



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA

Aléxia Jhenniffer P. Amaral de Araújo

Imobilização de α -amilase em magnetita

Goiânia, 2023.



INSTITUTO FEDERAL
Goiás

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAÇÃO NO REPOSITÓRIO DIGITAL DO IFG - ReDi IFG

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Digital (ReDi IFG), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IFG.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| ☐ Tese | ☒ Artigo Científico |
| ☐ Dissertação | ☐ Capítulo de Livro |
| ☐ Monografia – Especialização | ☐ Livro |
| ☒ TCC - Graduação | ☐ Trabalho Apresentado em Evento |
| ☐ Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor:

Matrícula: 20151011080221

Título do Trabalho: *Imobilização de α -amilase em magnetita.*

Autorização - Marque uma das opções

1. ☒ Autorizo disponibilizar meu trabalho no Repositório Digital do IFG (acesso aberto);
2. ☐ Autorizo disponibilizar meu trabalho no Repositório Digital do IFG somente após a data ____/____/____ (Embargo);
3. ☐ Não autorizo disponibilizar meu trabalho no Repositório Digital do IFG (acesso restrito).

Ao indicar a opção **2 ou 3**, marque a justificativa:

- ☐ O documento está sujeito a registro de patente.
☐ O documento pode vir a ser publicado como livro, capítulo de livro ou artigo.
☐ Outra justificativa: _____

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- i. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- ii. obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- iii. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás.

Goiânia, 10/07/23.
Local Data

Alícia Jhemiffer Pereira Amorim de Araújo

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Imobilização de α -amilase em magnetita

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC apresentado à Coordenação de Química Instituto Federal Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Aline Mendonça Pascoal Santos e co-orientação do Prof^o. Dr. Maurício Vicente Cruz, como requisito para obtenção do Grau de Bacharel em Química.

Goiânia, 2023.

Ar12i Araújo, Alécia Jhennifer P. Amaral de.

Imobilização de α -amilase em magnetita / Alécia Jhennifer P. Amaral de Araújo. – Goiânia: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus Goiânia, 2023.
41 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Mendonça Pascoal Santos
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Vicente Cruz.

TCC (Trabalho de Conclusão de Curso) – Bacharelado em Química, Coordenação de Química, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus Goiânia.

1. Imobilização enzimática. 2. Biocatalisador. 3. Magnetita. I. Santos, Aline Mendonça Pascoal (orientadora). II. Cruz, Mauricio Vicente (coorientador). III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus Goiânia. IV. Título.

CDD 540

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Karol Almeida da Silva CRB1/ 2.740
Biblioteca Professor Jorge Félix de Souza,
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus Goiânia.



INSTITUTO FEDERAL
Goiás

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
CÂMPUS GOIÂNIA

ATA Nº 05/2023

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao vigésimo sexto dia do mês de junho do ano de dois mil e vinte e três, às 16:00 horas, do Instituto Federal de Goiás, Campus Goiânia, situado à Rua 75, Setor Central da cidade de Goiânia, Estado de Goiás, foi realizada a sessão pública de apresentação e defesa do Trabalho de Conclusão de Curso da Graduanda **Aléxia Jhennifer Pereira Amaral de Araújo** (20151011080221), do curso Bacharelado em Química, no primeiro semestre do ano de dois mil e vinte e três. A banca foi composta pelos seguintes membros: Profa. Drª Aline Mendonça Pascoal Santos; Prof. Dr. Mauricio Vicente Cruz; Profª. Dra. Waléria Rodovalho e MSc. Richard Douglas Rodrigues Ferreira, sob a presidência da primeira. O trabalho de conclusão de curso tem como título **Imobilização de α -amilase em magnetita**, da área de Química, sob orientação da Profa. Drª Aline Mendonça Pascoal Santos e co-orientação do Prof. Dr. Mauricio Vicente Cruz. Após a apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso, tendo sido a autora arguida pela Banca Examinadora, a nota final foi 10.

Encerra-se a presente sessão às 18 horas. Eu, Profa. Drª Aline Mendonça Pascoal Santos, dato e assino a presente ata que segue assinada por todos os membros da Banca e pela graduanda.

(Assinado eletronicamente)
Profa. Drª Aline Mendonça P. Santos

(Assinado eletronicamente)
Prof. Dr. Mauricio Vicente Cruz

(Assinado eletronicamente)
Profa. Drª Waléria Rodovalho

(Assinado eletronicamente)
MSc. Richard Douglas R. Ferreira

(Assinado eletronicamente)
Aléxia Jhennifer Pereira Amaral de Araújo
(Graduanda)

Documento assinado eletronicamente por:

- Aline Mendonça Pascoal Santos, COORDENADOR(A) - SUB-CHEFIA - GYN-CCAQ, em 10/07/2023 13:15:22.
- Mauricio Vicente Cruz, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 05/07/2023 14:22:49.
- Waleria Rodovalho, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 03/07/2023 20:12:23.
- Richard Douglas Rodrigues Ferreira, Richard Douglas Rodrigues Ferreira - Estudante - Ufg (01567601000143), em 28/06/2023 15:13:29.
- Aléxia Jhennifer Pereira Amaral de Araújo, 20151011080221 - Discente, em 28/06/2023 15:11:33.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 21/06/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifg.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 422275
Código de Autenticação: ee6a1a112c



AGRADECIMENTOS

Presto primeiramente meus agradecimentos a Deus e toda espiritualidade pela oportunidade e amparo durante essa caminhada. Gratidão, também, aos meus pais Flávia Pereira do Amaral e Kléber Sandro de Araújo por todo suporte material e emocional para chegar nesse momento de conclusão de mais uma etapa nessa vida. Meus agradecimentos também ao meu irmão Alexander Pereira Amaral de Araújo e minha avó Margarida Pereira de Lima pelo apoio com tudo quando sempre precisei.

Muito obrigada aos meus professores que me ensinaram tanto nessa jornada acadêmica, e aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Aline Mendonça Pascoal Santos e Prof^o. Dr. Maurício Vicente Cruz por toda ajuda e amparo na realização deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Aos laboratórios das instituições que contribuíram para pesquisa: Laboratório de Química, do Instituto Federal de Goiás, Câmpus Goiânia e Laboratório de Química de Polímeros, responsável: Prof^a Dr^a Kátia Flávia Fernandes, na Universidade Federal de Goiás, Câmpus Samambaia.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

“A ostra, para fazer uma pérola, precisa ter dentro de si um grão de areia que a faça sofrer. (...) Pessoas felizes não sentem a necessidade de criar.”

Rubem Alves - *‘Ostra feliz não faz pérola’*.

RESUMO

A imobilização de biocatalisadores melhora a estabilidade dos mesmos frente às condições degradantes e gera uma grande otimização quanto ao custo, por possibilitar sua reutilização. As α -amilase têm grande aplicação desde a produção de alimentos até aplicabilidades na área têxtil e biologia molecular. Nesse contexto, a magnetita se mostra um bom suporte para imobilização enzimática por realizar uma boa interação enzima-suporte por interações moleculares. O presente trabalho teve como propósito principal a imobilização da α -amilase, utilizando a magnetita, onde a sua síntese, por coprecipitação, demonstrou atividade magnética quando exposta a um ímã e um rendimento de 6,14%. A imobilização da α -amilase apresenta atividade de 0,66 UE/mL para 30 min de reação, e 0,70 UE/mL para 60 min e obteve-se eficiência de imobilização, respectivamente, de 47,1% e 49,9%, utilizando a metodologia de adsorção física.

Palavras chave: imobilização enzimática, biocatalisador, α -amilase, magnetita.

ABSTRACT

The immobilization of biocatalysts improves their stability in the face of degrading conditions and generates a great optimization in terms of cost, by enabling their reuse. The α -amylases have wide application from food production to applicability in the textile area and molecular biology. In this context, magnetite is a good support for enzymatic immobilization because it performs a good enzyme-support interaction through molecular interactions. The present work had as its main purpose the immobilization of α -amylase, using magnetite, where its synthesis, by coprecipitation, demonstrated magnetic activity when exposed to a magnet and a yield of 6.14%. The immobilization of α -amylase presents an activity of 0.66 EU/mL for 30 min of reaction, and 0.70 EU/mL for 60 min and immobilization efficiency was obtained, respectively, of 47.1% and 49.9 %, using the physical adsorption methodology.

Key Word: enzymatic immobilization, biocatalyst, α -amylase, magnetite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ligação glicosídica.....	3
Figura 02: Métodos de imobilização de biomoléculas.....	6
Figura 03: Esquema dos métodos de imobilização de enzimas.....	7
Figura 04: Estrutura cristalina dos óxidos de ferro (Hematita, Magnetita e Maghemita)	8
Figura 05: Fluxograma da síntese da magnetita.....	12
Figura 06: Fluxograma da atividade da enzima livre.....	15
Figura 07: Fluxograma de imobilização da α -amilase.....	17
Figura 08 : Magnetita sintetizada.....	18
Figura 09: Indicação de açúcar redutor pelo ADNS.....	23

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Reagentes utilizados para síntese da magnetita.....	11
Quadro 02: Reagentes utilizados na verificação da atividade da α -amilase.....	14
Quadro 03: Eficiência da enzima imobilizada.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Média e desvio padrão da síntese da magnetita.....	19
Tabela 02: Ensaio da amilase livre.....	21
Tabela 03: Atividade da enzima imobilizada.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

g	Gramma
mL	Miligramma
min	Minutos
pH	Potencial Hidrogeniônico
°C	Graus Celsius
L	Litros
ADNS	Ácido Dinitrosalicílico
DP	Desvio Padrão
AR	Açúcares Redutores
MM	Massa Molar
m	Massa
UE	Unidades enzimáticas para hidrolisar 1mol de substrato, em 1mL de solução a cada minuto.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Fundamentação teórica.....	2
2.1. α -amilase.....	2
2.2. Imobilização de enzimas.....	3
2.3. Métodos de imobilização enzimática.....	5
2.4. Magnetita.....	8
3. Objetivos.....	10
3.1. Objetivos gerais.....	10
3.2. Objetivos específicos.....	10
4. Procedimento Experimental.....	11
4.1. Síntese da magnetita.....	11
4.1.1. Materiais.....	11
4.1.2. Procedimento experimental.....	11
4.1.3. Método de síntese da magnetita.....	12
4.2. Atividade da enzima livre.....	13
4.2.1. Materiais.....	13
4.2.2. Procedimento experimental.....	14
4.2.3. Método de avaliação de atividade da enzima livre.....	15
4.3. Imobilização da α -amilase.....	16
4.3.1. Materiais.....	16
4.3.2. Procedimento experimental.....	16
4.3.3. Método de imobilização da α -amilase.....	17
5. Resultados.....	18
5.1 Síntese da magnetita.....	18
5.2 Atividade da α -amilase.....	20
6. Conclusão.....	24
7. Referências.....	25

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores proteicos de grande importância por conduzirem reações de maneira específica com seu substrato diminuindo a energia de ativação dessa reação, aumentando sua velocidade (MENDES *et al.*, 2011). As aplicabilidades enzimáticas estão presentes em produção de alimentos, indústria têxtil, produção de bebidas fermentadas alcoólicas, em saneantes, indústria de celulose e papel, na área farmacêutica, biologia molecular e outras (SILVA, 2017).

O crescimento de indústrias biotecnológicas faz com que seja importante o estudo acerca de biomoléculas e biomateriais e suas aplicações. Entre as diferentes classes de biocatalisadores pode-se destacar as amilases. Pertencentes à classe das hidrolases, elas têm ampla aplicabilidade principalmente na produção de D-glucose e xarope de milho, e representam grande parte do mercado mundial de enzimas. As α -amilase são enzimas que hidrolisam amido e derivados liberando glicose, dextrinas e também maltoses como produto. Dentre as principais fontes de produção de enzimas, os fungos e bactérias representam as principais delas (SILVA, 2017; KOBLOITZ, 2008).

A imobilização enzimática tem grande importância por atuar melhorando a estabilidade das enzimas, fazendo com que a proteína enzimática suporte condições desnaturantes. Outro fator é que proporciona reutilização, tornando-as mais baratas em relação ao processo de extração, isolamento e purificação (FERNANDES *et al.*, 2003). Imobilizar um biocatalisador significa retê-lo em uma partícula insolúvel dada como suporte utilizando de métodos físicos ou químicos. Dentre esses, o método de adsorção física consiste em fixar proteínas enzimáticas à superfície de um suporte mediante a interação eletrostática (FERNANDES *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a magnetita (Fe_3O_4) se apresenta como um bom suporte de imobilização enzimática, dentre os métodos físicos e químicos, a síntese da magnetita pode ocorrer por coprecipitação o qual é compreendido como a incorporação de substâncias solúveis em um precipitado (FARIAS, 2017). Este trabalho teve como objetivo imobilizar α -amilase por adsorção utilizando magnetita sintetizada por coprecipitação como suporte.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 α -AMILASE

As amilases são enzimas que catalisam reações onde ocorre a hidrólise de glicogênio, amilose e amilopectina, transformando-os em dextrinas maltose e também moléculas de glicose. É encontrada na forma de α -amilase na saliva, onde também recebe o nome de ptialina e é encontrada no pâncreas, na forma de amilase pancreática (SILVA *et al.*, 2017).

Segundo, Silva *et al.*, (2017), por ser uma enzima do tipo hidrolase que atua celularmente clivando glicogênio e amido, os quais são ingeridos usualmente na dieta, esse biocatalisador tem um papel muito importante no processo digestivo onde atua quebrando amido, sacarose entre outros exemplos e glicoses para célula. As hidrolases como proteases, amilases, lipases, pectinases, celulases e catalases têm função importante não apenas na digestão, mas também ampla aplicação industrial como panificação, fermentação de bebidas, desengomagem dos tecidos na área têxtil. Os grandes avanços vêm com a produção biotecnológica de enzimas com maior estabilidade na atividade catalítica para utilização em indústrias, atendendo demandas específicas.

As formas de obtenção de amilases e também das proteases podem ser feitas através de fontes animais e por microorganismos. Dentre essas, as fontes microbianas são de maior utilização, o microorganismo mais citado para produção da amilase são bactérias do gênero *Bacillus*, principalmente para utilização em escala industrial (POONDLA *et al.*, 2016).

Dois tipos de amilases podem ser destacados, as α -amilase e β -amilase, atuando sobre o amido, e outros derivados de polissacarídeos como glicogênio. Elas se diferenciam pela maneira que agem hidrolisando carboidratos, a α -amilase quebra ligações glicosídicas α - 1,4 (entre duas glicoses) e as β -amilase atuam clivando, também, ligações glicosídicas α - 1,6 como apresentado na Figura 01 as ligações glicosídicas com suas respectivas numerações de localização de carbonos referentes a hexose formadora da glicose (FERNANDES *et al.*, 2007).

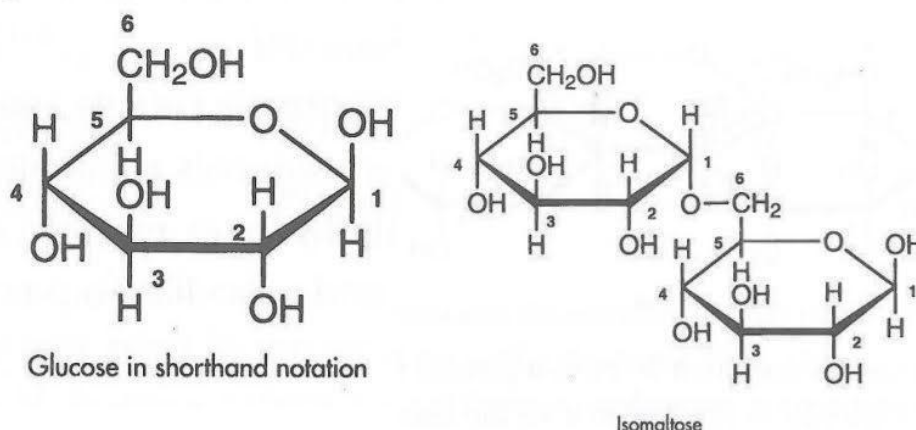


Figura 01: Ligação glicosídica.

Fonte: De Paoli - Rotenfuss Bier.

As α -amilase têm características específicas para sua atividade enzimática, as de origem vegetal têm pH ótimo na faixa ácida, por volta de 5, e temperatura de atividade ideal por volta dos 40°C. Para α -amilase animal o pH e temperatura onde a velocidade da reação é máxima fica em 6,8 e 37°C (KOBELITZ, 2008).

2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Atuando no controle da velocidade e na regulação das reações que ocorrem em organismos vivos, as enzimas são proteínas que catalisam reações químicas hidrolisando substratos específicos em locais chamados de sítios ativos utilizando arranjos ,também, específicos (FERNANDES *et al.*, 2003). O nome das enzimas é dado conforme o tipo de substrato que se liga à ela, por catalisar reações biológicas, as enzimas são conhecidas como biocatalisadores naturais e atuam diminuindo a energia de ativação das reações. Isso faz com que as reações tenham uma velocidade maior, por isso as reações mediadas por enzimas têm a possibilidade de acontecer dentro de organismos vivos (FARIAS, 2017).

A ação das enzimas em uma reação ocorre mediante a interação de seus sítios ativos específicos com substrato, e, de acordo com Mendes *et al.*, (2011), as enzimas, para que permaneçam estáveis, dependem de condições especiais como pH ótimo para reagirem, uma faixa de temperatura aceitável onde essa proteína não desnature e perca sua função. Todos esses fatores são chamados de condições ótimas para uma enzima se ligar ao seu substrato, aumentando a velocidade de uma reação diminuindo sua energia de ativação por atuarem no estado de transição dos reagentes, abaixando sua energia para que os produtos possam ser formados.

A técnica de imobilização enzimática consiste na retenção de um biocatalisador enzimático para aplicação de inúmeros processos industriais, os quais envolvem a produção de alimentos, processamento de materiais em indústrias bioquímicas e químicas, produtos farmacêuticos, seleção e integração em técnicas moleculares entre outras utilizações (MENDES *et al.*, 2011).

Um dos grandes motivos de se imobilizar enzimas é pela obtenção de maiores vantagens quanto ao custo alto para extrair, isolar e purificar. Outra vantagem é a facilidade de recuperação da enzima imobilizada para reutilização e a simplicidade da técnica evitando custos altos. Quanto às desvantagens, pode-se citar a possibilidade de dessorção (retirada de substâncias adsorvidas ou absorvidas) no meio reacional pela variação de temperatura e pH e a aleatoriedade da interação enzima-suporte. Em relação à uma enzima livre, os biocatalisadores enzimáticos imobilizados apresentam maior resistência às condições desnaturantes citadas (FERNANDES *et al.*, 2010).

Para imobilizar uma enzima, a magnetita, segundo Farias (2017), se mostra bastante eficaz como partícula suporte em métodos de imobilização enzimática por ter uma boa interação de superfície com enzimas. É um processo de reversibilidade fácil, onde a enzima imobilizada com a magnetita pode ser separada do substrato através de sua característica magnética ou por filtração.

2.3 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A atividade enzimática (U), independente do método de imobilização, significa quanto substrato uma enzima hidrolisa por minuto, isso implica diretamente na velocidade da reação. Reações catalisadas são para que aconteçam em uma velocidade maior em relação a mesma reação sem um catalisador, e em reações biológicas a atividade de uma enzima pode ser calculada medindo-se a quantidade do produto obtido, obtendo resultados calculados para cada minuto de reação (GARCIA, 2010).

Segundo Furlani *et al.*, 2020, a atividade enzimática é influenciada no contexto do método escolhido para imobilização, quantidade e pureza da enzima selecionada para utilização. Podendo assim, ocorrer um aumento ou diminuição da atividade enzimática.

Imobilizar uma enzima significa conseguir reter este biocatalisador em algum tipo de suporte, utilizando métodos físicos (onde existe apenas uma interação eletrostática entre a enzima e o suporte) e químicos (onde há formação de ligações com a molécula enzimática e o suporte), como na Figura 02. Essa técnica viabiliza muito os processos químicos, bioquímicos e biotecnológicos industriais por manter a estabilidade das enzimas, pois a partícula suporte acaba envolvendo e protegendo o material enzimático promovendo o aumento da resistência enzimática quando essas enzimas são expostas a condições que as degradam (FURLANI *et al.*, 2020).

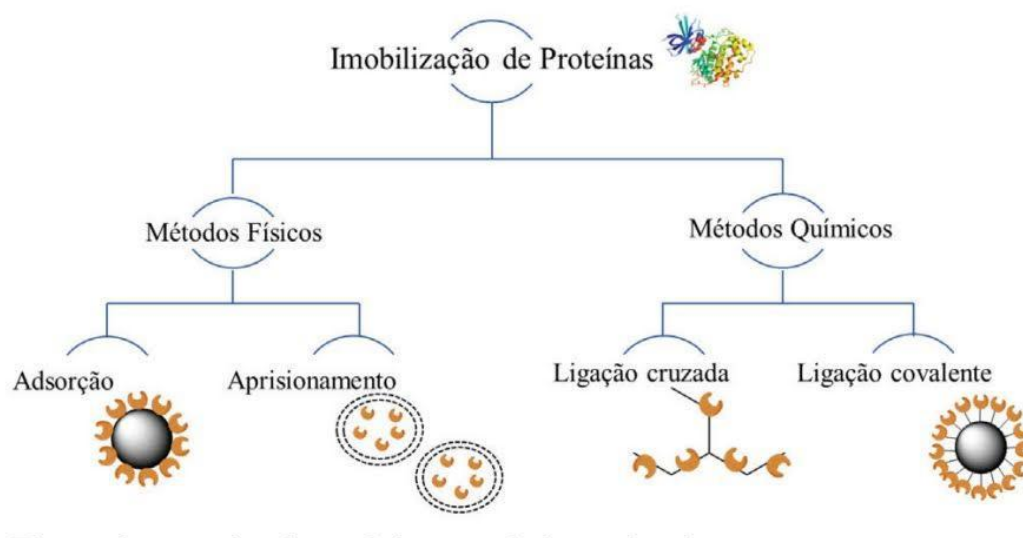


Figura 02: Métodos de imobilização de biomoléculas

Fonte: FURLANI *et al.*, 2020.

Os métodos químicos de imobilização acontecem reagindo o adsorvato com o adsorvente para serem firmados em sua superfície. Enquanto os físicos envolvem apenas interações de forças intermoleculares. Dentre os métodos de imobilização que existem, como ilustrado na Figura 03, pode-se citar o confinamento em matrizes poliméricas, encapsulação em membranas poliméricas, a adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica, ligação covalente a uma matriz insolúvel, a encapsulação e também reticulação (GARCIA, 2010).

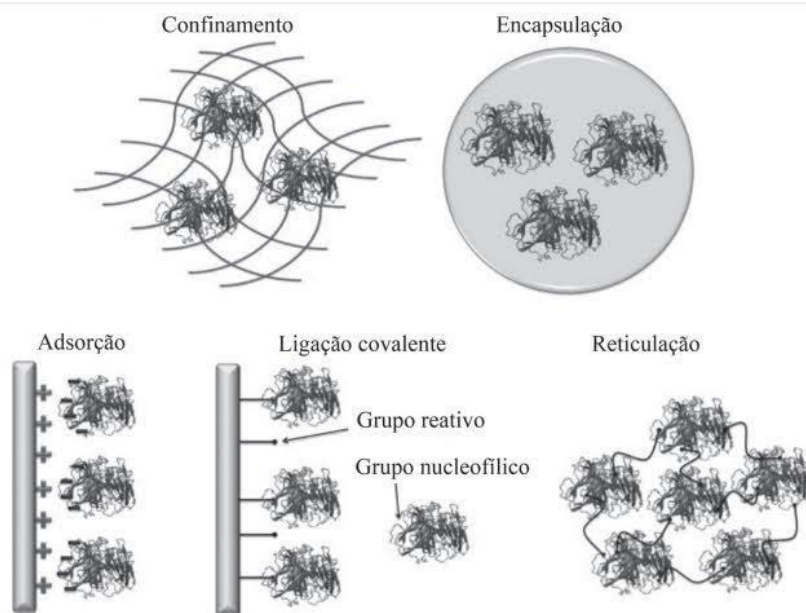


Figura 03: Esquema dos métodos de imobilização de enzimas

Fonte: SOUZA *et al.*, 2017.

Segundo Souza *et al.*, 2017, os métodos apresentados na Figura 03 podem ser descritos da seguinte maneira:

- **Encapsulação:** É formada uma reação de polimerização, onde a enzima é incorporada a proteínas em estruturas poliméricas.
- **Reticulação:** formam-se retículos, cristalizando a enzima num substrato bifuncional, estabilizando-a para estudos em difração de raio-x.
- **Ligação covalente:** grupos superficiais, de um suporte insolúvel, fazem ligações covalentes com os grupos ligantes de uma molécula enzimática.

O método de adsorção física consiste na aderência das partículas suporte na proteína enzimática, e foi uma das primeiras técnicas estudadas. É um método simples e também reversível de imobilização; pode ocorrer por meio de ligações de hidrogênio, e forças de Van de Waals (SOUZA *et al.*, 2017).

O tipo específico da interação suporte-enzima depende da natureza química e também das propriedades superficiais dos envolvidos. Essa técnica de imobilização por adsorção consiste em misturar o suporte insolúvel à uma solução de enzima em condições específicas para a não degradação (FERNANDES *et al.*, 2010).

2.4 MAGNETITA

Magnetita é um óxido de ferro bastante comum, de composição química Fe_3O_4 , é um mineral que tem uma característica marcante de possuir um magnetismo natural. Na maioria dos casos, apresenta forma cristalina cúbica, como representado na Figura 04, podendo conter Ti, Mn, Mg, Zn, Ni, Al, Cr e V em sua estrutura química (ESCOBARO *et al.*, 2019).

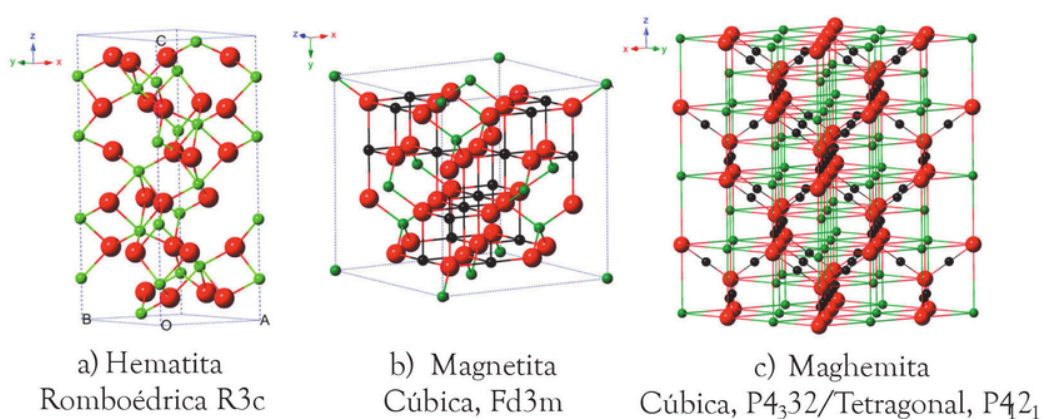


Figura 04 - Estrutura cristalina dos óxidos de ferro (Hematita, Magnetita e Maghemita)

Fonte : ESCOBARO *et al.*, 2019.

Mineralogicamente, a magnetita se associa às rochas ígneas, e aos minerais maghemitas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematitas (Fe_2O_3). Com uma dureza entre 5,5 e 6,5 Mohs, quebradiço e com uma grande força magnética, se dissolve facilmente em ácido clorídrico (HCl). As características mineralógicas, texturais e estruturais dos grãos são de grande importância porque influenciam de forma direta na eficiência dos processos químicos industriais (CARVALHO, 2021).

Esse mineral, por ser um ímã natural, possui inúmeras aplicabilidades, dentre elas, a retirada de íons metálicos em meios aquosos através da adsorção, em tecnologias eletrônicas, imobilização de biocatalisadores, vetorização de ativos medicinais entre outras. É bastante estudada suas aplicabilidades em tamanho

nano, onde as nanopartículas de magnetita tem características físicas, ópticas e a ampliação da superfície de contato para utilização em meios reacionais químicos é notadamente diferenciada (PANTA, 2013).

Nesse contexto, a nanotecnologia tem como objeto de estudo principal as nanopartículas, além de suas aplicações. As nanopartículas são partículas em nanoescala, essa escala nanométrica se encontra entre 1 e 100 nanômetros (DANTAS *et al.*, 2019). Suas aplicações estão em campos bem variados como alimentos, tratamento de água, na área clínica, medicamentos, eletrônicos, cosméticos, na área têxtil entre outras. O crescente interesse industrial em nanotecnologia, faz com que seja bastante útil cada vez mais estudos científicos na área (RAMOS *et al.*, 2019).

As nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas em diagnósticos e outros campos de aplicação como biologia celular (para separação de células alvos e organelas celulares), em biologia molecular (para separar oligonucleotídeos e ácidos nucleicos), em bioquímica (para isolar enzimas e anticorpos), em microbiologia (para concentrar microorganismos patogênicos), entre outras inúmeras aplicações. Esse tipo de nanopartícula tem um comportamento superparamagnético, o que confere bastante aplicações (SCAPIM *et al.*, 2020). Essa propriedade magnética bastante singular é especificamente ligada ao tamanho das nanopartículas. Quanto maior a uniformidade da sua forma esférica, maior será sua reatividade, pois tudo isso amplifica a superfície de contato. Nanopartículas de óxido de ferro especificamente, têm um grande potencial de aplicações em áreas como Medicina, Biologia e Química (ARAÚJO *et al.*, 2019).

Quanto à síntese da magnetita, existem diversas metodologias, dentre elas o método de coprecipitação é de grande interesse pela praticidade. A síntese da magnetita via coprecipitação envolve a adição de uma base, como agente redutor, em uma solução contendo íons de ferro Fe^{2+} e Fe^{3+} . Um grande desafio nesse método de síntese é o controle do tamanho das partículas que pode ser feito controlando a temperatura e o pH do sistema de reação. (VASCONCELOS, 2019).

Segundo Scapim *et al.*, 2020, o método de coprecipitação pode ser compreendido como um processo de incorporação de substâncias solúveis aos precipitados. Essa técnica de síntese pode ser realizada de três maneiras:

- Coprecipitação por adsorção superficial: onde o precipitado tem uma tendência a atrair para si substâncias estranhas.
- Coprecipitação por oclusão: onde há a prisão, por uma abertura momentânea, de uma substância dentro do cristal à medida que ele cresce.
- Coprecipitação por inclusão: onde uma substância ocupa um lugar da rede na estrutura cristalográfica resultando num defeito, que não é estrutural.

Outra metodologia, segundo Majadi *et al.*, 2016, de bastante interesse atual, estudada pela química verde é a síntese verde de nanopartículas de óxidos de ferro. Esse tipo de síntese abre mão do uso de reagentes tóxicos, usando por exemplo extratos vegetais com poder oxidativo, para gerar um produto final com aplicabilidades biológicas que causem o mínimo de toxicidade possível.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

A imobilização enzimática da α -amilase pelo método de adsorção utilizando magnetita.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Síntese da magnetita pelo método de coprecipitação;
2. Utilização da magnetita como partícula suporte de imobilização enzimática;
3. Imobilização da α -amilase pelo método de adsorção;
4. Análise da atividade enzimática da α -amilase livre e imobilizada em 30min e 60min.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 SÍNTESE DA MAGNETITA

4.1.1 MATERIAIS

Para síntese da magnetita via coprecipitação foram utilizados os reagentes descritos no Quadro 01, onde estão especificados também os dados contidos no rótulo da cada um deles. Os reagentes especificados foram cedidos pelo laboratório de química do Instituto Federal de Goiás, Câmpus Goiânia, onde foi realizada a síntese.

QUADRO 01: REAGENTES UTILIZADOS PARA SÍNTESE DA MAGNETITA.

Reagentes	Fabricante	Pureza	Função
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Êxodo Científica	99%	Precursor de Ferro
NaNO_3	Vetc	99%	Promover oxirredução
NaOH	Dinâmica	98%	Alcalinização do meio
HCl	Alphatec	37%	Acidificação do meio
H_2O deionizada	-	-	Diluição

Fonte: PRÓPRIA

4.1.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O processo da síntese da magnetita está apresentado na Figura 05, a seguir, onde é descrito o processo realizado em laboratório em forma de fluxograma.

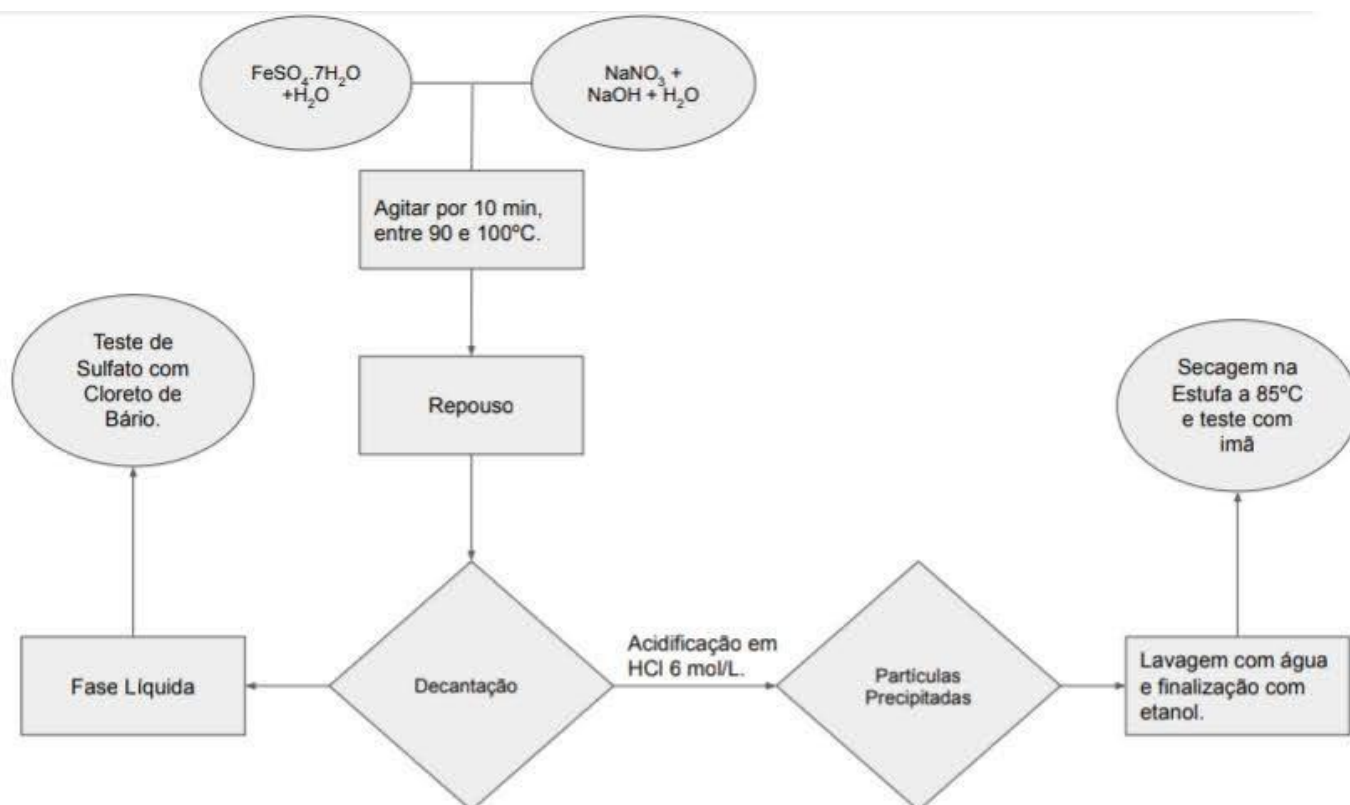
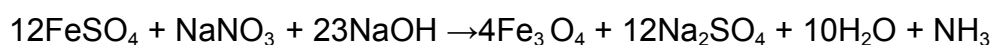


Figura 05: Fluxograma da síntese da magnetita

Fonte: PRÓPRIA

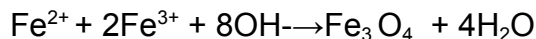
4.1.3 MÉTODO DA SÍNTESE DA MAGNETITA

Com base no método de Panta ,2013, foi feita a síntese da magnetita como apresentado na Figura 05 onde inicialmente preparou-se uma solução de HCl 6 mol/L em um balão de 100mL. Posteriormente, foram pesados os sais de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) com 27,8g, que equivalem a 15,2g de sulfato ferroso sem água na molécula, para 200mL de água deionizada num béquer, o nitrato de sódio (NaNO_3) com 0,84g para 100mL de água deionizada em outro béquer, e 15g de hidróxido de sódio (NaOH) que foram adicionados à solução de nitrato de sódio, segundo a estequiometria da equação global.



Depois de preparadas, as soluções com sais foram aquecidas à 75°C, após isso, sob agitação vigorosa, foram misturadas e formou-se um precipitado gelatinoso

de cor verde. Prosseguindo o aquecimento e a agitação por 10 min, com a temperatura controlada entre 90 e 100°C, a mistura tornou-se uma solução coloidal de cor preta. A formação da magnetita é descrita como na reação a seguir:



Posteriormente, realizou-se a acidificação do sólido com a solução de HCl 6 mol/L, feita no início, controlando a acidez da solução com fita de pH, com objetivo de finalizar a reação feita em meio alcalino, e a solução foi colocada em repouso em temperatura ambiente onde houve uma divisão de fases da mistura. Realizou-se uma decantação líquido-sólido por 15 min e, posteriormente, a separação da fase líquida para descarte. Com meio acidificado, com pH em torno de 2, foi feita a lavagem das partículas precipitadas, com água por 3 dias (repetindo o processo de lavagem a cada 24h) até que o teste de sulfato com cloreto de bário desse negativo. Uma última lavagem com etanol 70% também foi feita para auxiliar na secagem. Em seguida, o material residual foi colocado em uma estufa, da marca Lucadema, à 85°C para secagem. Para finalizar, o pó obtido das partículas sintetizadas foi submetido a pesagem e a aproximação de um ímã para verificação qualitativa de magnetismo das partículas de magnetita (FARIAS, 2017; ABREU, 2017).

4.2 ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE

4.2.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para verificação da atividade da α -amilase em solução tampão de acetato de sódio com ácido acético e a solução de amido, estão descritos no QUADRO 02, onde estão apresentados os dados do rótulo de cada reagente. Os reagentes foram cedidos pelo laboratório de Química de Polímeros, responsável: Prof^a Dr^a Kátia Flávia Fernandes na Universidade Federal de Goiás Câmpus Samambaia, Goiânia.

QUADRO 02: REAGENTES UTILIZADOS NA VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE DA α -AMILASE

Reagentes	Fabricante	Pureza	Função
Acetato de sódio	Dinâmica	99%	manter pH
Ácido Acético Glacial	Synth	99,7%	Manter pH
Amido Solúvel	Sigma-Aldrich	98%	Substrato enzimático
Estoque α -AMILASE	Novozyme Ltda	-	Biocatalisador
H2O destilada	-	-	Diluição
ADNS	Produzido no laboratório	-	Dosagem de açúcares redutores

Fonte: PRÓPRIA

4.2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para realização do procedimento da avaliação da atividade da enzima livre em laboratório, foram seguidas as etapas apresentadas no fluxograma descrito na Figura 06.

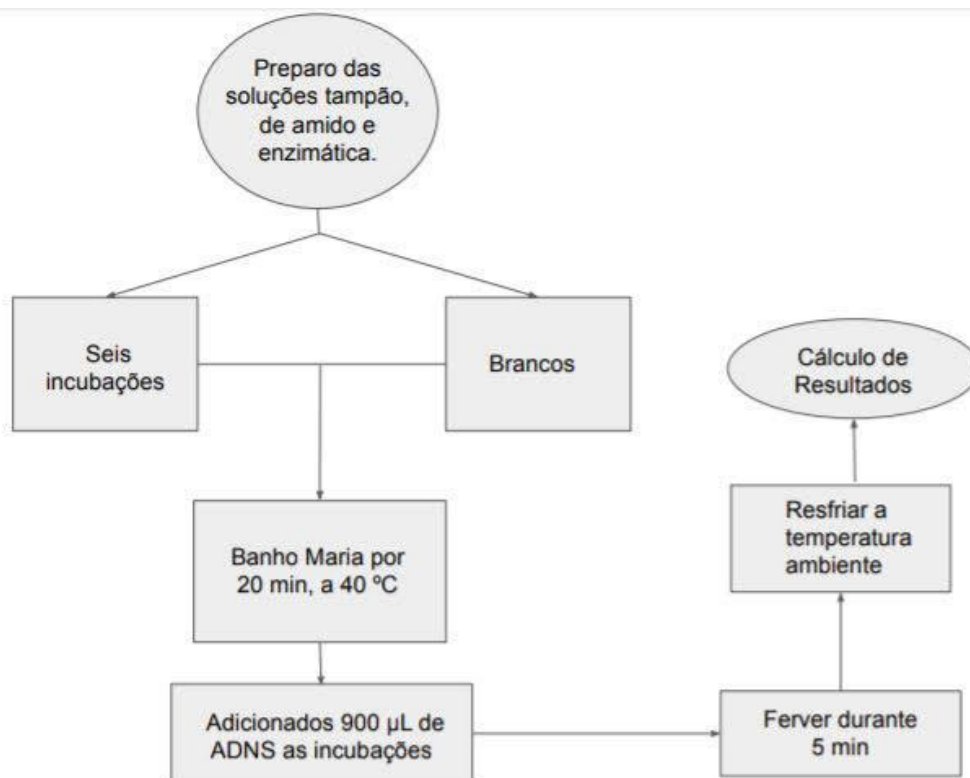


Figura 06: Fluxograma da atividade da enzima livre

Fonte: PRÓPRIA

4.2.3 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMA LIVRE

Com base na figura 06, para o preparo da solução tampão de 2 mol/L foram pesados 0,38g de acetato de sódio e adicionados em 46 mL de água destilada. Também foram pipetados 280 µL (0,028 mL) ácido acético glacial e colocados em 4,8 mL de água destilada, onde ambas as soluções são de 0,1 mol/L. Depois, foi feita a mistura dessas duas soluções e um ajuste de pH com NaOH, com auxílio de um pHmetro até atingir 5,5. Após esse preparo, as soluções foram transferidas para um balão de 100 mL e completado com água destilada. Na preparação do substrato, foi utilizado amido solúvel 0,5%(m/v). Pesou-se, então, 0,25g de amido e adicionou-se em 50 mL da solução tampão. Para 1mL de solução enzimática, com diluição 1:10, foram pipetados 100 µL de α -amilase e 900 µL da solução tampão de acetato de sódio.

Para dosar a atividade de α -amilase foram preparadas 6 incubações com 250 µL da solução de amido, 100 µL da solução tampão e 150 µL da solução enzimática de α -amilase deixadas em banho-maria, por 20 min em 40°C.

Para leitura no espectrofotômetro foram feitos, juntamente com as incubações, três brancos da seguinte forma :

Branco da solução enzimática: 250 μL de solução tampão, 100 μL de solução tampão e 150 μL solução enzimática.

Branco da solução de amido: 250 μL de solução de amido, 100 μL solução tampão e 150 μL de solução tampão.

Branco do ADNS: 250 μL tampão, 100 μL de tampão e 150 μL de ADNS.

Após esse período de 20 min, adicionou-se às incubações 900 μL de ADNS com curva de calibração onde $y = 0,6977x - 0,4601$ e seu $r^2 = 0,9866$, para dosagem de açúcares redutores à medida que eles são oxidados, e foram levadas para ferver durante 5 min. Depois de resfriadas à temperatura ambiente, foram lidas em um espectrofotômetro da marca Bioespectro SP - 220, para verificação dos resultados de atividade da enzima livre (PEREIRA; FERNANDES E WHOA, 2017).

4.3 IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE

4.3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para imobilização da enzima e o laboratório da realização do experimento foram os mesmos para realização da verificação da atividade da enzima livre descritos no QUADRO 02, acrescentando a magnetita.

4.3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O processo da imobilização é descrito no fluxograma da Figura 07, que descreve simplificadaamente as etapas do processo realizado em laboratório.

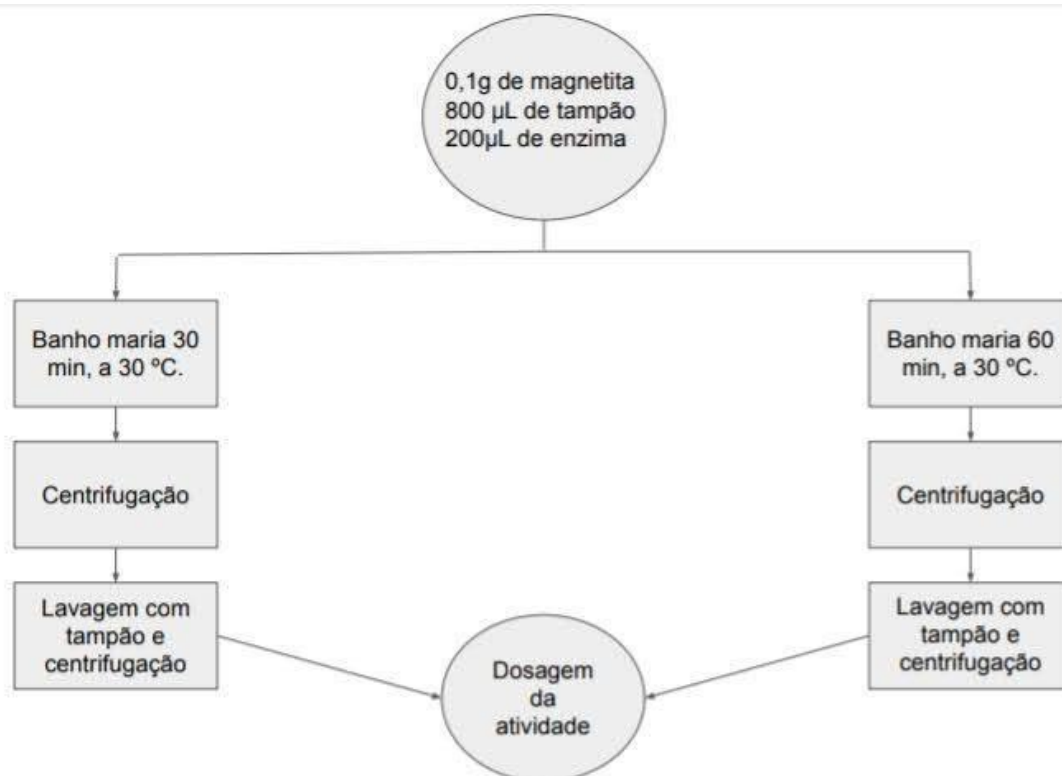


Figura 07: Fluxograma da imobilização da α -amilase

Fonte: PRÓPRIA

4.3.3 MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE

Baseado na figura 07, para imobilização da α -amilase foram pesados 0,1g de magnetita e colocados em uma solução de 200 µL da enzima e 800 µL da solução tampão feita para avaliação da atividade enzimática. Foram feitas duas etapas separadas nesse processo, onde uma foi levada para banho maria por 30 min a 30°C e a outra continuou até que completasse 60 min nesta temperatura. Após o tempo de cada etapa ter sido finalizada, elas foram centrifugadas por 5 min e lavadas com 500 µL de solução tampão e novamente foram para a centrifuga, da marca Janetzki TH 12 (FERNANDES *et al.*, 2007).

Depois disso, realizou-se a dosagem da atividade das enzimas que ficaram imobilizadas na magnetita, seguindo o mesmo procedimento da avaliação da enzima livre. Onde foram feitas quatro soluções com 250 µL da solução de amido, 100 µL de tampão e 150 µL da solução enzimática. Foram feitas quatro soluções para enzima imobilizada em 30 min e quatro soluções para enzima imobilizada em 60 min

com adição de 900 µL de ADNS. Para o cálculo da eficiência da imobilização foi usada a seguinte equação:

$$UE \text{ (enzima imobilizada)} \div UE \text{ (enzima livre)}$$

5. RESULTADOS

5.1 SÍNTESE DA MAGNETITA

O procedimento para obter a magnetita sintetizada por coprecipitação foi realizado em meio alcalino aquoso e posteriormente acidificado para finalização do processo que foi feito em meio básico/alcalino, onde resultou num produto em pó, preto e denso que apresenta magnetismo por responder a um campo magnético frente a presença de um ímã, como apresentado na Figura 08.

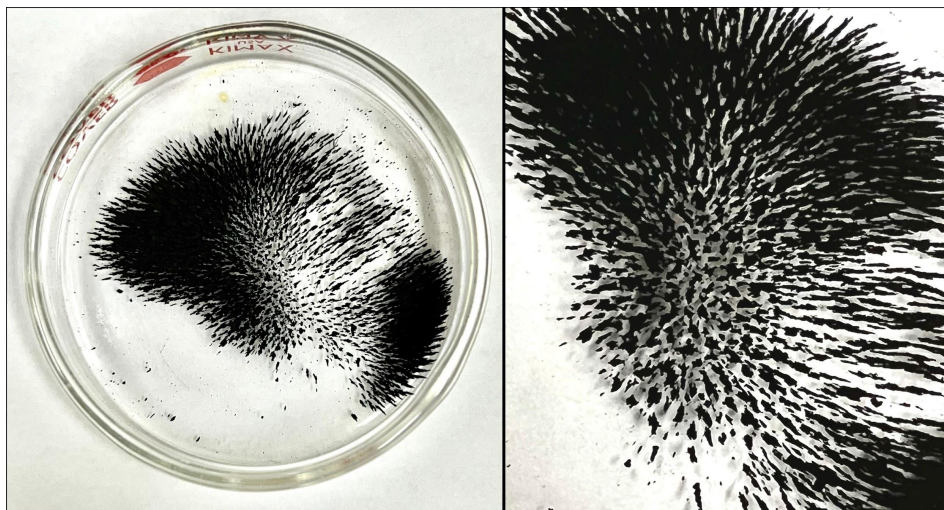


Figura 08 : Magnetita sintetizada

Fonte: PRÓPRIA

Foram realizadas duas sínteses (A e B), onde com o resultado das massas de cada uma delas foi possível calcular os resultados de média e desvio padrão apresentados na Tabela 01.

Tabela 01: Média e desvio padrão da síntese da magnetita

Síntese	Massa (g)
A	0,5986
B	0,3392
Média	0,4689
Desvio Padrão	0,183423499

Fonte: PRÓPRIA

Quanto ao rendimento da reação, foi possível obter 6,14% com os cálculos apresentados em relação aos dados de massa utilizados de sulfato de ferro heptahidratado e os da massa obtida de magnetita em laboratório. O rendimento baixo pode ter ocorrido pelas lavagens no processo de decantação. O que poderia ser resolvido alternativamente utilizando um ímã, já que a magnetita possui atração a um campo magnético. (ESCOBARO *et al.*, 2019).

Com base na reação:



foi possível chegar a um reagente limitante e um em excesso usando as massas molares entre FeSO_4 e o NaNO_3 em relação a massa que foi colocada para reagir onde o sulfato de ferro heptahidratado tem 278,01g/mol (desconsiderando a massa de água da molécula a molaridade encontrada é 152,01g/mol) e o nitrato de sódio tem massa molar de 85g/mol, a massa de nitrato de sódio pode ser encontrada com a seguinte regra de três simples, onde:

$$\begin{array}{ccc} 12\text{FeSO}_4 & \text{-----} & 1\text{NaNO}_3 \\ 12*(152,01\text{g}) & \text{-----} & 85\text{g} \\ 15,2\text{g} & \text{-----} & x \end{array}$$

$x = 0,708\text{g}$ de NaNO_3 são necessários para reagir com 15,2 de FeSO_4 (dos 27,8g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pesados).

$$\begin{array}{ccc} 12*(152,01\text{g}) \text{ FeSO}_4 & \text{---} & 85\text{g NaNO}_3 \\ y & \text{-----} & 0,84\text{g de NaNO}_3 \end{array}$$

$y = 18,2\text{g}$ de FeSO_4 são necessários para reagir com 0,84g de NaNO_3

reagente limitante: FeSO_4
reagente em excesso: NaNO_3

$$0,84\text{g} - 0,708\text{g} = 0,132\text{g} \text{ em excesso de } \text{NaNO}_3$$

Faz-se necessário encontrar a massa formada de magnetita, Fe_3O_4 , onde sua massa molar é 229g/mol, através do reagente limitante encontrado, conforme a proporção da equação da reação global da síntese.

Com:

$$\begin{array}{rcl} 12 \text{ mol de } \text{FeSO}_4 & \text{---} & 4 \text{ mol de } \text{Fe}_3\text{O}_4 \\ 12 \cdot (152,01\text{g}) & \text{-----} & 4 \cdot (229\text{g}) \\ 15,2\text{g} & \text{-----} & m_T \end{array}$$

$$m_T = 7,63\text{g}$$

Onde;

$$\text{Rendimento} = (m_{\text{experimental}} / m_{\text{teórica}}) \cdot 100$$

Logo;

$$\text{Rendimento} = (0,4689\text{g} / 7,63\text{g}) \cdot 100$$

$$\text{Rendimento} = 6,14\%$$

5.2 ATIVIDADE DA α -AMILASE

A realização do ensaio para avaliação da enzima livre foi feita com solução de α -amilase em solução tampão acetato e substrato de amido. Foi adicionado ao ensaio ADNS, ácido 3,5-dinitrosalicílico, para verificação de açúcares redutores na solução.

Para a atividade da enzima livre, foram obtidos os resultados de absorbância mostrados na Tabela 02, e a partir disso foram calculados os demais resultados apresentados da quantidade de açúcares redutores e chegando no valor da medida de atividade enzimática (UE) por cada mL de solução.

Tabela 02: Ensaio da amilase livre

Ensaio para amilase livre						
ABS	[AR] mg/mL	[AR] mmol/mL	[AR] μ mol/mL	[AR] μ mol/mL min	UE/0,15mL	UE/mL
0,388	0,6220581912	0,00345587884	3,45587884	0,172793942	0,172793942	1,151959613
0,492	0,7711193923	0,004283996624	4,283996624	0,2141998312	0,2141998312	1,427998875
0,502	0,7854522001	0,004363623334	4,363623334	0,2181811667	0,2181811667	1,454541111
0,496	0,7768525154	0,004315847308	4,315847308	0,2157923654	0,2157923654	1,438615769
0,555	0,8614160814	0,004785644897	4,785644897	0,2392822448	0,2392822448	1,595214966
0,453	0,7152214419	0,003973452455	3,973452455	0,1986726227	0,1986726227	1,324484152
Média	0,7553533037	0,004196407243	4,196407243	0,2098203621	0,2098203621	1,398802414
Dwsvio Padrão	0,0803046641	0,0004461370228	0,4461370228	0,02230685114	0,02230685114	0,1487123409

Fonte: PRÓPRIA

O cálculo de açúcares redutores (AR) foi realizado com base na equação da curva de reação do ADNS, onde $y = 0,6977x - 0,4601$ e seu $r^2 = 0,9866$. A absorbância lida é o x da equação e através disso é possível encontrar a quantidade de açúcares redutores em mg/mL. Onde esse valor foi dividido pela massa molar da glicose (180g/mol) e posteriormente multiplicada por 1000 para trabalhar na unidade desejada e dividiu-se o resultado encontrado por 20 min para que fosse encontrado o resultado da quantidade de açúcares redutores em 1 min. Para encontrar a atividade da enzima em 1 mL, foi multiplicado o último valor encontrado por 1000 e dividido por 150, para obter-se o valor da atividade enzimática em mol/mL.min.

Para enzima imobilizada em magnetita foram obtidos os cálculos apresentados na Tabela 03, onde é verificada a atividade das enzimas, em relação à quantidade de açúcar redutores medidos em absorbância. Realizou-se duas reações de imobilização em tempos diferentes, uma em 30min e outra em 60min, a fim de verificar a mudança de atividade enzimática.

Tabela 03: Atividade da enzima imobilizada

Enzima Imobilizada (30 min)	ABS (nm)	[AR] mg/mL	[AR] mmol/mL	[AR] mmol/mL min	[AR] μ mol/mL min	Atividade (UE/mL)	Atividade (UE/mL)
A1	0,343	0,5575605561	0,003097558645	0,0001548779323	0,1548779323	0,1548779323	1,032519548
A2	0,371	0,5976924179	0,003320513433	0,0001660256717	0,1660256717	0,1660256717	1,106837811
A3	0,293	0,4858965171	0,002699425095	0,0001349712548	0,1349712548	0,1349712548	0,8998083651
A4	0,3	0,4959294826	0,002755163792	0,0001377581896	0,1377581896	0,1377581896	0,9183879307
	Média	0,5342697434	0,002968165241	0,00009893884138	0,09893884138	0,09893884138	0,6595922759
	DP	0,05283572725	0,0002935318181	0,0000146765909	0,0146765909	0,0146765909	0,09784393935

Enzima Imobilizada (60 min)	ABS (nm)					Atividade (UE/mL)	Atividade (UE/mL)
A1	0,338	0,5503941522	0,00305774529	0,000101924843	0,101924843	0,101924843	0,6794989534
A2	0,328	0,5360613444	0,00297811858	0,00009927061934	0,09927061934	0,09927061934	0,6618041289
A3	0,384	0,6163250681	0,003424028156	0,0001141342719	0,1141342719	0,1141342719	0,7608951458
A4	0,343	0,5575605561	0,003097558645	0,0001032519548	0,1032519548	0,1032519548	0,6883463656
	Média	0,5650852802	0,003139362668	0,0001046454223	0,1046454223	0,1046454223	0,6976361484
	DP	0,03530984482	0,0001961658046	0,000006538860153	0,006538860153	0,006538860153	0,04359240102

Fonte: PRÓPRIA

O ensaio da verificação da imobilização foi mediado por reagente ADNS, onde observou-se ação da enzima na solução ao final do ensaio. Isso mostra que as enzimas estavam imobilizadas na magnetita presente na solução. A Figura 09 mostra à direita os dois ensaios de avaliação da atividade da enzima imobilizada nos tempos de reação de 30 min e 60 min, e a esquerda a enzima livre em substrato ao lado do branco de ADNS (de cor mais clara). Quanto aos cálculos e absorbâncias obtidas, verifica-se que atividade enzimática se estabiliza com o passar do tempo de reação, pois mesmo apresentando aumento em relação ao tempo de reação o desvio padrão não mostra que haja uma provável diferença estatística significativa onde a média de atividade em 30 min é aproximadamente 0,66 UE/mL e em 60min essa atividade aumenta um pouco para aproximadamente 0,70 UE/mL, com desvio padrão de respectivamente 0,0098 e 0,0043 para 30 min e 60 min de imobilização enzimática.(FERNANDES *et al.*, 2007).

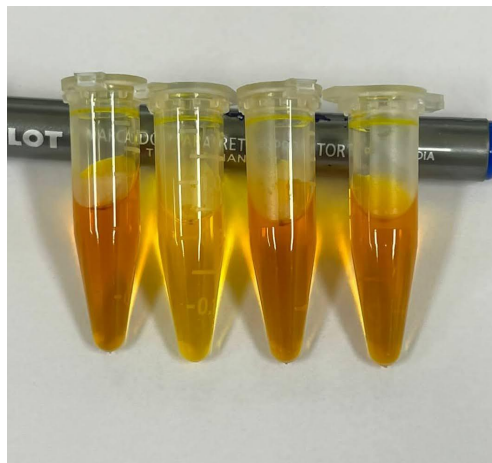


Figura 09: Indicação de açúcar redutor pelo ADNS

Fonte: PRÓPRIA

O QUADRO 03 apresenta resultados de eficiência das reações das enzimas imobilizadas em 30 min e 60 min, onde esse cálculo é feito dividindo a média da atividade da enzima imobilizada pela média da atividade a enzima livre, onde foram utilizados os dados da Tabela 02 e Tabela 03. Em relação aos resultados, é possível observar que há pouca diferença e com o passar do tempo a eficiência da reação enzimática aumenta de 47% em 30min para quase 50% em 60min.

QUADRO 03: EFICIÊNCIA DA ENZIMA IMOBILIZADA

Tempo de reação (min)	Eficiência (%)
30	47,15407045
60	49,87381644

Fonte: PRÓPRIA

Juntamente com os resultados da enzima livre, discutidos anteriormente, essa pouca diferença reflete pelo fato de a enzima se estabilizar frente ao decorrer do tempo de reação através da imobilização da proteína. Sua eficiência começa atingir um valor fixo máximo onde consegue hidrolisar o substrato (PEREIRA; FERNANDES E WHOA, 2017).

6. CONCLUSÃO

A magnetita pode fornecer interações moleculares capazes de reter uma molécula enzimática. Sua característica magnética fornece ainda mais intensidade de interações entre as moléculas. Este trabalho mostra o sucesso da síntese da magnetita com um rendimento de 6,14% pelo método de coprecipitação utilizado. Bem como, também, que a magnetita, mesmo não funcionalizada, consegue gerar um suporte capaz de imobilizar a α -amilase pela metodologia de adsorção, mantendo sua atividade biocatalítica em dois tempos distintos de reação, 30min e 60min.

Como uma ferramenta importante para a estabilização enzimática, a imobilização da α -amilase se mostra com uma boa eficiência nos parâmetros avaliados nesse estudo e com bastante aplicabilidades. Onde cabe também estudos posteriores para as técnicas utilizadas, como melhoramento analítico para síntese da magnetita, avaliação da atividade da enzima em vários limites de tempo reacionais diferentes, ou até mesmo um aplicação da α -amilase imobilizada nas condições apresentadas neste estudo.

Com os objetivos deste trabalho atendidos com sucesso, efetivando a síntese da magnetita como partícula suporte e a avaliação da imobilização enzimática da α -amilase, a contribuição para estudos tecnológicos posteriores fica estabelecida.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, M.A.A. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA MAGNETITA OBTIDA A PARTIR DE REJEITO DE BAUXITA DA MINA DE JURUTI, PARÁ, BRASIL**. Santarém, Pará, 2017. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia). Universidade Federal do Oeste do Pará.

Araújo, A.F.;Sousa G.H; Araújo, G.V;Santos I.C;Fernandes, L.R. **SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA POR COPRECIPITAÇÃO**, In:74º Congresso Anual da ABM, São Paulo, 2019.

Carvalho, M. B. de P. **DETERMINAÇÃO DE MAGNETITA RESIDUAL EM CONCENTRADO DE MINÉRIO DE FERRO A PARTIR DE TRATAMENTO DE IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA**. Ouro Preto-SP, 2021. TCC (Geologia) - Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto.

Dantas, A.P.S; Vanderlei, R.M; Marconcini, J.M; Paris E.C. **SÍNTESE E PROPRIEDADES ÓTICAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO PRODUZIDAS POR COPRECIPITAÇÃO E HIDROTERMAL**, p 579-582. In: Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária, São Paulo,2019.

Escobar, A. M. Pizzioa, Luis R. Romanelli, Gustavo P. **CATALIZADORES MAGNÉTICOS BASADOS EN ÓXIDO DE HIERRO: SÍNTESIS, PROPIEDADES Y APLICACIONES**. Ciencia en Desarrollo, Vol. 10 No. 1. ISSN 0121 - 7488 - Enero a Junio de 2019. DOI: <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n1.2019.88111>.

FARIAS, M.Y.V. **IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS VISANDO A APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES**. Fortaleza-CE, 2017. TCC (Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará.

FERNANDES L.P.; ULHOA, C.J.; ASQUIERI,E.R.; MONTEIRO,V.N., **PRODUÇÃO DE AMILASES PELO FUNGO *MACROPHOMINA PHASEOLINA***, Revista Eletrônica de Farmácia, vol. IV, p. 43-45; 2007.

Fernandes, K. F., S. Lima, C. & M. Lopes, F. **TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS**. Revista Processos Químicos - Junho de 2010, Artigo 4.

Fernandes, K.F. Lima, C.S. Lopes, F.M. Collins, C.H. **PROPERTIES OF HORSE RADISH PEROXIDASE IMMOBILIZED ONTO POLYANILINE**. Elsevier Ltd. Process Biochemistry 39 (2004) 957–962. Junho, 2003.

Furlani, I. L. Amaral, B. S. Oliveira, R. V. Cass, Q. B. **IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: CONCEITO E EFEITOS NA PROTEÓLISE**. Quim. Nova, Vol. 43, No. 4, 463-473, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170525>.

GARCIA, M. B. F. **IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MATERIAIS NANOESTRUTURADOS: ATIVIDADE, ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DA PEROXIDASE IMOBILIZADA EM BICAMADAS LIPÍDICAS E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**. Florianópolis, 2010. Tese (Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Koblitz, M.G.B., **Bioquímica de Alimentos- Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro, RJ. Editora LAB, 2008.

Majadi S.; Sehrig F. Z.; Farkhani S. M.; Golougeh M. S.; Akbarzadeh A. **CURRENT METHODS FOR SYNTHESIS OF MAGNETIC NANOPARTICLES**, In: Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology - Biotechnology, 44:2, 722-734, (2016) DOI:10.3109/21691401.2014.982802.

Mendes, A. A. Castro, P. C. De Oliveira H. F. De Giordano, R. L. C. **APLICAÇÃO DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL**. Quim. Nova, Vol. 34, No. 5, 831-840, 2011.

PANTA P. C. **OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO POR COPRECIPITAÇÃO, SUA ESTABILIZAÇÃO COM SURFACTANTES E CARACTERIZAÇÃO QUANTO À MORFOLOGIA, CRISTALINIDADE E COMPORTAMENTO MAGNÉTICO**. Porto Alegre, 2013. Tese (Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pereira, S.E. Fernandes, K.F. Ulhoa C.J. **IMMOBILIZATION OF *CRYPTOCOCCUS FLAVUS* α -AMYLASE ON GLASS TUBES AND ITS APPLICATION IN STARCH HYDROLYSIS** (2017) 1-8. DOI 10.1002/star.201600189. www.starch-journal.com.

Poondla, V. Yannam S. K. Gummadi S. N. Subramanyam R. Obulam V. S. R. **ENHANCED PRODUCTION OF PECTINASE BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ISOLATE USING FRUIT AND AGRO-INDUSTRIAL WASTES: IT'S APPLICATION IN FRUIT AND FIBER PROCESSING.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 6 (2016) 40–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.007> .1878-8181/& 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

De Paoli, L. **Bier** **wordpress-Rotenfuss** **Bier.** Disponível em: <https://rotenfussbier.wordpress.com/2012/09/24/alfa-e-beta-amilase/#:~:text=S%C3%A3o%20a%20alfa%20e%20a,for%20favorecida%20durante%20a%20mostura>.

Ramos V.C; Michelotti M.A.M; Pinto E.M; Kinoshita A. **EFEITO DA TEMPERATURA NO PROCESSO DE COPRECIPITAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**, p 356-371. In: Revista Hipótese, Itapetininga, v.5, n.1, 2019. ISSN: 2446-7154.

Scapim L. C. M; S. B. Borges; De Paula J. N; Ferreira L. P; Almeida P. R. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMAGNETITA PELO PROCESSO DE COPRECIPITAÇÃO**, In: The Journal of Engineering and Exact Sciences - JCEC vol.03,n. 08, 2017,doi: 10.18540/jcecvl3iss8pp1182-1191;ISSN: 2527-1075.

Silva, L. A. de F. Carvalho, S. A. de F. Florêncio D. Alves, M. F. Silva, N. L. T. Gomes, J. R. Santos, K. S. **PRODUÇÃO DE AMILASE POR FUNGO FILAMENTOSO ENDOFÍTICO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.** Cad. Ciências. Agrárias., v. 9, n. 3, supl. 1, p. 49–53, 2017 - ISSN 2447-6218.

SOUZA, L. T. de A. VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M. RESENDE, R. MENDES, A. A.; **"IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE"**, p. 529 -568. In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4, Cap 15. São Paulo: Blucher, 2017. ISBN: 9788521211150, DOI 10.5151/9788521211150-15.

VASCONCELOS, M.C.V. **SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO E DE ESTRUTURAS HÍBRIDAS COM GRAFENO.** São Paulo, 2019. TCC (Engenharia de Materiais) - Universidade de São Paulo.

