



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

**IMOBILIZAÇÃO DE α -AMILASE EM BLENDA DE
PECTINA-PVA**

MAURÍCIO VICENTE CRUZ

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Samantha Salomão
Caramori.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Kátia Flávia
Fernandes

Anápolis-GO

Julho 2013

MAURÍCIO VICENTE CRUZ

**IMOBILIZAÇÃO DE α -AMILASE EM BLENDA DE
PECTINA-PVA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências moleculares da Universidade Estadual de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares na área de concentração de Química Orgânica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samantha Salomão Caramori.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes

Anápolis-GO

Julho 2013

IMOBILIZAÇÃO DE α -AMILASE EM BLENDA DE PECTINA-PVA

MAURÍCIO VICENTE CRUZ

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:

Profa. Dra. Samantha Salomão Caramori (UEG)

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)

Profa. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira (UFG)

ANÁPOLIS, GO – BRASIL

JULHO 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta conquista! Certamente não teria conseguido sem a sua presença ao meu lado em todos os instantes. Aos meus amigos Danilo, Weslany, Caroline (minha irmãzinha) e Marcos. Parceiros que compartilharam a mesma experiência e que com sua amizade foram capazes de amenizar os sofrimentos nos momentos difíceis.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa; e à Universidade Estadual de Goiás por me proporcionar mais uma fascinante experiência intelectual. Aos membros da banca, por terem aceitado o convite de participarem da avaliação deste trabalho. À Ediléia por sempre prestar um atendimento gentil e eficiente.

Ao Prof. Reginaldo e à Cristine por gentilmente disponibilizarem o Laboratório de Fisiologia da Digestão para realização dos testes de digestibilidade in vitro.

Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas, onde este trabalho foi desenvolvido, sinto-me honrado em ter integrado esta sensacional equipe de pesquisadores. Vocês fizeram uma grande diferença na minha vida!

Carinhosamente agradeço à minha orientadora Profa. Samantha por todo incentivo e apoio fornecido durante a realização deste trabalho e à minha co-orientadora Profa. Kátia, por acreditar no meu potencial e acima de tudo, por apresentar-me o universo científico como uma experiência deslumbrante na tentativa de se obter informações sobre o desconhecido.

A todos o meu obrigado!

“Porque o Senhor dá a sabedoria; da sua boca é que vem o conhecimento e o entendimento”. Provérbios 2:6.

*Dedico este trabalho àqueles cujas vidas
são para mim exemplos de humildade
perseverança e amor incondicional; meus
pais José Vicente Cruz e Maria Aldenir
Cruz.*

RESUMO

As enzimas apresentam diversas características que as colocam em vantagem em relação aos catalisadores químicos convencionais. Entretanto, a sua utilização é limitada pelas condições reacionais a que são submetidas. As técnicas de imobilização de enzimas surgem neste contexto como uma alternativa que possibilitam melhorar as características cinéticas das enzimas frente a estas possíveis variações no ambiente reacional. Os polissacarídeos naturais são candidatos promissores como suportes para imobilização de enzimas, principalmente devido à sua biodegradabilidade. Dentre os polissacarídeos naturais, a pectina destaca-se pela capacidade de formação de géis, bem como pela formação de estruturas para liberação controlada de substâncias químicas. Neste trabalho foram produzidas e caracterizadas blendas de pectina e álcool polivinílico contendo a α -amilase comercial Termamyl[®] imobilizada por aprisionamento na rede dos polímeros reticulada em diferentes concentrações de glutaraldeído (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25%). Uma parte dos materiais foi cortada em formato de pastilhas de 6 mm de diâmetro e a outra parte foi triturada, sendo a atividade enzimática inicial testada posteriormente. Foram realizados testes para avaliar o efeito do agente reticulante sobre a atividade da enzima imobilizada e a taxa de liberação da enzima ao longo de 24 h. Avaliou-se a solubilidade dos materiais em água (pH 5,7), em solução de ácido clorídrico 0,2 mol L⁻¹ (pH 2,0), em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) e em solução de tamponamento ruminal (pH 7,0). Os materiais foram testados quanto a sua resistência a tração (TS) e porcentagem de alongação. A blenda produzida na concentração de glutaraldeído de 0,5% foi incubada na presença de líquido ruminal bovino durante 24 e 48 h, para avaliação da perda de massa e da capacidade de retenção da atividade enzimática. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as blendas apresentam uma superfície bastante irregular e

rugosa e a atividade enzimática para o material particulado foi maior do que a atividade no material no formato de pastilhas. O sistema pectina/PVA/amilase apresentou maior solubilidade em pH 6,5. O teste de resistência à tração mostrou que a blenda produzida com a maior concentração de glutaraldeído (1,25%) possui maior resistência dentre as demais, suportando uma carga máxima de 0,69 kgf e uma porcentagem de alongação de 24,22%. A variação na concentração de glutaraldeído parece não exercer efeito sobre a atividade de amilase aprisionada, mas sim na taxa de liberação da enzima. A blenda produzida na concentração de glutaraldeído de 0,25% apresentou maior capacidade de liberação da enzima com uma atividade de 0,07 UE após 24 h de incubação. Os ensaios em líquido ruminal demonstraram que o material apresenta uma perda de massa de aproximadamente 80% após 24 e 48 h de incubação e uma atividade enzimática de 0,021 e 0,099 UE/ mg de material após 24 e 48 h, respectivamente. Nos reatores de hidrólise contínua de amido em ambiente ruminal bovino observou-se que a blenda confeccionada na concentração de 1,25% demonstrou melhor desempenho quanto à capacidade de liberação contínua da α -amilase, resultando em uma atividade enzimática considerável mesmo após 36 h de incubação. O teor de amido remanescente nos reatores foi menor (0,81 mg/ mL) no reator onde se obteve a maior taxa de hidrólise (blenda com 1,25% de glutaraldeído) e maior (2,19 mg/ mL) no reator em que se constatou a menor taxa de hidrólise mediante a ação da blenda com 0,25% do agente reticulante.

Palavras-chave: aprisionamento, Termamyl[®], pectina, glutaraldeído.

ABSTRACT

Enzymes have several characteristics in advantage to the conventional chemical catalysts. However, their use is limited by reaction conditions and, in this context, the enzyme immobilization arise improving the kinetic characteristics in the reaction environment. Natural polysaccharides are promising candidates as supports for enzyme immobilization, especially due to their biodegradability. Among the natural polysaccharides, pectin is distinguished by the ability to form gels, as well as the formation of structures for chemical-delivery systems. In this work were produced and characterized blends of polyvinyl alcohol and pectin containing the α -amylase Termamyl[®] immobilized by entrapment using crosslinked polymers in different glutaraldehyde concentrations (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25%). Part of the material was cut in pellets 6 mm in diameter and the other was crushed, followed by the measurement of the amylase activity. The effect of crosslinking agent on the activity of the immobilized enzyme and on the rate of enzyme released was tested for over 24 h. It was also evaluated the solubility of the material in water (pH 5.7) in a 0.2 mol L⁻¹ hydrochloric acid (pH 2.0), 0.1 mol L⁻¹ sodium phosphate buffer (pH 6.5) and ruminal buffering solution (pH 7.0). The materials were tested for their tensile strength (TS) and percentage of elongation. The blend produced in 0.5% glutaraldehyde was incubated in the presence of bovine rumen fluid for 24 h and 48 h to evaluate the mass loss and the amylase-delivery capacity. The scanning electron microscopy showed that the blends have a very irregular and rough surface. The activity of the powder pectin/PVA/amylase was higher than in the material in pellet form. The system pectin / PVA / amylase had higher solubility at pH 6.5. Testing of the tensile strength showed that the blend produced with the highest concentration of glutaraldehyde (1.25%) has greater resistance among the

other, supporting a maximum load of 0.69 kgf and elongation of 24.22%. Apparently, variations in the concentration of glutaraldehyde does not have any effect on the activity of the entrapped amylase. In enzyme-delivery assays, the blend produced using 0.25% glutaraldehyde showed a higher capacity to release the enzyme with an activity of 0.07 EU after 24 h of incubation. Tests in rumen fluid demonstrated that the material has a mass loss of approximately 80% after 24 and 48 h of incubation and enzyme activity of 0.021 and 0.099 EU / mg of material after 24 and 48 h, respectively. Reactors in continuous hydrolysis of starch in the rumen cattle was observed that the blend prepared at a concentration of 1.25% showed better performance regarding the ability of continuous release of α -amylase, resulting in a considerable enzymatic activity even after 36 h of incubation. The starch remaining in the reactors was lower (0.81 mg / mL) in the reactor where it had the highest rate of hydrolysis (blend with 1.25% glutaraldehyde) and higher (2.19 mg / mL) in the reactor found that the lowest rate of hydrolysis by the action of the blends with 0.25% of the crosslinking agent.

Keywords: entrapment, Termamyl[®], pectin, glutaraldehyde.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido poli(galacturônico). (<i>Software: ACD/ ChemStech FREEWARE</i>).....	9
Figura 2. Frutos de lobeira (<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil).....	10
Figura 3. Saponificação do poli(acetato de vinila) produzindo poli(álcool vinílico) e éster acetato de metila. (<i>Software: ACD/ ChemStetch FREEWARE</i>)12	
Figura 4. Desenho esquemático do abdome bovino. A) – Saco dorssal da parede ruminal. b) – Pilar ruminal ventral. c) – Transição ruminirreticular/ suco reticular. d) – Saco reticular. e) – Saco omasal. f) – Lâminas do omaso e g) – Abomaso (TEIXEIRA et al., 1998)	14
Figura 5. Esquema ilustrativo do experimento descrito nos itens 3.3.3 e 3.3.4. A) – Coleta do líquido ruminal. B) – Homogeneização. C) – suprimento de CO ₂ . D) – Filtração. E) – Adição no jarro digestor e F) – Material pronto para ser incubado. (<i>In Vitro</i> True Digestibility using the DAISY Incubbator AKOM Technology - 03/05).....	31
Figura 6. Formação da estrutura proposta para a blenda pectina/glutaraldeído/PVA	37
Figura 7. Blenda de pectina/PVA/amilase. A) – formato de pastilha e B) – pulverizado.	39
Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura das blendas de pectina/PVA. AS AMOSTRAS 1; 2; 3; 4 e 5 referem-se às blendas produzidas nas concentrações de glutaraldeído de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25%, respectivamente.	40
Figura 9. Solubilidade das blendas de pectina/PVA/amilase em diferentes condições de pH. As letras distintas sobre as barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	42

Figura10. Atividade inicial das blendas de pectina/PVA/amilase em diferentes concentrações de glutaraldeído. As letras sobre as barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	44
Figura 11. Estimativa da atividade específica nas blendas de pectina/PVA/amilase em diferentes concentrações de glutaraldeído. As letras distintas sobre as barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	45
Figura 12. Atividade nas blendas de pectina/PVA/amilase após tratamento com a solução ácida. As letras distintas sobre as barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	46
Figura 13. Potencial hidrolítico das blendas de pectina-PVA ao longo de 48 h de incubação na presença do líquido ruminal bovino.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa e concentração dos reagentes utilizados para o preparo da solução A.....	28
Tabela 2. Massa e concentração dos reagentes utilizados para o preparo da solução B.....	29
Tabela 3. Resistência à tração e porcentagem de alongação.....	41
Tabela 4 Atividade da α -amilase (UE) nas blendas de pectina/PVA/amilase obtidas nos ensaios realizados ao longo de 24 h.....	48
Tabela 5. Avaliação da perda de massa da blenda de pectina/PVA/amilase após a incubação com o líquido ruminal.	50
Tabela 6. Atividade da α -amilase após 24 e 48 h de incubação da blenda com o líquido ruminal.	51
Tabela 7. Concentração de amido remanescente constatada nos reatores após 48 h incubação com o líquido ruminal bovino.....	55

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – α - AMILASES (<i>E.C 3.2.1.1</i>)	1
1.1.1 – Termamyl® 120 L.....	3
1.1.2 – Imobilização de α -amilases	4
1.2 – PECTINA DE LOBEIRA (<i>Solanum lycocarpum St. Hil</i>).....	7
1.3 – α -AMILASE NA DIGESTÃO EM RUMINANTES	13
2 – OBJETIVOS.....	20
2.1 – OBJETIVO GERAL	20
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 – METODOLOGIA.....	21
3.1 – α -AMILASE	21
3.2 – EXTRAÇÃO DA PECTINA DE LOBEIRA	21
3.3 – SÍNTESE DAS BLENDA DE PECTINA/PVA E IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE.....	22
3.4 – ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA.....	23
3.5 – ESTIMATIVA DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	24
3.6 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E PORCENTAGEM DE ENLONGAÇÃO.....	25
3.7 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A SOLUBILIDADE DAS BLENDA.....	25
3.8 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE ATIVIDADE E LIBERAÇÃO DA α -AMILASE IMOBILIZADA	26

3.9 – ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE IN VITRO do SISTEMA PECTINA/PVA/AMILASE	27
3.9.1 – Preparo dos sacos de filtro e das amostras	27
3.9.2 – Preparo da solução tampão	28
3.9.3 – Coleta e preparo do líquido ruminal	29
3.9.4 – Incubação das amostras	30
3.10 – PRODUÇÃO DE REATORES DE HIDRÓLISE CONTÍNUA DE AMIDO EM AMBIENTE RUMINAL BOVINO	31
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 – EXTRAÇÃO DA PECTINA DE LOBEIRA	34
4.2 – SÍNTESE DAS BLENDS DE PECTINA/PVA E IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE	35
4.3 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E PORCENTAGEM DE ENLONGAÇÃO	41
4.4 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A SOLUBILIDADE DAS BLENDS	42
4.5 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	43
4.6 – ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE IN VITRO DA BLEND DE PECTINA/PVA/AMILASE	49
4.7 – ENSAIO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE APÓS INCUBAÇÃO	50
4.8 – REATORES DE HIDRÓLISE CONTÍNUA DE AMIDO EM AMBIENTE RUMINAL BOVINO	53
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

6 – PERSPECTIVAS	59
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – α -AMILASES (E.C 3.2.1.1)

As enzimas são substâncias orgânicas poliméricas formadas por unidades de aminoácidos que atuam no metabolismo dos seres vivos como catalisadores naturais. Estes biocatalisadores, na maioria das vezes de estrutura proteica do tipo globular terciária ou quaternária, aceleram bastante a velocidade de uma reação termodinamicamente favorável, diminuindo a energia de ativação e estabilizando o estado de transição das reações (HUANG et al., 1990; NELSON; COX, 2011). As enzimas estão presentes em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, dos mais simples, como as formas de vida unicelulares, aos mais complexos (SUTLIFF et al., 1991; SPIER, 2005). A denominação das enzimas geralmente é dada de acordo com o substrato em que atuam. Assim, o termo amilase indica a ação enzimática sobre o amido (amilo), que é constituído por dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e amilopectina (80-85%) (VIEIRA-JÚNIOR, 2006).

O amido é um carboidrato de cadeia longa e complexa, utilizado pelas plantas como molécula de armazenamento para o excesso de glicose. É considerado um dos polímeros mais abundantes na natureza e um dos produtos de maior importância sintetizado pelas plantas, depois da celulose. A hidrólise das ligações glicosídicas (α -1,4 e as ramificações α -1,6) do amido leva à sua conversão em moléculas de açúcares simples. A indústria do amido tem experimentado um crescimento excepcional nas últimas décadas, fato que se deve à molécula ser considerada uma das mais abundantes fontes de energia (MEYER, 2007; SILVA, 2009).

A ação da α -amilase (1,4- α -D-glicano glicanoidrolase, EC 3.2.1.1) sobre as ligações glicosídicas do tipo α -1,4 ocorre de forma aleatória, originando uma mistura de glicose, maltose e dextrinas (TIEN et al., 1999). É uma enzima que pode ser encontrada em animais, plantas, fungos e bactérias. As α -amilases pertencem à família das amilases, podendo ainda, devido à sua semelhança na sequência dos aminoácidos, ser considerada como membro da família 13 das glicosídeo hidrolases (GH-13). Nos animais esta enzima atua sobre as ligações α -1,4 das moléculas de glicogênio, forma de armazenamento de glicose nesta espécie (TIEN et al., 1999; VIEIRA-JÚNIOR, 2006). As enzimas amilolíticas podem ser obtidas de diversas fontes incluindo animais e micro-organismos tais como as cepas da espécie *Aspergillus* (principalmente *A. niger*, *A. awamori* e *A. usami*), ou ainda por meio de cereais germinados que as contenham, como por exemplo, o malte de cevada (MEYER, 2007; SANKALIA et al., 2007). A temperatura ótima desta classe de enzimas varia entre 55 e 75 °C e o pH entre 4,8 e 6,5, porém estas faixas dependem de sua origem. Dentre as aplicações de utilização das enzimas amilolíticas destacam-se a indústria de panificação; as indústrias de fermentação para fabricação de álcool e bebidas alcoólicas para o pré-cozimento de cereais; a produção de xaropes de glicose; o preparo de gomas de dextrinas, empregadas na indústria de papel e tecidos; dentre outras (BIAZUS et al., 2005a; b; SILVA et al., 2008).

Dentre os micro-organismos potenciais na produção de amilase destacam-se os fungos, bactérias e actinomicetos; entretanto, as enzimas produzidas por fungos e bactérias dominam a maioria do setor industrial (VIEIRA-JÚNIOR, 2006). As α -amilases e glicoamilases são as enzimas produzidas em maior quantidade pelos fungos, sendo as α -amilases produzidas por muitos gêneros de fungos filamentosos e leveduras. Algumas bactérias, como *Bacillus sp*; *B. amyloliquefaciens* e *B. liqueniformes* são capazes de sintetizar α -amilases com características mais apreciadas para aplicações comerciais, como

termoestabilidade e termoatividade. Porém, a capacidade de sacarificação destas enzimas é inferior à apresentada por algumas enzimas termoestáveis produzidas por fungos (SILVA, 2009; SANKALIA et al., 2007).

Nos processos de liquefação do amido, as enzimas tais como as α -amilases desempenham um papel importante, pois propiciam a obtenção de xaropes refinados e edulcorantes amplamente utilizados na indústria alimentícia. Desta forma a imobilização da amilase é uma ferramenta viável para auxiliar nestes processos industriais, pois conforme o método de imobilização empregado pode-se obter uma minimização de gastos, uma vez que a imobilização torna possível a reutilização da enzima, sendo ainda de fácil separação dos produtos de hidrólise (MEYER, 2007).

1.1.1 – Termamyl[®] 120 L

A Termamyl[®] 120 L (Novozymes A/S) é uma enzima produzida por fermentação submersa de uma cepa modificada de *Bacillus licheniformis* que é capaz de expressar uma amilase termoestável. Esta enzima apresenta uma capacidade de hidrolisar moléculas de amido semelhante às demais α -amilases (NOVOZYMES A/S, 2013a). Entretanto, um diferencial da Termamyl[®] é a sua alta estabilidade frente a condições extremas, como em elevadas temperaturas, baixos valores de pH e em baixas concentrações de íons cálcio. Devido a estas características esta enzima é bastante utilizada em processos em que a hidrólise do amido ocorre em altas temperaturas, como por exemplo, na produção de xaropes de glicose e frutose. Nestes processos a enzima é submetida a temperaturas de 105-110 °C, pH 5,1 e a uma concentração de cálcio de 5 mg/ kg de amido (NOVO NORDISH, 1999; NOVOZYMES A/S, 2013b).

1.1.2 – Imobilização de α -amilases

As enzimas apresentam diversas características que as colocam em vantagem em relação aos catalisadores químicos convencionais, como por exemplo a sua alta especificidade pelo substrato, um fator que reduz a ocorrência de reações secundárias. Estas reações levam à produção de subprodutos indesejáveis no ambiente reacional (TERASHIMA et al., 1996; KRAJEWSKA, 2004).

Entretanto, a utilização de enzimas é geralmente limitada pelas condições reacionais a que são submetidas, uma vez que mudanças bruscas no ambiente reacional como alterações no pH e temperatura, podem ocasionar a desestruturação da configuração tridimensional da enzima, e conseqüentemente, a perda de sua atividade. As técnicas de imobilização de enzimas surgem neste contexto como alternativas que possibilitam melhorar as características cinéticas das enzimas frente a estas possíveis variações no ambiente reacional (FERNANDES et al., 2003; KRAJEWSKA, 2004; PURCENA et al., 2009; CARAMORI et al., 2010).

A imobilização de enzimas corresponde ao conjunto de técnicas que tem por finalidade confinar as enzimas em uma determinada região do espaço, mantendo as suas propriedades catalíticas e proporcionando, em alguns casos, o aumento de sua estabilidade frente a possíveis variações de temperatura e pH, além de permitir a sua reutilização (SILVA, 2000).

Os métodos de imobilização se baseiam na adesão da enzima a um suporte de origem orgânica ou inorgânica. Estes, por sua vez, podem ser de origem natural ou sintética (CARAMORI; RODRIGUES; FERNANDES,

2011). Na imobilização é imprescindível que a enzima permaneça com seu sítio ativo livre para realização da catálise enzimática. As principais técnicas de imobilização de enzimas são: imobilização por ligação covalente e iônica, imobilização por aprisionamento e por adsorção. A escolha do método de imobilização depende das condições de aplicação assim como do tipo de interação entre o suporte e a enzima (PURCENA et al., 2009).

Diversos trabalhos realizados no Laboratório de Química de Proteínas da Universidade Federal de Goiás atestam as vantagens da utilização correta das técnicas de imobilização de enzimas, dentre os quais se destacam os trabalhos realizados por Pascoal et al. (2011) em que a α -amilase de *Aspergillus niger* foi imobilizada em polianilina permitindo a reutilização da enzima por 15 ciclos; por Caramori e Fernandes (2008) em que a tripsina foi imobilizada em compósito de poli(etileno tereftalato)-poli(anilina) conferindo à enzima uma maior estabilidade em relação à enzima livre, com retenção de 100% da atividade após 14 dias de armazenamento e 100% de atividade operacional após quatro ciclos de uso; por Purcena et al. (2009) no qual relata que a tripsina foi imobilizada covalentemente em polianilina proporcionando à enzima maior estabilidade a altas temperaturas (45-55 °C) e em regiões de pH alcalino (7-10); por Caramori et al., (2011) que descrevem que a tripsina foi imobilizada em discos de PVA demonstrando atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 35 °C.

A imobilização da α -amilase tem sido bastante testada ao longo dos anos em diversos trabalhos relatando a utilização dos mais variados tipos de suportes, como em pérolas de vidro com diâmetro de poro controlado (EMNEUS; GORTON, 1990), em areia (ZANIN et al., 1994), colágeno (STRUMEYER et al., 1974) em géis de Sephadex e Sepharose (MURAO et al., 1977), em poliaminoestireno (LINKO et al., 1975), em 2-hidroximetilmetacrilato (ARICA

et al., 1995), em celulose carboximetilada (OHTSUKA et al., 1984), em polianilina (PASCOAL et al., 2011) dentre outros.

Os polissacarídeos naturais são candidatos promissores como suportes para imobilização de enzimas, principalmente devido à sua biodegradabilidade, fator que permite a sua utilização em larga-escala, sem provocar impactos ambientais (REISS et al., 1998).

Dentre os trabalhos realizados abordando o processo de imobilização da α -amilase em suportes poliméricos sintéticos e naturais (carboidratos) podemos citar o estudo desenvolvido por Rani et al. (2007) que observaram mudanças nas propriedades cinéticas da α -amilase após sua imobilização em esferas de vidro de arilamina, sendo que o sistema permitiu a reutilização da enzima por 100 ciclos. Pascoal et al. (2011) imobilizaram a α -amilase de *Aspergillus niger* em polianilina modificada quimicamente com glutaraldeído e observaram uma retenção da atividade da enzima de 42%. Os autores também constataram que a enzima imobilizada se mostrou menos sensível quanto à inibição por íons Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} em comparação com a enzima livre; e que a presença de $CaCl_2$ contribui para aumento da estabilidade térmica do sistema.

Silva et al. (2008) imobilizaram amilases, extraídas do malte do milho, por aprisionamento em alginato de sódio. Os pesquisadores conseguiram imobilizar 100% das enzimas e constataram uma baixa perda da atividade empregando condições ótimas de pH; concentração de malte no extrato e concentração de alginato de sódio, determinadas por planejamento fatorial.

Riaz, et al. (2009) estudaram a imobilização da α -amilase de *B. Subtilis* por aprisionamento em esferas de alginato de cálcio e verificaram um aumento de 10 °C na temperatura ótima da enzima imobilizada em relação à livre; e constataram que o pH ótimo da enzima imobilizada e livre foi 7,5 e 7,0,

respectivamente. Os mesmos autores demonstraram que a enzima imobilizada obteve um rendimento da atividade de 65%.

Desta forma, podemos observar que os polímeros naturais são materiais que apresentam um futuro promissor no desenvolvimento de suportes para imobilização de enzimas de importância industrial. Para tanto se faz necessário o conhecimento de suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

1.2 – PECTINA DE LOBEIRA (*Solanum lycocarpum* St. Hil)

Nos últimos anos tem-se observado um crescimento elevado em pesquisas envolvendo polímeros naturais nos sistemas de liberação controlada de fármacos, enzimas e proteínas. Isto se deve basicamente à sua grande disponibilidade na natureza, baixo custo para obtenção, ampla variedade de estruturas, estabilidade elevada, ótimas propriedades geleificantes, por serem biocompatíveis e, principalmente, por não apresentarem toxicidade aos sistemas biológicos (MUNJERI et al., 1997; OLIVEIRA, et al., 2007, BUNHAK et al., 2007 a, b). Dentre os vários polissacarídeos de origem vegetal estudados destacam-se a pectina, a goma arábica, a inulina, a amilose, dentre outros (SOUTO-MAIOR et al., 2008).

A pectina é um biopolímero não-tóxico encontrado na parede celular de plantas superiores; suas moléculas são constituídas principalmente de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -(1 \rightarrow 4) que podem apresentar-se em sua forma livre ou parcialmente esterificados com metanol (Figura 1). As cadeias formadas pelos resíduos de ácido D-galacturônico são interrompidas por unidades de α -(1 \rightarrow 2)-L-ramnose, a partir das quais partem cadeias laterais contendo açúcares neutros. Estas cadeias laterais permitem a adesão das

moléculas de pectina à matriz polissacarídica da parede celular vegetal (HIORTH et al., 2006). Apesar das substâncias pécticas serem constituídas principalmente de ácido D-galacturônico, elas podem apresentar proporções variáveis de outros açúcares, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-frutose ou ainda traços e 2-O-metilfucose e possuem uma massa molecular variando entre 50.000 e 180.000 g mol⁻¹ (CANTERI, 2010; MUNARIN et al., 2012).

O grau de esterificação das substâncias pécticas, ou grau de metoxilação, refere-se ao percentual de ácido D-galacturônico esterificado com metanol, e constitui-se como um parâmetro utilizado para classificá-las. As pectinas com grau de esterificação maior que 50% são classificadas como pectinas de alta metoxilação (HMP) e as que apresentam grau de esterificação menor que 50% são denominadas pectinas de baixo grau de metoxilação (LMP) (HIORTH, 2006). As pectinas de baixa metoxilação podem apresentar grupos amida, que são encontrados na faixa de 10 a 25% (SRIAMORNSAK et al., 1997; FU; RAO, 2001).

As propriedades das pectinas são significativamente influenciadas pelo grau de esterificação (SCAMPARINI, 1978). As pectinas de baixo grau de esterificação apresentam melhor capacidade de formação de géis através da interação com cátions divalentes como o cálcio, já as pectinas de alto grau de esterificação não apresentam boas propriedades gelificantes mediante interação com íons cálcio (SRIAMORNSAK, 1998).

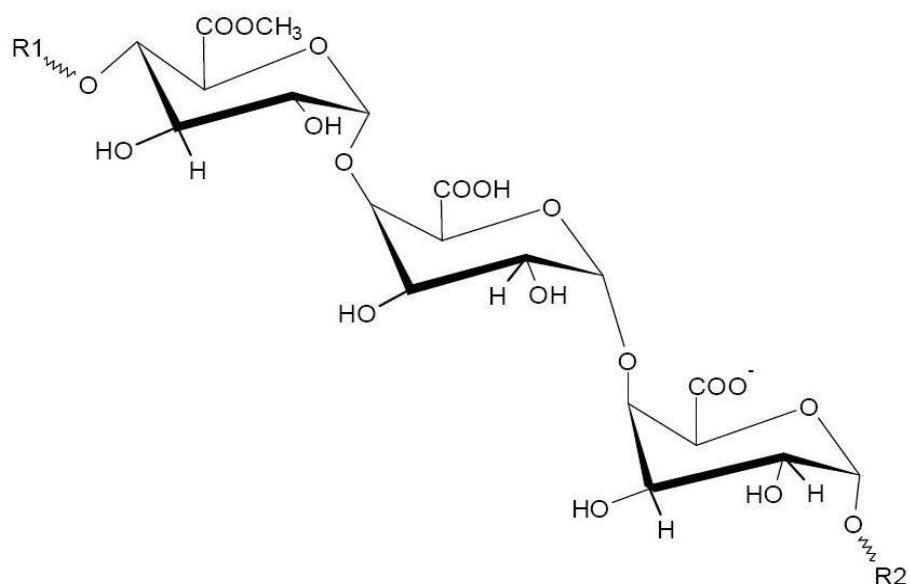


Figura 1 – Estrutura química do ácido poli(gacturônico). (Software: ACD/ChemSketch FREEWARE).

As pectinas de alta metoxilação (HMP) são capazes de aumentar a viscosidade de soluções e por este motivo são empregadas extensivamente na indústria alimentícia, como por exemplo, na produção de geléias e na gelificação de sucos de fruta (EVAGELIOU et al., 2000). As propriedades funcionais, tais como solubilidade, gelificação, formação de filme e propriedades reológicas são significativamente influenciadas pela presença de cadeias laterais constituídas principalmente por unidades de arabinose e galactose. As HMP também são capazes formar gel em meio ácido ou na presença de concentrações elevadas de um co-soluto, usualmente sacarose (CANTERI, 2010; MUNARIN et al., 2012).

Os frutos cítricos são as principais fontes de pectina exploradas comercialmente. No bioma Cerrado, alguns estudos demonstram que a Lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil) (Figura 2) tem se destacado como uma fonte promissora para a extração de polissacarídeos como a pectina e o amido. Dentre os principais motivos tem-se o fato da lobeira ser uma planta que floresce durante o ano inteiro e apresenta um longo período de colheita que vai de julho a

janeiro. Outro fato se deve à quantidade de frutos produzidos: cada árvore produz entre 40-100 frutos, sendo que a massa dos frutos pode variar entre 400 e 900 g (TORRALBO et al., 2012; CLERICI et al., 2011).



Figura 2. Frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil).

A pectina extraída a partir da farinha de frutos secos de lobeira apresenta cerca de 65% dos resíduos de ácido D-galacturônico esterificados com o metanol. Portanto, em comparação com a pectina cítrica comercial disponível, apresenta maior grau de metoxilação (MUNARIN et al., 2012). Esta característica, aliada à ausência de alguns fatores antinutricionais como atividade hemaglutinante, saponinas e inibidores de tripsina e de α -amilase faz dos frutos de lobeira uma fonte promissora a para extração de pectinas (TORRALBO et al., 2012).

A pectina tem sido estudada para aplicações em vários sistemas terapêuticos cólon-específicos, na confecção de sistemas matriciais,

reservatórios e ainda em associação com outros polímeros (SRIAMORNSAK, 1998; SOUTO-MAIOR et al., 2008). Outro fator de extrema relevância que favorece a pectina como sistema de entrega específica de medicamentos no cólon é que este polissacarídeo demonstra resistência na passagem pelo segmento proximal do trato gastrointestinal, sendo biodegradado especificamente pela microflora anaeróbica, encontrada exclusivamente no cólon (SINHA et al., 2001; FRIEND, 2005; ORLU et al., 2006).

O processo de amaciamento dos frutos ocorre principalmente devido à degradação de polissacarídeos pécticos. A pectinametilesterase (E.C. 3.1.1.11) é uma das enzimas deste processo de degradação, que atua na desmetilação dos ésteres metílicos dos ácidos poligalacturônicos e está distribuída em raízes, caules, folhas e frutos de grande parte das plantas superiores. A enzima poligalacturonase (E.C. 3.2.15) catalisa a hidrólise glicosídica do ácido péctico e sua atividade é dependente da ação da pectinametilesterase, uma vez que a presença dos grupos metílicos na estrutura da pectina torna inativa a poligalacturonase (CARDELLO et al., 1992; PIMENTA et al., 2000; HUBER et al., 2001).

Neste contexto, a ação enzimática é um fator importante para a obtenção de uma rede de pectina, uma vez que se faz necessária a formação de pontes iônicas através da interação de íons cálcio com grupos carboxila não esterificados. Assim, quando os grupos carboxila encontram-se bloqueados por grupos metil-esterificados, estes não podem formar a rede intercadeia com os íons cálcio (SANTOS, 2003).

Observa-se que tanto a pectina quanto os carboidratos naturais de uma forma geral tem demonstrado excelente desempenho na confecção de suportes para a imobilização de enzimas. A possibilidade de se produzir biomateriais combinados como as blendas, compósitos e redes interpenetradas é uma

alternativa atraente, pois é possível nestes sistemas unir as vantagens dos dois materiais utilizados, a fim de se produzir um suporte adequado para o sistema de imobilização (CONG et al., 1995; CARAMORI et al., 2011). Dentre estes a produção de blendas se destaca uma vez que consiste numa ferramenta eficiente na obtenção de materiais com características e propriedades peculiares. As blendas são formadas pela mistura de dois polímeros na tentativa de se obter um material com propriedades intermediárias às aquelas apresentadas pelos polímeros individualmente (COSTA-JUNIOR; MANSUR, 2008).

Neste contexto, o álcool polivinílico (PVA) é um polímero que tem ganhado destaque nos processos de obtenção de blendas para aplicações biotecnológicas devido a características como boa transparência, consistência macia, excelente resistência química e, principalmente, por sua biocompatibilidade (FEITOSA, 2008; ZAIN et al., 2011).

O PVA é obtido de forma indireta mediante a polimerização do acetato de vinila a poli(acetato de vinila) (PVAc) com posterior hidrólise a poli(álcool vinílico) na presença de hidróxido de potássio e metanol (Figura 3) (FERNANDES, 2005). É um polímero solúvel em água, fato que se deve ao elevado teor de hidroxilas presentes na sua estrutura química que lhe confere um caráter hidrofílico, mediante a capacidade de formação de ligações de hidrogênio (CARAMORI et al., 2011).

O grau de hidrólise do PVA é uma grandeza representada pela relação entre o percentual de hidroxilas no copolímero final, após a reação de hidrólise, e o número total de radicais ácido acético antes da hidrólise. Este parâmetro é de grande importância durante a determinação das propriedades deste polímero. O aumento do grau de hidrólise do PVA diminui a sua solubilidade em água, uma vez que se obtém uma estrutura de elevada estabilidade energética devido o aumento do número de ligações de hidrogênio intra e intercadeias. Há também

um aumento na capacidade de adesão a superfícies hidrofílicas, na viscosidade e na resistência à tração (COSTA-JUNIOR; MANSUR, 2008).

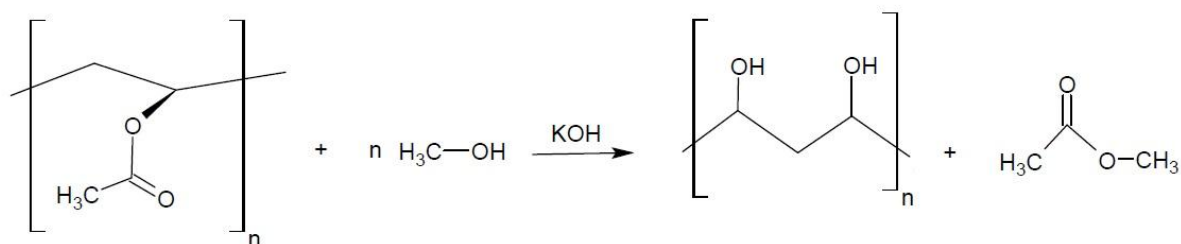


Figura 3. Saponificação do poli(acetato de vinila) produzindo poli(álcool vinílico) e éster acetato de metila. (*Software:* ACD/ ChemSketch FREEWARE).

O comportamento de fusão do PVA não é semelhante aos demais polímeros termoplásticos. Porém, à temperatura de 150 °C sofre decomposição perdendo água proveniente dos grupos hidroxila adjacentes. O seu ponto de fusão e entalpia de fusão ocorrem aproximadamente a 220 °C e 73,3 J/g, respectivamente. A sua temperatura de transição vítrea pode variar de 70 a 85 °C (COSTA-JUNIOR; MANSUR, 2008).

Devido ao grande número de grupos hidroxila presentes na estrutura química do PVA o mesmo apresenta a capacidade de interagir com moléculas reticulantes, que geralmente são moléculas que possuem baixa massa molecular em relação à cadeia polimérica e que apresentam pelo menos dois grupos funcionais reativos que lhes permite estabelecer uma ponte entre as cadeias poliméricas. A interação do PVA com moléculas reticulantes tais como o ácido bórico e o glutaraldeído levam à formação de uma rede tridimensional, que podem conferir à nova estrutura propriedades físicas peculiares (BERGER et al., 2004).

1.3 – α -AMILASE NA DIGESTÃO EM RUMINANTES

As α -amilases desempenham um papel essencial no processo digestivo dos animais, pois atuam disponibilizando carboidratos de baixa massa molecular (dextrinas) para a célula. A glicose é um açúcar que possui elevado teor energético, e uma vez utilizada como fonte de energia pela célula pode contribuir efetivamente para o ganho de peso dos animais. Nos ruminantes, as α -amilases são responsáveis pela hidrólise de polissacarídeos presentes nas dietas ricas em carboidratos, como por exemplo nas rações utilizadas em sistemas de confinamento (BANNINK et al., 2008).

Os ruminantes são definidos como animais herbívoros que possuem vários compartimentos gástricos, sendo por tal motivo considerados poligástricos. O emprego do termo ruminante é devido ao fato destes animais ruminarem, ou seja, o animal ingere o alimento rapidamente e após um período regurgitam-no para a boca, onde é novamente mastigado e deglutido (SWENSON; REECE, 1996). O estômago dos ruminantes apresenta quatro compartimentos: são eles o rúmen, o retículo, o omaso (que são considerados pré-estômagos) (Figura 4a-f) e servem como um tanque de fermentação microbiana dos alimentos; e o abomaso (estômago verdadeiro) (Figura 4g), que é caracterizado como um compartimento secretório e está amplamente relacionado com a hidrólise de proteínas pela pepsina em meio ácido. A fermentação dos nutrientes pelos micro-organismos ocorre nos pro-ventrículos (Figura 4b), proporcionando a absorção dos ácidos graxos voláteis, a absorção de água e a compactação do bolo alimentar (SWENSON; REECE, 1996; TEIXEIRA et al., 1998; VLAEMINCK et al., 2004; CERDÀ, 2005).

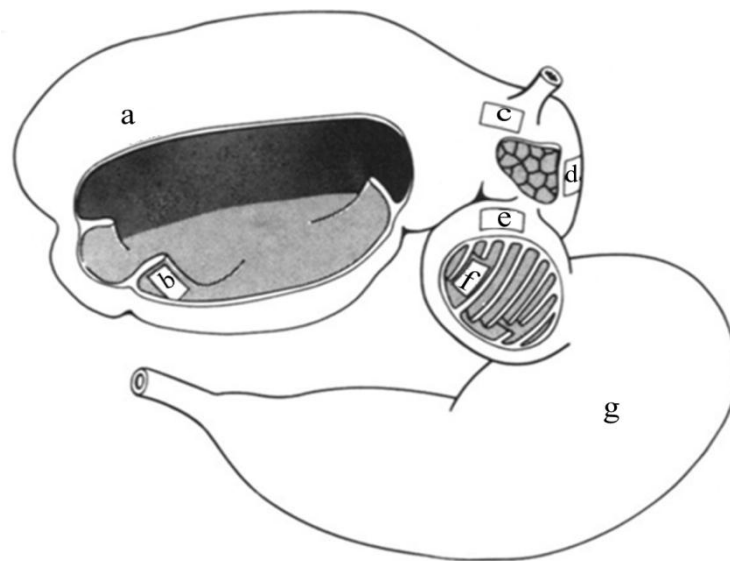


Figura 4. Desenho esquemático do abdome bovino. a) – Saco dorsal da parede ruminal. b) – Pilar ruminal ventral. c) – Transição ruminirreticular / suco reticular. d) – Saco reticular. e) – Saco omasal. f) – Lâminas do omaso e g) – Abomaso (TEIXEIRA et al., 1998).

Todos esses compartimentos digestivos atuam de forma coordenada promovendo a degradação e absorção dos nutrientes presentes nos alimentos da dieta do animal. O rúmen, o retículo e o omaso são responsáveis pelo processamento mecânico dos alimentos envolvendo as partes propulsoras dos movimentos peristálticos, contrações do abdome e ainda relacionam-se com a regurgitação, mistura, ruminação, separação de líquidos e sólidos e na remoção dos gases produzidos durante o processo fermentativo. O abomaso é o compartimento similar ao estômago dos seres humanos, e está envolvido na digestão enzimática dos alimentos (TEIXEIRA et al., 1998; VELÁSQUEZ; PICHARD, 2006; BANNINK et al., 2008).

A alimentação de ruminantes é uma etapa crucial na fase de terminação, ou seja, desde quando o animal é separado em confinamentos até que haja adequação do seu peso aos requisitos necessários para o abate. Assim, o confinamento consiste numa ferramenta bastante empregada para o aumento dos

índices de produtividade da pecuária de corte, e apresenta reflexos positivos sobre a qualidade da carcaça e a oferta de carne na entressafra. Porém, segundo Bannink et al. (2008), o êxito desta prática está diretamente relacionado à disponibilidade e ao custo dos alimentos utilizados.

As rações utilizadas na dieta dos ruminantes são compostas de alimentos volumosos e concentrados, sendo que o balanceamento das rações determinará a relação volumoso/concentrado necessária para cada tipo de animal e taxa de ganho de peso (BANNINK et al., 2008). As maiores taxas de ganho em peso exigem maior concentração energética na ração. Dietas para bovinos em confinamento incluem alimentos volumosos, concentrados e aditivos. São caracterizados como alimentos volumosos aqueles que apresentam um teor de fibra bruta na matéria seca superior a 18%, tais como os capins verdes, silagens, feno, palhadas. Os alimentos concentrados são aqueles que apresentam menos que 18% de fibra bruta na matéria seca e podem ser classificados como protéicos (quando tem mais de 20% de proteína na matéria seca) ou energéticos (com menos de 20% de proteína na matéria seca), como o milho, o trigoilho e o farelo de arroz (CARDOSO, 1991; COSTA, 2002).

Assim, os alimentos que apresentam elevado teor de carboidratos estruturais ou fibras possuem menor conteúdo energético quando comparados com aqueles com elevado teor de carboidratos não estruturais, como o grão de milho ou a torta de soja (TIBO et al., 2000). A eficiência de utilização de nutrientes da ração objetivando o ganho de peso depende diretamente da concentração energética da ração e da disponibilidade de amilase (RUSSEL et al., 1992). As rações que possuem baixa concentração energética, à base de volumosos exclusivamente, são empregadas com uma eficiência de 30% para o ganho em peso, por outro lado as rações de alta concentração energética

apresentam uma eficiência de 45% podendo ser aprimorada pela incorporação da amilase na dieta do animal (GARCIA TRUJILLO; CÁCERES, 1984).

Nos últimos anos os sistemas de produção animal de terminação de bovinos em confinamento, assim como na alimentação de vacas leiteiras de alta produção, tem utilizado a cultura do milho como alimento essencial (SORIANO; POLAN; MILLER, 2000; GOROCICA-BUENFIL; LOERCH, 2005; BROWN; MILLEN, 2009; SILVA, 2009). Este fato se deve ao seu teor energético elevado e alta produtividade na digestão. Para que o animal possa apresentar um desempenho satisfatório, ou seja, qualidade de acabamento das carcaças, sua dieta exige um maior teor de alimentos concentrados. Desta forma, a alimentação desses animais é constituída em 100% de concentrado na maioria dos sistemas de confinamento. Neste tipo de dieta a ração é isenta de fibra proveniente de alimentos volumosos, sendo que o grão de milho inteiro compõe cerca de 80% da dieta e o restante é composto por um núcleo protéico, vitamínico e mineral (GRANDINI, 2009).

A bovinocultura de corte alcançou destaque na economia nacional e cada vez mais vem assumindo a liderança no mercado mundial de carnes. O Brasil é o maior produtor mundial de carne bovina, produzindo cerca de oito milhões de toneladas por ano e ostenta desde 2003 a primeira posição como exportador mundial, tanto na comercialização de carnes frescas quanto industrializadas (SCHLESINGER, 2010). Entretanto, a inserção definitiva e a manutenção do Brasil no mercado mundial de carnes só serão possíveis com o fornecimento para o mercado consumidor de alimentos seguros e com preços acessíveis (VALLE, 2007).

Pesquisas atualizadas do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) mostram que no primeiro trimestre de 2012 houve uma redução de 2% em relação ao trimestre anterior e um aumento de 1,6% em relação ao

mesmo período de 2011, com um total de 7,219 milhões de cabeças de bovinos abatidas. A mesma pesquisa ainda mostra que o peso médio das carcaças neste primeiro trimestre de 2012 foi cerca de 4,5 kg menor que no trimestre anterior e aproximadamente 1,7 kg maior em relação ao primeiro trimestre de 2011 (IBGE, 2012).

A alimentação dos ruminantes corresponde de 30 a 70% dos custos de sua produção, sendo um fator justificável para a busca de novas alternativas alimentares de baixo valor comercial. Diversos trabalhos relatam a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como parte da suplementação alimentar dos ruminantes (MIOTTO et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; REGO et al., 2010; BRINGEL et al., 2011). Estas ferramentas surgem como uma alternativa para minimizar os gastos com alimentação e maximizar a oferta de alimentos com elevado teor energético, um fator que pode contribuir para a inserção dos pequenos produtores de gado de corte no mercado (VALLE, 2007).

Os ruminantes apresentam um ecossistema sofisticado e diverso na capacidade de utilização dos carboidratos fibrosos constituintes da parede celular dos vegetais. Isto é possível devido à uma relação simbiótica destes carboidratos com a diversificada população microbiana presente no rúmen. Embora a microbiota ruminal seja capaz de metabolizar celulose e outros carboidratos fibrosos, existem fatores que podem limitar a extensão da digestão no rúmen, como a estrutura e composição da planta, interações físico-químicas e ainda fatores relacionados ao animal, como a mastigação, salivação e pH ruminal (VLAEMINCK et al., 2004; MARTINS, 2006; CYSNEIROS, 2009; VELÁSQUEZ, PICHARD, 2010).

As α -amilases presentes no rúmen atuam aumentando a disponibilidade de produtos da hidrólise do amido (dextrinas), substrato utilizado pelas bactérias produtoras de hidrolases (TRICARICO et al., 2008). Rojo et al. (2005)

avaliaram a eficiência no aproveitamento do amido proveniente do grão do sorgo. Os autores observaram um incremento de 13,9% no ganho de peso de cordeiros fornecendo 2,9 g de amilase (0,018 UE/mg) por kg de sorgo na ração. Assim, um mecanismo que tornasse possível a liberação gradativa da α -amilase no trato digestivo dos ruminantes poderia aumentar a taxa de produtos de hidrólise no rúmen, e nos demais compartimentos do trato digestivo do animal, proporcionando um possível aumento na taxa de absorção, dos produtos de hidrólise do amido, e conseqüentemente contribuir para o aumento de peso do animal.

Assim, as características de estabilidade apresentada pela Termamyl[®] são fatores de grande importância que a colocam em destaque quando comparada às demais amilases, principalmente quando se refere a ambientes reacionais que variam significativamente de composição química, tal como os compartimentos digestivos dos ruminantes (rúmen, retículo, omaso e abomaso). Nestes locais formam-se ambientes com composições diversificadas, como exemplo as condições de pH que variam significativamente de um ambiente para o outro. O pH no rúmen, retículo e omaso está situado entre 6,8-7,0 enquanto que no abomaso o pH fica próximo a 2,0. Desta forma, a Termamyl seria uma opção viável para aplicação nestes locais.

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Produzir uma blenda de pectina/PVA com α -amilase aprisionada como sistema de liberação contínua da enzima.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter uma formulação que propicie a obtenção de um filme de pectina resistente a condições ácidas (pH 2,0);

Imobilizar a α -amilase por aprisionamento no interior do filme;

Realizar a caracterização do filme quanto à solubilidade, resistência mecânica e superfície;

Analisar a perda de massa e a capacidade de retenção da atividade da enzima imobilizada após incubação *in vitro* do material em ambiente ruminal bovino durante 24 e 48 h;

Avaliar a capacidade de liberação da enzima (*in vitro*) a partir da matriz polimérica ao longo do tempo na presença de líquido ruminal bovino e quantificar o teor de amido remanescente após a incubação dos materiais.

3 – METODOLOGIA

3.1 – α -AMILASE

Para imobilização utilizou-se a α -amilase comercial termoestável Termamyl[®] 120 L fornecida por Novozymes Latin America Ltda (Araucária – PR, Brasil). A solução enzimática empregada na imobilização foi preparada pela diluição da enzima em água destilada na proporção de 1:10 (v/v), que apresentou uma atividade média de 413 UE/ mL (\pm 6,7) e uma atividade específica média de 256 UE/ mg de proteína (\pm 3,14). Uma unidade de enzima (UE) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1,0 μ mol de açúcar redutor mL⁻¹ min⁻¹. A Termamyl[®], segundo dados do fabricante, suporta uma faixa de temperatura de 105-110 °C e pH 5,1.

3.2 – EXTRAÇÃO DA PECTINA DE LOBEIRA

Para a extração da pectina de lobeira empregou-se a metodologia descrita por Torralbo et al. (2012). Uma extração padrão foi conduzida da seguinte forma: a farinha da polpa dos frutos secos de lobeira foi suspensa em água a uma taxa de 1 g de farinha/ 30 mL de água. O pH da água foi ajustado para 1,0 utilizando solução de ácido nítrico 70% (v/v). A mistura foi aquecida a 80 °C por 30 min. Em seguida o extrato ácido quente foi filtrado a vácuo e resfriado a 4 °C. O filtrado foi então precipitado com dois volumes de etanol 96% e o sistema rapidamente misturado e mantido em repouso a 4 °C por 24 h. A mistura resultante foi centrifugada tendo o sobrenadante descartado e o material sólido seco a 60 °C em estufa com circulação de ar forçada. Os frutos de lobeira utilizados neste estudo foram coletados na Universidade Federal de Goiás

(Campus Samambaia, Goiânia – Brasil) e Universidade Estadual de Goiás (UnUCET, Campus Dr. Henrique Santillo, Anápolis – Brasil). Foram feitas duas coletas que ocorreram no segundo semestre de 2011 e no primeiro semestre de 2012.

3.3 – SÍNTESE DAS BLENDA DE PECTINA/PVA E IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE

Para a síntese das blendas de pectina e álcool poli(vinílico) (PVA) foram preparadas cinco soluções contendo 2,0 g de pectina e 0,20 g de PVA (Vetec Química Fina Ltda., São Paulo, Brasil) em 20 mL de água destilada sob agitação constante e à temperatura ambiente (25 °C). Após a completa solubilização dos polímeros foram adicionados 2 mL da solução diluída de α -amilase (Termamyl[®]) e em cada solução adicionou-se volumes diferentes de glutaraldeído (1,5-pentanodial) 25% (v/v, Vetec Química Fina Ltda.) para a obtenção de uma concentração final de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25%, e um volume final de 25 mL. O sistema foi mantido em agitação por 10 min a 25 °C. As soluções resultantes foram depositadas sobre moldes e os filmes produzidos mediante a evaporação espontânea do solvente durante um intervalo de 24 h. Os filmes foram então removidos dos moldes e moídos em moinho de facas. O filme confeccionado na concentração de 0,5% foi cortado em formato de pastilhas de 6 mm de diâmetro. Os materiais passaram a ser denominados de pectina/PVA/amilase. Realizou-se testes para quantificar a atividade da α -amilase nos materiais (conforme item 3.4), antes e após a permanência do material por 2 h em solução de ácido clorídrico 0,2 mol L⁻¹ seguida por 1 h em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5.

A caracterização da superfície do sistema pectina/PVA/amilase foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL, JSM 6610, EUA) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

3.4 – ENSAIO DE ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

A atividade da enzima livre foi determinada conforme a metodologia descrita por Bernfeld et al. (1955), com modificações. Incubou-se 20 μL da amostra em 80 μL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} , pH 6,5 e 100 μL de solução de amido 0,5% (p/v); o sistema foi mantido a 40 °C por 15 min. Posteriormente, uma alíquota de 100 μL foi retirada e adicionada a 900 μL do reativo de ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) ($y = 0,7777x - 0,1967$ com $R^2 = 0,9911$ e $y = 0,631x - 0,0853$ com $R^2 = 0,9929$). Este sistema foi mantido por 5 min em banho-maria a 100 °C, e após atingir a temperatura ambiente (~ 25 °C) efetuou-se a leitura a 550 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics modelo 2000 UV, Piracicaba, Brasil). Nos ensaios de atividade da enzima imobilizada o sistema reacional era constituído de 10 mg do pó do filme de pectina/PVA/amilase em 100 μL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} , pH 6,5 e 100 μL de solução de amido 0,5% (p/v); o sistema permaneceu sob agitação constante a 40 °C por 15 min. Os passos seguintes foram conduzidos conforme descrito acima.

Nos ensaios de atividade da α -amilase realizados neste estudo foram utilizados como padrões a temperatura de 40 °C e o pH 6,5. Estes valores foram escolhidos devido à proximidade com a temperatura (39 °C) e o pH (6,8-7,0) do ambiente ruminal bovino, de forma que não se torna viável a variação destes parâmetros de reação.

3.5 – ESTIMATIVA DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA IMOBILIZADA

A atividade específica dos materiais foi estimada mediante a lavagem por 30 min dos filmes com 0,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5 . Em seguida o material foi centrifugado e a atividade da α -amilase e o teor de proteínas no sobrenadante foram determinados. A atividade da α -amilase foi determinada conforme descrito no ítem 3.4 e o teor de proteínas totais pelo método de Qubit[®]. A estimativa da atividade específica foi obtida pela resolução da Equação 1.

$$AE = \frac{E_{(imobilizada)}}{P_{(imobilizada)}} = \frac{E_{(inicial)} - E_{(lavada)}}{P_{(inicial)} - P_{(lavada)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

AE representa a estimativa da atividade específica (UE/ mg de proteína) do sistema pectina/PVA/amilase;

$E_{(imobilizada)}$ é a atividade da amilase (UE/ mL) na solução de imobilização;

$P_{(imobilizada)}$ é a concentração de proteínas (mg/ mL) retidas no suporte;

$E_{(inicial)}$ é a atividade da amilase (UE/ mL) na solução de imobilização;

$E_{(lavada)}$ é a atividade da amilase (UE/ mL) quantificada no solvente de lavagem do suporte;

$P_{(inicial)}$ é a concentração de proteína (mg/ mL) na solução de imobilização;

$P_{(lavada)}$ é a concentração de proteína (mg/ mL) quantificada no solvente de lavagem do suporte.

3.6 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E ELONGAMENTO

As propriedades mecânicas das amostras foram determinadas num Analisador de Textura TA. TX2 (Stable Micro Systems 118, Surrey, UK), com uma célula de carga de 50 N equipado com pegas de tração (modelo A/ TG 119). As amostras dos filmes foram cortadas em tiras de 20 mm de largura e 40 mm de comprimento, de acordo com a ASTM D-638m-93 padrão. A separação de aderência foi de 25 mm, com uma velocidade de cruzeta de 500 mm min⁻¹. A resistência à tração (TS) e porcentagem de alongação (% E) na ruptura foram avaliados. Cada amostra usada no experimento foi anteriormente inspecionada, a fim de eliminar as que continham quaisquer defeitos, tais como bolhas de ar, furos, rasgos ou que exibiam variação de espessura média superior a 5%.

3.7 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A SOLUBILIDADE DAS BLENDS

A solubilidade das blends de pectina/PVA/amilase foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Gontard et al. (1992). A matéria seca foi determinada por aquecimento das amostras a 105 °C por 24 h. Uma porção de 100 mg da amostra seca foi imersa em 10 mL de água destilada (pH 5,0),

solução de tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 6,5) e em solução tampão ruminal (pH 7,0) e incubado a 40 °C sob agitação por 24 h. Em seguida realizou-se filtração à vácuo, sendo o material retido no filtro seco a 105 °C por 24 h. A solubilidade das blendas foi expressa em porcentagem de massa solúvel em relação à massa total segundo a Equação 2.

$$S(\%) = \frac{M_{(inicial)} - M_{(final)}}{M_{(inicial)}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

S(%) representa a porcentagem de massa solúvel;

M_(inicial) representa a massa inicial da amostra (mg);

M_(final) representa a massa final da amostra (mg).

3.8 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE ATIVIDADE E LIBERAÇÃO DA α -AMILASE IMOBILIZADA

Com o propósito de avaliar o efeito da concentração de glutaraldeído sobre a atividade e liberação da α -amilase imobilizada, foram preparadas cinco blendas de pectina/PVA/amilase variando-se a concentração final de glutaraldeído (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25%). A atividade inicial dos filmes foi quantificada utilizando-se 10 mg das amostras contendo a enzima imobilizada. Para análise da liberação contínua da enzima, utilizou-se 20 mg de amostra e a atividade da amilase foi verificada a cada duas horas após incubação com 100 μ L de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5, em um período

de 24 h. A atividade da α -amilase também foi testada nos materiais antes e após a permanência por 2 h em solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ seguida por 1 h em solução tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5. Em todos os ensaios de atividade da α -amilase foram descontados os brancos da amostra e do amido. Após o término do experimento o material foi seco à temperatura ambiente em dessecador por 48 h e posteriormente pesado para fins de cálculo da porcentagem de solubilidade em relação à massa inicial, conforme Eq. 2.

3.9 – ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE IN VITRO DO SISTEMA PECTINA/PVA /AMILASE

A fim de verificar se o sistema de pectina/PVA/amilase (0,25% (v/v) de glutaraldeído) sofria degradação na presença de enzimas digestivas do trato gastro intestinal de ruminantes realizou-se ensaios de digestibilidade in vitro do sistema na presença do líquido ruminal bovino. Os ensaios constituíram-se das seguintes etapas descritas abaixo.

3.9.1 – Preparo dos sacos de filtro e das amostras

Sacos de filtro F57 (filtro-náilon) (ANKOM Technology, Macedon, EUA), com porosidade de 25 microns, dimensões de 5,0 cm x 5,5 cm, foram lavados com acetona (P.A.), por 3 a 5 min. Após o escoamento do produto, foram colocados em estufa com circulação forçada de ar a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min e posteriormente em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$, *overnight*. A lavagem com acetona foi realizada a fim de se remover um surfactante que poderia inibir a digestão microbiana. A massa de cada saco de filtro F57 foi registrada e em seguida

foram adicionados aos sacos aproximadamente 0,5 g da amostra do filme de pectina/PVA/amilase produzido na concentração de glutaraldeído de 0,5%. Sacos vazios foram pesados para cálculo do fator de correção (branco). Os sacos de filtro contendo as amostras e o branco foram selados a quente, com seladora (Selamil portátil de mesa, Minas Gerais, Brasil).

3.9.2 – Preparo da solução tampão

A solução tampão foi constituída da mistura de uma solução A com uma solução B, da qual obteve-se uma solução tampão cuja faixa de pH foi entre 6,8-7,0. Para o preparo da solução A foram pesadas as quantidades dos reagentes indicadas na Tabela 1 para um volume final de 5,32 L de solução. Para a solução B, preparou-se um volume de 1,064 L (Tabela 2). As duas soluções foram preparadas e mantidas a 39 °C até o momento de incubação das amostras, utilizando água destilada previamente aquecida. Esta solução tampão tem por finalidade simular o processo de salivacão do bovino, um mecanismo que propicia ao ambiente ruminal um pH próximo à neutralidade (6,8-7,0) (GONZÁLES et al., 2012).

Tabela 1. Massa e concentração dos reagentes utilizados para o preparo da solução A.

Reagente	Massa (g)	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	53,2	10
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	2,66	0,5
NaCl	5,33	0,5
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,532	0,1
Uréia	2,66	0,5

Tabela 2. Massa e concentração dos reagentes utilizados para o preparo da solução B.

Reagentes	Massa (g)	Concentração (g/L)
Na ₂ CO ₃	15,96	15
Na ₂ S . 9 H ₂ O	1,064	1,0

3.9.3 – Coleta e preparo do líquido ruminal bovino

Antes da coleta do líquido ruminal bovino, garrafa térmica, funil, provetas, recipientes de coletas e liquidificador foram aquecidos com água destilada a 39 °C. Para a coleta foi utilizado um novilho mestiço ³/₄ de holandês, com peso corporal aproximado de 370 kg, provido de cânula no rúmen. O animal, mantido em baia coberta e piso cimentado, foi adaptado à dieta, por período de 14 dias antes da coleta do líquido e teve livre acesso a água e sal mineral. A alimentação foi à base de 1,0 kg de milho integral inteiro, fornecido às 8 h e feno de Tifton 85, *ad libitum*. O material coletado foi armazenado em garrafa térmica previamente aquecida e hermeticamente fechada. O líquido ruminal foi processado em liquidificador para obtenção de uma amostra representativa da microbiota ruminal, uma vez que esta poderia encontrar-se aderida à matéria orgânica. Em seguida, o líquido ruminal processado foi filtrado. Ambos os processos foram realizados sob atmosfera de dióxido de carbono (CO₂), a fim de garantir um meio anaeróbico, necessário para sobrevivência dos micro-organismos.

3.9.4 – Incubação das amostras

Uma alíquota de 400 mL do líquido ruminal filtrado foi adicionada em cada um dos quatro jarros digestores contendo 1600 mL da solução tampão preparada no item 3.9.2 à temperatura de 39 °C. Em cada jarro digestor foram adicionadas 20 amostras e dois brancos e o sistema foi levado à incubadora *in vitro* (Tecnal, Piracicaba, Brasil), onde permaneceram sob agitação a 39 °C. A remoção do material incubado para quantificação da atividade da α -amilase e da digestibilidade ocorreu nos tempos de 24 e 48 h. Após 24 h de incubação foram retiradas 12 amostras de cada jarro, sendo estas lavadas três vezes com 800 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5. Em seguida, duas amostras foram abertas para realização do ensaio de atividade da α -amilase descrito no item 3.4, e o restante das amostras foi seco em estufa a 60 °C por 24 h e posteriormente pesadas. Para o material que permaneceu por 48 h de incubação repetiu-se o mesmo procedimento. A perda de massa foi calculada por diferença entre a massa inicial do material e a massa obtida após os tempos de incubação. A Figura 5 resume as metodologias descritas nos itens 3.9.3 e 3.9.4.

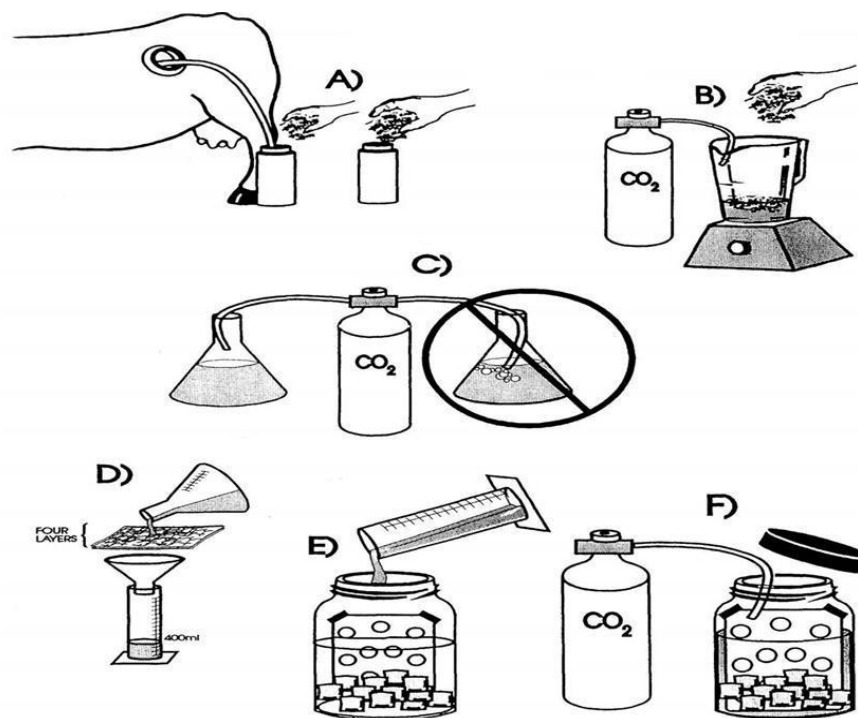


Figura 5. Esquema ilustrativo do experimento descrito nos itens 3.3.3 e 3.3.4. A) Coleta do líquido ruminal. B) Homogeneização. C) Suprimento de CO_2 . D) Filtração. E) Adição no jarro digestor e F) Material pronto para ser incubado. (*In Vitro* True Digestibility using the DAISY Incubator ANKOM Technology - 03/05).

3.10. PRODUÇÃO DE REATORES DE HIDRÓLISE CONTÍNUA DE AMIDO EM AMBIENTE RUMINAL BOVINO

As blendas produzidas nas concentrações de glutaraldeído de 0,25 e 1,25% foram avaliadas quanto à sua capacidade na hidrólise contínua de amido em ambiente ruminal bovino. Para isto, foram preparados alguns reatores cuja composição está detalhada a seguir.

Reator 0,25%: 400 mL de líquido ruminal bovino (conforme descrito no item 3.9.3), 1600 mL de solução tampão ruminal (conforme item 3.9.2), 80 g de

milho triturado cujas partículas possuíam diâmetros menores que 500 µm e 20 g do material de pectina/PVA/amilase produzido na concentração de glutaraldeído de 0,25%.

Reator 1,25%: 400 mL de líquido ruminal bovino (conforme descrito no item 3.9.3), 1600 mL de solução tampão ruminal (conforme item 3.9.2), 80 g de milho triturado cujas partículas possuíam diâmetros menores que 500 µm e 20 g do material de pectina/PVA/amilase produzido na concentração de glutaraldeído de 1,25%.

Reator padrão: 400 mL de líquido ruminal bovino (conforme descrito no item 3.9.3), 1600 mL de solução tampão ruminal (conforme item 3.9.2) e 80 g de milho triturado cujas partículas possuíam diâmetros menores que 500 µm.

Após a incubação das blendas nos reatores três alíquotas de 1,0 mL foram retiradas para quantificação do teor de açúcar redutor (tempo zero) e as quantificações posteriores foram realizadas a cada 2 h até completar 12 h de incubação. Após este período a quantificação foi realizada a cada 12 h até completar 48 h de incubação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para quantificação do teor de açúcar redutor empregou-se o método descrito por Miller (1959), em que 100 µL de amostra foram incubados com 900 µL do reativo de ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) ($y = 0,8944x - 0,2114$ com $R^2 = 0,9972$). Este sistema foi mantido por 5 min em banho-maria a 100 °C, e após atingirem a temperatura ambiente (~ 25°C) efetuou-se a leitura a 550 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics modelo 2000 UV, Piracicaba, Brasil).

O teor de amido foi determinado antes e após a incubação das blendas nos reatores para quantificação do teor de amido remanescente. Para isto, empregou-se a metodologia descrita por Fuwa (1954), com modificações. O ensaio reacional foi constituído por 200 µL de amostra; 200 µL de solução de ácido

acético 1,0 mol L⁻¹; 200 µL do reagente de Fuwa (0,0225x + 0,0182 com R² = 0,9943) e 9,4 mL de água destilada. Após homogeneização realizou-se a leitura a 660 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics modelo 2000 UV, Piracicaba, Brasil).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – EXTRAÇÃO DA PECTINA DE LOBEIRA

O processo de extração de substâncias pécticas tem sido bem estudado no decorrer dos últimos anos, apresentando como principal finalidade estabelecer as condições ótimas do processo e ainda caracterizar as propriedades físicas das substâncias obtidas (ILESÍAS; LOZANO, 2004; MESBAHI et al., 2005). Assim, os trabalhos futuros que utilizarão as pectinas como material de estudo poderão contar com uma grande quantidade de pesquisas referentes a estas substâncias, podendo minimizar as etapas de trabalho na busca de um material com propriedades cada vez mais adequadas à suas necessidades.

Torrálbo et al. (2012) caracterizaram satisfatoriamente o processo de extração de pectina a partir dos frutos de Lobeira, motivo pelo qual se adotou esta metodologia para obtenção da pectina neste estudo. Estes autores otimizaram o processo utilizando a metodologia de superfície de resposta, tendo como variáveis o pH, temperatura e tempo de extração. As condições em que observaram maior rendimento (33,6%) na extração da pectina foram em pH 1,0; à temperatura de 80 °C e tempo de extração de 30 min. As condições ótimas de extração variam conforme a fonte de obtenção da pectina. No trabalho realizado por Kliemann et al. (2009) o processo de extração de pectina da casca do maracujá (*Passiflora edulis* flavicarpa) resultou em condições ótimas de extração com ácido cítrico pH 1,0, à temperatura de 80 °C e tempo de extração de 10 min.

4.2 – SÍNTESE DAS BLENDA DE PECTINA/PVA E IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE

Segundo Costa-Júnior et al. (2008), o processo de reticulação se dá mediante a formação de ligações cruzadas entre a molécula reticulante e as cadeias poliméricas. A molécula reticulante geralmente apresenta massa molecular menor em relação à massa molecular da cadeia principal e possui, no mínimo, dois grupos funcionais reativos em sua estrutura. Neste contexto, o glutaraldeído se destaca como um excelente agente reticulante na formação de redes de polipeptídeos e proteínas devido à reatividade dos grupos aldeídos.

Considerando a reatividade dos grupos presentes nas estruturas das espécies químicas em questão (pectina, glutaraldeído e PVA) e baseando-se nos princípios dos mecanismos das reações ácido-base, é possível propor interações químicas existentes entre essas espécies. A estrutura da matriz de pectina/PVA/amilase reticulada com glutaraldeído pode ter sido obtida mediante o estabelecimento de uma ligação covalente entre a hidroxila presente no carbono 3 do resíduo de ácido D-galacturônico, presente na estrutura da pectina, e o carbono carbonílico localizado em uma das extremidades do glutaraldeído; a outra extremidade livre na molécula de glutaraldeído se liga a duas hidroxilas presentes na cadeia polimérica do PVA (Figura 6), conforme proposto por Mansur et al. (2008); Caramori et al. (2010) e Batista et al. (2013).

A pectina possui uma estrutura altamente complexa de forma que a representação de todas as informações disponíveis em um único modelo estrutural é um desafio encontrado pelos pesquisadores (VORAGEN et al., 2009). Considerando a predominância dos resíduos de ácido poligalacturônico, os quais representam cerca de 60-65% do total da molécula (VORAGEN et al.,

2009; CANTERI, 2010), propõe-se a estrutura apresentada na Figura 6 como resultado do processo de reticulação entre pectina, glutaraldeído e PVA.

A estrutura proposta aqui para a pectina reticulada com glutaraldeído e PVA leva em consideração apenas os resíduos de ácido poligalacturônico, principal constituinte nas moléculas de pectina com cerca de 60-65% do total da pectina (VORAGEN et al., 2009; CANTERI, 2010). É possível a existência de variações conforme a possibilidade de outras interações químicas da molécula de glutaraldeído com porções diferentes dos resíduos de ácido galacturônico da estrutura molecular da pectina.

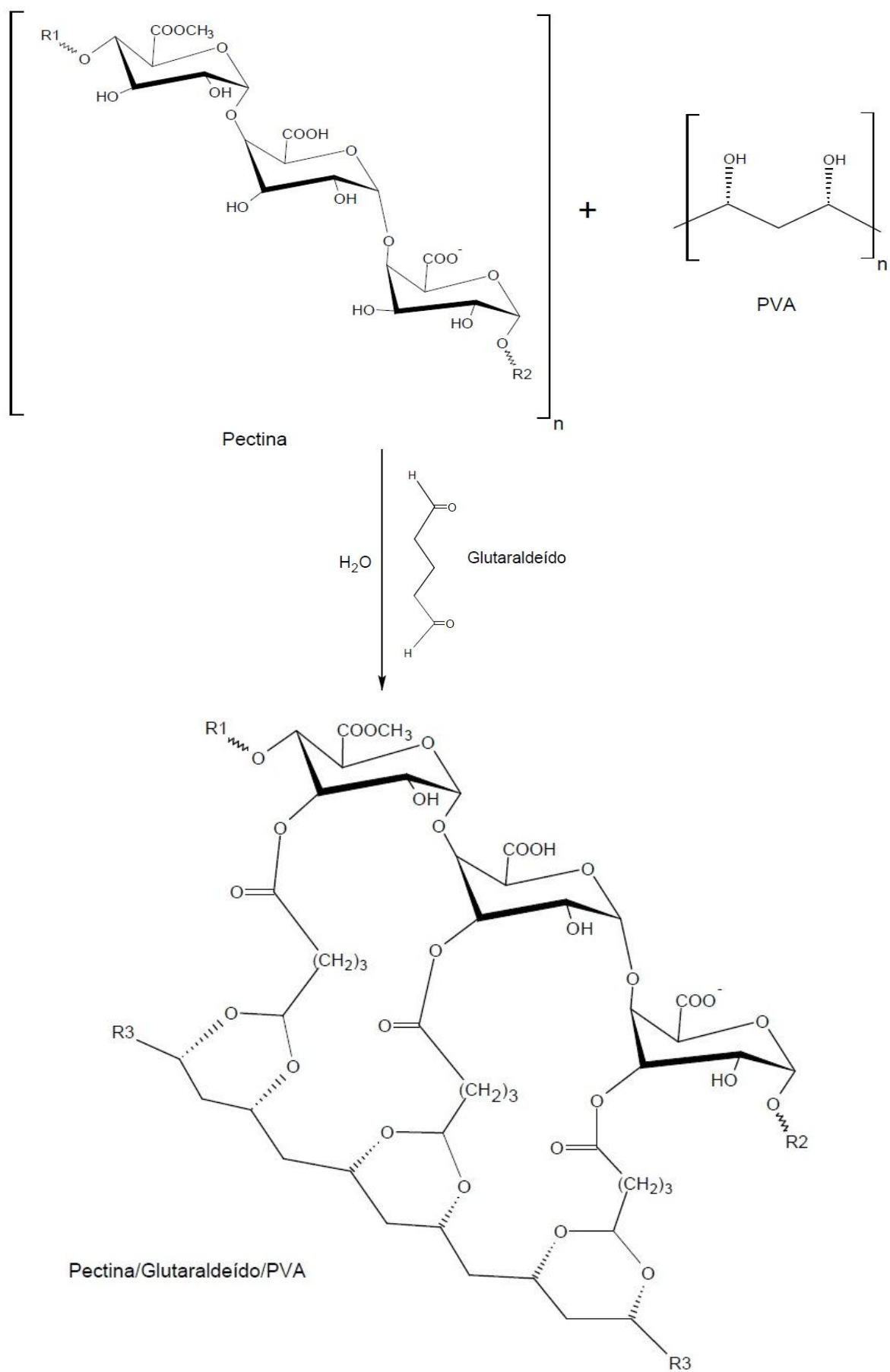


Figura 6. Proposta da estrutura química para a blenda pectina/glutaraldeído/PVA.

A imobilização da α -amilase por aprisionamento no filme ocorreu sempre em pH 4,0 não sofrendo alteração durante as etapas de produção da blenda. Este ambiente ácido é favorável para a polimerização do PVA e conseqüentemente para a produção da blenda de pectina/PVA/amilase. Além disso, o preparo das soluções e o processo de formação da blenda ocorreram à temperatura ambiente (25 °C) de forma que não se torna interessante variar a temperatura de imobilização.

A blenda de pectina/PVA/amilase sintetizada mostrou-se insolúvel em solução de ácido clorídrico 0,2 mol L⁻¹, pH 2,0. A insolubilidade do material em meio ácido pode ser atribuída ao processo de reticulação com o glutaraldeído, que provoca um aumento na resistência do material, e como consequência há também uma limitação das cadeias poliméricas que diminui a capacidade de interação do material com as moléculas do solvente. Um exemplo do sistema recém sintetizado pode ser visualizado na Figura 7.

O material no formato de pastilha apresentou uma atividade enzimática média de 0,67 UE/ mg de material (\pm 0,095), enquanto que o material pulverizado apresentou 0,78 UE/ mg de material (\pm 0,011). Esses resultados foram estatisticamente diferentes no teste de Tukey ($p < 0,05$). Esta diferença pode ser explicada pela maior superfície de contato do material pulverizado em relação à pastilha, que permite maior interação do material com o solvente circundante, promovendo maior solubilidade de sua rede e expondo com maior facilidade as camadas das enzimas imobilizadas na rede. Nas pastilhas tem-se uma quantificação da atividade enzimática devido apenas às enzimas retidas em sua superfície. Desta forma, optou-se por trabalhar com o material pulverizado nas análises posteriores.

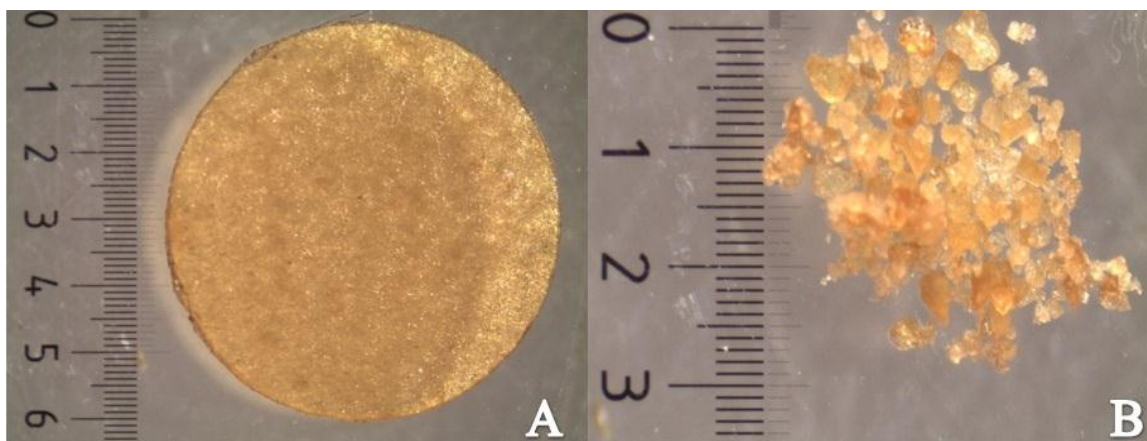


Figura 7. Blenda de pectina/PVA/amilase. A) – formato de pastilha e B) – pulverizado.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 8) das blendas mostrou que os materiais apresentam uma superfície bastante irregular e rugosa. As blendas confeccionadas nas concentrações de glutaraldeído de 0,25, 0,75 e 1,0% apresentaram uma rugosidade superficial de aspecto mais homogêneo quando comparadas com as blendas produzidas nas concentrações de glutaraldeído de 0,5 e 1,25%, que possuem uma irregularidade mais acentuada. Estas irregularidades na superfície das blendas conferem uma maior superfície de contato com o ambiente circundante, podendo refletir diretamente em sua solubilidade frente a diferentes solventes (SAHLIN et al., 2007). O aumento da superfície de contato também aumenta a possibilidade de acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima, assim como a capacidade de liberação do produto do ambiente de catálise.

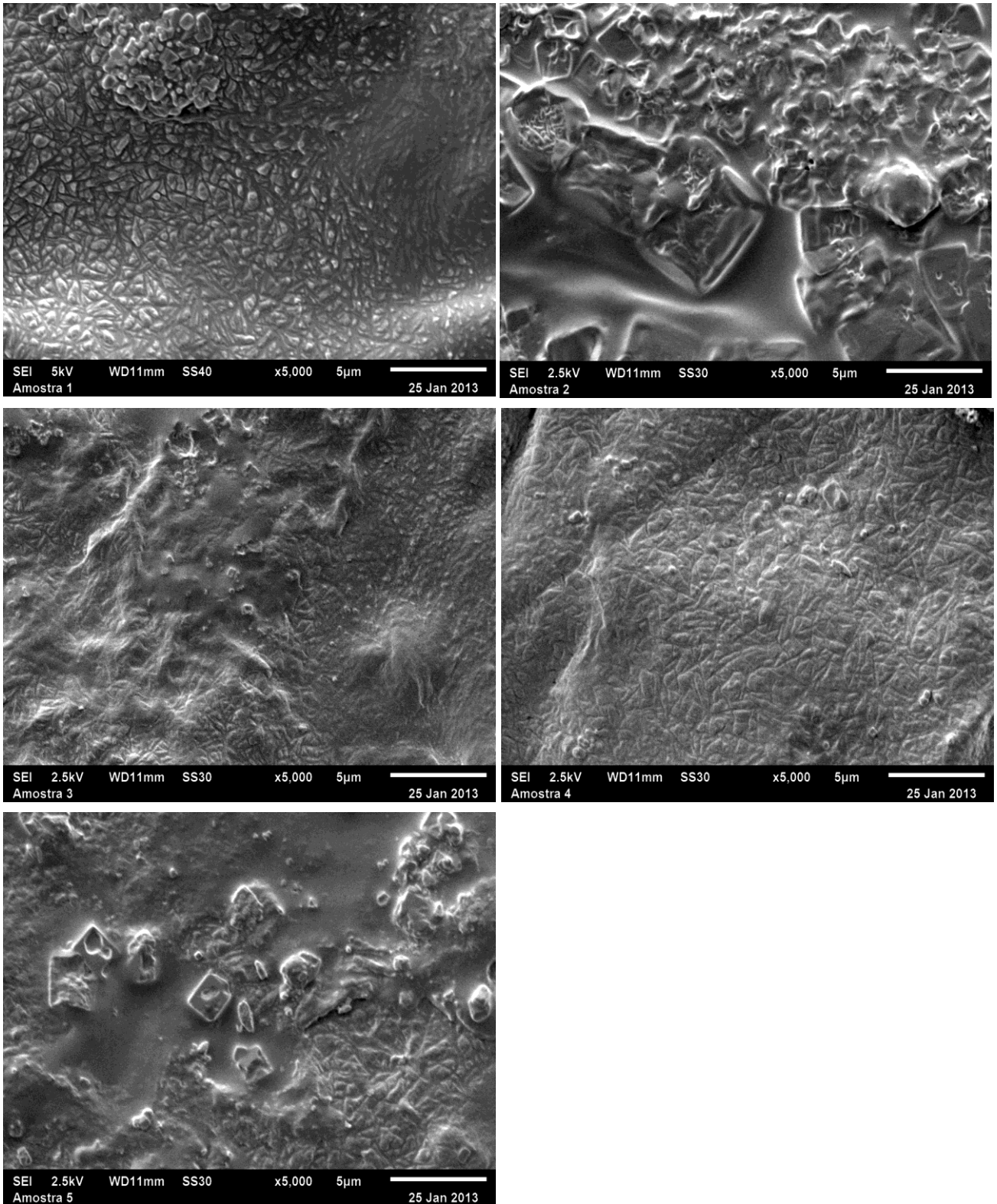


Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura das blendas de pectina/PVA. As amostras 1; 2; 3; 4 e 5 referem-se às blendas produzidas nas concentrações de glutaraldeído de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25%, respectivamente.

4.3 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E PORCENTAGEM DE ELONGAÇÃO

As blendas de pectina/PVA demonstraram baixa resistência à tração. Os dados da Tabela 3 demonstram que a resistência à tração é dependente da concentração de glutaraldeído ofertada durante a confecção das blendas. O aumento na concentração de glutaraldeído durante a produção das blendas implica em um aumento na capacidade de formação de ligações cruzadas entre pectina-glutaraldeído-PVA, conforme o modelo de reticulação demonstrado na Figura 6. Assim, o aumento da resistência à tração verificada nos filmes pode ser atribuído ao aumento do número de ligações cruzadas entre as redes poliméricas (BATISTA et al., 2013).

Tabela 3. Resistência à tração e porcentagem de alongação.

Pectina/PVA/amilase	Carga máxima (kgf)	Elongação (%)
0,25%	0,26 (\pm 0,015) ^c	41,44 (\pm 0,96) ^a
0,50%	0,59 (\pm 0,020) ^b	35,36 (\pm 0,24) ^b
0,75%	0,52 (\pm 0,030) ^b	41,08 (\pm 1,58) ^a
1,00%	0,55 (\pm 0,050) ^b	26,33 (\pm 2,00) ^a
1,25%	0,69 (\pm 0,050) ^a	24,22 (\pm 1,32) ^c

*As letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A SOLUBILIDADE DAS BLENIDAS

As blendas de pectina/PVA/amilase apresentaram uma solubilidade em água (pH 5,7) de aproximadamente 20% e não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Em solução tampão fosfato de sódio (pH 6,5) verificou-se maior solubilidade para a blenda produzida com a menor concentração de glutaraldeído (0,25%). No ensaio de solubilidade realizado em solução tampão ruminal (pH 7,0), verificou-se uma menor solubilidade para as blendas produzidas nas concentrações de glutaraldeído de 0,25 e 0,5%, enquanto que para as blendas produzidas nas concentrações de 0,75; 1,0 e 0,5% observada foi maior solubilidade (Figura 9).

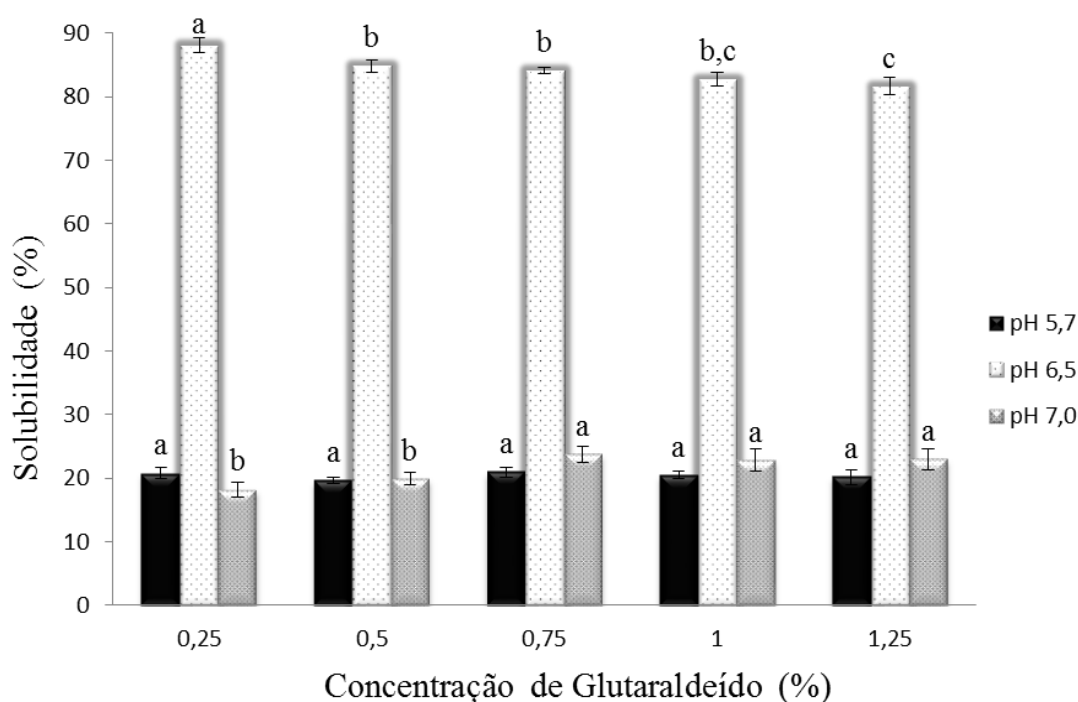


Figura 9. Solubilidade das blendas de pectina/PVA/amilase em diferentes condições de pH. As letras distintas sobre as barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A solubilidade é caracterizada pela completa estabilização das cargas iônicas provenientes das moléculas do material mediante solvatação pelas moléculas do solvente. A intensidade das interações intermoleculares é um fator que afeta diretamente a capacidade de solubilização (ATIKINS; JONES, 2006). O aumento na concentração do agente reticulante (glutaraldeído), além de aumentar o número de ligações cruzadas, também pode ser responsável por um aumento considerável no número de interações intermoleculares, tais como as ligações de hidrogênio, que refletem diretamente na diminuição da solubilidade, aumentando o grau de hidrofobicidade do material reticulado (BEPPU et al., 2007; BATISTA et al., 2013).

Em estudo realizado por Goy et al. (2004) foram produziram esferas de quitosana reticuladas quimicamente com glutaraldeído. Os autores verificaram que após o processo de reticulação, o material se mostrou insolúvel em soluções ácidas. Segundo Beppu et al. (1999) a reticulação da quitosana com glutaraldeído é capaz de torná-la mais resistente tanto do ponto de vista físico e químico, como também microbiológico.

4.5 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

As Figuras 10 e 11 apresentam o efeito da concentração de glutaraldeído na blenda pectina/PVA/amilase e sua relação com a atividade enzimática inespecífica e específica, respectivamente. Na Figura 10 observa-se que a atividade inicial do sistema foi influenciada pela variação na concentração de

glutaraldeído, porém não houve diferença significativa entre os materiais quanto à atividade da α -amilase ($p < 0,05$).

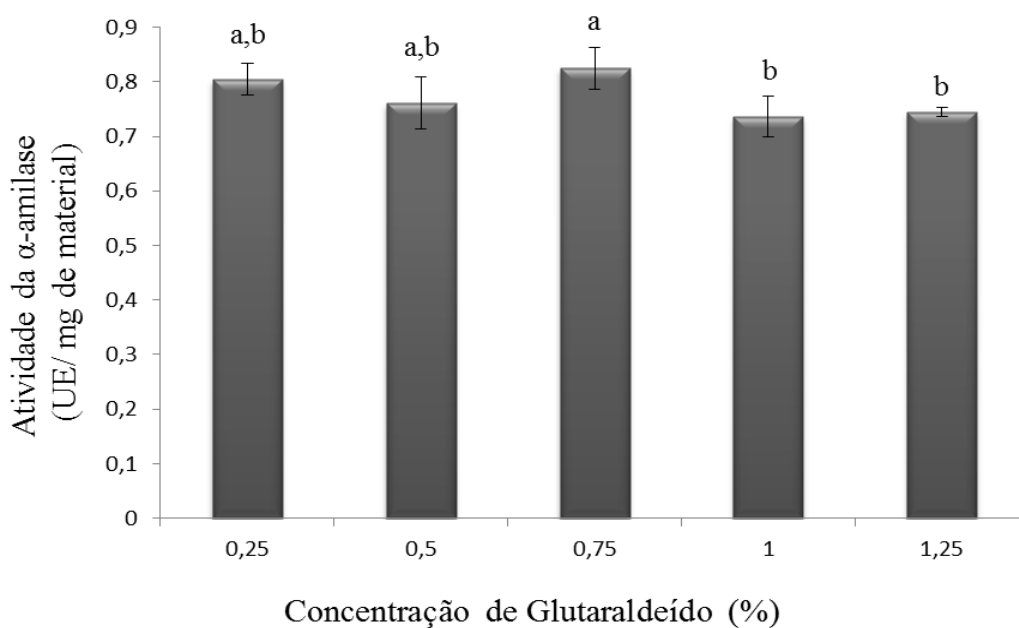


Figura 10. Atividade inicial nas blendas de pectina/PVA/amilase em diferentes concentrações de glutaraldeído. As letras distintas sobre as barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A estimativa da atividade específica dos materiais (Figura 11) apontou para maior atividade nos materiais nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,25%. Porém, a diferença entre os valores não foi significativa quando testada estatisticamente.

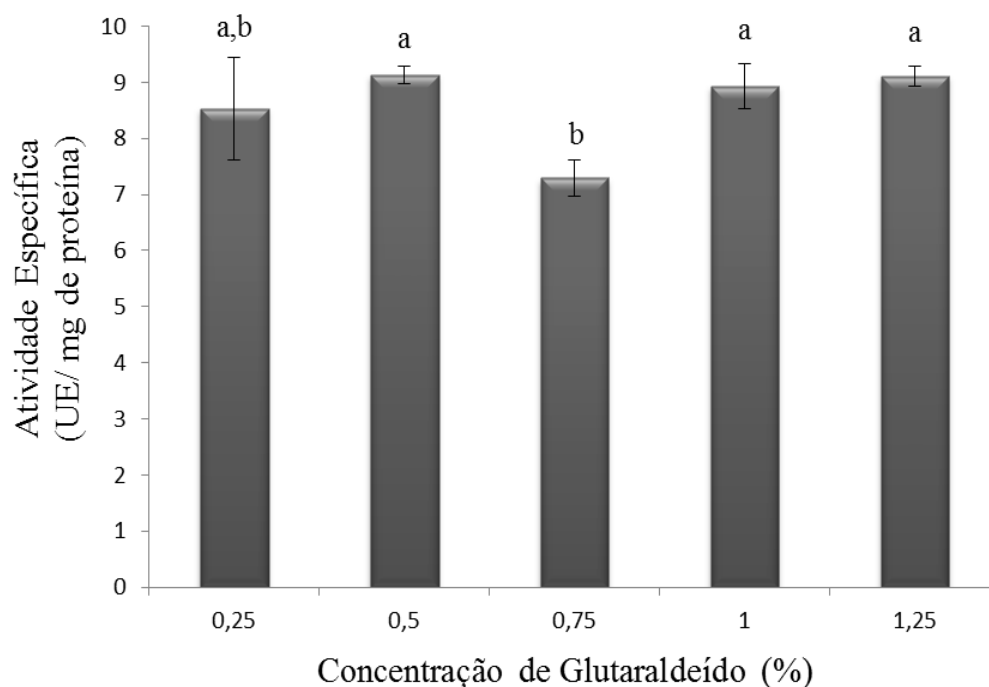


Figura 11. Estimativa da atividade específica nas blendas de pectina/PVA/amilase em diferentes concentrações de glutaraldeído. As letras distintas sobre as barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As blendas de pectina/PVA/amilase foram incubadas com solução ácida ($\text{HCl } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0) por 2 h e com solução tampão ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5) por 1 h, a fim de se estudar a estabilidade do sistema em ambientes de pH variados, conforme acontece no processo de digestão de bovinos. Os dados obtidos neste experimento podem ser visualizados na Figura 12 e mostram que houve uma redução aparente, porém não significativa na atividade dos materiais em relação à atividade inicial ($p < 0,05$). Vale ressaltar que estes dados referem-se apenas às condições laboratoriais e não refletem por si as condições reais de trabalho (câmaras digestivas de bovinos).

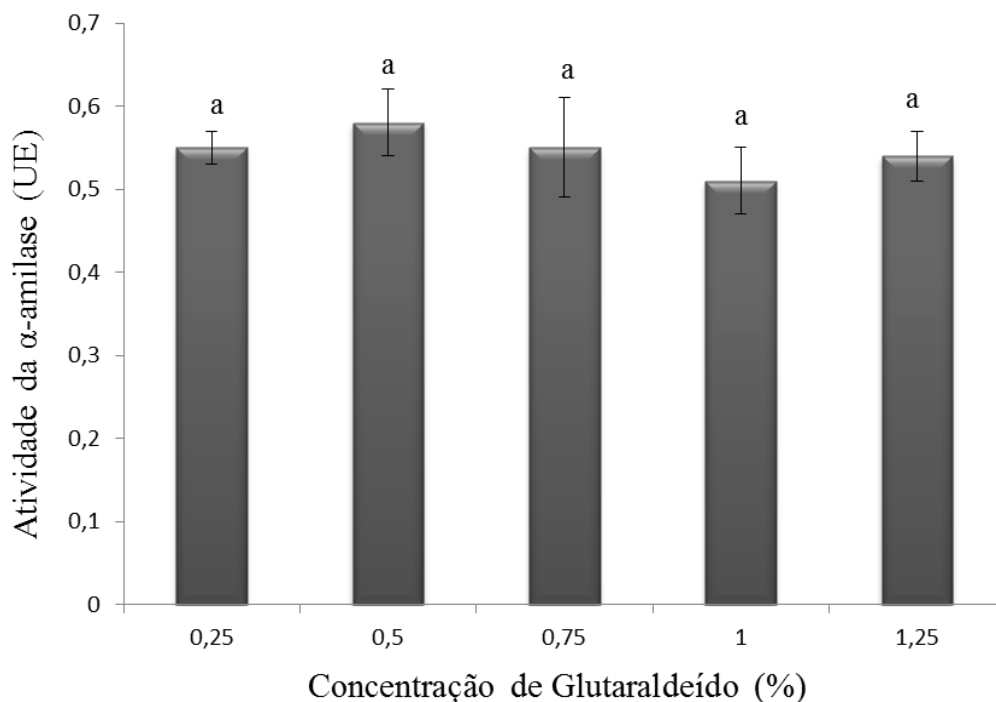


Figura 12. Atividade nas blendas de pectina/PVA/amilase após tratamento com a solução ácida. As letras distintas sobre as barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Embora a concentração de glutaraldeído aparentemente não influencie na atividade de amilase imobilizada à blenda, a taxa de liberação da enzima no meio reacional é consideravelmente influenciada pela concentração deste reagente (Tabela 4). O material de pectina/PVA/amilase produzido com a concentração de glutaraldeído de 0,25% destacou-se dos demais, permitindo a liberação contínua da enzima ao longo de 24 h; na concentração de 0,5% foi possível constatar a liberação da enzima nas primeiras 10 h de incubação; nas concentrações de 0,75 e 1,0% a liberação ocorreu em 8 h; e na concentração de 1,25% em 6 h. O processo de reticulação com glutaraldeído confere ao material maior resistência à solubilidade no meio reacional, mediante a formação de ligações cruzadas entre o polissacarídeo (pectina) e o PVA.

Como o material reticulado com menor concentração de glutaraldeído (0,25%) demonstrou maior solubilidade no meio de reação (pH 6,5) (Figura 8), pode-se atribuir a retenção prolongada da atividade da enzima à maior solubilidade do filme, que é um fator responsável pela exposição de novas camadas do filme contendo a amilase imobilizada e ativa. Batista et al. (2013) imobilizaram lipase em filme de PVA e quitosana como revestimento em reatores e verificaram a capacidade de reuso do filme por 25 ciclos, mantendo 65% da atividade inicial. Os autores atribuíram a manutenção da atividade devido à elevada solubilidade do filme que proporcionava a exposição de novas camadas contendo a lipase ativa.

Tabela 4. Atividade da α -amilase (UE) nos materiais de pectina/PVA/amilase obtidas nos ensaios realizados a longo de 24 h.

Tempo (h)	0,25%	0,50%	0,75%	1,0%	1,25%
2	13,50 (\pm 1,4)	14,4 (\pm 0,21)	11,6 (\pm 0,503)	13,9 (\pm 0,57)	14,28 (\pm 0,24)
4	3,20 (\pm 0,16)	1,83 (\pm 0,240)	2,670 (\pm 0,022)	2,66 (\pm 0,393)	1,80 (\pm 0,187)
6	0,28 (\pm 0,03)	0,194 (\pm 0,03)	0,247 (\pm 0,048)	0,40 (\pm 0,002)	0,240 (\pm 0,02)
8	0,24 (\pm 0,05)	0,14 (\pm 0,023)	0,072 (\pm 0,002)	0,06 (\pm 0,001)	-
10	0,24 (\pm 0,02)	0,10 (\pm 0,013)	-	-	-
12	0,22 (\pm 0,002)	-	-	-	-
14	0,16 (\pm 0,01)	-	-	-	-
16	0,09 (\pm 0,01)	-	-	-	-
18	0,13 (\pm 0,02)	-	-	-	-
20	0,13 (\pm 0,02)	-	-	-	-
22	0,10 (\pm 0,04)	-	-	-	-
24	0,07 (\pm 0,01)	-	-	-	-

Diversos trabalhos foram realizados utilizando substâncias pécticas como matriz de suporte para aprisionamento de compostos de importância biológica, dentre os quais se destaca o estudo realizado por Sriamornsak et al. (1997). Os autores verificaram um aumento no tempo de liberação da teofilina, utilizando pérolas revestidas com pectinato de cálcio, tanto em meio aquoso quanto em fluido gástrico simulado. A conclusão do trabalho é que as pérolas revestidas com pectinato de cálcio são mais eficientes no retardamento da liberação da teofilina que o método convencional empregado.

4.6 – ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE IN VITRO DA BLENDAS DE PECTINA/PVA/AMILASE

A perda de massa média observada após 24 e 48 h de incubação da blenda de pectina/PVA/amilase foi 79,32% ($\pm 1,68$) e 80,83% ($\pm 3,77$), respectivamente (Tabela 5). A perda de massa do sistema é devido à permanência do material em um ambiente rico em micro-organismos anaeróbicos presentes no líquido ruminal, os quais atuam na degradação da matéria orgânica, principalmente a pectina.

A Tabela 5 apresenta os valores de perda de massa verificada após 24 e 48 h de incubação. No tempo de 48 h de incubação a perda de massa foi apenas 1,51% maior em relação ao tempo de 24 h. Este pequeno aumento pode ser explicado pela maior permanência do material na incubadora, que proporcionou um maior tempo de exposição do material à flora microbiana presente no líquido ruminal, e conseqüentemente houve a pequena variação na perda de massa do sistema pectina/PVA/amilase.

Tabela 5. Avaliação da perda de massa da blenda de pectina/PVA/amilase após a incubação com o líquido ruminal.

Tempo de incubação (h)	Massa do saco vazio (g)	Massa da amostra (g)	Massa final (g)	Perda de massa (%)
24	0,5042 (\pm 0,018)	0,507 (\pm 0,0055)	0,584 (\pm 0,02)	79,32 (\pm 1,68)
48	0,508(\pm 0,02)	0,507 (\pm 0,0057)	0,58(\pm 0,024)	80,83 (\pm 3,77)

*Os valores entre parênteses representam o desvio padrão verificado nos ensaios.

4.7 – ENSAIO DE ATIVIDADE DA α -AMILASE APÓS INCUBAÇÃO

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos para a atividade da α -amilase após 24 e 48 h de incubação com o líquido ruminal. A atividade média da enzima foi de 0,021 UE/ mg de material, que corresponde a 2,76% da atividade recuperada quando comparada com a atividade do material antes da incubação (0,761 UE/ mg de material). A atividade inicial verificada no sistema pectina/PVA/amilase representa a atividade de apenas uma parcela de enzimas retida na camada externa do material, sendo esta a primeira camada de enzimas a ser liberada no ambiente ruminal. As atividades verificadas nos ensaios de 24 e 48 h de incubação referem-se às camadas mais internas de α -amilase aprisionadas que podem ter sido expostas mediante a ação de micro-organismos presentes no líquido ruminal.

Tabela 6. Atividade da α -amilase após 24 e 48 h de incubação da blenda com o líquido ruminal.

Tempo de incubação (h)	Atividade da α-amilase (UE/mg de material)
24	0,021 (\pm 0,004)
48	0,099 (\pm 0,023)

*Os valores entre parênteses representam o desvio padrão verificado nos ensaios.

A análise dos dados da Tabela 6 mostra que houve uma recuperação de 2,76% da atividade da enzima em relação à atividade inicial do material (0,761 UE/ mg de material) após 24 h de incubação, enquanto que no tempo de incubação de 48 h foi recuperado aproximadamente 13% da atividade enzimática, como resultado do maior tempo de permanência do material com líquido ruminal bovino, que propiciou a exposição de novas camadas do material contendo a α -amilase ativa.

Kansoula et al. (2006) imobilizaram a α -amilase produzidas por *Bacillus subtilis*, por aprisionamento em esferas de alginato de cálcio. A enzima imobilizada apresentou uma capacidade de liberação de açúcares redutores (18 mg/mL), a partir da molécula do amido, inferior àquela apresentada pela enzima livre (27 mg/mL). Os autores relataram que a baixa atividade enzimática obtida nos ensaios poderia, em parte, ser explicada pela matriz do gel, que atuaria como uma barreira limitante da taxa de difusão das longas moléculas de amido ao sítio ativo da enzima aprisionada no polímero.

Na matriz de pectina/PVA/amilase, após a análise de digestibilidade *in vitro* nos tempos de 24 e 48 h, foi possível constatar uma conversão de açúcares redutores, a partir da solução de amido 0,5% (p/v), de 1,18 mg/mL e 1,75 mg/mL, respectivamente. Esses valores obtidos são, aproximadamente, dez

vezes menores que o valor obtido pelos pesquisadores acima mencionados. Porém, vale ressaltar que a matriz de pectina/PVA/amilase antes de ter sua atividade testada, passou pelas condições drásticas de digestibilidade *in vitro*. Em adição, o líquido ruminal que permaneceu em contato com o material apresenta uma complexidade de composição, principalmente matéria orgânica particulada.

A atividade média da α -amilase para um tempo de digestão de 48 h foi de 0,099 UE/ mg de material (Tabela 5). A atividade do material neste tempo de incubação foi aproximadamente quatro vezes maior que a atividade obtida no tempo de incubação de 24 h (0,021 UE/ mg de material). Considerando a perda de massa do material após 48 h de incubação verifica-se que há uma pequena diferença (1,51%) em relação ao tempo de 24 h, porém Este crucial para apresentar a maior atividade verificada no experimento mediante a exposição de novas camadas de α -amilase aprisionadas na matriz polimérica.

Nos sistemas de imobilização por aprisionamento em redes reticuladas com íons carregados positivamente, como nos casos de esferas de pectinato de cálcio, a taxa de liberação do material imobilizado é fortemente influenciada pela presença de íons H^+ , que atuam desfazendo a rede com os íons cálcio produzindo regiões contendo ácidos pectínicos, que são mais permeáveis (SRIAMORNSAK et al., 1997). Porém, nos experimentos realizados neste estudo verificou-se que o ambiente ácido pouco influencia na solubilidade do material, desta forma podemos inferir que a taxa de liberação da enzima a partir da matriz de pectina/PVA/amilase é devida apenas à sua taxa de degradação por fatores diversos, como por exemplo a ação de micro-organismos presentes no rúmen bovino.

4.8. REATORES DE HIDRÓLISE CONTÍNUA DE AMIDO EM AMBIENTE RUMINAL BOVINO

No experimento realizado com os reatores para avaliação do potencial hidrolítico das blendas em ambiente ruminal bovino observou-se a existência de um pico onde a quantidade de açúcar redutor produzida é máxima, havendo uma diminuição ao longo do tempo. Segundo Willians et al. (1989) e Weimer et al. (1999) o fluido ruminal é caracterizado por apresentar um ecossistema microbiano extremamente complexo que possui diferentes espécies de micro-organismos. Esta microbiota pode secretar enzimas de funções e características variadas. Assim, pode-se inferir que a diminuição na concentração de açúcar redutor observado nos reatores se deve à sua digestão pelos micro-organismos ruminais, uma vez que constituem uma fonte de energia de elevada acessibilidade (BEUACHEMIN et al., 2000).

Pela análise da Figura 13 percebe-se que o sistema com a blenda produzida na concentração de 0,25% de glutaraldeído atingiu um valor máximo na quantidade de açúcar redutor (4,5 mg/ mL) produzida após 2 h de incubação, com uma redução nas quantificações posteriores atingindo ao final de 48 h de incubação comportamento semelhante ao apresentado pelo padrão.

A blenda confeccionada na concentração de glutaraldeído de 1,25% demonstrou melhor potencial quanto a sua capacidade de hidrólise de amido em ambiente ruminal bovino, verificada ao longo de 36 h de incubação. Conforme o demonstrado na Tabela 3 esta blenda apresentou maior resistência à tração e uma menor solubilidade em todas as condições de pH testadas. Porém na presença do líquido ruminal além do efeito do pH do meio reacional, tem-se a presença da microbiota ruminal que contribui fortemente para a degradação da matriz polimérica. Desta forma, a blenda que apresentou maior resistência à

tração (1,25%) pode ter apresentado menor taxa de degradação do que a blenda de menor resistência (0,25%). Uma solubilização lenta indica uma maior taxa de liberação de enzima para o ambiente reacional ao longo do tempo, implicando em um aumento na concentração de açúcares redutores, conforme observado na Figura 13.

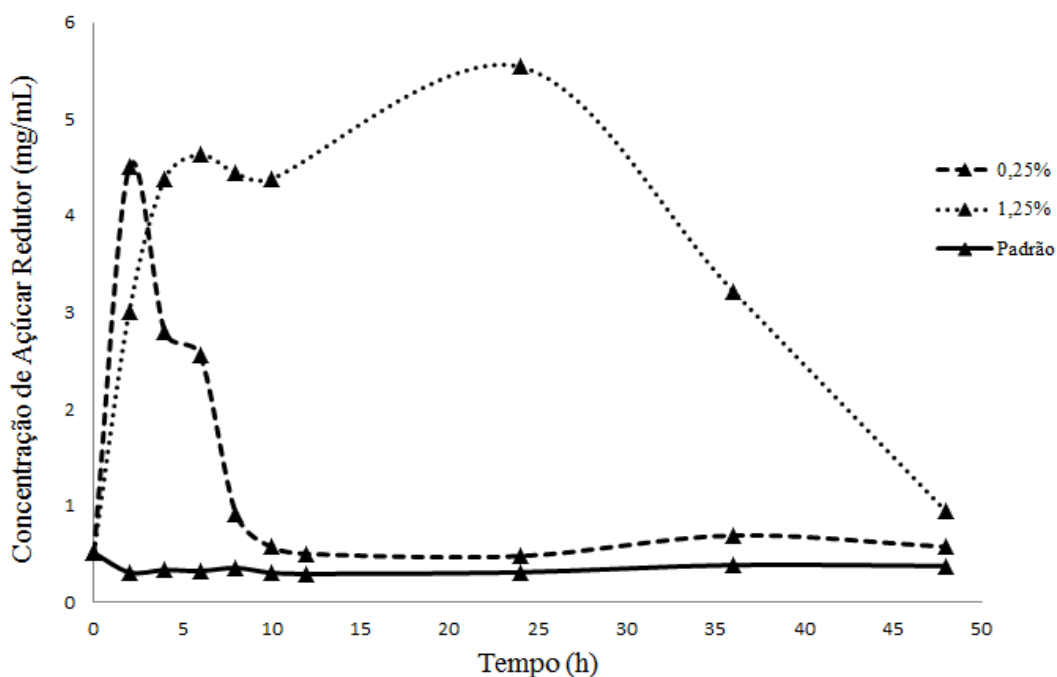


Figura 13. Potencial hidrolítico das blendas de pectina-PVA ao longo de 48 h de incubação na presença do líquido ruminal bovino.

Os resultados obtidos neste experimento diferem do comportamento observado nos reatores produzidos na ausência do líquido ruminal bovino (Tabela 4), onde a blenda obtida com a concentração de glutaraldeído de 0,25% demonstrou maior retenção na capacidade de liberação da enzima para o meio reacional, em que foi possível observar uma atividade enzimática da α -amilase mesmo após 24 h de incubação; enquanto que a blenda produzida na

concentração de glutaraldeído de 1,25% não teve a atividade enzimática quantificada após 6 h de incubação.

A concentração de amido constatada inicialmente após a adição dos grânulos de milho aos reatores foi de 2,03 mg/ mL. Decorridas as 48 h de incubação dos materiais contendo a α -amilase imobilizada, observou-se que a concentração residual de amido no reator contendo a blenda confeccionada na concentração de glutaraldeído de 0,25% foi cerca de 7,3% superior à concentração de amido inicial do reator. Porém, a blenda produzida na concentração de glutaraldeído de 1,25% mostrou uma redução na concentração de amido de aproximadamente 39,9% em relação à concentração inicial. Os valores das concentrações remanescentes de amido mensuradas nos reatores após as 48 h incubação das blendas com o líquido ruminal bovino estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Concentração remanescente de amido constatada nos reatores após 48 h de incubação com o líquido ruminal bovino.

Reatores	Concentração de amido (mg/ mL)
0,25%	2,19 (\pm 0,051)
1,25%	0,81 (\pm 0,14)
Padrão	2,62 (\pm 0,87)

*Os valores entre parênteses representam o desvio padrão verificado nos ensaios.

Os grãos de milho possuem o pericarpo como estrutura de proteção que lhes confere maior resistência. Esta resistência atua como uma barreira para a degradação microbiana e para a digestão enzimática. Segundo Philippeau et al.

(1996) no grão de milho duro, esta matriz proteica que encobre os grânulos de amido limitam a digestão ruminal do amido.

A partir da análise dos dados da tabela 7 verifica-se uma diferença nos valores da concentração de amido mensurados após incubação dos materiais, embora tenha sido adicionada, inicialmente, a mesma quantidade (80 g) de milho triturado aos reatores. Este processo pode ser explicado tanto pela ação microbiana presente no líquido ruminal quanto pela ação das enzimas liberadas a partir das blendas. Percebe que a quantidade de amido detectado no reator contendo a blenda confeccionada na concentração de glutaraldeído de 1,25% foi inferior (0,81 mg/ mL) à quantidade de amido mensurado no reator contendo a blenda produzida na concentração de glutaraldeído de 0,25% (2,19 mg/ mL). Através dos dados apresentados na Figura 13 observa-se que no reator 1,25% houve uma maior taxa de hidrólise do amido como resultado da ação da enzima α -amilase liberada a partir da blenda (1,25%), ocasionando uma diminuição na quantidade de amido disponível para detecção do ensaio de Fuwa. O contrário ocorre no reator 0,25%, em que a taxa de hidrólise da blenda (0,25%) foi menor, restando maior quantidade de amido para quantificação.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os frutos de Lobeira consistem em uma excelente fonte para obtenção de substâncias pécnicas, uma vez que esta planta frutifica durante todo o ano com um longo período de colheita aliado ao fato de que cada indivíduo pode produzir cerca de 40-100 frutos com massas que variam entre 400-900 g/ fruto.

As blendas produzidas neste estudo como suporte para a imobilização da amilase apresentaram uma superfície bastante irregular, contribuindo de forma significativa para a liberação da enzima aprisionada na rede polimérica e ainda foram resistentes ao tratamento com solução ácida (pH 2,0) retendo parte da atividade enzimática. O estudo mostrou ainda que a variação na concentração de glutaraldeído durante a confecção das blendas não influencia diretamente na atividade inicial, tampouco na estimativa da atividade específica dos materiais, porém nos ensaios *in vitro* de liberação da enzima ao longo do tempo observou-se uma maior retenção da capacidade de liberação da enzima na blenda produzida na concentração de glutaraldeído de 0,25%. De uma forma geral, todas as blendas apresentaram uma baixa resistência mecânica, sendo a blenda produzida na concentração de glutaraldeído de 1,25% a que se destacou das demais com maior resistência mecânica e menor porcentagem de alongação.

O processo de reticulação das blendas com glutaraldeído influenciou diretamente na solubilidade das mesmas. Foi constatado que as blendas apresentam uma dependência direta do pH do fluido circundante, sendo o pH 6,5 aquele em que se obteve uma maior solubilização das blendas.

A blenda produzida demonstrou-se capaz de reter parte da atividade enzimática (0,099 UE/ mg de material) mesmo após 48 h de incubação na presença de líquido ruminal bovino com uma perda de massa de aproximadamente 80%.

Nos reatores de liberação controlada da enzima observou-se que a blenda confeccionada na concentração de glutaraldeído de 0,25% demonstrou melhor desempenho quando testada na ausência do líquido ruminal bovino, mantendo atividade enzimática após 12 h de incubação. Porém, na presença do líquido ruminal bovino a blenda produzida na concentração de glutaraldeído de 1,25% demonstrou melhor desempenho quanto à capacidade de liberação contínua da α -amilase, que resulta em atividade enzimática considerável mesmo após 36 h de incubação.

O teor de amido remanescente nos reatores foi menor onde se obteve a maior taxa de hidrólise (blenda com 1,25% de glutaraldeído) e uma maior quantidade de amido foi mensurada no reator em que se constatou a menor taxa de hidrólise mediante a ação da blenda com 0,25% do agente reticulante.

Conforme os resultados preliminares apresentados neste trabalho, o material utilizado como suporte para imobilização da α -amilase apresentou características que o favorecem como possível candidato a liberação contínua da enzima (α -amilase) em ambiente ruminal bovino.

6 – PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho têm-se:

- Testar o sistema incorporado na ração de ruminantes como uma forma de minimizar o conteúdo de amido fecal.

- Testar o sistema quanto ao seu possível efeito no processo de ganho de peso quando adicionado à dieta de bovinos de corte confinados.

- Testar o sistema quanto ao seu possível efeito na produtividade de leite quando adicionado à dieta de vacas leiteiras de alta produção.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Society for Testing and Materials (ASTM). Designation: D638M-93, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Annual Book of ASTM Standards. ASTM, Philadelphia, 1995.

ARICA, M. Y.; HASIRCI, V.; ALAEDDINOGLU, N. G. Covalent immobilization of α -amylase onto PHEMA microspheres: Preparation and Application to fixed-bed reactor. **Biomaterials**, v. 16, p.761-768, 1995.

ATIKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Encapsulation of α -amylase into starch-based biomaterials: An enzymatic approach to tailor their degradation rate. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 3021-3030, 2009.

BANNINK, A.; FRANCE, J.; LOPEZ, S.; GERRITS, W. J. J.; et al. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. **Animal Feed Science and Technology**, v. 143, p. 3-26, 2008.

BATISTA, K. A.; LOPES, F. M.; YAMASHITA, F., et al. Lipase entrapment in PVA/Chitosan biodegradable film for reactor coatings. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1696-1701, 2013.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; MAEKAWA, M.; MORGAVI, D. P.; KAMPEN, R. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 3, p. 543-553, 2000.

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 4, p.163-169, 1999.

BEPPU, M. M.; VIEIRA, R. S.; AIMOLI, C. G.; et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, p. 163-169, 2007.

BERGER, J.; REIST, M. MAYER, J. M.; et al., Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p.35-52, 2004.

BERNFELD, P. α and β -amylases. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 149-158, 1955.

BIAZUS, J. P. M. et al. Maximizing of production stages of malt from *Zea mays*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. special, p. 138-145, 2005a.

BIAZUS, J. P. M. et al. Optimization of drying process of *Zea mays* malt to use as alternative source of amylolytic enzymes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. special, p. 185-190, 2005b.

BUNHANK, E. J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; CAVALCANTI, O. A. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de polimetacrilato: avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d'água. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 312-317, 2007a.

BUNHAK, E. J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; CAVALCANTI, O. A. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de etilcelulose. Avaliação das características de hidratação e permeabilidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 89-95, 2007b.

BRINGEL, L. M. L.; NEIVA, J. N. M.; ARAÚJO, V. L.; et al. Consumo, digestibilidade e balanço de nitrogênio em borregos alimentados com torta de dendê em substituição à silagem de capim-elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 1975-1983, 2011.

BROWN, M.S. MILLEN, D.D. **Protocolos para adaptar bovinos confinados a dietas de alto concentrado**. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES. *Anais...* Botucatu: FCA-UNESP-FMVZ, 2009, p.23-31.

CANTERI, M. H. G. **Caracterização comparativa entre pectinas extraídas do pericarpo de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2010. 158p.

CARAMORI, S. S.; FARIA, F. N.; VIANA, M. P.; FERNANDES, K. F.; CARVALHO JUNIOR, L. B. Trypsin immobilization on discs of polyvinyl alcohol glutaraldehyde/polyaniline composite. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 252-257, 2011.

CARAMORI, S. S.; RODRIGUES, C. R.; FERNANDES, K. F. Imobilização de enzimas. In: OLIVEIRA, S. S. (Org.). **Ciências moleculares**. Goiânia: Ueg, 2011. p. 147-165.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. The use of poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite for trypsin immobilization. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p.1159-1163, 2008.

CARDELLO, L.; LOURENÇO, E. J. Purificação parcial e caracterização da pectinametilsterase de berinjela (*Solanum meongena*. L). **Alimentos e Nutrição**, v. 4, p. 111-123, 1992.

CARDOSO, E.G. **Princípios da nutrição e exigências nutricionais de bovinos de corte**. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE, v.1, 1991, Campo Grande. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1991. 44p.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F.; CARVALHO JÚNIOR, L. B. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol-polyaniline-glutaraldehyde composite disc: a probable matrix for protein immobilization. **Processos Químicos**, v. 6, p. 46-52, 2010.

CERDÀ, A. **Fermentación ruminal, degradación y sincronización energía-proteína entenerasencebo intensivo**. Tese de doutorado. Universitat Autònoma de Barcelona, 2005. 196p.

CONG, L.; KAUL, R.; DISSING, U.; MATTIASSON, B. A model study on eudragit and polyethyleneimine as soluble carries of α -amilase for repeated hyfrolysis of starch. **Journal of Biotechnology**, v. 42, p.75-84, 1995.

COSTA, M.A.L.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F.; et al. Desempenho, digestibilidade e características de carcaça de novilhos zebuínos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n.1, p.268-279, 2002.

COSTA-JUNIOR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/ poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.

CLERICI, M.T.P.S.; KALLMANN, C.; GASPI, F.O.G.; et al. Physical, chemical and technological characteristics of Solanum lycocarpum A. St. - HILL (Solanaceae) fruit flour and starch. **Food Research International**, v. 44, p. 2143-2150, 2011.

CYSNEIROS, C. S. S. **Enzimas fibrolíticas de *Humicolagrisea*: produção, caracterização e seus efeitos sobre a digestibilidade *in vitro* do capim marandu, casquinha de soja, feno de tifton 85 e forragem de milho**. Tese de doutorado.Universidade Federal de Goiás. 2009. 104p.

EMNE'US, J.; GORTON, L. Effects on the hydrolysis of native starch and glycogen by a thermostable a-amylase after immobilization on solid supports. **Analytica Chimica Acta**, v. 234, p.97-106, 1990.

EVAGELIOU, V.; RICHARDSON, R. K., MORRIS, E. R. Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high-methoxy pectin gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 245-259, 2000.

FEITOSA, M. A. F. **Compatibilização de blenda polimérica de poliamida 6,6/polietileno de baixa densidade utilizando radiação ionizante de feixe de elétrons**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2008. 50p.

FERNANDES, K. F., LIMA, C. S., PINHO, H., COLLINS, C.H., 2003. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p.1379-1384, 2003.

FERNANDES, D. M. **Estudo da estabilidade térmica de blendas de álcool poli(vinílico)/ lignina modificada**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR, 2005. 152p.

FERREIRA, A. C. H.; RODRIGUEZ, N. M.; NEIVA, J. N. M. et al. Desempenho produtivo de ovinos alimentados com silagens de capim-elefante contendo subprodutos do processamento de frutas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, p. 315-322, 2009.

FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 2, p. 247-265, 2005.

FU, J. T.; RAO, M. A. Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: the effect of sucrose. **Food hydrocolloids**, v. 15, p. 93-100, 2001.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **Journal of biochemistry**, v. 4, p. 583-603, 1954.

GONTARD, N.; GUILBERT, S; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films-influence of the main process variables on films properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190-195, 1992.

GARCIA TRUJILLO, R.O. CÁCERES. **Nuevos sistemas para expresar el valor nutritivo de los alimentos y el requerimiento y racionamiento de los ruminantes**. Matanzas: Estación Experimental de Pastos y Forrages "Indio Hatuey", 1984. 44p.

GONZÁLEZ, L. A.; MANTECA, X.; CALSAMIGLIAS, S.; et al. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, p. 66-79, 2012.

GOROCICA-BUENFIL, M. A.; LOERCH, S. C. Effect of cattle age, forage level, and corn processing on diet digestibility and feedlot performance. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 83, n. 3, p. 705-714, 2005.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, 2004.

GRANDINI, D. Dietas Contendo Grãos de Milho Inteiro sem Fonte de Volumoso para Bovinos Confinados. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES. Anais. Botucatu: FCA-UNESP-FMVZ, 2009, p.90-102.

HIORTH, M.; VERSLAND, T.; HEIKKILA, J.; THO, I.; SANDE, S. A. Immersion coating of pellets with calcium pectinate and chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 308, p. 25-32, 2006.

HUANG. N.; SUTLIFF, T.D.; LITTS, J.C.; RODRIGUEZ, R.L. Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. **Plant Molecular Biology**, v.14, n.5, p.655-668, 1990.

HUBER, D. J.; KARAKURT, Y.; JEONG, J. Pectin degradation in ripening and wounded fruits. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 224-241, 2001.

IGLESIAS, M. T.; LOZANO, J. E. Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 215-223, 2004.

In Vitro True Digestibility using the DAISY Incubator ANKOM Technology - 03/05. Disponível em: http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf. Acesso em: 10 ago, 2012.

IBGE: Estatística da Produção Pecuária. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201201_publica_completa.pdf. Acesso em: 20 ago, 2012.

KLIEMANN, E.; SIMAS, K. N.; AMANTE, E. R.; et al. Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) using response surface methodology. **International Journal of Science and Technology**, v. 44, p. 476-483, 2009.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Starch hydrolysis by the action of an

entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 343-349, 2006.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

LINKO, Y.Y.; SAARINEN, P.; M. LINKO. Starch conversion by soluble and immobilized α -amylase. **Biotechnology Bioengineering**, v. 17, p. 153-159, 1975.

MANSUR, H. S.; SADAHIRA, C. M.; SOUZA, A. N.; et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials science engineering C**, v. 28, p. 539-548, 2008.

MARTINS, S. A.; VIEIRA, F. P.; BERCHIELLI, T. T. et al. Taxa de passagem e parâmetros ruminais em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1-11, 2006.

MIOTTO, F. R. C.; NEIVA, J. N. M.; VOLTOLINI, T. V. J. et al. Desempenho produtivo de tourinhos Nelore x Limousin alimentados com dietas contendo gérmen de milho integral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, p. 624-632, 2009.

MESBAHI, G.; JAMALIAN, J.; FARAHNAKY, A. A comparative study functional properties of beet and citrus pectins in food systems. **Food hydrocolloids**, v. 19, p. 731-738, 2005.

MEYER, L. N. **Effect of immobilization method on activity of alpha-amylase**. Ohio State University. 2007. 45p.

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

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 681-689, 2012.

MUNJERI, O.; COLLETT, J. H.; FELL, J. T. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 46, p. 273-278, 1997.

MURAO, S.; INUI, M.; ARAI, M. Preparation of immobilized bacterial α -amylase of liquefying type and its properties. **Hakko Kogaku Kaishi**, v. 55, p.75-77, 1977.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**, 5 Ed. Porto Alegre: Artmed 2011.

NOVO NORDISK, 1999. Termamyl LC: an α -amylase preparation produced by *Bacillus licheniformis* expressing a gene encoding a modified α -amylase from *Bacillus licheniformis*. GRAS Notice submitted to the U.S. **Food and Drug Administration**. GRN 000022.

NOVOZYMES S/A, 2013a. Disponível em: <http://www.bimber.info/files/thermamyl-application.pdf>. Acesso em 22/05/2013 às 22:44.

NOVOZYMES S/A, 2013b. Disponível em: <http://www.bimber.info/files/thermamyl-pds.pdf>. Acesso em 22/05/2013 às 22:47.

OHTSUKA, Y.; KAWAGUCHI, H.; YAMAMOTO, T. Immobilization of α -amylase on polymer carriers having different structures. **Journal Applied Polymer Science**, v. 29, p. 3295-3306, 1984.

OLIVEIRA, F. M.; CAVALCANTI, O. A. Pré-bióticos na formação de filmes isolados de Eudragit RS30D. Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 325-331, 2007.

ORLU, M.; CEVHER, E.; ARAMAN, A. Design and evaluation of colon specific drug delivery system containing flurbiprofen microsponges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, n. 1-2, p. 103-117, 2006.

PASCOAL, A. M.; MITIDIARI, S.; FERNANDES, K. F. Immobilisation of α -amylase from *Aspergillus niger* onto polyaniline. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 300-306, 2011.

PHILIPPEAU, C., CHAMPION, M., MICHALET-DOREAU, B. Influence du genotype et du stade de maturite sur la digestion ruminale de l'amidon de maïs recolte au stade ensilage. In: Symposium on Silage maize, 1996, Nantes. Annales... Nantes, 1996. p. 379-380.

PIMENTA, C. J.; CHAGAS, S. J. R.; COSTA, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica L.*) colhido em quatro estádios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 4, p. 1079-1083, 2000.

PURCENA, L.L.A.; CARAMORI, S.S.; MITIDIARI, S.; FERNANDES, K.F. The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p.1077-1081, 2009.

RANI, P.; SHARMA, M.; KUMAR, V.; PUNDIR, C. S. Immobilization of amylase onto arylamine glass beads affixed inside a plastic beaker: Kinetic properties and application. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 230-233, 2007.

REGO, M.M.T.; NEIVA, J.N.M.; REGO, A.C. et al. Intake, nutrients digestibility and nitrogen balance of elephant grass silages with mango by-product addition. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 74-80, 2010.

REISS, M.; HEIBGES A.; METZGER, J.; HARTMEIER, W. 1998. Determination of BOD-values of starch-containing waste water by BOD-biosensor. **Biosensors Bioelectron**, v. 13, p. 1083-1090, 1998.

RIAZ, A.; QADER, S. A. U.; A, A.; I, S. Immobilization of a Thermostable α -amylase on calcium alginate beads from *Bacillus Subtilis* KIBGE-HAR. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p.2883-2887. 2009.

ROJO, R.; Mendoza, G.D.; Gonzalez, S.S.; et al. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. **Animal Feed Science Technology**, v. 124, p. 655-665, 2005.

- RUSSEL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.C.; et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant Fermentation. **Journal Animal Science**. v. 70, p. 3553-3561, 1992.
- SAHLIN, F.; ALMQVIST, A.; LARSSON, R.; et al. Rough surface flow factors in full film lubrication based on a homogenization technique. **Tribology International**, v. 40, p. 1025-1034, 2007.
- SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M., et al. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 215-232, 2007.
- SANTOS, R. **Imobilização de lipases em gel de pectina**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Regional de Blumenau. Florianópolis e Blumenau - SC, 2003. 58p.
- SILVA, R. L. F. O. B.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 642-648, 2008.
- SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 2009. 160p.
- SILVA, L.; MACHADO, P. F.; FRANCISCO JUNIOR, J. C.; DONIZETTI, M.; PEREIRA, A. R. Relação entre a composição química e a degradabilidade *in situ* da matéria seca e da fibra detergente neutro da fração volumosa de híbridos de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 288-294, 2000.
- SILVA, H. L. **Dietas de alta proporção de concentrado para bovinos de corte confinados**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO, 2009. 157p.
- SINHA, V.R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 19-38, 2001.
- SCAMPARINI, A. **Desmetoxilação de pectina cítrica**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 1978. 69p.
- SCHLESINGER, S. **Onde pastar? O gado bovino no Brasil**. 1ª Ed. Rio de Janeiro – RJ: Fase, 2010.
- SORIANO, F.D., POLAN, C. E., MILLER, C. N. Milk production and composition, rumen fermentation parameters, and grazing behavior of dairy cows supplemented with different forms and amounts of corn grain. **Journal of Dairy Science**, v.83. p. 1520-1529, 2000.
- SOUTO-MAIOR, J. P. A.; REIS, A. V.; PEDREIRO, L. N.; CAVALCANTE, O. A. Avaliação da pectina fosfatada aplicada na formação de filmes isolados. Material candidato a novos sistemas para liberação modificada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 203-213, 2008.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR, 2005. 143p.

SRIAMORNSAK, P. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 169, p. 213-220, 1998.

SRIAMORNSAK, P.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; PRAKONGPAN, S. Calcium pectinate gel coated pellets as an alternative carrier to calcium pectinate beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p. 189-194, 1997.

SUTLIFF, T.D., HUANG, N., LITTS, J.C., RODRIGUEZ, R.L. Characterization of an α -amylase multigene cluster in rice. **Plant Molecular Biology**, v.16, n.4, p. 579-591, 1991.

STRUMEYER, D.H.; CONSTANTINIDES, A.; FREUDENBERGER, J. Preparation and characterization of α -amylase immobilized on collagen membranes. **Journal Food Science**, v. 39, p. 498-502, 1974.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes, fisiologia dos animais domésticos. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

TEIXEIRA, A. F.; WEDEL, T.; KRAMMER, H. J. KIIHNEL, W. Structural differences of the enteric nervous system in the cattle forestomach revealed by whole mount immunohistochemistry. **Annals of Anatomy**, v. 180, p. 393-400, 1998.

TERASHIMA, M.; HAYASHI, N.; THOMAS, B.R; RODRIGUEZ, R.L.; KATOH, S. Kinetic parameters of two rice α -amilase isozymes for oligosaccharide degradation. **Plant Science**, v. 116, p. 9-14, 1996.

TIBO G. C.; VALADARES FILHO S. C.; VALADARES, R. F. D.; SILVA, J. F. C.; CECON, P. R.; LEÃO, M.I.; SILVA, R. B. Níveis de concentrado em dietas de novilhos mestiços F1 simental x nelore. 1. Consumo e digestibilidades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 910-920, 2000.

TIEN, C. J.; CHIANG, B. H. Immobilization of α -amylase on a zirconium dynamic membrane. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 337-383, 1999.

TORRALBO, D. F.; BATISTA, K. A.; DI-MEDEIROS, M. C. B. FERNANDES, K. F. Extraction and partial characterization of *Solanum lycocarpum* pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 378-383, 2012.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillusoryzae* α -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 136-150, 2008.

VALLE, E. R. **Boas práticas agropecuárias - bovinos de corte**. 1 ed. Campo Grande-MS: Embrapa Gado de Corte, 2007.

VELÁSQUEZ, A.; PICHARD, G. Effects of rumen fluid pre-incubation on in vitro proteolytic activity of enzymatic extracts from rumen microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 162, p. 75-82, 2010.

VIEIRA-JÚNIOR, A. **Alfa e beta-amilase no metabolismo do amido durante o amadurecimento da banana: clonagem e caracterização molecular**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2006. 91p.

VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V.; VAN LAAR, H.; DEMEYER, D. Rumen odd and branched chain fatty acids in relation to in vitro rumen volatile fatty acid productions and dietary characteristics of incubated substrates. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, p. 401-411, 2004.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263-275, 2009.

WEIMER, P. J.; WAGHORN, C. L.; MERTENS, D. R.; Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82. n. 1, p. 122-134, 1999.

WILLIAMS, A. G.; WITHERS, S. E.; STRACHAN, N. H. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 15-26, 1989.

ZANIN, G.M.; KAMBARA, L.M.; CALSAVARA, L.P.V.; DE MORAES, F.F. Performance of fixed and fluidized bed reactors with immobilized enzyme. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 45, p. 627-640, 1994.

ZAIN, N. A. M.; SUHAIMI, M. S.; IDRIS, A. Development and modification of PVA-alginate as a suitable immobilization matrix. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2122-2129, 2011.