosa, e capacidade de fornecerem carbono e energia para o crescimento de microrganismos. Dentre estes, o resíduo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (casca, entrecasca e pontas) é um material constituído de 30 a 50% de amido, em base seca. Este polissacarídeo possibilita o crescimento de biocatalisadores seletivos ao utilizar a fermentação em estado sólido como método para produção de enzimas amilolíticas (Pandey et al. 2005).

O *Aspergillus niger* é uma espécie de fungo filamentososo que se destaca na FES. É amplamente utilizado para a produção de enzimas por ser considerado GRAS (*Generally Recognized as Safe* - reconhecido como de uso seguro), grau conferido pela *Food and Drug Administration* (FDA) devido à sua baixa toxicidade (Dini et al., 2014). O gênero *Aspergillus* é o de maior importância na bioconversão de resíduos, sendo capazes de excretar mais de 20 diferentes tipos de enzimas após inoculação em substratos (Seena et al., 2019a).

Apesar da FES ser uma técnica de baixo custo para produção de enzimas, é necessário que as enzimas apresentem alto grau de purificação para proporcionar tais atribuições ao produto final. Para obter tal resultado, técnicas cromatográficas são aplicadas, (Lenhoff, 2011; Gonçalves et al., 2016, Silva et al., 2019). Este tipo de método requer a utilização de colunas cromatográficas e o desenvolvimento de leitos fixos não tradicionais, como os criogéis que tem atraído a atenção em aplicações para purificação de enzimas devido à seletividade, elevada porosidade e capacidade de separação sob condições próximas às fisiológicas, causando menos danos aos compostos. (Chen et al., 2008; Haleem et al., 2024). Dentre as técnicas cromatográficas, a de troca iônica (CTI) é um método viável na extração e purificação de proteínas, visto a grande quantidade de cargas das proteínas, pois a técnica se baseia em uma competição dos íons de interesse pelos grupos que estão carregados na fase estacionária. É muito usada na purificação de proteínas, peptídeos e enzimas, e tem como princípio a separação da biomolécula retida na superfície da matriz porosa a partir da adsorção diferenciada, podendo haver a atração ou repulsão entre os constituintes da fase móvel (mix proteico/enzimático) e fase estacionária (matriz porosa) (Chen et al., 2008; Fidelis, 2011).

Sendo assim, neste trabalho, objetivou-se sintetizar uma coluna cromatográfica de troca iônica com grupo ativo disponibilizado pela arginina no intuito de purificar enzimas amilolíticas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Enzimas

A etimologia da palavra enzima, derivada de *enzymos*, é subdividida em duas partes, a primeira do grego medieval “en” em ou dentro e a segunda “zymos” levedura. Desde o século XIX são realizados estudos sobre a ação catalítica de enzimas e são referenciados o uso de processos que hoje são reconhecidos como enzimáticos (Tonolli et al., 2021).

Atualmente, o mercado global de enzimas industriais atingiu um valor estimado de US\$ 9,9 milhões de dólares em 2019 com perspectivas indicando um aumento de 7,1 % até 2027 (Zhang et al., 2020; Baptiste, 2020). Entretanto, no cenário brasileiro, apesar do vasto potencial do país para a produção de enzimas devido à abundância de matéria orgânica e diversidade biológica, a realidade é marcada predominantemente pela importação desses compostos (Kumar et al., 2021). Na busca de atender às crescentes demandas por novos biocatalisadores com propriedades únicas e especiais e substituição de 40 % das reações químicas que utilizam solventes tóxicos por reações enzimáticas, muitas alternativas estão sendo estudadas. E entre as enzimas produzidas por técnicas biotecnológicas, as que apresentam atividade aminolítica representam o grupo enzimático de grande aplicação industrial (Bruno et al., 2019).

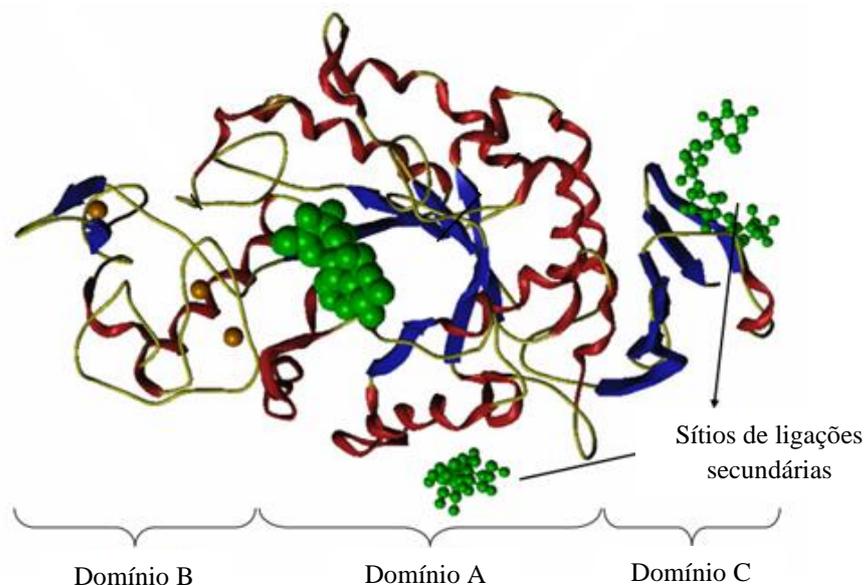
### 2.2. $\alpha$ -Amilase

A  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -glucano-4-glucanohidrolase, E.C. 3.2.1.1) fazem parte do grupo das endoenzimas carboidrases com atividade hidrolítica das ligações  $\alpha$ -1,4 em polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união do tipo  $\alpha$ -1,4 (Torres et al., 2012; Zhang et al., 2020). E desempenha papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo. As  $\alpha$ -amilases podem ser sintetizadas a partir das glândulas salivares, pâncreas humanos, pâncreas do rato, cevada malteada, algumas espécies do gênero *Aspergillus* (*oryzae*, *niger*), *Pseudomonas saccharophila*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus* (Zhang et al., 2020).

Dentre as diversas fontes amiláceas, as  $\alpha$ -amilases produzidas por fungos têm caráter ácido, com atividade em uma faixa de pH entre 4,0 e 7,0, com o ponto isoelétrico entre 4,0 e 5,0. Estudos indicam que essa característica ocorre devido a grande quantidade de resíduos de aminoácidos ácidos na superfície da proteína, principalmente aspartato e glutamato (Paul et al., 2021; Mesbah, 2022). Em relação a massa molecular, pode variar numa faixa de 10 a 210 kDa dependendo da sua origem. As  $\alpha$ -amilases de origem microbiana variam o peso molecular entre 28 e 69 kDa, e estão divididas entre

bacterianas e fúngicas, aquelas de origem bacteriana apresentam variações de 28 a 78 kDa, e as fúngicas; de 41 a 69 kDa (Cortez et al., 2017; Oliveira, 2020).

Autores como Friedberg (1983) e Canganella e colaboradores (1994) destacaram que, mesmo tendo diferentes origens, as fontes da enzima amilolítica podem apresentar homologia semelhante como sítios catalíticos e o sítio de ligação ao substrato. A Figura 1 apresenta a estrutura tridimensional das  $\alpha$ -amilases e seus 3 domínios principais (A, B e C).



**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura de  $\alpha$ -amilase e seus domínios.

Fonte: Adaptada de Mótyán et al., 2011.

O domínio catalítico A é o mais conservado em todas as famílias da  $\alpha$ -amilases. Ele consiste de um barril, denominado “TIM - Triosephosphate isomerase”, com oito fitas- $\beta$  paralelas arranjadas circundadas por 8  $\alpha$ -hélices numa estrutura em forma de barril. O TIM possui 4 regiões ativas na estrutura da  $\alpha$ -amilases, são elas: primeira região – resíduo de histidina na região C-terminal da terceira fita- $\beta$  que interage com o resíduo de glicose do substrato; segunda região – resíduo de ácido aspártico na quarta fita- $\beta$  que age como nucleófilo durante a catálise; terceira região – resíduo de ácido glutâmico na quinta fita- $\beta$  que age como doador/aceptor de prótons; e quarta região – resíduo de histidina e de ácido aspártico na sétima fita- $\beta$  que podem formar ligações de hidrogênio com o resíduo de glicose do substrato (Van Der Maarel et al., 2002). O domínio B forma grande parte da ligação com o substrato, dá flexibilidade à molécula e presume-se que seja importante para a especificidade de substrato observada entre diferentes  $\alpha$ -amilases (Janeček & Baláz, 1997). E por fim o domínio C que auxilia na estabilização do domínio catalítico e na ligação com o substrato (Macgregor, 1988).

### **2.3. Fermentação em estado sólido**

A fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semissólida aplica-se aos processos onde existe crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, em que a quantidade de líquido apresenta um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e metabolismo dos microrganismos, mas não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (Putri et al., 2020). O processo da FES ganhou destaque para ser aplicado na produção de enzimas por meio de resíduos agroindustriais, pois mesmo após o processo de extração, é gerado menos resíduo líquido quando comparado aos processos de fermentação submersos. Este processo gera maior interesse econômico para a agroindústria e para produtores da agricultura familiar, uma vez que os coprodutos gerados são utilizados como fonte principal para produção de enzimas (Putri et al., 2020).

Visando maior rendimento na FES, o *A. niger* são os fungos mais utilizados devido a sua característica filamentosa, visto que estes não se utilizam de água como fator principal para o seu desenvolvimento, necessitando apenas de umidade suficiente para o metabolismo e a manutenção do crescimento, possuindo a capacidade de se desenvolver em pH baixo, além de produzirem esporos (Farinas, 2015; Putri et al., 2020).

### **2.1. Resíduo de Mandioca**

A mandioca, denominada cientificamente como *Manihot esculenta* Crantz, é também conhecida no Brasil por aipim ou macaxeira. É um alimento rico em amido e é fonte alimentar para milhões de pessoas de países tropicais incluindo o Brasil. A Nigéria é o maior produtor mundial representando cerca de 18% da produção mundial, o Brasil ocupou a quinta posição em 2022 com uma produção de 17 milhões de toneladas (Shahbandeh, 2023; Knoema, 2024). Além de ser um alimento básico em muitos países, a mandioca é usada para a produção de etanol, medicamentos, produtos químicos, ração animal, dentre outros (Shahbandeh, 2023).

Levando em consideração as riquezas encontradas na mandioca e seu coproduto, cultura de raízes amiláceas que contribuiu com 12 % da produção mundial de amido, no ano de 2011, é possível justificar a utilização como substrato para produção de enzimas aminolíticas juntamente a microrganismos capazes de sintetizá-las, principalmente por fermentação em estado sólido (Odoch et al., 2020). Por este fato, os microrganismos que mais se adaptam à fermentação em estado sólido para síntese amilácea são as espécies do gênero *Aspergillus* devido a sua estabilidade e produção dessas enzimas em condições salinas e pH, variáveis de grande interesse industrial (Fujinami & Fujisawa, 2010).

### 2.1.1. *Aspergillus niger*

Espécies do gênero *Aspergillus* formam o grupo mais importante de microrganismos utilizados para produção de enzimas empregadas na indústria alimentícia. As colônias, geralmente, têm crescimento rápido, inicialmente são brancas e amarelas, passando para marrom ou para o negro, e são compostas por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídios (Kempka et al., 2017).

As espécies que compõem esse gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície sólida, no ar e na água, tanto em organismos vegetais, bem como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (Rodrigues et al., 2011).

Em função das condições do meio, essa espécie é capaz de produzir mais de 19 enzimas diferentes, tais como celulases, peroxidases, lactases, lacases e amilases (Rodrigues et al., 2011).



**Figura 2.** Imagem do fungo *Aspergillus niger* ampliado em 400 vezes.

Fonte: Igarashi & Kohiyama, 2011.

O uso do *A. niger* apresenta vantagens como facilidade de manipulação, especificidade para uso em fermentação em estado sólido, alta produtividade em baixa umidade, habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo, e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (Kempka et al., 2017).

### 2.2. *Técnicas cromatográficas para purificação de proteínas Cromatografia de troca-iônica*

Um sistema cromatográfico compreende duas fases, uma fase estacionária fixa e uma fase móvel. O princípio de separação se baseia na diferença de interação dos componentes da solução (fase móvel) com a fase estacionária, resultando em migrações diferenciais do composto, permitindo assim separá-los (Fidelis, 2011). É chamado de alimentação, o movimento da fase móvel pela fase

estacionária, que resulta na captura das moléculas, ou seja, é o processo na qual os componentes da fase móvel são adsorvidos à coluna (Silva & Collins, 2011).

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas para purificação de proteínas e dentre as técnicas de cromatografia líquida, pode-se destacar: cromatografia de afinidade (CA) que tem como princípio a interação específica por determinado grupo químico, cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) se dá pela união da matriz à molécula por grupos apolares e a cromatografia de troca-iônica (CTI) que se baseia na interação pelas diferentes cargas existentes (Silva et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Nascimento et al., 2019).

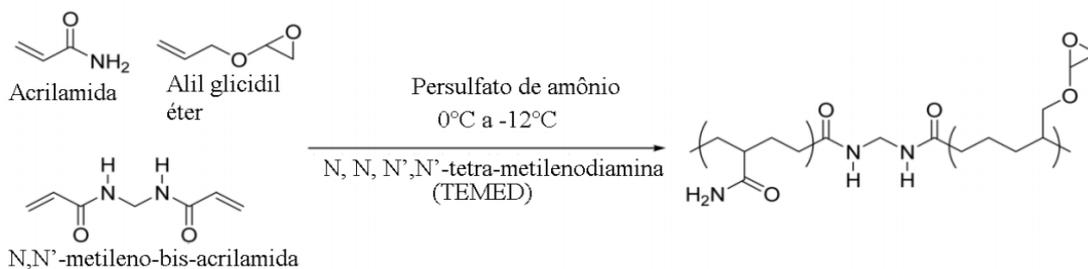
### 2.2.1. *Colunas cromatográficas: criogel*

Os criogéis são géis poliméricos formados em condições de congelamento moderado (temperatura entre -10°C e -20°C). Possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho que varia de 10 a 100 µm e se diferenciam das demais matrizes de separação por fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solução (Fontan et al., 2018).

Por conter uma estrutura de grandes poros interconectados e diâmetros diferentes que possibilitam baixa resistência ao escoamento, os monólitos têm se tornado uma tecnologia muito útil na área de biosseparação (Ertürk; Mattiasson, 2014), constituindo uma fase estacionária muito atrativa para cromatografia, principalmente, no processamento de grandes biomoléculas como as proteínas.

Estas colunas cromatográficas apresentaram grande potencial para reparar os desafios que limitam a aplicação das colunas convencionais aos métodos cromatográficos como, elevada área superficial gerando alta capacidade de saturação e resistência a matérias-primas altamente concentradas, fluidos viscosos ou particulados (Gonçalves et al., 2016; Machado et al., 2015), e entre os monólitos poliméricos utilizados como colunas cromatográficas o criogel de poliacrilamida apresenta destaque.

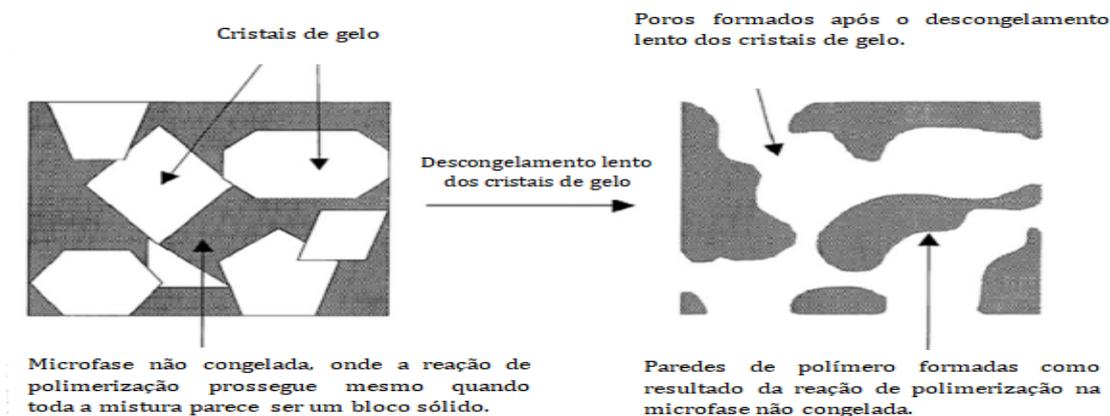
Estes monólitos poliméricos podem ser formados a partir de qualquer precursor de formação de gel (Plieva et al., 2004), como exemplo os géis de agarose, amido ou gelatina, meio onde a rede formada é mantida unida por ligações não-covalentes ditas como ligações fracas. O criogel é obtido da polimerização de moléculas de acrilamida (Aam) com o agente formador de ligações cruzadas, o N, N'-metileno-bis-acrilamida (BAam), adicionados ou não de outros monômeros, como o alil-glicidil éter (AGE) (Silva et al, 2019; Gun'ko et al., 2013), juntamente a agentes catalisadores de reação pela técnica da criogeleificação, ilustrado na Figura 3.



**Figura 3.** Reação de formação do criogel de poliacrilamida.

Fonte: Adaptado de Mallik e Hage (2006).

A reação química ocorre nesta microfase líquida não congelada, sendo que a polimerização das frações monoméricas (Aam + BAam) ocorrem em baixas temperaturas (Machado et al., 2015; Wang et al., 2014; Carvalho et al., 2014; Yun et al., 2014; Hixon et al., 2017). O diâmetro dos poros formados após o descongelamento gradual da coluna monolítica está diretamente relacionado com o rearranjo dos monômeros de Aam e BAam, em conjunto com a taxa de congelamento da matriz, como ilustrado na Figura 4, uma vez que taxas mais lentas podem resultar em poros maiores com interconectividade aumentada. Em contrapartida, as taxas de congelamento mais rápidas produzem criogéis mecanicamente mais fracos e com baixo nível de interconectividade (Hixon et al., 2017).

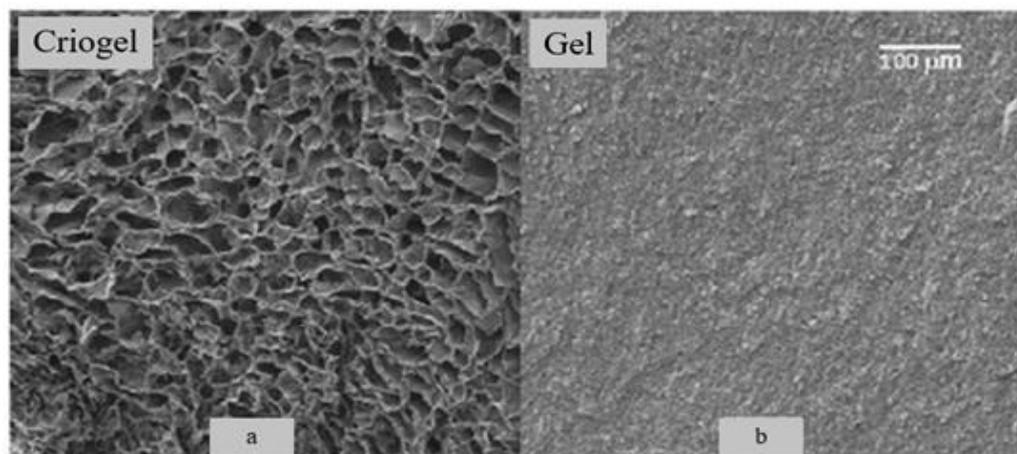


**Figura 4.** Representação esquemática da produção de criogéis.

Fonte: Adaptado de Erturk e Mattiasson (2014).

Plieva e colaboradores (2007) fizeram uma análise comparativa através da microscopia eletrônica de varredura de criogéis preparados a partir de uma mesma composição, mas submetidos a reação de polimerização em diferentes temperaturas (-20 e 20° C), e observaram que, enquanto a estrutura do material preparado à temperatura ambiente (20° C), é compacta e praticamente sem funcionalidade para cromatografia, o criogel (-20°C), apresenta grandes poros interconectados,

separados por paredes sólidas poliméricas, que permitem o fluxo de fluídos por sua estrutura, como pode ser observado na micrografia apresentada na Figura 5.



**Figura 5.** Imagem por microscopia eletrônica de varredura: (a) Criogel sintetizado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e (b) gel sintetizado a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Fonte: Plieva et al., 2007.

Os criogéis, sintetizados em condições de congelamento ( $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), são um tipo de polímeros altamente porosos e permite que soluções contendo fragmentos celulares e materiais particulados em geral possam ser escoados sem provocar sua obstrução (Silva et al., 2019), podendo ser utilizados em diversas aplicações (Tian et al., 2024), como imobilização e purificação de biomoléculas (Hixon et al., 2017; Gonçalves et al., 2016; Machado et al., 2015), e outros. Além de apresentam versatilidade, podendo ser produzidas na forma de coluna, discos ou membrana, e quando comparadas às colunas cromatográficas tradicionais, apresentam baixo custo (Silva et al., 2019).

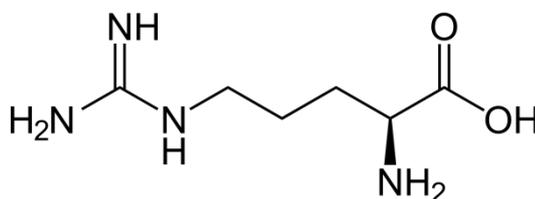
### ***2.3. Modificação da superfície dos criogéis***

Embora já exista uma ampla variedade de colunas monolíticas disponíveis, não há uma que seja uma solução universal, visto que, cada tipo de biomolécula e cada sistema apresentam suas peculiaridades. A variedade de combinações de monômeros e reagentes modificadores da superfície dos criogéis permitem que estes monólitos poliméricos se adéquem a quase todos os tipos de separação (Silva et al., 2023). Colunas cromatográficas sintetizadas com Aam e BAam podem conter monômeros alil-glicidil-eter (AGE) que disponibilizam grupos epóxi para ancorar os ligantes que darão a característica principal ao criogel, sendo de troca iônica, afinidade ou interação hidrofóbica (Paiva et al., 2019).

Esta modificação da superfície das colunas cromatográficas pode ser realizada a partir da funcionalização das mesmas a partir da introdução, além do grupo epóxi, de grupos reativos por meio

da circulação de soluções contendo agentes reticulantes, ou imobilização de grupos funcionais na superfície dos monólitos após a sua polimerização (Yao et al., 2007). Várias metodologias de funcionalização de superfície são apontadas como essenciais para imobilização e purificação de biomoléculas (Silva et al., 2023; Batista et al., 2018).

A identificação de uma imobilização inadequada pode levar a alterações na conformação da proteína/enzima ou a modificações estruturais que reduzem a sua bioatividade (Garifullina & Shen, 2019). Para reduzir esse efeito, são estudados protocolos para imobilização grupos funcionais ou regiões ativas presentes na superfície dos monólitos, uma vez que, os grupos funcionais presentes em aminoácidos conferem características específicas para o monólito, uma vez que, o radical presente neles pode ser de caráter catiônico ou aniônico (Mateo et al., 2007). O aminoácido arginina ( $\text{NH}^{+2}$ ) (Figura 6) é um desses que pode conferir um caráter aniônico ao criogel, sendo ele capaz de atrair o seu contra íon. Os demais grupos fornecidos pelo ácido glutâmico ( $\text{COO}^-$ ), pela Proteína A (especificidade a Imunoglobulina G - IgG), Concanavalina A (específico para glicoproteínas e polissacarídeos), Heparina (específico para fatores de coagulação, lipoproteínas, lípase, hormônios e fatores de crescimento) são utilizados para favorecer a interação do mesmo com a biomolécula alvo de acordo a sua especificidade (Santos et al., 2016). Essa interação tem como intuito reduzir o efeito de impedimento estérico, e, conseqüentemente, aumentar a capacidade de adsorção da biomolécula alvo.



**Figura 6.** Estrutura molecular da arginina.

A estrutura de um aminoácido dá informações acerca de como o pH pode afetá-lo, o que tem relação direta à sua forma de interação, assim a arginina pode ser utilizada como um trocador iônico, em decorrência da presença de funções orgânicas protonadas e/ou desprotonadas. O  $\text{pK}_R$  de um aminoácido define a desprotonação do grupo amina presente na cadeia R, no caso da arginina, quando esse valor se encontra abaixo de 9,04 ( $\text{NH}^{+2}$ ) está apto para troca aniônica. Já existem trabalhos utilizando a arginina como ligante, Baptista (2009) utilizou mini colunas de agarose funcionalizadas com arginina para purificação de plasmídeo.

Biazus e colaboradores (2010) estudaram a purificação de amilases de malte de milho (*Zea mays*), tendo como etapas de pré-purificação, a adsorção em leite expandido (ALE) usando as resinas de troca aniônica Amberlite IRA 410 e, como purificação, o fracionamento utilizando álcool etílico.

Os autores conseguiram recuperar cerca de 96 % da atividade inicial do malte indicando uma boa afinidade desta resina com as enzimas aminolíticas do malte. Há a necessidade de estudos similares a dos autores supracitados juntamente com a funcionalização das colunas, uma vez que foi demonstrado que a purificação de amilases por leito utilizando trocadores iônicos são eficientes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Purificar amilases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando novas colunas monolíticas macroporosas de troca aniônica funcionalizadas com arginina.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- 1) Desenvolver uma nova coluna monolítica macroporosa pelo processo de criogeificação e funcionalizar como um trocador de ânions, sendo a arginina o grupo ativo do mesmo;
- 2) Caracterizar o adsorvente produzido com relação a aspectos físicos, químicos e operacionais;
- 3) Caracterizar o resíduo de mandioca em relação a sua composição centesimal;
- 4) Estudar a ação do fungo *Aspergillus niger* na etapa de fermentação em estado sólido para obtenção da amilase;
- 5) Verificar o potencial do adsorvente produzido na purificação de amilases.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Local do experimento**

O experimento foi realizado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Itapetinga, no Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) e Laboratório de Resíduos Agroindustriais (LABRA).

### **4.2. Principais Reagentes**

Para realização deste projeto foram utilizados Acrilamida (Aam), bis-acrilamida (BAam), N,N,N',N'- tetrametilenodiamino (TEMED), persulfato de amônio (APS), alil-glicidil-eter (AGE) para a síntese dos criogéis e arginina para funcionalização dos criogéis. Os demais reagentes utilizados no experimento estão descritos ao longo da metodologia e todos possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS. O resíduo de mandioca, doado pela Empresa Boa Terra Chips, da cidade de Gandu-BA.

### **4.3. Síntese do Criogel**

Para a síntese dos criogéis, foram adaptadas as metodologias propostas por Gonçalves et al. (2016) e Mól et al. (2017). Foram formulados criogéis com 7 % de monômeros, onde 3,3 % (m/v) de acrilamida (Aam) e 1,2 % (m/v) de monômeros de bis-acrilamida (BAam) foram solubilizados em água deionizada com 2,5 % (m/v) de alil-glicidil-éter (AGE), e esta solução foi desgaseificada em banho de ultrassom por cerca de 5 minutos. A polimerização se deu a partir da adição dos catalisadores desta reação, 140  $\mu\text{L}$  de solução de persulfato de amônio (APS) na concentração de 0,5  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 91  $\mu\text{L}$  de N,N,N',N'-tetrametilenodiamino (TEMED) para cada 100 mL de solução de monômeros, sob condições de resfriamento. A solução foi homogeneizada e vertida em seringas de 10 mL e 1 cm de diâmetro e estas foram imersas em banho termostático com álcool à temperatura de  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Em seguida, os criogéis foram retirados do banho termostático com álcool, mantidos à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  por 4 h para o descongelamento lento e por fim secos em estufa a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Cada criogel foi submetido ao corte das extremidades defeituosas e realizada a lavagem dessas colunas monolíticas com água destilada em 4 ciclos com duração de 1 h cada lavagem. Em seguida as colunas foram secas em estufa de secagem e esterilização Tecnal (TE-393/1) para posteriores etapas.

### **4.4. Funcionalização dos criogéis para troca iônica**

O processo de funcionalização dos criogéis seguiu a metodologia descrita por Nascimento (2021) e Gonçalves et al. (2017), com adaptações. Foi preparada uma solução-tampão carbonato de sódio (TCS)  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  em pH 9,2 e solução-tampão fosfato de sódio (TFS)  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,2, para dissolução dos componentes utilizados na funcionalização. Utilizou-se seringas de 20 mL que eram então seladas, em cada percolação de solução, agitação orbital foi mantida a 20 rpm. A cada ciclo os criogéis eram suavemente comprimidos para retirada do excesso da solução da etapa anterior.

Primeiramente os criogéis foram imersos em 20 mL de álcool etílico absoluto por 2 h para abertura do anel epóxi. Feito isso, realizou-se uma lavagem com água destilada por 1 h, sendo posteriormente utilizada a solução TCS por também 1 h. Em seguida, os criogéis foram imersos em 20 mL de solução etilenodiamina  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  em TCS e mantidos por 14 h a temperatura ambiente ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Passado esse tempo realizou-se duas lavagens com água destilada, cada uma de 30 min, na qual, os criogéis eram deixados nas seringas em agitador orbital. Em seguida, 20 mL de solução TFS foi deixado em contato com o criogel por 1 h. Para retirada do excesso da solução anterior realizou-se duas lavagens de 30 min com água destilada. Então os criogéis foram mantidos em 20 mL de solução de arginina  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  em TFS por 17 h a temperatura ambiente de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Realizou-se uma lavagem de 1h com água destilada, sendo posteriormente passada uma solução de borohidreto de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em TCS por 1 h em temperatura ambiente de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , nessa etapa as seringas ficaram abertas, devido a formação de gás, e agitadas manualmente a cada 15 min. Por fim, duas lavagens de 30 min cada com água destilada foram realizadas para finalização do processo. Os criogéis foram secos em estufa a  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e assim obteve-se uma coluna adsorvente monolítica supermacroporosa de interação aniônica.

#### ***4.5. Caracterização estrutural e hidrodinâmica do leito monolítico***

##### ***4.5.1. Caracterização estrutural***

A caracterização tem por objetivo conhecer as propriedades das matrizes produzidas antes e após o processo de ativação e com isso, determinar a melhor aplicação das mesmas. Os parâmetros avaliados foram: Capacidade de inchamento e Grau de expansão; Ponto de Carga Zero; Porosidade Total e suas frações.

##### ***4.5.2. Capacidade de Inchamento e Grau de Expansão (ED)***

Capacidade de inchamento (S) do criogel foi determinada, primeiramente, por pesagem de cada coluna monolítica em balança analítica Mettler Toledo – ME204, e com posterior hidratação dos mesmos em béqueres contendo 50 mL de água ultrapura Arium® Mini à temperatura ambiente

de 25°C por 24 h para promover a hidratação das suas frações porosas. O valor de  $S$  foi calculado a partir da Equação 1 (Savina *et al.*, 2005).

$$S = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \quad (1)$$

Onde:  $m_s$  e  $m_d$  são as massas do criogel hidratado e desidratado (em g) e  $S$  expresso em  $g_{H_2O}.g_{de\ gel}^{-1}$ .

O grau de expansão (ED) foi calculado de acordo a equação (2) que relaciona o volume ( $v_2$ ) ocupado pela coluna monolítica, já hidratada, após imersão da mesma numa proveta contendo 30 mL de água ultrapura Arium® Mini.

$$ED = \frac{(v_2 - v_1)}{m_d} \quad (2)$$

Onde:  $v_1$  é o volume inicial da proveta graduada (mL),  $v_2$  é o volume identificado na proveta graduada após a colocação do criogel (mL) e  $m_d$  é a massa do criogel desidratado.

#### 4.5.3. *Análise de ponto de carga zero (PCZ)*

O PCZ é definido como o pH em que o criogel possui carga neutra. Com adaptações da metodologia proposta por (Mól *et al.*, 2019) o procedimento consistiu em condicionar 50 mg de criogel funcionalizado, em contato com 50 mL de soluções de cloreto de sódio ( $0,1\ mol.L^{-1}$ ) em diferentes valores de pH (1-11) sendo deixados sobre agitação orbital a 25 rpm durante 24 h. O pH de cada solução foi ajustado com solução de HCl ( $0,5\ mol.L^{-1}$ ) ou NaOH ( $0,5\ mol.L^{-1}$ ). Ao final de 24 h, o pH foi medido e construído o gráfico, do pH final versus pH inicial. O pH do PCZ corresponde à faixa onde o pH final se mantém constante independentemente do pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

#### 4.5.4. *Porosidade dos criogéis*

Para a determinação da porosidade, os criogéis, com massa inicial conhecida, foram acondicionados por sete dias em dessecador contendo solução de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar permanecesse em torno de 98% a temperatura ambiente (25 °C). Após sete dias as massas dos criogéis foram anotadas.

Os criogéis foram submersos em recipientes contendo cerca de 30 mL de água por 24 h, após isso as suas massas foram obtidas novamente. Os criogéis foram então delicadamente espremidos e secos com lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, sendo suas massas

novamente medidas. A fração de macroporos ( $\varphi_M$ ), com tamanho  $\geq 1\mu\text{m}$ , fração de meso e microporos ( $\varphi_m$ ), com tamanho  $< 1\mu\text{m}$ , fração de água ligada ( $\varphi_{wb}$ ), fração de polímero seco ( $\varphi_d$ ) e porosidade total ( $\varphi_T$ ) dos criogéis foram calculadas utilizando as Equações 3 a 7, respectivamente (Plieva et al. 2004a e 2004b).

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (3)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (4)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (5)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (6)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (7)$$

Onde:  $m_s$  é a massa do criogel hidratado (kg),  $m_d$  é a massa do criogel desidratado (kg),  $m_e$  é a massa do criogel espremido (kg) e  $m_{wb}$  é a massa do criogel com água de ligação (kg).

#### **4.1. Caracterização hidrodinâmica**

A caracterização ocorreu no equipamento AKTA Pure 25 (Figura 7) (GE Healthcare Life Sciences) com volume de coluna (VC) de 15,386 mL. Os pulsos de acetona 5 % ( $\text{m.v}^{-1}$ ) foram monitorados por um sistema conectado ao computador e controlado por meio do *Software Unicorn 7.2*. Os parâmetros hidrodinâmicos avaliados neste trabalho foram: Permeabilidade ao Escoamento; a Distribuição dos Tempos de Residência; e Altura Equivalente de Pratos Teóricos.

##### **4.1.1. Permeabilidade ao Escoamento**

Para o cálculo da permeabilidade ao escoamento foi utilizada a equação de Darcy (Paredes et al., 2004; Guiochon, 2007) (Equação 8), para um escoamento em meios porosos, onde o coeficiente angular da equação ajustada no gráfico de vazão versus pressão hidrostática sobre a coluna determinará a permeabilidade.

$$Q = \frac{AK_p}{\eta L} \Delta P \quad (8)$$

Sendo  $\Delta P$  a variação da pressão hidrostática sobre a coluna (Pa),  $\eta$  é a viscosidade cinemática da fase móvel ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $Q$  é a vazão volumétrica ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $A$  é a área transversal da coluna ( $\text{m}^2$ ),  $L$  é a altura do leito (m) e  $K_w$  é a permeabilidade ao escoamento do leito ( $\text{m}^2$ ).

#### 4.1.2. *Distribuição dos tempos de residência (DTR)*

A determinação das curvas de distribuição dos tempos de residência foi realizada empregando o método adaptado de Yao et al. (2006a e 2006b). Para tal, emprega-se a Equação (9), e além do tempo de retenção, foram calculados também as variâncias ( $\sigma^2$ ) ou os segundos momentos estatísticos ( $M_2$ ) de cada pulso, segundo Furusawa et al. (1976).

$$M_2 = \sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n A_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad (9)$$

Onde:  $M_2$  é o segundo momento estatístico ( $\text{s}^2$ ) corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento,  $\sigma^2$  é a variância do pulso observado ( $\text{s}^2$ ),  $t_i$  é o tempo (s) em que a  $i$ -ésima observação foi registrada,  $\Delta t_i$  é o intervalo de tempo (s) entre a  $i$ -ésima e a  $(i-1)$ -ésima observação (para  $i \geq 2$ ),  $A_i$  é a absorbância registrada no tempo  $t_i$  e  $t_R$  é o tempo de retenção do pulso observado (s).

Os gráficos das curvas de *DTR* foram plotados na forma normalizada de acordo com a Equação 10 (Zabka et al., 2006).

$$DTR = \frac{C(t)}{\int_0^\infty C(t) dt} = \frac{Abs(t)}{\int_0^\infty Abs(t) dt} \quad (10)$$

Onde: *DTR* é a função de distribuição de tempo de residência normalizada ( $\text{s}^{-1}$ ) e *Abs* é a absorbância registrada em função do tempo.

#### 4.1.3. *Altura equivalente de pratos teóricos (AEPT)*

Os valores da AEPT foram calculados conforme a Equação 11:

$$AEPT = L \frac{\sigma_t^2}{t_R^2} \quad (11)$$

Onde:  $L$  é a altura do leito (m),  $t_R^2$  é o tempo de retenção do pulso ( $\text{s}^2$ ) e  $\sigma^2$  é a sua variância ( $\text{s}^2$ ).

### 4.2. *Preparo do substrato*

O resíduo de mandioca, doado pela Empresa Boa Terra Chips, da cidade de Gandu – BA, foi lavado, higienizado, seco em estufa com circulação de ar a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  (SL 102; Solab). Após a retirada

parcial da umidade, o resíduo foi triturado em moinho de facas tipo Willey (EDB-5; DeLeo, POA) para a obtenção de partículas com 2 mm. Por fim, o resíduo em pó foi caracterizado com base na sua composição centesimal e armazenado em sacos de polietileno de baixa densidade até o momento de serem utilizados na etapa de fermentação em estado sólido.

### **4.3. Caracterização química e físico do farelo do resíduo de mandioca**

#### **4.3.1. Análise de umidade, cinzas e proteínas do farelo do resíduo de mandioca**

Os seguintes métodos foram realizados conforme descrito pela Association of Official Analytical Chemists (Aoac, 2005): teor de umidade (n° 925.09) em estufa a 105 °C até peso constante; conteúdo de cinzas (n° 923.03) em mufla a 550 °C; proteína (n° 920.87) por Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de 6,25.

#### **4.3.2. Teor de amido total no farelo do resíduo de mandioca**

O teor de amido foi quantificado de acordo com o método de antrona (Moraes e Chaves, 1988) com modificações.

A amostra do farelo do resíduo de mandioca foi embrulhada em papel de filtro e imersas em solução de hexano, permanecendo por 72 h sob refrigeração à 8 °C para desengordurar. Pesou-se 0,5 g da amostra desengordurada diretamente em tubo de ensaio e adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,50 mol.L<sup>-1</sup>. A mistura foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 1 h, agitando o tubo em agitador Vórtex Mixer (Labnet International, Inc). Em seguida, transferiu-se o conteúdo do tubo para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água ultrapura Arium® Mini. Foram realizadas curvas de calibração para determinar a concentração de solução de amido necessária para realizar a leitura espectrofotométrica. Com auxílio de uma pipeta automática, retirou-se 100 µL, 200 µL e 300 µL da solução contida no balão para tubo de ensaio adicionou-se 900 µL, 800 µL, 700 µL de água ultrapura Arium® Mini, respectivamente, e 2000 µL de solução antrona e agitou-se em Vórtex Mixer (Labnet International, Inc). Os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C por 3 minutos, retirados do banho e esfriados na temperatura ambiente 25 °C. Foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (KASVI, modelo K37-VIS) a 620 nm. Preparou-se um branco com 1 mL de água destilada e 2000 µL de antrona. Os valores de absorbância foram correlacionados com a equação obtida da curva padrão. O procedimento foi realizado em triplicata. O teor de amido total foi obtido por meio da Equação 12.

$$\text{Amido (\%)} = \frac{(A * F * 100 * 0,9)}{P} \quad (12)$$

Onde: *A* refere-se a absorvância da amostra, *F* ao fator de correção da curva, *P* a massa da amostra da alíquota em microgramas (µg) e 0,9 como o fator de correção de glucose para amido.

#### 4.3.3. *Teor de amilose aparente e amilopectina do farelo do resíduo de mandioca*

O conteúdo de amilose do farelo do resíduo de mandioca foi determinado por espectrometria de acordo com o método colorimétrico do iodo simplificado proposto por Martinez e Cuevas (1989) com modificações, que se baseia na transmissão da luz através de um complexo colorido que a amilose forma ao reagir com iodo, e o teor de amilopectina foi encontrado por diferença entre a concentração de amido e amilose.

Pesou-se 0,01 g da amostra desengordurada em tubos de ensaio com tampa. Adicionou-se 1 mL de etanol 95%, vagarosamente com posterior homogeneização. A mistura foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 10 min, transcorrido esse tempo, 9 mL de hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>, foi adicionado e a amostra foi resfriada por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidos para balões de 100 ml e os volumes foram completados com água ultrapura Arium® Mini. Utilizou-se 200 µL da solução da farinha do resíduo de mandioca, 40 µL de ácido acético (1 mol.L<sup>-1</sup>), seguido de agitação. Completou-se com 80 µL de solução de iodo e 4780 µL de água ultrapura Arium® Mini. A suspensão foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos. A leitura das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (KASVI, modelo K37-VIS), no comprimento de intervalo de luz visível a 610 nm. Os resultados obtidos foram a média de duas repetições em triplicata. O teor de amilose foi obtido de acordo com a Equação 13.

$$\text{Amilose (\%)} = \frac{A * 100}{C_1} \quad (13)$$

Onde: *A* é a concentração de amilose na solução (µg.µL<sup>-1</sup>), obtida por meio da curva padrão e *C*<sub>1</sub> é a concentração de amido solução (µg.µL<sup>-1</sup>).

#### 4.4. *Condições de cultivo do microrganismo*

O fungo utilizado para este trabalho foi o *Aspergillus niger* ATCC 10535 cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ), sendo esta cepa isolada, caracterizada e depositada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS. Rio de Janeiro, RJ),

sob o registro de número: 40018 e lote: 068840018. Este fungo vem sendo renovado periodicamente e preservado em sílica, mantido sob refrigeração ( $2 \pm 1$  °C). O fungo foi inoculado em meio Potato Dextrose Agar (PDA) e incubado em estufa bacteriológica (SL 222; Solab) a 30 °C por 7 dias. Após o período de 7 dias, a cultura de esporos foi extraída com uma solução 0,01% v.v<sup>-1</sup> de Tween 80 (Vetec, Brasil) e raspada com auxílio de pérolas de vidro com movimentos circulares, ambos previamente esterilizados em autoclave vertical a 121 °C por 15 min. Foi coletada uma alíquota de 0,1 mL da solução de esporos obtida e diluída para a quantificação dos esporos em microscópio binocular (L1000; Bioval) utilizando câmara de Neubauer.

#### 4.5. *Fermentação em estado sólido (FES)*

A FES foi conduzida em erlenmeyers de 250 mL contendo 10 gramas do resíduo de mandioca e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de  $10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> de meio sólido (Tung et al., 2004). Com o objetivo de observar a melhor condição para a produção de  $\alpha$ -amilase, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para variáveis independentes: tempo de fermentação (TF) e pH da fermentação conforme apresentado na Tabela 1. Foram realizados 20 ensaios, sendo 4 fatoriais (combinações entre níveis -1 e +1), 4 axiais, ambos com 2 repetições e 1 central com 4 repetições.

**Tabela 1.** Níveis e variáveis estudadas para avaliação da produção de amilase.

Variáveis	Níveis				
	-1,414	-1	0	1	1,414
TF (horas) (X1)	39,5	42	48	54	56,5
pH (X2)	4,6	5	6	7	7,4

Todos os biorreatores foram incubados a 30 °C em estufa bacteriológica. Para favorecer o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo cada biorreator possuiu 60 % de umidade total.

#### 4.6. *Preparo do extrato enzimático*

O extrato enzimático de cada tratamento foi preparado com a adição de 20 mL da solução tampão referente a cada pH (X2) nos respectivos biorreatores, e foram mantidos sob condições de agitação de 200 rpm em shaker de bancada QUIMIS-Q816M20 por 30 minutos a 30 °C. A remoção dos sólidos suspensos foi realizada por prensagem mecânica e o líquido homogêneo centrifugado a 2338 G por 15 min a 4 °C (Centrifuga Refrigeradora SPLabor) (PURWANTO, 2016).

#### 4.7. *Purificação da $\alpha$ -amilase obtida por FES em leito monolítico*

O processo de purificação da solução de alimentação foi realizado em triplicata, utilizando-se um equipamento AKTA Pure 25 Figura 7 (GE Healthcare Life Sciences) com uma coluna montada com 2 peças monolíticas de criogéis funcionalizados, totalizando um volume de leito de 15,386 mL. O monitoramento da fase móvel foi realizado utilizando-se um detector com comprimento de onda fixo em 280 nm, com o sistema conectado a um computador e controlado por meio do *Software Unicorn 7.2*.



**Figura 7.** Cromatógrafo Akta Pure para purificação de proteínas.

Para a hidratação, lavagem e equilíbrio prévio da coluna, utilizou-se água destilada e tampão fosfato de sódio (TFS)  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,0, com 20 volumes de coluna (VC) cada, a uma vazão de  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$  (utilizada em todo o processo). Após isso foi realizada uma etapa para equilibrar a coluna percolando 4 VC de tampão TFS ( $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0). Dessa forma, teve início o processo de alimentação, percolados 5 VC, da solução de extrato bruto, até a formação e estabilização da curva de ruptura. Logo após a coluna foi lavada com 4 volumes de tampão fosfato de sódio para retirada dos componentes não adsorvidos pela coluna. Para a etapa de eluição, utilizou-se uma solução de NaCl ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) preparada em TFS ( $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em pH 7,0, passando-se 4 VC. Posteriormente a coluna foi reequilibrada e lavada com quatro volumes do tampão TFS ( $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em pH 7,0 e água destilada, respectivamente.

Os picos de eluição foram coletados manualmente. Submetidos ao processo de diálise para retirada do NaCl. Foram utilizadas novamente bolsas de diálise (D0530, Sigma), previamente ativadas (código D0530, Sigma), com aproximadamente 6 cm de comprimento.

#### **4.8. Purificação da $\alpha$ -amilase obtida por FES em batelada**

Para o processo de purificação em batelada utilizou-se uma curva de calibração com albumina de soro bovino (BSA - pureza  $\geq 98\%$ ), para quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Nos ensaios, 4 mL da solução de extrato bruto foram deixados em contato com aproximadamente 25 mg de criogel seco por 12 h (*overnight*) à temperatura ambiente, sob rotação orbital de 20 rpm. Após isso, o extrato que estava em contato com o criogel foi retirado e foram realizadas duas lavagens com 4 mL da solução tampão TFS ( $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em pH 7,0 para retirada da  $\alpha$ -amilase não adsorvida na superfície do trocador produzido, o sobrenadante foi reservado. A eluição da  $\alpha$ -amilase foi realizada utilizando 2 mL de uma solução de NaCl ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em TFS  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7,0 que permaneceu em contato com o criogel por 4 h. Decorrido esse período, a solução eluída foi filtrada e submetida a diálise para retirada do excesso de NaCl. Utilizou-se bolsas de diálise (D0530, Sigma) com aproximadamente 6 cm de comprimento. Foram realizadas 5 lavagens de 200 mL de tampão TFS em pH 7,0, trocadas a cada 2 h.

Cada solução do processo de purificação recebeu uma identificação, sendo a solução antes do contato do criogel de nominado como “extrato bruto”, a solução excludente após a percolação sob o criogel de “sobrenadante” e a solução dialisada após o processo da dessorção da  $\alpha$ -amilase ‘eluição’. Determinou-se para cada solução obtida o teor de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) e atividade enzimática (Okolo et al., 1995).

#### **4.9. Determinação da atividade enzimática**

A atividade aminolítica foi determinada de acordo metodologia proposta por Okolo et al. (1995), com adaptações. Utilizou-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de amido solúvel na concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em tampão acetato (pH 5,6), 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e 400  $\mu\text{L}$  de água destilada, totalizando 1000  $\mu\text{L}$  de solução para atividade enzimática. O branco continha 1000  $\mu\text{L}$  de água destilada. Essa mistura foi submetida à incubação em temperatura de  $50^\circ\text{C}$  por 30 minutos para hidrólise e adicionados 2 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), e essa mistura foi submetida a temperatura de  $100^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), utilizando a solução de glicose como padrão conforme Miller (1959), no comprimento de onda de 540 nm utilizando espectrofotômetro (KASVI, modelo K37-VIS). Para evitar valores superestimados de atividade enzimática, foi realizada a leitura das amostras dos extratos brutos, sobrenadantes e eluídos, porém sem a etapa de hidrólise. Os resultados para açúcar redutor total ( $\text{AR}_T$ ) com a etapa de hidrólise e sem a etapa de hidrólise para cada tratamento foram subtraídos, gerando valores para  $\Delta\text{AR}_T$ . Segundo GHOSE (1987), uma unidade

de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por mL de extrato por minuto. A partir da Equação 14 calculou-se a atividade enzimática, a qual foi expressa em U.mL<sup>-1</sup>.

$$\frac{U}{mL} = \frac{AR_T * V_T}{0,18 * V_C * T_H} \quad (14)$$

Onde:  $AR_T$ : Açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg.mL<sup>-1</sup>);  $V_T$ : Volume total utilizado na hidrólise (mL);  $V_C$ : Volume do extrato enzimático utilizado na hidrólise (mL);  $T_H$  Tempo de hidrólise (min); 0,18 : massa de 1 μmol de glicose.

#### 4.9.1. *Atividade específica e Fator de purificação*

Para verificar a eficiência do processo de purificação foi realizado o cálculo do fator de purificação (Equação 16), para isso, utilizou-se o cálculo da atividade específica (Equação 15). O fator de purificação compara a atividade específica da solução purificada (sobrenadante e eluído) e a atividade específica da solução bruta (extrato bruto).

$$\text{Atividade específica} \left( \frac{U}{mg} \right) = \frac{ATV_{\text{enzimático}}}{P_T} \quad (15)$$

$$\text{Fator de Purificação} = \frac{AE_{\text{Eluído}}}{AE_{\text{Extrato}}} \quad (16)$$

Onde:  $ATV_{\text{Enzimática}}$ : atividade enzimática,  $P_T$ : proteína total,  $AE_{\text{Eluído}}$ : atividade específica do eluído e a  $AE_{\text{Extrato}}$ : atividade específica do extrato.

#### 4.9.2. *Teor de proteína no extrato enzimático*

A quantificação de proteínas totais no extrato enzimático foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (Bradford, 1976) utilizando espectrofotômetro (KASVI, modelo K37-VIS), por meio da leitura de absorbância no comprimento de onda de 595 nm, usando Albumina de Soro Bovino (BSA) como proteína padrão, em concentrações de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> a 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

### **4.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições desnaturante (SDS – PAGE)**

A análise de eletroforese em gel desnaturante foi realizada seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970) com adaptações. Primeiramente foi produzido um gel de empilhamento na concentração de 4 % (v.v<sup>-1</sup>) e um gel de separação na concentração de 12 % (v.v<sup>-1</sup>).

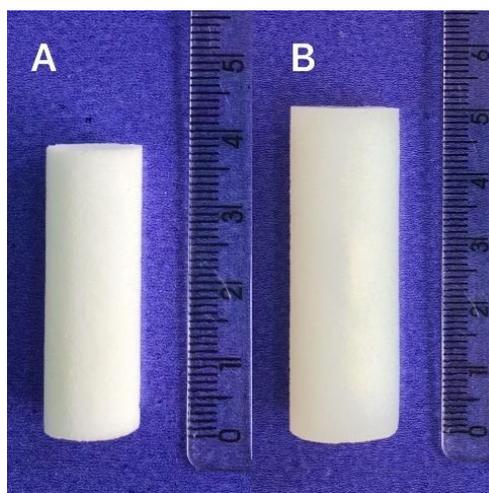
O tratamento que obteve comportamento mais adequado para produção de α-amilase após o processo de FES utilizando o DCCR foi submetido a eletroforese. Os marcadores moleculares foram BSA, lipase e lisozima, na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Para a desnaturação 60 μL das amostras foram

vertidas em tubos eppendorf e diluídas em 40  $\mu\text{L}$  da solução tampão desnaturante e submetidas à temperatura de 100 °C por 3 minutos. Alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  da amostra desnaturada foi colocada em cada poço do gel e a corrida realizada a uma tensão constante de 120 V, após finalização da corrida o gel foi mantido em contato em solução fixadora, 10 % (v.v<sup>-1</sup>) de metanol e 5 % (v.v<sup>-1</sup>) de ácido acético) por 2 h. Feito isso, foi realizada a etapa de coloração do gel usando Coomassie Blue G-250, permanecendo em contato por 24 h, logo após, foram realizadas lavagens com água destilada. O gel foi deixado em contato com a solução descorante, até obtenção de um gel transparente, sempre fazendo a troca da solução quando necessário.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Síntese do criogel

Com base na Figura 8, observou-se formação de uma estrutura monolítica de formato cilíndrico, conforme relatado por Silva et al., (2019) e Nascimento et al., 2019. De maneira abrangente, a matriz porosa do criogel de poliacrilamida permitiu uma expansão de aproximadamente 1 cm em relação à sua altura quando hidratado (Figura A).



**Figura 8.** Imagem do criogel controle desidratado (A) e hidratado (B).

Como evidenciado acima, destaca-se, também, a robustez e consistência do material desenvolvido. Vale destacar que uma matriz porosa se torna relevante, uma vez que a expansão do material durante o uso confere a capacidade de absorção de água pelos poros existentes. Além disso, a uniformidade da estrutura monolítica sugere um controle efetivo da pressão quando o a matriz está em uso.

### 5.2. Caracterização estrutural dos criogéis controle e funcionalizado

Os valores para caracterização dos criogéis controle e funcionalizado com arginina, incluindo fração de macroporos ( $\varphi_M$ ), fração de meso e microporos ( $\varphi_m$ ), fração de água ligada ( $\varphi_{wb}$ ), fração de polímero seco ( $\varphi_d$ ) e porosidade total ( $\varphi_T$ ), capacidade de inchamento (S) e grau de expansão (ED), estão expressos na Tabela 2. Para todos os parâmetros investigados, nenhum deles apresentou diferença significativa por meio do teste t a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) em ambos.

**Tabela 2.** Resultados da caracterização estrutural das matrizes produzidas.

Parâmetros	Controle	Funcionalizado (arginina)
Fração macroporosa (%)	0,60 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,03 <sup>a</sup>
Fração meso/microporos (%)	0,33 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>
Fração água de ligação (%)	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>
Fração de polímero seco (%)	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>
Porosidade total (%)	0,93 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,02 <sup>a</sup>
S (kg.kg <sup>-1</sup> )	20,54 ± 1,14 <sup>a</sup>	20,36 ± 0,71 <sup>a</sup>
ED (L.kg <sup>-1</sup> )	21,66 ± 1,18 <sup>a</sup>	21,36 ± 1,53 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

É possível observar que a ligeira variação entre as duas amostras para as frações monoméricas tem provável influência dos grupos amina disponibilizados pela arginina, resultando em uma redistribuição de poros após o tratamento.

Neste caso, as alterações sutis nos parâmetros estudados no criogel, não impactou negativamente para a aplicação específica da coluna. Isso sugere que o criogel funcionalizado com arginina para aplicação não compromete suas propriedades fundamentais.

Os valores encontrados para S e ED são próximos, tais parâmetros estão correlacionados, ou seja, impacta na maleabilidade das matrizes após sua hidratação, o que tem relação com a resistência mecânica da matriz (Gonçalves et al., 2016), pois após o inchamento ele se torna mais maleável e provavelmente menos resistente a pressões antes de se deformarem (Carvalho et al., 2014).

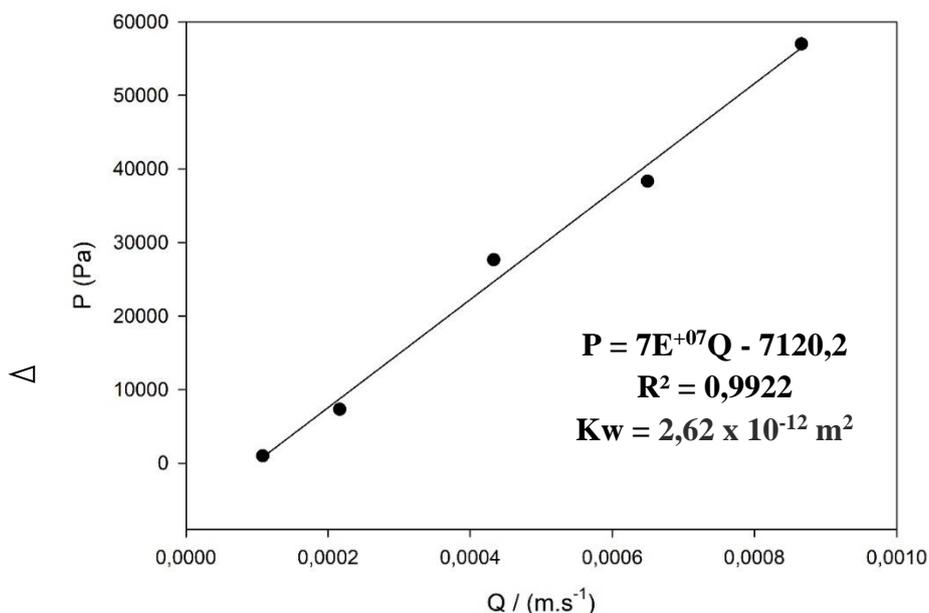
Esses resultados não apresentam semelhança com os obtidos no trabalho realizado por Nascimento et al. (2019), que sintetizou criogéis com a mesma concentração de monômeros, 7 % (m.v<sup>-1</sup>), porém sem a inserção de grupos radicais epóxi, disponibilizados pelo alil glicidil éter (AGE), encontrando valores de 12,37 kg.kg<sup>-1</sup> para o criogel trocador iônico (DMAEA-Q). Os valores superiores obtidos neste estudo, podem ser justificados devido o AGE ser é um componente altamente reativo com alta densidade de elétrons capaz de promover a ligações de hidrogênio, se ligando mais facilmente a água disponível no meio, aumentando conseqüentemente a capacidade de inchamento do criogel. Gonçalves e colaboradores (2016), ao estudarem criogéis também com 7 % (m.v<sup>-1</sup>) de monômeros e testarem diferentes metodologias de imobilização, verificaram o menor valor para capacidade de inchamento de 16,41 kg.kg<sup>-1</sup> ao utilizarem método de imobilização. Entretanto, para as matrizes funcionalizadas pelo método do glutaraldeído o valor obtido (19,46 kg.kg<sup>-1</sup>) foi semelhante ao deste estudo. Esse valor para o método do glutaraldeído pode ser explicado pela redução da mobilidade do criogel após inserção dos braços espaçadores disponibilizados pelo

glutaraldeído. O grau de expansão é um parâmetro importante pois relaciona a massa do criogel seco quando armazenado e o volume que ocupa quando hidratado e em condições operacionais. Os resultados obtidos indicaram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e funcionalizado. Isso sugere que ambos os grupos apresentam características relevantes para aplicação em processos cromatográficos, uma vez que a sua natureza macroporosa justifica a sua capacidade de ligar-se aos componentes que percolam o leite.

Os dados relacionados à porosidade e suas frações constituintes reafirmam a principal característica do criogel pela qual sua utilização se justifica, a sua natureza macroporosa. Os resultados observados em relação à porosidade total em torno de 92%, sendo a fração macroporosa superior a 60 % e microporosa de 32 % o que deixa claro a predominância de macroporos. Os valores obtidos foram encontrados, também, por Nascimento et al. (2019), Porfírio et al. (2024) e Mól (2017). Tal característica tem destaque no uso dessas matrizes para purificação de soluções mais concentradas ou de natureza viscosa e até mesmo que contenham materiais particulados.

### **5.1. Caracterização hidrodinâmica do monólito: Permeabilidade ao Escoamento; a Distribuição dos Tempos de Residência; e Altura Equivalente de Pratos Teóricos.**

Os dados experimentais relativos à queda de pressão hidrostática em função da velocidade superficial de escoamento estão apresentados na Figura 9.

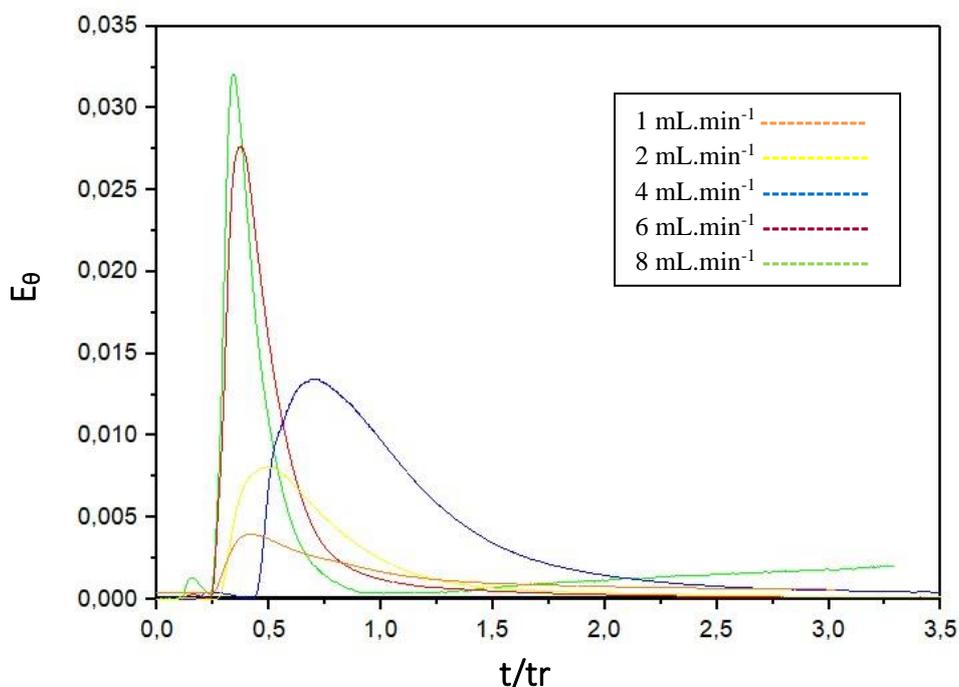


**Figura 9.** Dados experimentais referentes a variação de pressão ( $\Delta P$ ) em função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel no leito de troca aniônica.

O processo de transferência de massa em monólitos é dominado pelo mecanismo convectivo devido a influência do tamanho dos poros, pois favorece o escoamento dos fluidos (Pleiva et al., 2004b), e a permeabilidade ao escoamento está relacionada com a resistência ao fluxo através da coluna do monólito. Monólitos como o criogel são formados por poros interconectados de diferentes tamanhos, e quanto maior a porosidade e os tamanhos destes, mais facilmente ocorrerá a difusão das moléculas sob a matriz monolítica e melhor será sua eficiência como matriz para processos de purificação.

A permeabilidade ao escoamento calculada foi de  $2,62 \times 10^{-12} \text{ m}^2$ . Valores próximos foram encontrados por Neves et al. 2020 que obtiveram  $K_w$  igual a  $2,51 \times 10^{-13} \text{ m}^2$  ao trabalharem com criogéis de afinidade e Porfirio et al. 2024 ao estudarem criogéis IMAC verificaram um valor de  $1,69 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ .

Os resultados encontrados indicam que o monólito sintetizado apresentou baixa resistência ao fluxo, devido a maior fração de macroporos presentes em sua estrutura, como pode ser comprovado na Tabela 2. A baixa resistência ao escoamento permite que as matrizes supermacroporosas possam ser utilizadas em processos cromatográficos, suportando altas vazões, sem que elevadas pressões sejam alcançadas, o que é desejável para as técnicas cromatográficas (Porfirio et al., 2024; Neves et al., 2020). A distribuição dos tempos de residência (DTR) para pulsos de acetona em diferentes velocidades de escoamento da fase móvel são apresentadas na Figura 10.



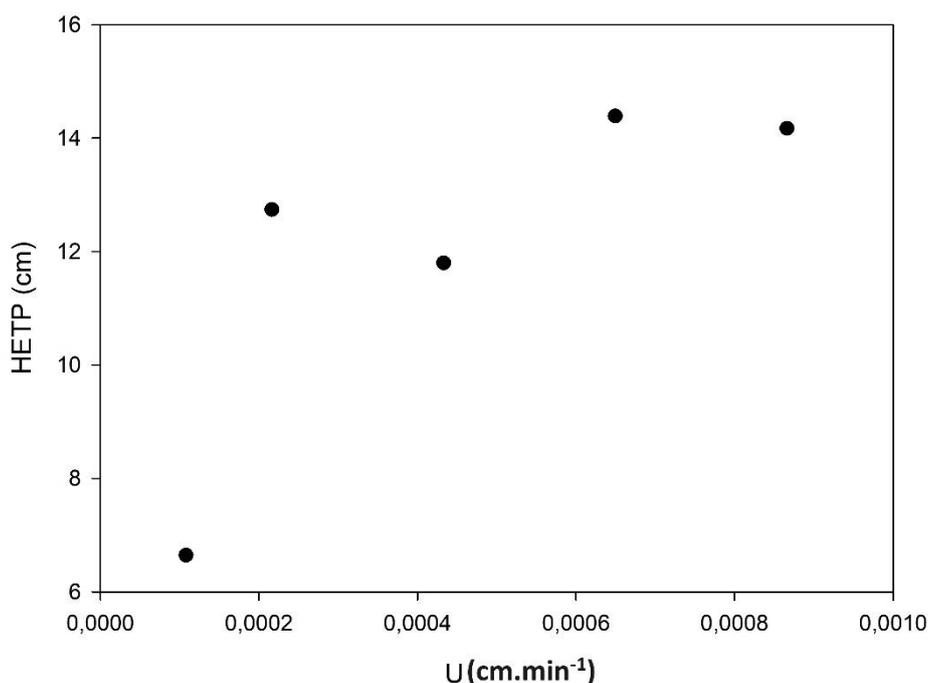
**Figura 10.** Distribuição dos tempos de residência para pulsos de acetona em diferentes velocidades superficiais de escoamento no leito monolítico produzido.

Ao analisar os perfis das curvas, observa-se uma uniformidade nos picos nas vazões 6 e 8 mL.min<sup>-1</sup>. Essa uniformidade é atribuída ao grau de mistura no escoamento através do leito monolítico.

O contrário do que se espera numa distribuição dos tempos de residência, onde geralmente se espera maior a largura da base do pico em menor vazão, neste caso, ocorreu o oposto. Mostrou-se que quanto maior a vazão maior a largura do pico, esse fato pode ser explicado pela distribuição interna dos poros da matriz, favorecendo o escoamento laminar sob esses poros.

De acordo com Yao et al. (2006a), a assimetria nas curvas de DTR com caudas estendidas está diretamente relacionada a uma estrutura porosa não homogênea ou à falta de uniformidade na distribuição dos poros que são formados no criogel durante o processo de produção, acarretando uma mistura e dispersão intensas dentro da coluna.

Na Figura 11 são apresentados os resultados obtidos para o AEPT em função da velocidade superficial de escoamento.

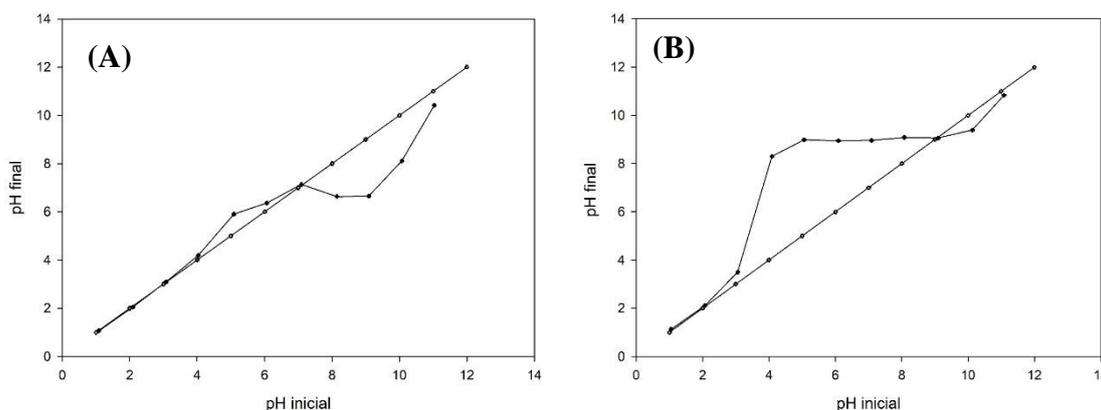


**Figura 11.** Altura equivalente dos pratos teóricos da coluna de criogel produzida em função da velocidade superficial de escoamento, para pulsos de acetona.

Os valores obtidos neste trabalho de altura equivalente a um prato teórico (AEPT) estão na faixa de 6,5 a 14,2 cm. Verificou-se que a AEPT da coluna produzida variou em função da velocidade de escoamento da fase móvel. Tais valores indicam que a velocidade de escoamento da fase móvel exerce um efeito relevante sobre a AEPT, com dispersão, contribuindo para baixa eficiência da coluna e conseqüentemente baixos rendimentos.

## 5.2. Análise do ponto de carga zero

O ponto de carga zero (PCZ) é o parâmetro para analisar o comportamento dos sítios ativos na superfície do criogel. Caso a matriz esteja desprotonada, ou seja, valor de pH acima do PCZ, o criogel está apto para adsorver compostos carregados positivamente, enquanto valores de pH abaixo do PCZ está protonado favorecendo a adsorção aniônica como foi mencionado por Mól et al. (2019). A figura 12 exibe o comportamento do criogel controle (Figura A) e funcionalizado (Figura B) em uma faixa de pH de 1,0 a 12,0.



**Figura 12.** Análise do Ponto de carga zero para o criogel produzido. (A) Controle; (B) Funcionalizado.

A alteração observada para o criogel controle é caracterizada pela ausência de grupos imobilizados em sua superfície, observando um valor para pH de 7,04. O pH que representa o momento tamponante para o criogel funcionalizado (B) foi o pH 9,02 aproximadamente. Ao imobilizar a arginina, o caráter aniônico prevalece devido ao surgimento de grupamentos amina disponibilizados por aminoácidos.

O processo de funcionalização do criogel produzido foi realizado em pH 7,0 por meio da imobilização da arginina à sua superfície, trazendo um caráter aniônico à matriz produzida. Com isso, ocorreu a disponibilização do grupo amina ( $\text{NH}^{+2}$ ) responsável pela alteração do pH do criogel produzido, além de atuar no processo adsortivo.

## 5.3. Composição centesimal do resíduo de mandioca

Os parâmetros avaliados do farelo do resíduo de mandioca encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composição físico-química do farelo do resíduo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).

Parâmetros Avaliados	Farelo do resíduo de mandioca
Amilose (%)	13,70±0,15
Amilopectina (%)	53,31±0,15
Amido total* (%)	67,01±0,15
Umidade* (%)	8,76 ±1,31
Cinzas* (%)	3,25±0,09
Proteína* (%)	5,88±0,04

\*Resultados expressos em base seca.

O parâmetro importante a ser observado é o teor de amilose presente na fonte de amido. O alto teor de amilose auxilia diretamente na síntese enzimática já que as enzimas aminolíticas hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,4 presentes na cadeia linear da amilose e nas extremidades da amilopectina, liberando uma mistura de maltose e glicose. A amilopectina, polissacarídeo ramificado, possui em sua grande maioria, ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,6 e estas ligações não são hidrolisadas de forma específica pela  $\alpha$ -amilase, mas sim por  $\beta$ -amilases e  $\alpha$ -1,6 glucosidase (Conn & Stumpf, 1975).

#### 5.4. Atividade Enzimática

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos para a atividade específica da  $\alpha$ -amilase para o planejamento experimental proposto.

**Tabela 4.** Atividade específica da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de fermentação (TF) e pH.

Ensaio	Variáveis decodificadas		Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )
	TF (horas)	pH			
1	42	5	0,88	0,10	8,96
2	42	5	0,50	0,09	5,39
3	42	7	0,80	0,40	1,98
4	42	7	0,12	0,42	0,29
5	54	7	1,41	0,19	7,49
6	54	7	1,58	0,19	8,09
7	54	5	0,04	0,11	0,34
8	54	5	0,45	0,10	4,41
9	39,5	6	0,79	0,15	5,33
10	39,5	6	0,26	0,15	1,78
11	56,5	6	1,10	0,24	4,58
12	56,5	6	1,43	0,19	7,52
13	48	4,6	0,09	0,10	0,94
14	48	4,6	0,41	0,08	4,86
15	48	7,4	1,90	0,22	8,68
16	48	7,4	0,94	0,20	4,62

17	48	6	0,74	0,20	3,64
18	48	6	0,22	0,21	1,03
19	48	6	1,14	0,12	9,12
20	48	6	0,79	0,27	2,94

O resultado para atividade específica, Tabela 4, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) (Tabela 5) e a significância do modelo verificado pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Resultados da análise de regressão para a atividade específica da  $\alpha$ -amilase para DCCR

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	P	R <sup>2</sup> <sub>tratamento</sub>	R <sup>2</sup> <sub>total</sub>
Regressão	3	0,0356	0,0119	8,4164	0,0034	0,9338	0,6638
Modelo	8	0,0381	0,0048	3,3798	0,0326		
Falta de ajuste	5	0,0025	0,0005	0,3579	0,8667		
Erro	11	0,0155	0,0014				
Total	19	0,0536					

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = teste F; p = probabilidade; R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinação.

Observando a tabela verifica-se que a regressão foi significativa (P= 0,0034) e falta de ajuste não significativo (P=0,8667).

Dos parâmetros testados, apenas os efeitos quadráticos (X<sub>1</sub><sup>2</sup>) e (X<sub>2</sub><sup>2</sup>) foram não-significativos (P>0,05). Os efeitos linear e de interação destas variáveis foram significativos, conforme apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6.** Estimativa dos parâmetros do modelo completo no DCCR.

Parâmetro	Estimativa	valor - P
$\beta_0$ (Intercepto)	0,07418	<0,0001
$\beta_1$ (X <sub>1</sub> )	0,02042	0,0139
$\beta_2$ (X <sub>2</sub> )	0,02656	0,0042
$\beta_5$ (X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> )	0,03716	0,0027

Na Equação 17 é apresentado o modelo matemático proposto para determinar a atividade específica da  $\alpha$ -amilase em termos de valores não codificados.

$$\text{Atividade específica} = 0,07418 + 0,02042TF + 0,02656pH + 0,03716TFpH \quad (17)$$

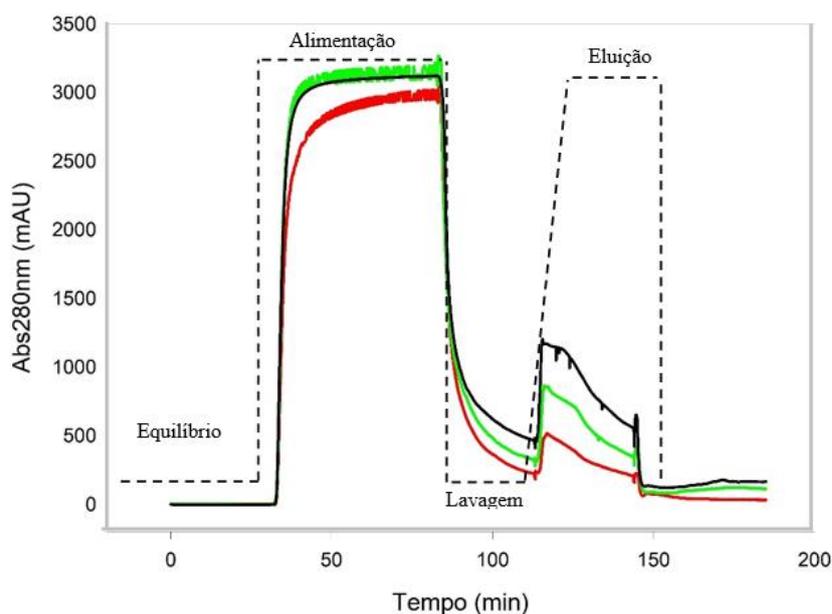
$$R^2_{\text{tratamento}} = 0,9338$$

Através da equação derivada das variáveis não codificadas, foi possível determinar a melhor condição para a produção de  $\alpha$ -amilase. Os melhores resultados foram obtidos no tempo de fermentação de 48 horas e pH 7,4. Resaltando que a eficiência da FES para produção de enzimas vai além das escolhas corretas de substrato e microorganismo, sendo necessárias as adequações dos parâmetros físico-químicos do processo. Com relação a influencia exercida pelo pH, constatou que o meio alcalinizado favoreceu para uma atividade enzimática de 21,68 U.mL<sup>-1</sup> com possível aplicação

em processos industriais, visto que o ponto isoelétrico dessa enzima está abaixo desse valor, possuindo, então, uma densidade de cargas que favoreceu a atuação da enzima sob o substrato.

### 5.5. Purificação da $\alpha$ -amilase obtida por FES em coluna monolítica

O extrato bruto enzimático obtido na FES com 48 horas de fermentação e extraído com pH 7,4 foi aplicado em cromatógrafo Akta Pure, objetivando a purificação parcial da  $\alpha$ -amilase. O perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 13. Foi realizada a corrida em triplicata para efeito de comparação dos tempos dos picos referentes a eluição da  $\alpha$ -amilase



**Figura 13.** Perfil de adsorção da purificação parcial  $\alpha$ -amilase por meio do extrato bruto, utilizando a coluna de monolítica em sistema cromatográfico Akta Pure.

Ode ser analisado o surgimento de picos largos e baixa resolução na etapa de eluição, isso mostra a baixa interação enzima-matriz.

Os dados referentes a volume, concentração, proteína total, atividade enzimática e atividade específica do processo de purificação parcial da  $\alpha$ -amilase em coluna monolítica são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados referentes à purificação  $\alpha$ -amilase obtida por FES por cromatografia de troca iônica na coluna monolítica produzida.

Amostra	Extrato	Eluição
Volume (mL)	76,93	10
Conc. Proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,315	<0,1
Proteína total (mg)	24,23	-
Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )	0,424 ± 0,008	0,387 ± 0,037
Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	1,346 ± 0,318	-

A atividade específica em um processo de purificação é um parâmetro de grande importância pois relaciona a atividade enzimática ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) a concentração de enzima ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) que está presente na solução. No trabalho, foi encontrado o valor de  $1,346 \text{ U.mg}^{-1}$  para o extrato bruto, o eluído apresentou  $0,387 \text{ U.mL}^{-1}$  para atividade enzimática. A quantificação de proteínas totais por análise de Bradford (1967) não apresentou valores aptos para obter resultados para atividade específica no eluído.

Para identificar essa baixa interação no processo de purificação do extrato enzimático, foi realizada a purificação em batelada, utilizando a mesma coluna polimérica, porém, agora, analisando o sobrenadante e o eluído da adsorção.

### 5.6. Purificação parcial da $\alpha$ -amilase obtida por FES em processo em batelada

Os resultados referentes ao processo de purificação parcial da  $\alpha$ -amilase obtida por FES em processo em batelada estão apresentados na Tabela 8.

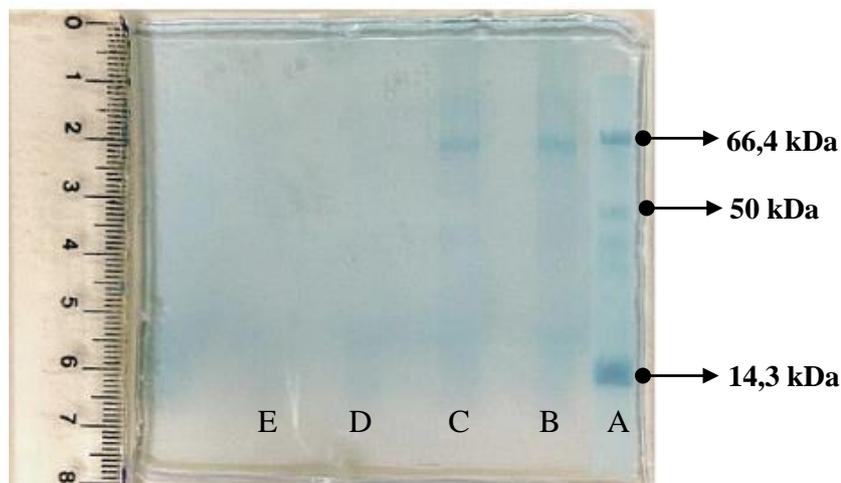
**Tabela 8.** Resultados referentes à purificação parcial em batelada da  $\alpha$ -amilase por troca iônica.

Amostra	Extrato	Sobrenadante	Eluição
<b>Volume (mL)</b>	4	4	2
<b>Conc. Proteína (<math>\text{mg.mL}^{-1}</math>)</b>	0,32	0,11	0,20
<b>Proteína total (mg)</b>	$1,26 \pm 0,09$	$0,44 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,09$
<b>Atividade enzimática (<math>\text{U.mL}^{-1}</math>)</b>	$0,42 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,06$	$0,034 \pm 0,01$
<b>Atividade específica (<math>\text{U.mg}^{-1}</math>)</b>	$1,34 \pm 0,32$	$15,32 \pm 4,01$	$0,22 \pm 0,14$
<b>Fator de purificação</b>	-	11,04	0,16

Ao analisar os resultados obtidos nestas análises e compará-los aos obtidos para purificação em sistema cromatográfico, pode-se reconhecer que a coluna polimérica não apresentou um comportamento esperado. Isto é, não houve interação eletrostática entre extrato enzimático e a matriz polimérica funcionalizada com grupamento amina ( $\text{NH}^{+2}$ ), este resultado pode ser correlacionado ao pH utilizados nas extrações em conjunto com o ponto isoelétrico da enzima alvo que pode variar entre 4,0 e 5,0 de acordo Paul et al. (2021), ocasionando a falta de interação eletrostática, o que não favoreceu a troca aniônica. Foi possível observar que o sobrenadante apresentou resultados para a atividade específica e fator de purificação superiores, quando comparado aos valores encontrados para o extrato bruto e eluído em batelada, bem como para purificação em coluna monolítica. Sendo possível concluir, que a coluna promoveu a purificação parcial do extrato enzimático ao remover possíveis contaminantes que interferiam na atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase.

### 5.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante (SDS – PAGE)

A imagem da eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 14) comprovam os resultados verificados nas metodologias testadas para a purificação da  $\alpha$ -amilase.



**Figura 14.** Gel de eletroforese (SDS-PAGE) a 12%, para  $\alpha$ -amilase parcialmente purificada. (A) Padrões BSA; Lipase e Lisozima; (B) extrato enzimático; (C) sobrenadante (batelada); (D) eluído (batelada); e (E) eluído (coluna monolítica).

Verificou-se que o extrato bruto obtido na FES apresentou uma única banda com massa molar próximo a 66 kDa. Cortez et al. (2017), indicaram que as  $\alpha$ -amilases de origem fúngica possuem massa molar na faixa de 41 a 69 kDa. A mesma banda foi verificada na solução sobrenadante, ou seja, na solução que permaneceu em contato com o criogel no processo em batelada, indicando ser a enzima em estudo após a purificação. Enquanto, que as soluções eluídas tanto no processo em leito monolítico quanto em batelada não foi verificado a presença de bandas proteicas, Dey & Banerjee (2014), estudando a purificação e caracterização bioquímica da enzima  $\alpha$ -amilase produzida por *Aspergillus oryzae* IFO30103, observaram que a massa molar foi de 51,3 kDa, próximo ao verificado neste estudo.

As imagens indicam a comprovação que não houve interação enzima-matriz, mas sim, a retirada de compostos indesejáveis, que conseqüentemente elevou a atividade (enzimática e específica) do sobrenadante ao compará-la com a atividade do extrato bruto.

## 6. CONCLUSÕES

Foram produzidos criogéis trocadores aniônicos funcionalizados com arginina , aplicados para purificação de amilases produzidas por fermentação em estado sólido. Os resultados para caracterização estrutural da coluna monolítica indicaram não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controle e o funcionalizado, concluindo que os grupos funcionais ali inseridos não afetaram a estrutura do mesmo. Ambos apresentaram porosidade total de 92 %, sendo constituídos majoritariamente de macroporos, com potencial aplicação para purificação de macromoléculas.

A etapa de fermentação em estado sólido, utilizando *Aspergillus niger* como fungo filamentosos, apresentou potencial para síntese de enzimas aminolíticas. A enzima obtida apresentou atividade específica de  $21,68 \text{ U.mL}^{-1}$  com possível aplicação em processos industriais. Apesar da matriz não ter apresentado a eficiência como esperado, ainda assim, os resultados demonstram que houve purificação parcial e que o adsorvente retirou do meio contaminantes que interferiam na atividade enzimática.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. F.; VIEIRA, M. P.; TEIXEIRA, J. M.; MOTA, K. I. A.; CARVALHO, S. A. Produção de enzimas por fungos filamentosos. Fundamentos e atualidades em tecnologia e inspeção de alimentos. Fortaleza: **Editora In Vivo**, 2020.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official Methods of analysis of Association of Official Chemists (13th ed.). Washington: **AOAC**. 2005.

BAPTISTA, Â. P. D. Derivados de Aminoácidos como Ligandos em Cromatografia de Afinidade para a Purificação de Plasmídeos. **Defesa de mestrado**. Universidade da Beira Interior, Covilhã – Portugal, 2009.

BATISTA, G. A; OLIVEIRA, A. C. F ; NEVES, I. C. O ; ROCHA, R. A ; RESENDE, J. V ; VERÍSSIMO, L. A. A. Funcionalização de criogéis com polietilenoimina para a adsorção da albumina do soro bovino por cromatografia de troca iônica. **In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2018, São Paulo. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2018. p. 697.

BIAZUS, J. P. M., SANTANA, J. C. C., SOUZA, R. R., TAMBOURGI, E. B. Purificação de amilases de malte de Zea mays. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 218-223, 2010.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Coord). Biotecnologia industrial: fundamentos. 1º Ed. São Paulo: **Edgard Blucher**, p. 254, 2001.

BRADFORD, 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.

BRUNO S, COPPOLA D, DI PRISCO G. Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications. **Mar Drugs**. v. 17, pag. 1–36, 2019.

CANGANELLA et al. Characterization of amylolytic and pullulytic activities from thermophilic Archaea and from a new *Fervidobacterium* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 42, p. 239-245, 1994.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA, W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**. v. 154, p. 308-314, 2014.

CAVALCANTI, J. S. Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leite na forma expandida. 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Natal-RN. 2010.

CHEN, F.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. (2008). Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid. **Chemical Engineering Science**. v. 63, p. 71-77, 2008.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-production fungi from Brazil savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 881-885, 2005.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. Introdução à Bioquímica. São Paulo: **Edgard Blücher**, p.447, 1975.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. DE; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017.

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of  $\alpha$ -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis an Agricultural Biotechnology**. v. 4, p. 83-90, 2015.

DINGLE, J.; TEID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 4, n. 8, p. 149-155, 1953.

DINI, C.; DOPORTO, M. C.; VIÑA, S. Z. GARCIA, M. A. Cassava flour and starch as differentiated ingredients for gluten free products. **Nova Science Publishers**, p. 27, 2014.

EL-RAHIM, W. M. A.; EL-ARDY, O. A. M.; MOHAMMAD, F. H. A.; *Desalination* **2009**, 249, 1206.

- ERTÜRK, G.; MATTIASSON, BO. Cryogels-versatile tools in bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 24-35, 2014.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomassdegrading enzymes for the bioenergy sector. Renewable and Sustainable. **Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.
- FELLOWS, P. Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas. **Zaragoza: Editorial Acribia**, 1994. p. 172-177.
- FIDELIS, P. C. Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite. 71 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 2011.
- FIORDA, F.A.et al. Farinha de bagaço de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [s.l.], v. 43, n. 4, p. 408-416, 2013.
- FLORENCIO, C., COURI, S., FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by Trichoderma strains. **Enzyme Research**, p.1-7, 2012.
- FLORENCIO, C., COURI, S., FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by Trichoderma strains. **Enzyme Research**, p.1-7, 2012.
- FONTAN, R. D. C. I.; BONOMO, R. C. F.; GONÇALVES, G. R. F.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Alternatives for characterizing macroporous polyacrylamide monolithic ion exchanger columns. **Polymer Engineering & Science**, v. 58, n. 10, p. 1717-1725, 2018.
- FRIEDBERG. On the primary structure of amylases. **FEBS Letters**. v. 152, p. 139-140, 1983.
- FUJINAMI, S. & FUJISAWA, M. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes—past, present and future. **Environmental Technology**, 31, 845–856, 2010
- FURUSAWA, T.; SUZUKI, M.; SMITH, J. M. Rate Parameters in Heterogeneous Catalysis by Pulse Techniques. **Catalysis Reviews**, v. 13, p. 43–76, 1976.
- GARIFULLINA, A. & SHEN, A. Q. Optimized Immobilization of Biomolecules on Nonspherical Gold Nanostructures for Efficient Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing. **Anal. Chem.** v. 91, pag. 15090-15098, 2019.

- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **In: Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, C. M. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal of Chromatography B**, v. 1033-1034, p. 406-412, 2016.
- GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, p. 101-168, 2007.
- GUN'KO, V. M.; SAVINA, I. N.; MIKHALOVSKY, S. V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. **Advanced in Colloid and Interface Science**, v. 187-188, p. 1-46, 2013.
- HALEEM, A.; PAN, J.; SHAH, A.; HUSSAIN, H.; HE, W. A systematic review on new advancement and assessment of emerging polymeric cryogels for environmental sustainability and energy production. **Separation and Purification Technology**. v. 316, pag. 123678, 2023.
- HAN, X.; WEN, H.; LUO, Y.; WENHAO, X.; XIAOYAO, J.; JIANHUA, X. Effects of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase on the characterization and function of maize porous starches. *Food Hydrocolloids*, v. 116, pag. 106661, 2021.
- HIXON, K. R.; LU, T.; SELL, S. A. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 62, p. 29–41, n. 15, 2017.
- IGARASHI, W.; KOHIYAMA, F. S. Desenvolvimento de um protótipo para identificação do fungo *Aspergillus Niger*. V. 5, 2011.
- JANEČEK & BALÁZ. Domain evolution in the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Molecular Evolution**. v. 304, n. 1, p. 322-331, 1997.
- KEMPKA, A. P. et al. Influence of different inductors and operating conditions in the production of lipase from *Aspergillus niger* using cassava peel: a short study. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 9-18, 2017.
- KIM, H. S.; HAGE, D. S. Handbook of Affinity Chromatography. **Boca Raton: CRC Press**, 2005.
- KNOEMA, World Data Atlas Topics Agriculture. Cassava production in the World. 2024. Disponível em: <https://knoema.com/data/cassava+agriculture-indicators-production>
- KUMAR, A.; MUKHIA, S.; KUMAR, R. Industrial applications of cold-adapted enzymes: challenges, innovations and future perspective. v. 426, pag. 1-18, 2021.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970

LENHOFF, A. M. Protein adsorption and transport in polymerfunctionalized ion-exchangers. **Journal of Chromatography A**, v.1218, 8748-8759, 2011.

LI, N.; BAI, R. Copper adsorption on chitosan-cellulose hydrogel beads: behaviors and mechanisms, **Separation Purification Technology**. v, 42, p. 237-247, 2005.

LUO, Q.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; XIAO, X.; NI, J. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 481-489, 2002.

MACGREGOR.  $\alpha$ -Amylase structure and activity. **Journal of Protein Chemistry**. v. 7, p. 399-415, 1988.

MACHADO, A. P. F.; MINIM, L. A.; FONTAN; R. C. I.; MINIM, V. P. R.; GONÇALVES, G. R. F.; MÓL, P. C. G. Adsorptive behavior of  $\alpha$ -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, p. 64-69, 2015.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Atividade amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**. v. 32, n. 4, p. 345 – 352, 2006.

MARTINEZ, C.; CUEVAS, F. Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz. **Guia de estudo**. CIAT, p. 75, 1989.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 11, p. 124–130, 2017.

MESBAH, N. M. Industrial Biotechnology Based on Enzymes From Extreme Environments. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 10, 2022.

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

MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; ELLER, M. R.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A.; Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017.

MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; MINIM, L. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and capture of  $\beta$ -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochemistry**. v, 82, p. 75-83, 2019.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments, **5th edition. John Wiley & Sons, Inc.**, New York, 684p, 2001.

MORAES, O.M.G.; CHAVES, M.B. Método espectrofotométrico para a determinação de amido em produtos cárneos. **In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**, 4<sup>o</sup>, Belo Horizonte, p. 281, 1988.

MÓTYÁN, J. A.; Gyémánt, G.; HARANGI, J.; BAGOSSI, P. Computer-aided subsite mapping of  $\alpha$ -amylases. **Carbohydrate Research**. v. 346, p. 410–415, 2011.

NASCIMENTO, I. S.; SILVA, D. L.; PEREIRA, T. B.; GONÇALVES, G. R. F.; VERÍSSIMO, L. A. A.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I. Capture of lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds in a single step using a supermacroporous ion exchange cryogel. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 1, p. 313-324, 2019.

NEVES, A. C. O.; RODRIGUES, A. A.; VALENTIM, T. T.; MEIRA, A. C. F. O.; SILVA, S. H.; VERÍSSIMO, L. A. A.; RESENDE, J. V. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves. **Jornal de Cromatografia B**. v. 1161, pag. 122435, 2020.

ODOCH, M.; BUYS, E. M.; TAYLOR, J. R. N. Solid-State Fermentation of Cassava Roots Using Cellulolytic-Type Alkaliphilic *Bacillus* spp. Cultures to Modify the Cell Walls and Assist Starch Release. v. 191, pag. 1395-1410, 2020.

OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. **Journal of Science of Food and Agriculture**, vol. 69, pag. 109-115, 1995.

OLIVEIRA, A. C. F.; NEVES, I. C. O.; SARAIVA, J. A. M.; CARVALHO, M. F. F.; BATISTA, G. A.; VERÍSSIMO, L. A. A. ; RESENDE, J. V. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, vol. 55, pag. 2012-2024, 2019.

OLIVEIRA, H. S. De. Efluente oleoso como alternativa para a produção de lipase por fungos. 2020. 61p. **Dissertação** (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

PAIVA, T. S.; BATISTA, G. A.; GROppo, I. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; RESENDE, J. V.; FONTAN, R. C. I. Desenvolvimento de adsorventes monolíticos para purificação de proteínas por cromatografia de interação hidrofóbica. **Anais do V CMEA: Congresso Mineiro de Engenharia de Alimentos**. v. 1, 2019.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p.1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1º ed. **New Delhi: Asiatech Publishers, Inc**, p. 760, 2005.

PAREDES, B.; GONZÁLEZ, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, J. M. (2004). Particulate poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) material for protein separation by anion-exchange chromatography. **Separation and Purification Technology**, v.40, 243-250.

PARSHETTI, G. K.; KALME, S. D.; GOMARE, S. S.; GOVINDWAR, S. P.; **Bioresour. Technol**, n 98, p. 3638, 2007.

PAUL, J. S.; et al. Aspects and recent trends in microbial  $\alpha$ -amylase: a review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 193, n. 8, p. 2649-2698, 2021.

PETRO, M.; SVEC, F.; RÉCHET, J. M. J. Immobilization of trypsin onto “molded” macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 4, p. 355-363, 1996.

- PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004b.
- PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004b.
- PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 11, p. 1657-1671, 2007.
- PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004.
- PORFIRIO, M. C. P.; SANTOS, J. B.; ALVES, A. N.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I. Purification of pineapple bromelain by IMAC chromatography using chlorophyll-activated macroporous matrices. **Jornal de Cromatografia B**. v. 1234, pag. 124027, 2024.
- PURWANTO, M. G. M. The role and efficiency of ammonium sulfate precipitation in purification process of papain crude extract. **Procedia Chemistry**, n. 18, p. 127-131, 2016.
- PUTRI, D. N. et al. Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. **Energy Reports**, v. 6, p. 331-335, 2020.
- RAINA, D., KUMAR, V., & SARAN, S. A critical review on exploitation of agro-industrial biomass as substrates for the therapeutic microbial enzymes production and implemented protein purification techniques. 2022.
- RAVINDRAN, R. Hassan, S. S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K. A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. **Bioengineering**. v. 5, pag. 93, 2018.
- ROCHA et al. Crueira: resíduo agroindustrial sólido rico em amido. **Scientia Plena**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 10–14, 2016.
- RODRIGUES, J.P. M.; CALIARI, M.; ASQUIERI, E. R. Caracterização e análise sensorial de biscoitos de polvilho elaborados com diferentes níveis de farelo de mandioca. **Ciência Rural**, Goiânia-GO, v. 41, n. 12, p. 2196-2202, 2011.

RODRIGUES, K.; SILVA, K. M. L.; SILVA, G. M. M.; LIMA, P. C. C. Remoção de corante por uso de *Aspergillus niger* AN400 em reator em bateladas sequenciais. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 7, 1119-1123, 2011.

SANTOS, C. M. S. Desenvolvimento de adsorventes monolíticos macroporosos com concanavalina a immobilizada para a purificação de lectinas. 78 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2016.

SAVINA, I. N; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium doperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, p .9596-9603, 2005.

SEENA, S. et al. Biodiversity of leaf litter fungi in streams along a latitudinal gradient. **Science of the Total Environment**, v. 661, n. January, p. 306–315, 2019a.

SHAHBANDEH, M. Leading cassava producing countries worldwide in 2021. Statista, 2024. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/1391572/global-leading-cassava-producing-countries/>

SILLS, A.M.; SAUDER, M.E.; STEWARD, G.G. Amylase Activity in Certain Yeasts and a Fungal Species. **Dev. Ind. Microbiol.** 1983; 24. p. 295.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Applications of high performance liquid chromatography for the study of emerging organic pollutants. **Revisão Quím. Nova**. v. 34, n. 4, 2011.

SILVA, J. F.; LIMA, C, M. G. ; SILVA, D. L.; NASCIMENTO, I. S.; RODRIGUES, S, O.; GONÇALVES, L. A. ; SANTANA, R. F. ; KHALID, W ; VERRUCK, S. ; EMRAN, T. B.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; KHANDAKER, M. U.; FARUQUE, M. R. I. ; FONTAN, R. DA C. I. . Lectin Purification through Affinity Chromatography Exploiting Macroporous Monolithic Adsorbents. **Separations**, v. 10, p. 36, 2023.

SILVA, J. F.; SILVA, D. L.; NASCIMENTO, R. G; VERÍSSIMO, L. A. A.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. M.; FONTAN, R. C. I. Enhancements in sugar immobilization in polymeric microporous matrices for affinity capture. **Journal Of Applied Polymer Science (Online)**, v. 136, p. 47956-47956, 2019.

SMITH, J. Food Additive User's Handbook. New York: Blackie and Son Ltd., 1991. p. 131, 144.

- SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação sem estado sólido. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2005.
- TIAN, H.; ZHU, Z.; MA, F.; LI, J.; LI, J.; LI, Y.; YANG, P. Preparation of poly (polyethylene glycol diacrylate -co- maleic anhydride) cryogels and its adsorption performance of cationic dyes. **Reactive and Functional Polymers**, v.195, 2024.
- TONOLLI, P. N.; FRANCO, F. F.; SILVA, A. F. G. A construção histórica do conceito de enzima e sua abordagem em livros didáticos de biologia. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.28, p.727- 744, 2021.
- TORRES, L. M; LEONE. M.; MISCHAN. M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.7, p.1327-1332, 2012.
- TUNG, Q.T. MIYATA, N. IWAHORI, K. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. **Journal of bioscience and bioengineering**. v. 97, p.329-335. 2004.
- VAN DER MAAREL et al. Proprieties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylases family. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 137-155, 2002.
- WANG, C.; BAI, S.; TAO, S-P.; SUN, Y. Evaluation of steric exclusion chromatography on cryogel column for the separation of serum proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1333, p. 54–59, 2014.
- WANG, Y.; TIAN, X.; ZHANG, Z.; TIAN, M.; ZHANG, F. Investigation of the potential mechanisms of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase through ultrasound intensification. **LWT-Food Science and Technology**, v. 198, p 115979, 2024.
- YAO, K. et al. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 246-251, 2007.
- YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical engineering science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006a.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 103-110, 2006b.

YUN, J.; CHENG, X.; YE, J.; SHEN, S.; YANG, G.; YAO, K.; KIRSEBOM, H.; LIN, Q.; GUAN, X.; YAO, J. Chromatographic Adsorption of Serum Albumin and Antibody Proteins in Cryogels with Benzyl-Quaternary Amine Ligands, **Journal of Chromatography A**, v. 1381, p. 173-183, 2015.

ZABKA, M.; MINCEVA, M.; RODRIGUES, A. E. Experimental and modeling study of adsorption in preparative monolithic silica column. **Chemical Engineering and Processing**, v.45, p. 150-160, 2006.

ZHANG, Y. Y.; RUI, X.; SIMPSON, B. K. Trends in nanozymes development versus traditional enzymes in food science. **Food Science**, v. 37, p. 10-16, 2020.