

IMOBILIZAÇÃO DE AMILASES EM MATRIZES 3D

Ana Vitória M. Cunha¹; Vivian M. Benassi¹; Marcio Schimiele¹; João Pedro A. Souza¹; Ranieri R. Lima¹; Tarcísio Michael F. S. de Oliveira¹.

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

moreira.cunha@ufvjm.edu.br

Palavras-Chave: Alginato de sódio, Impressão 3D, Biocatalisadores.

1 INTRODUÇÃO

As amilases são enzimas de grande importância industrial, responsáveis pela degradação do amido em açúcares menores, como maltose e glicose. Elas são produzidas por diversas fontes, incluindo microrganismos, como *Aspergillus* e *Bacillus*, plantas e animais, sendo amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, bebidas, detergentes, papel e celulose, além de desempenharem papel crucial na produção de biocombustíveis. A relevância econômica das amilases é notável, uma vez que permitem processos mais eficientes e a conversão de biomassa em produtos de alto valor agregado. Além disso, sua utilização contribui para a redução do consumo energético e de produtos químicos em processos industriais, trazendo benefícios ambientais significativos (HUSSAIN *et al.*, 2017).

No entanto, a aplicação das amilases na forma livre apresenta limitações importantes. Sua atividade pode ser significativamente afetada por variações de pH, temperatura e presença de inibidores, comuns em processos industriais. Além disso, a enzima livre sofre perda gradual de funcionalidade ao longo do tempo, tornando-se instável durante processos prolongados, e a recuperação para a reutilização é complicada, o que encarece e dificulta a viabilidade econômica do processo (HUSSAIN *et al.*, 2017).

Uma estratégia eficiente para contornar essas limitações é a imobilização enzimática, que consiste em aprisionar a enzima em uma matriz insolúvel. Esse aprisionamento protege a enzima, aumenta sua estabilidade frente a variações ambientais, facilita a recuperação e possibilita múltiplos usos sem perda significativa de atividade. Diversos métodos de imobilização podem ser aplicados, incluindo adsorção, ligação covalente e encapsulamento, sendo o alginato de sódio um dos materiais mais utilizados para esse fim. Ele se destaca por ser de baixo custo, abundante, biocompatível, não tóxico e de fácil manipulação (ZARUBIN *et al.*, 2015).

O alginato é um polissacarídeo natural extraído de algas marrons formado por unidades de β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico, unidas por ligações 1-4 glicosídicas. Em contato com íons cálcio forma uma rede tridimensional estável, na qual os íons Ca^{2+} interagem com as cadeias de ácido gulurônico, conferindo rigidez mecânica e resistência à matriz. Essa estrutura permite a entrada de substratos e a saída de produtos, enquanto mantém a enzima protegida e funcional por períodos mais longos (MÜLLER, SANTOS, BRIGIDO, 2011). Além disso, propriedades como viscosidade, porosidade e densidade da matriz influenciam diretamente a difusão de moléculas e a eficiência catalítica, sendo fatores importantes a serem controlados.

Para aumentar o controle sobre a geometria e as propriedades da matriz de alginato, este trabalho propõe a utilização da impressão 3D, uma tecnologia que permite criar estruturas tridimensionais com precisão, variando parâmetros como diâmetro de bicos, número de camadas e distribuição de poros. Essa abordagem possibilita ajustar a difusão de substratos, a estabilidade mecânica e a acessibilidade da enzima dentro da matriz, permitindo o desenvolvimento de biocatalisadores mais eficientes, customizáveis e potencialmente sustentáveis (SHAO; LIAO; GAO, 2022).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da imobilização da amilase microbiana produzida por *Aspergillus* sp. C333 em matrizes de alginato de sódio

produzidas por impressão 3D, investigando como diferentes configurações estruturais podem interferir na atividade enzimática.

2 METODOLOGIA

2.1 Preparação do gel de alginato de sódio

O gel de alginato de sódio foi preparado de acordo com Bickerstaff (1997). Inicialmente, dissolveram-se 0,4 g de alginato de sódio em 10 mL do extrato bruto rico em amilases. A mistura foi cuidadosamente agitada, garantindo a distribuição uniforme da enzima em toda a matriz polimérica. Paralelamente, preparou-se uma solução aquosa de cloreto de cálcio a 4% (m/v), que atuará como agente de reticulação do gel.

2.2 Impressão 3D das amilases em matriz polimérica de alginato

A solução de alginato de sódio contendo a enzima foi transferida para uma seringa plástica de 10 mL, acoplada a impressora 3D. A impressão foi realizada com geometria circular, utilizando três bicos plásticos com ponteira metálica, diferenciados por cores e diâmetros, sendo esses: cor laranja com diâmetro interno 0,34 mm e externo 0,64 mm; cor azul com diâmetro interno 0,42 mm e externo 0,72 mm e cor roxo com diâmetro interno 0,52 mm e externo 0,82 mm (Figura 1).

Figura 1- Imagem dos bicos de extrusão da impressora 3D.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Cada bico foi impresso três vezes em diferentes condições de camadas: 5, 10 e 20. O software *Bioscaffolds* foi utilizado para definir os parâmetros de impressão e gerar o código *G-code*, posteriormente executado via *Repetier* conectado à impressora 3D. Após a impressão, as amostras foram cuidadosamente transferidas para um recipiente e mergulhadas em solução de CaCl₂ por 30 minutos.

2.3 Dosagem da atividade amilolítica pelo método sacarificante

Para realizar a dosagem das amilases imobilizadas impressas, os derivados imobilizados foram lavados com água destilada, escorridos e transferidos para um béquer contendo 5 mL do substrato amido 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 100 mM pH 4,8 e levados em banho-maria à 50 °C, durante 10 minutos.

Decorrido o tempo de incubação, alíquotas de 50 µL foram retirados e transferidos para tubos de ensaio contendo o mesmo volume do ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS), que foram então fervidos por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados, e acrescentado 500 µL de água destilada e homogeneizados. O branco da reação consistiu na retirada da alíquota de 50 µL no tempo zero, ou seja, antes da inserção em banho-maria, representando a não hidrólise das amilases imobilizadas.

A leitura das absorbâncias foi realizada à 540 nm em leitor de microplacas Loccus LMR-96. A concentração de açúcares redutores foi determinada pela curva padrão de glicose (0–0,05 mg/mL), com $R^2 \geq 0,98$. A atividade enzimática foi expressa em U conforme a equação a seguir:

$$\text{Atividade Amilolítica (U)} = ABS (\text{nm}) \cdot \frac{1}{t(\text{min})} \cdot \frac{1}{f (\text{nm}/\mu\text{mol})}$$

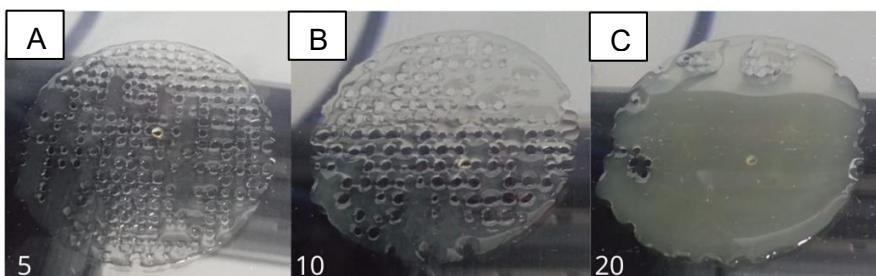
Sendo ABS a absorbância, t o tempo de reação (min.), f o fator de conversão do DNS (nm/ μmol). Uma unidade (U) correspondeu a liberação de 1 μmol de açúcares redutores por minuto nas condições descritas de reação.

3 Resultados e Discussão

3.1 Imobilização das amilases utilizando distintos bicos de extrusão

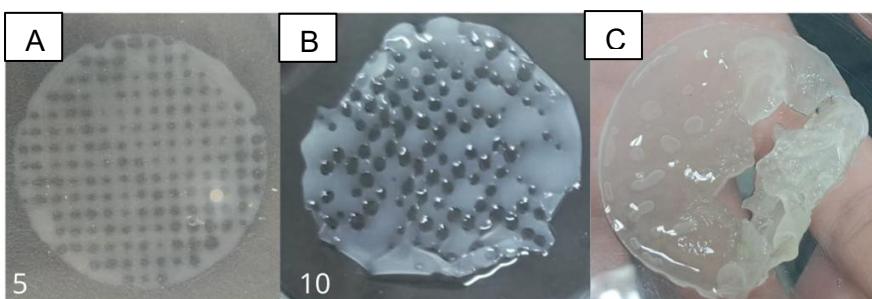
O bico laranja apresenta diâmetro interno de 0,34 mm e externo de 0,64 mm. Esse tamanho define o volume de gel depositado em cada camada, podendo influenciar a firmeza da estrutura e a uniformidade da reação enzimática. Ao observar a Figura 2, pode-se verificar o formato dos derivados imobilizados impressos pelo bico laranja em 5, 10 e 20 camadas, respectivamente, após a impressão. Enquanto que a Figura 2 apresentou as mesmas amostras após 30 minutos de contato com o cloreto de cálcio.

Figura 2. Imagem representativa dos derivados imobilizados impressos em impressora 3D utilizando bico de extrusão de cor laranja. (A) 5 camadas, (B) 10 camadas e (C) 20 camadas.



Fonte: Autoria própria, 2025

Figura 3. Imagem representativa dos derivados imobilizados impressos em impressora 3D utilizando bico de extrusão de cor laranja após a inserção em solução de cloreto de cálcio. (A) 5 camadas, (B) 10 camadas e (C) 20 camadas.



Fonte: Autoria própria, 2025

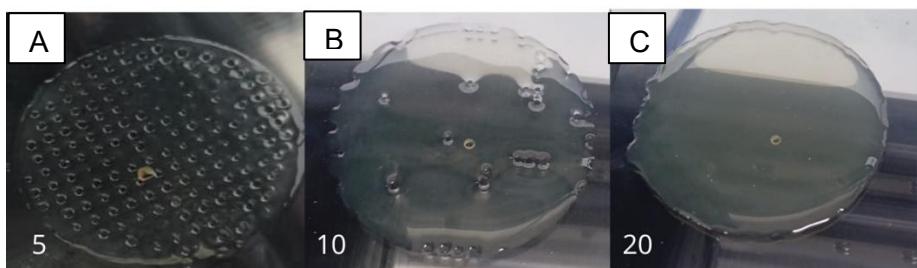
A partir dos resultados obtidos, observou-se que as camadas de 5 e 10 praticamente não sofreram deformações após a inserção das mesmas nas soluções de cloreto de cálcio, mantendo a forma original, enquanto que o derivado imobilizado impresso com 20 camadas apresentaram retracções significativas (Figura 3).

Ao analisar a atividade dos derivados imobilizados após impressão e inserção em solução de cloreto de cálcio, verificou que o derivado com 5 camadas obteve uma atividade de 0,076 U, 10 camadas com 0,039 U e com 20 camadas com 0,129 U. O bico laranja apresentou um comportamento bastante heterogêneo entre os derivados impressos.

Ao analisar a impressão em bico azul com diâmetro interno de 0,42 mm e externo de 0,72 mm. O maior volume de gel depositado neste bico tendeu a aumentar a rigidez da estrutura, mas também pode tornar a superfície mais suscetível a deformações em camadas mais espessas.

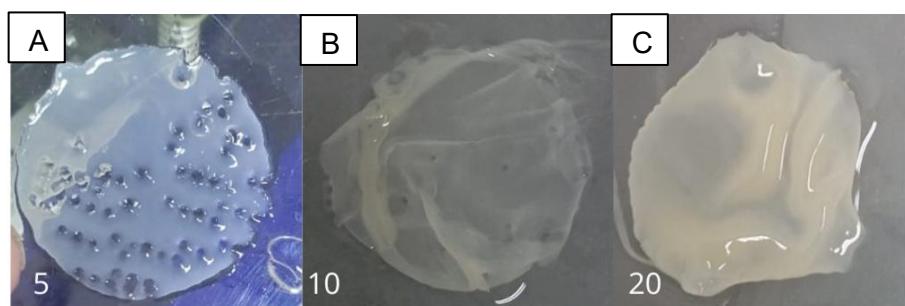
A Figura 4 apresentou os derivados imobilizados impressos com o bico azul em 5, 10 e 20 camadas, logo após a impressão. Enquanto que a Figura 5 apresentou as mesmas amostras após 30 minutos de contato com o cloreto de cálcio.

Figura 4. Imagem representativa dos derivados imobilizados impressos em impressora 3D utilizando bico de extrusão de cor azul. (A) 5 camadas, (B) 10 camadas e (C) 20 camadas.



Fonte: Autoria própria, 2025

Figura 5. Imagem representativa dos derivados imobilizados impressos em impressora 3D utilizando bico de extrusão de cor laranja após a inserção em solução de cloreto de cálcio. (A) 5 camadas, (B) 10 camadas e (C) 20 camadas.

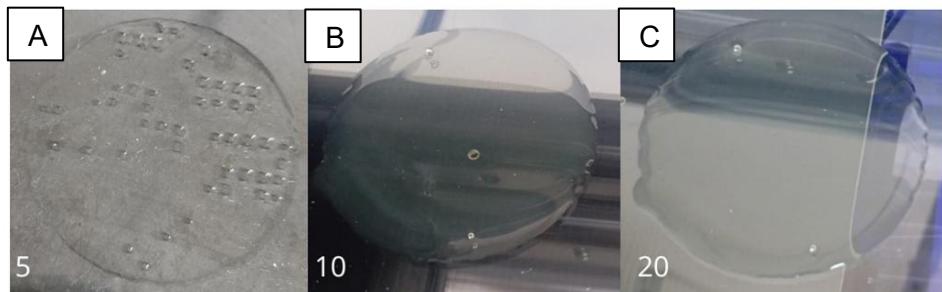


Fonte: Autoria própria, 2025

Pode-se observar que o derivado impresso em bico azul com 5 camadas praticamente não sofreu deformação após a inserção em solução de cloreto de cálcio, enquanto as de 10 e 20 camadas exibiram retracções mais acentuadas (Figura 4). Em relação à atividade amilolítica dos derivados imobilizados, pode-se observar que a que possuiu 5 camadas obteve 0,092 U, com 10 camadas 0,097 U e com 20 camadas 0,048 U.

Ao analisar a impressão dos géis utilizando o bico roxo com diâmetro interno de 0,52 mm e externo de 0,82 mm, pode-se verificar na Figura 6 o formato dos derivados imobilizados com 5, 10 e 20 camadas, logo após a impressão e na Figura 7 os mesmos derivados após 30 minutos de contato com o cloreto de cálcio.

Figura 6. Amostras do bico roxo impressas em 5, 10 e 20 camadas imediatamente após a impressão.



Fonte: Autoria própria, 2025

Figura 7. Amostras do bico roxo após 30 minutos de contato com cloreto de cálcio.



Fonte: Autoria própria, 2025

Ao analisar as Figuras 5 e 6, observou-se que os derivados impressos com 5 e 10 camadas praticamente não sofreram deformações após a inclusão em solução de cloreto de cálcio, enquanto a de 20 camadas apresentou retracções visíveis. Ao analisar a atividade amilolítica dos impressos, verificou-se que a extrusão com 5 camadas obteve uma atividade de 0,092 U, com 10 camadas 0,097 U e com 20 camadas 0,048 U.

Ao analisar todos os derivados imobilizados, observou-se que o derivado impresso que manteve mais atividade enzimática foi o extrusado com bico laranja com 20 camadas. Entretanto, vale ressaltar que são necessários estudos mais detalhados de impressão e análise de outros parâmetros para a padronização do processo de imobilização via impressora 3D para obtenção de um derivado com atividade amilolítica significativa.

4 CONCLUSÃO

A análise do efeito do diâmetro dos bicos e do número de camadas sobre a impressão 3D de matrizes de alginato com amilases imobilizadas mostrou eficiência ao se obter derivados com atividade enzimática. Observou-se que o bico laranja, de menor diâmetro, manteve boa forma nas camadas finas, mas apresentou retracções importantes nas 20 camadas, sendo a extrusão com maior atividade enzimática.

De modo geral, os resultados mostraram que o tamanho do bico e o número de camadas são fatores determinantes para a integridade das estruturas impressas e para o desempenho da enzima. Ajustar esses parâmetros é, portanto, fundamental para otimizar a imobilização enzimática em matrizes 3D, conciliando estabilidade física e funcionalidade biológica.

AGRADECIMENTOS

À UFVJM, ao ICT e ao LMEDP pelo suporte institucional, e ao CNPq, à FAPEMIG e à CAPES Código de Financiamento 001 pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

HUSSAIN, Z. et al. Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 11, p. 252-260, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28438682/>. Acesso em: 25 set. 2025.

RAHMAN, R. N. Z. R. A. et al. Immobilization of commercial inulinase on alginate–chitosan beads. *Sustainable Chemical Processes*, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2013. Disponível em: <https://sustainablechemicalprocesses.springeropen.com/articles/10.1186/2043-7129-2-13>. Acesso em: 25 set. 2025.

NADEEM, M. et al. Kinetics of fungal extracellular α -amylase from *Fusarium solani* immobilized in calcium alginate beads. *Journal of Animal and Plant Sciences*, v. 25, n. 2, p. 475-482, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23741795/>. Acesso em: 25 set. 2025.

HAO, Y.; LIAO, Z.; GAO, B. Estratégias emergentes de impressão 3D para imobilização de enzimas: materiais, métodos e aplicações. *ACS Omega*, v. 7, n. 13, p. 10877-10888, 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c00357>. Acesso em: 25 set. 2025.