CLEISEANO EMANUEL DA SILVA PANIAGUA
(ORGANIZADOR)

ENGENHARIA QUÍMICA

QUALIDADE, PRODUTIVIDADE E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

Atena Editora
Ano 2024

CLEISEANO EMANUEL DA SILVA PANIAGUA
(ORGANIZADOR)

ENGENHARIA QUÍMICA

QUALIDADE, PRODUTIVIDADE E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

Atena Editora
Ano 2024

CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA E ENGENHARIAS

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Camila Alves de Cremo
Ellen Andressa Kubisty
Luiza Alves Batista
Nataly Evilin Gayde
Thamires Camili Gayde
Imagens da capa
iStock
Edição de arte
Luiza Alves Batista

2024 *by Atena Editora*
Copyright © Atena Editora
Copyright do texto © 2024 Os autores
Copyright da edição © 2024 Atena Editora
Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.
Open access publication by Atena Editora

Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial
Ciências Exatas e da Terra e Engenharias
Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Profª Drª Alana Maria Cerqueira de Oliveira – Instituto Federal do Acre
Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Profª Drª Ana Paula Florêncio Aires – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Fabrício Moraes de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Glécilla Colombelli de Souza Nunes – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Iara Margolis Ribeiro – Universidade Federal de Pernambuco
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Bitencourt Campos – Universidade do Extremo Sul Catarinense
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Maria José de Holanda Leite – Universidade Federal de Alagoas
Prof. Dr. Miguel Adriano Inácio – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
Prof. Dr. Milson dos Santos Barbosa – Universidade Tiradentes
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Dr. Nilzo Ivo Ladwig – Universidade do Extremo Sul Catarinense
Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
Profª Dr Ramiro Picoli Nippes – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Regina Célia da Silva Barros Allil – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA E ENGENHARIAS

Engenharia química: qualidade, produtividade e inovação tecnológica

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Andria Norman
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizador: Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

E57 Engenharia química: qualidade, produtividade e inovação tecnológica / Organizador Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2024.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-2291-4
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.914242203

1. Engenharia química. I. Paniagua, Cleiseano Emanuel da Silva (Organizador). II. Título.

CDD 660

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

O e-book: “Engenharia química: qualidade, produtividade e inovação tecnológica” é composto por quatro capítulos de livros que procuraram investigar: *i)* a utilização de sistemas eletrônicos de informação para a prestação de serviço de saneamento em Pernambuco; *ii) a* seleção de bactérias produtoras de amilase provenientes de diferentes vegetais e do solo; *iii)* a imobilização da enzima peroxidase em grânulos de alginato-pectina, alginato-pectina-amido para a produção de biopolímeros e; *iv)* a determinação da concentração do corante amarelo de tartrazina em diferentes marcas de suco em pó por espectrofotometria UV/Vis.

O primeiro capítulo apresenta um estudo de uso de um Sistema Eletrônico de Informações (SEI) com o intuito de organizar e padronizar a gestão de documentos da Agência de Regulação dos Serviços Públicos Delegados do Estado de Pernambuco (Arpe), os autores destacaram-se que o uso do SEI é capaz de promover um melhor monitoramento das informações e aprimorar a compreensão das diferentes áreas de regulação da Arpe.

O capítulo 2 apresenta um estudo que investigou o isolamento, a caracterização e a seleção de bactérias produtoras da enzima amilase, provenientes de amostras oriundas de vegetais e do solo. Os resultados apontaram que o maior índice de atividade enzimática é proveniente da bactéria do gênero *Bacillus subtilis* isolada a partir da raiz do milho (*Zea mays*).

O terceiro capítulo investiga a atividade biocatalítica da enzima peroxidase de raiz forte (HRP) para fins industriais, a partir da imobilização em biopolímeros híbridos contendo alginato, pectina e/ou amido. Os resultados apontaram que os grânulos de alginato-pectina-amido apresentam capacidade superior de imobilização de HRP em relação aos grânulos de alginato-pectina e inferior ao grânulo constituído somente de alginato (controle).

Por fim, o quarto capítulo investiga a detecção do corante amarelo tartrazina em diferentes marcas de sucos em pó por espectrofotometria UV/Vis, a fim de verificar se os mesmos atendem as recomendações estabelecidas pela ANVISA. Os resultados apontaram que todas as marcas analisadas, se encontravam dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA.

Nesta perspectiva, a Atena Editora vem trabalhando de forma a estimular e incentivar cada vez mais pesquisadores do Brasil e de outros países, a publicarem seus trabalhos com garantia de qualidade e excelência em forma de livros, capítulos de livros e artigos científicos.

Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1

POTENCIALIZANDO A REGULAÇÃO COM SISTEMAS INTEGRADOS: ANÁLISE DO CONVÊNIO ARPE-COMPESA E USO DO SEI

Cícero Henrique Macêdo Soares

https://doi.org/10.22533/at.ed.9142422031

CAPÍTULO 2 11

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTERIAS PRODUTORAS DE α-AMILASE

Cristian Jacques Bolner de Lima
Monique Virães Barbosa dos Santos
Marcos Benedito Santana

https://doi.org/10.22533/at.ed.9142422032

CAPÍTULO 3 19

IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE DE RAIZ FORTE POR APRISIONAMENTO E LIGAÇÃO COVALENTE EM SUPORTE HÍBRIDO DE ALGINATO-PECTINA E ALGINATO-PECTINA-AMIDO

Ani Caroline Weber
Bruno Eduardo da Silva
Joana Elisa Willrich
Bruna Costa
Cristiano de Aguiar Pereira
Giovana Schneider
Sabrina Grando Cordeiro
Daniel Augusto Weber
Jéssica Samara Herek dos Santos
Eduardo Miranda Ethur
Elisete Maria de Freitas
Filipa Rego Pinto Gomes
Lucélia Hoehne

https://doi.org/10.22533/at.ed.9142422033

CAPÍTULO 4 30

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TEOR DE CORANTE AMARELO TARTRAZINA EM PREPARADO SÓLIDO PARA REFRESCO POR ANÁLISE QUÍMICA INSTRUMENTAL

Victória Mel Prado
Beatriz B. Klein
Jorge N. Ganiko
Jaqueline N. de Sousa
Elaine de A. O. Coringa

https://doi.org/10.22533/at.ed.9142422034

SOBRE O ORGANIZADOR 35

ÍNDICE REMISSIVO 36

POTENCIALIZANDO A REGULAÇÃO COM SISTEMAS INTEGRADOS: ANÁLISE DO CONVÊNIO ARPE-COMPESA E USO DO SEI

Data de aceite: 21/03/2024

Cícero Henrique Macêdo Soares

RESUMO: O trabalho aborda o uso de sistemas como fator preponderante para a potencialização da ação de regulação da Agência de Regulação dos Serviços Públicos Delegados do Estado de Pernambuco (Arpe). Destacam-se a ressignificação do uso do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) pela agência para organização, padronização e gestão de documentos, bem como o Convênio de Cooperação entre a Arpe e a prestadora de serviços de água e esgotamento sanitário do Estado de Pernambuco, a Compesa, no qual ocorre o compartilhamento do uso do Sistema Integrado de gestão de Serviços de Saneamento para Companhias de Abastecimento de Água e Saneamento – GSAN, *Business Intelligence* – BI e Sistema de Informações Geográficas – GISCOMP. O estudo ressalta que o uso desses sistemas promove o monitoramento de informações e proporciona uma compreensão mais apurada na área de regulação.

PALAVRAS-CHAVE: Convênio de Cooperação. Sistemas. Monitoramento. Saneamento.

INTRODUÇÃO/OBJETIVOS

O uso de sistemas integrados entre agências de regulação e prestadoras de serviços de saneamento básico é essencial para o monitoramento eficiente das informações do setor, garantindo a padronização e centralização dos dados, o cumprimento de metas e a transparência na divulgação das informações. Nesse sentido, existem sistemas que podem promover estas melhorias. Como cita **Da Silva e Barbosa (2020)**, a adesão ao SEI por organizações públicas traz benefícios significativos. Afora as vantagens de cunho tecnológico e econômico, haja visto ser um software gratuito, com acesso remoto e 100% web, muitas vantagens do ponto de vista funcional podem ser elencadas: controle de acesso, elaboração de documentos dentro do sistema, assinatura eletrônica, criação de documentos modelo, acompanhamento especial do andamento de processos e controle de prazos. Desta maneira, as funcionalidades do SEI permitem notadamente maior

eficiência, agilidade e segurança na gestão de processos. No setor de saneamento, **Souza (2020)** destaca que o GSAN é uma alternativa de gerenciamento das informações. Já a disponibilização dos dados de projeto no GISCOMP tem o objetivo de centralizar informações, facilitando a visualização por todos os setores da companhia (**SANTOS, 2022**). O *Business Intelligence* desempenha um papel fundamental na tomada de decisões estratégicas das organizações. Ele permite a análise de dados e informações de forma integrada, proporcionando insights valiosos para melhorar o desempenho e a eficiência dos negócios. Na **Figura 1** estão os vários sistemas da Compesa:

Figura 1 - Acesso VPN-PORTAL Rede Compesa.

A seguir será descrito de forma breve sobre cada sistema:

a. Sistema Integrado de gestão de Serviços de Saneamento para Companhias de Abastecimento de Água e Saneamento – GSAN - é um tipo de sistema integrado

de gestão de serviços e no âmbito da Compesa está relacionado a área comercial. Silva (2017) destaca que o GSAN é um banco de dados alfanumérico composto para armazenamento de informações, que é alimentado pelas diferentes gerências da prestadora e contém detalhes sobre conexões de água, incluindo informações sobre imóveis e os clientes associados a essas conexões. Além disso, ele é atualizado diariamente pelas unidades de atendimento ao público, bem como pelas unidades de trabalho interno.

b. Sistema de Informações Geográficas – GISCOMP - é uma plataforma de serviços web que desempenha um papel fundamental na gestão corporativa. Ela é utilizada para aprimorar as operações comerciais, logísticas e de manutenção, permitindo-nos trabalhar com dados apresentados de forma visual em mapas, que é alimentado pelas diferentes gerências da prestadora e contém detalhes sobre conexões de água, incluindo informações sobre imóveis e os clientes associados a essas conexões (COMPESA 2023).

c. Business Intelligence – BI - é uma ferramenta mais a nível gerencial que auxilia no processo de coleta, análise, organização e monitoramento de informações.

Diante disso, o objetivo principal deste trabalho é analisar a ampliação da regulação através do uso do SEI na gestão dos processos da Coordenadoria de Saneamento da Arpe e do compartilhamento de sistemas, permitindo o monitoramento de informações e proporcionando uma compreensão mais precisa e abrangente na área de regulação do saneamento.

METODOLOGIA

Foi realizado levantamento quantitativo dos processos em tramitação na Coordenadoria de Saneamento nos últimos 5 (cinco) anos de modo a avaliar se houve algum impacto no andamento processual após a utilização dos sistemas.

Considerando a necessidade de otimizar os processos internos, promover a transparência, agilizar a comunicação entre os setores correlatos e facilitar o acesso às informações, o uso do SEI foi ressignificado dentro da atuação da Coordenadoria de Saneamento da Arpe no ano de 2022. Além disso, a Coordenadoria de Saneamento da Arpe (SARS), em parceria com a Compesa, celebrou o **Convênio de Cooperação nº 001/2022**, Processo SEI nº 0060500483.000194/2021-91, para ter acesso aos sistemas GSAN, BI e GISCOMP. Tendo em vista os objetivos do trabalho, o seu fluxo está disposto na **Figura 2**:

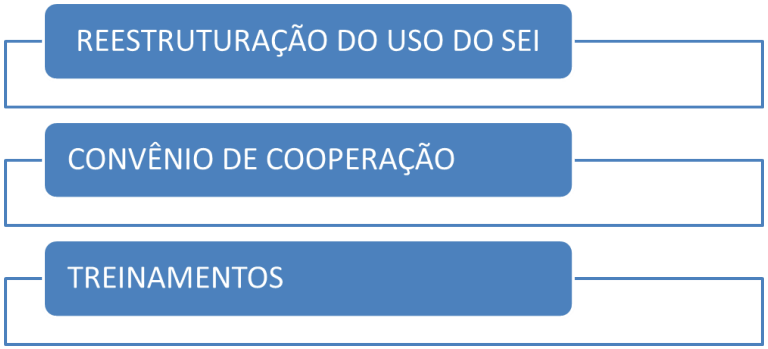

Figura 2 - Fluxo de aplicação dos sistemas pela Coordenadoria de Saneamento da Arpe.

Embora o Estado de Pernambuco tenha disposto no ano de 2017 sobre a utilização de meio eletrônico para a realização de processo administrativo no âmbito de sua administração pública, por meio do Decreto nº 45.157, de 23 de outubro de 2017, o diagnóstico realizado na Coordenadoria de Saneamento apontou um uso deficiente das funcionalidades do SEI, adotado como sistema oficial. A reestruturação do uso do SEI baseou-se em otimizar o uso dos recursos disponíveis no sistema visando organizar a distribuição e localização dos processos, como também agilizar os trâmites processuais para melhorar a gestão dos prazos. Assim, passaram a ser fortemente utilizadas foram as funcionalidades de padronização documental (sendo criados modelos de ofícios, comunicações internas, relatórios de fiscalização, notas técnicas, entre outros) e de organização em unidades (por exemplo, alicerçando a aplicação da Metodologia ACERTAR pela Arpe).

Complementarmente, diante da necessidade de monitoramento de informações, por parte da Agência, pertinentes ao setor de saneamento, principalmente para o acompanhamento das metas de universalização, redução de perdas, não intermitência do abastecimento e melhorias dos processos de tratamento, foi celebrado o Convênio de Cooperação Arpe-Compesa, pactuando-se o acesso a alguns sistemas da prestadora (GSAN, BI e GISCOMP) e obedecendo-se aos termos do convênio, como acesso, treinamento e uso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a implementação do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e o compartilhamento de bases de dados e acesso aos sistemas, como o GSAN, BI e GISCOMP, trouxeram melhorias significativas para as atividades de regulação da Arpe, a saber:

i) **Sistema Eletrônico de Informações (SEI)** - definição do uso de três unidades: ARPE-ACERTAR (unidade para tramitação dos processos relacionados à Metodologia ACERTAR, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela unidade),

ARPE – SARS (unidade para tramitação de processos de cunho administrativo e de pessoal da coordenadoria, e demandas externas) e ARPE - SARS Processos (unidade para tramitação dos processos administrativos relacionados às fiscalizações técnico-operacionais). Em ambas as unidades foram definidos marcadores de acordo com as etapas de tramitação do processo, acompanhamento especial para facilitar a busca e arquivamento, bem como a criação de processos modelos onde os documentos padronizados são criados e atualizados periodicamente.

A reorganização do uso do SEI trouxe benefícios significativos para a celeridade na análise e conclusão dos processos administrativos, conforme destacado na **Figura 3**, correspondendo a uma redução em 72% (setenta e dois por cento) do número de processos sem decisão administrativa se comparado o ano de 2022 (início do uso do SEI) com o ano de 2023 (SEI em pleno uso). O gráfico da **Figura 3** mostra também o número decisões administrativas lavradas em processos administrativos no período analisado, evidenciando um aumento de 378% (trezentos e setenta e oito por cento) se comparados o número médio de decisões dos anos anteriores ao uso do SEI (2019 a 2021) com o número de decisões no ano de 2023. Importante destacar que os dados de 2023 foram obtidos até o momento da conclusão da escrita deste trabalho e que o prognóstico é de melhoria. Considerando que não houve alteração no número de analistas de regulação que compõem a equipe da Coordenadoria de Saneamento, estes resultados refletem o aumento na capacidade de análise dos processos em decorrência do alinhamento da utilização do SEI com uma nova política de gestão da Coordenadoria.

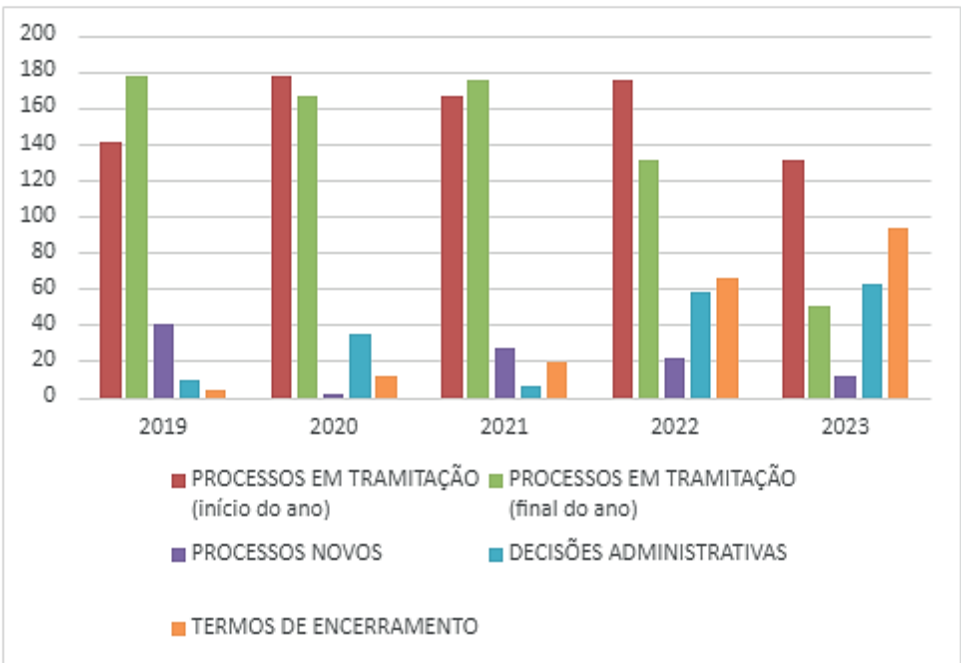

Figura 3 – Gráfico sobre os Processos Administrativos.

Importante ressaltar que o aumento da capacidade de análise dos processos agrega maior segurança administrativa em seus processos, uma vez que as resoluções da agência podem ser seguidas mais de perto no tocante aos prazos, e maior eficiência, uma vez que a resolutividade das não conformidades constatadas podem ser acompanhadas em momento próximo ao da ocorrência.

ii) **Convênio de Cooperação nº 001/2022 -** disponível no Processo SEI nº 0060500483.000194/2021-91, consta das seguintes etapas: disponibilização de acesso dos sistemas GSAN, BI e GISCOMP para os servidores da Coordenadoria de Saneamento da Arpe; treinamento dos sistemas, na sede da Compesa, e planejamento para monitoramento das metas da prestadora de serviços. A primeira etapa foi a efetivação dos acessos dos sistemas aos servidores da Coordenadoria de Saneamento e Resíduos Sólidos da Arpe:

a. Conforme destaca a **Figura 4**, para os acessos disponibilizados, os seguintes aspectos podem ser explorados: Atendimento ao Público, Cadastro, Micromedição, Cobrança e Arrecadação.

Figura 4 – Tela de acesso do GSAN.

b. O acesso ao GISCOMP é através do endereço https://servicos.compesa.com.br/giscomp/ e a **Figura 5** mostra os seguintes tópicos podem ser pesquisados:

Figura 5 – Tela de acesso do GISCOMP.

c. No contexto da Compesa existe um grande foco na apresentação de diversos indicadores, conforme destaca a **Figura 6**. O acesso ao BI é através do endereço https://vpn.compesa.com.br/remote/login?lang=en.

Figura 6 – Tela de acesso do BI Compesa.

Os treinamentos aconteceram nos dias 23 de março de 2023 (GSAN), 11 de maio de 2023 (GISCOMP) e 17 de maio de 2023 (BI). Nas **Figuras 7, 8 e 9** estão o registro desses momentos:

Figura 7 – Treinamento para o uso do GSAN.

Figura 8 – Treinamento para o uso do GISCOMP.

Figura 9 – Treinamento para o uso do BI.

Após as etapas de liberação de acessos e treinamentos, seguiu-se com a familiaridade dos sistemas para o seu uso nas diversas demandas. Com o acesso aos sistemas, algumas informações foram obtidas, contribuindo para a resolução das demandas em tempo menor, pois os prazos que seriam necessários para solicitação das informações e recebimento delas, foram encurtados a uma simples pesquisa. Com isso, gera-se mais celeridade e eficiência nas resolutividades das diversas demandas surgidas. A **Tabela 1** ilustra isso:

Nº Processo SEI	Descrição do Processo	Tipo de Informação
0030200027.000673/2021-72	Sanção do tipo multa – Abreu e Lima	Número de economias atendidas com água
0030200001.004871/2023-65	Esclarecimento sobre a cobrança de tarifa de esgoto em Parnamirim	Número de economias de esgoto Número de economias cadastradas na tarifa social Número de economias atendidas com água
0030200008.002058/2023-91	Falta de água por mais de 30 dias em Exu	Número de reclamações sobre extravasamento de esgoto

Tabela 1 – Processos administrativos que usaram os acessos aos sistemas Compesa.

Normalmente as solicitações de informações, no âmbito da Coordenadoria de Saneamento da Arpe, são regidas pelas Resoluções Arpe nº 083 (2013) e nº 012 (2009). Com a disponibilidade dos acessos aos sistemas da prestadora, os prazos previstos para o envio das respostas as solicitações são encurtadas a uma simples pesquisa. Com isso, gera-se mais celeridade e eficiência nas resolutividades das diversas demandas surgidas.

O diálogo com a prestadora de serviços de água e esgotamento sanitário, Compesa, foi estreitado por meio do Convênio de Cooperação, resultando em uma colaboração mais efetiva no compartilhamento de sistemas e na troca de informações relevantes para a regulação do setor. Além disso, o acesso aos sistemas pode contribuir para o monitoramento das demandas da Metodologia ACERTAR.

CONCLUSÃO

A ausência de sistema próprio de tecnologia da informação muitas vezes é apontada como fator limitador da atuação da agência de regulação. É sabido, porém, que avançar no desenvolvimento e aquisição de soluções tecnológicas é um processo custoso. A utilização dos sistemas apresentados no presente trabalho mitigou muitas dificuldades enfrentadas rotineiramente e mostrou que é possível atuar visando melhores resultados, fazendo-se bom uso dos recursos já disponíveis, enquanto se aguarda sistemas customizados.

Portanto, o presente trabalho demonstrou a importância da ressignificação do uso do SEI na Coordenadoria de Saneamento da Arpe, que através da padronização documental e organização das unidades alcançou grandes melhorias de gestão. Destacou-se o aumento expressivo da análise e conclusão de processos administrativos, que possibilitaram um acompanhamento mais efetivo da resolução das não conformidades constatadas. Ao mesmo tempo, o uso integrado de sistemas da prestadora de serviços, por meio do Convênio de Cooperação entre a Arpe e a Compesa, potencializou as atividades de regulação da agência na área de saneamento. Embora o uso efetivo desses sistemas seja recente, é possível vislumbrar a obtenção de dados estatísticos para as demandas consultadas nos anos posteriores, e a aplicação deles no acompanhamento da Metodologia ACERTAR.

As melhorias apresentadas representam um importante passo rumo ao aprimoramento contínuo da regulação do serviço de abastecimento de água e saneamento em Pernambuco. As perspectivas diante do Convênio de Cooperação nº 001/2022 é ampliar o acesso a outros sistemas, fortalecendo a parceria entre o regulador e o regulado e promovendo o ambiente regulatório.

REFERÊNCIAS

Agência de Regulação dos Serviços Públicos Delegados do Estado de Pernambuco (ARPE). RN-083 de 30 de julho de 2013. Disponível em: <http://www.arpe.pe.gov.br/images/RESOLUCAO/RN-083_de_30_de_julho_de_2013.pdf>. Acesso em: 14 de setembro de 2023.

Agência de Regulação dos Serviços Públicos Delegados do Estado de Pernambuco (ARPE). **RN-12 de 27 de novembro de 2009**. Disponível em: <http://www.arpe.pe.gov.br/images/RESOLUCAO/RN-12-de-27-de-novembro-de-2009.PDF>. Acesso em: 14 de setembro de 2023.

COMPESA. Sistema da Compesa integra cadastro de clientes e informações das redes de água e esgoto. Disponível em: <https://servicos.compesa.com.br/sistema-da-compesa-integra-cadastro-de-clientes-e-informacoes-das-redes-de-agua-e-esgoto/#:~:text=O%20Sistema%20de%20Informações%20Geográficas,%C3%A0s%20demandas%20internas%20e%20ao>. Acesso em: 14 de setembro de 2023.

DA SILVA, Lucílio Damião; BARBOSA, Rafaele Rodrigues. Sistema Eletrônico de Informações (SEI): uma análise da viabilidade de implantação nas diversas organizações públicas brasileiras. Revista Artigos. Com, v. 16, p. e3241-e3241, 2020.

SOUZA, Maria Luiza Ribeiro de. Sistema Integrado de Saneamento Rural (SISAR) Como Alternativa Para Gestão De Serviços De Saneamento. 2020.

SANTOS, José Gabriel Vieira. Uma abordagem Fit-For-Purpose para o aprimoramento do cadastro técnico da COMPESA–Companhia Pernambucana de Saneamento. 2022. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTERIAS PRODUTORAS DE α-AMILASE

Data de submissão: 11/03/2024 *Data de aceite: 21/03/2024*

Cristian Jacques Bolner de Lima
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, IFMT
Cáceres-MT

Monique Virães Barbosa dos Santos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, IFMT
Cáceres-MT

Marcos Benedito Santana
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, IFMT
Cáceres-MT

RESUMO: As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos por unidades de glicose. A apresentam grande importância na biotecnologia com um amplo campo de aplicações, como por exemplo na indústria de alimentos, em cervejarias e bebidas fermentadas, na indústria de papel e celulose, indústria química e farmacêutica, na produção de vitaminas e antibióticos. Este trabalho teve como objetivo, isolar, caracterizar e selecionar bactéria produtoras de amilase, provenientes de amostras oriundas de mandioca, milho, pão embolorado, cereais, ração de peixe, farinha de tapioca, grãos de feijão, arroz e do solo. Foram isoladas um total de doze bactérias produtoras de amilase, sendo que destas, a bactéria isolada da raiz de milho, posteriormente chamada de *Bacillus* sp. MR1 apresentou o maior índice de atividade enzimático (4,06 cm) demostrando potencial para produzir a enzima **α-**amilase.
PALAVRAS-CHAVE: Fermentação, Atividade enzimática, Enzimas.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND SELECTION OF α-AMYLASE PRODUCING BACTERIA

ABSTRACT: Amylases are enzymes that hydrolyze starch molecules, releasing various products including dextrins and progressively small polymers composed of glucose units. It is of great importance in biotechnology with a wide field of applications, such as in the food industry, in breweries and fermented drinks, in the paper and cellulose industry, in the chemical and pharmaceutical industry, in the production of vitamins and antibiotics. This work aimed to isolate, characterize and select amylase-producing bacteria from samples from

cassava, corn, moldy bread, cereals, fish feed, tapioca flour, bean grains, rice and soil. A total of twelve amylase-producing bacteria were isolated, these being a bacterium isolated from the corn root, later called *Bacillus* sp. MR1 presented the highest enzymatic activity index (4.06 cm) demonstrating the potential to produce the **α**-amylase enzyme.
KEYWORDS: Fermentation, Enzymatic activity, Enzymes.

1 | INTRODUÇÃO

As amilases representam um dos mais importantes grupos de enzimas dentro do campo da biotecnologia. A α-amilase é uma enzima que cliva as ligações α-1,4 do amido liberando unidades de glicose e dextrinas. Estas enzimas têm numerosas aplicações industriais e biotecnológicas, incluindo a sua utilização na sacarificação do amido para produção de etanol (RODRÍGUEZ et al., 2006).

Segundo Barato et al. (2011), a ampla diversidade quanto às características das enzimas potencializa sua aplicação em diferentes processos na indústria, assim, frente à demanda por novas hidrolases com prospecção de aplicabilidade no setor industrial, há um estímulo natural pela exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas.

Microrganismos isolados da própria matéria prima, que será empregada como substrato, na fermentação, representam uma alternativa promissora, uma vez que estes microrganismos estão mais adaptados à composição química da fonte nutricional e, portanto, mais hábeis para metabolizarem o substrato.

Diante da necessidade do setor agroindustrial em obter enzimas com novas características, assim como, substratos alternativos para cultivo, especialmente de menor custo, o presente trabalho objetivou o isolamento e seleção de bactérias oriundas de diferentes fontes e com capacidade para produzirem enzimas amilolíticas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Meios de cultura

Para o isolamento das culturas bacterianas foram utilizados os meios M1 e M2, cujas composições são apresentadas na tabela 01.

Componentes	Concentração (g/L)	
	M1	M2
Amido	0,5	5,0
Extrato de carne	3,0	3,0
Peptona	5,0	5,0
Agar bacteriológico	-	20,0

Tabela 01. Composição dos meios de cultura utilizados para o isolamento de microrganismos

2.2 Meio de cultura para a manutenção das cepas

As bactérias foram conservadas em tubos de eppendorf, contendo 1 mL meio de crescimento e 1 mL de glicerol a 20%. Após este processo, as culturas foram mantidas sob congelamento a -10°C, para diminuir o metabolismo celular, até futura necessidade de uso.

2.3 Meio de cultura para o crescimento dos microrganismos

O meio empregado no crescimento das culturas bacterianas está descrito na tabela 02.

Componente	Concentração (g/L)
Amido	5,0
Extrato de levedura	3,0
Peptona	5,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,6
(NH4)2SO4	6,0
KH_2PO_4	5,0

Tabela 02. Composição do meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos produtores de alfa amilase

2.4 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de mandioca, milho, pão embolorado, cereais, ração de peixe, farinha de tapioca e grãos de feijão e arroz. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos.

2.5 Isolamento dos microrganismos

Cerca de 5 g, de cada amostra, foram incubadas em frascos de erlenmeyers de 125 mL de capacidade, contendo 20 mL do meio M1 (Tabela 1), em agitador rotativo a 150 rpm, a 35°C, durante 72 horas.

Para o isolamento foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície usando o meio M2 (Tabela 2). Assim, foram tomadas alíquotas de 1 mL, de cada meio, realizando-se diluições decimais seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} em solução fisiológica, sendo 0,1 mL de cada diluição distribuída, com auxílio de alça de Drigalsky, na superfície do meio em placas de Petri. As culturas foram sucessivamente plaqueadas, tantas vezes quantas necessárias, até a obtenção de culturas puras, o que foi comprovado por observações morfológicas macroscópicas das colônias formadas e pela análise da morfologia microscópica pela observação de preparações coradas pelo método de Gram (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003).

2.6 Seleção preliminar de microrganismos produtores de α-amilase

A seleção de bactérias produtoras de **α-amilase** foi realizada segundo Mariano e Silveira (2005), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas em placas de Petri com meio M2. As placas foram incubadas a 30°C por 72h e, em seguida, realizadas as leituras.

Para tanto, foram adicionados 5 ml de solução de iodo-KI 0,01N (solução lugol) e mantido por 20 min, em seguida, a solução foi descartada e observado a presença de um halo claro em torno da colônia, indicando secreção de amilase. Os experimentos foram realizados em triplicata e para aquelas linhagens que apresentaram halo visível, a atividade amilolítica das linhagens foi estimada mediante um índice enzimático (IE), que expressa à relação do diâmetro médio do halo de hidrólise e o diâmetro médio da colônia.

2.7 Avaliação das características morfológicas de bactérias

A avaliação das características morfológicas é o primeiro passo para a identificação de um novo grupo taxonômico de microrganismos. Essas características podem identificar diferenças fisiológicas importantes em microrganismos, os quais podem ser detectados, posteriormente, mediante estudos mais refinados (PELCZAR et al., 1981).

Características culturais relevantes que podem ser avaliadas são o tempo de formação de colônias isoladas e alteração do pH do meio de cultura com azul de bromotimol como identificador de diferenças fisiológicas entre gêneros (KRIEG; HOLT, 1984). Além destas, outras características utilizadas são produção de exopolissacarídeos, tamanho, cor, borda, forma e aspecto da colônia (ODEE et al., 1997).

3 I RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Isolamento e seleção de microrganismos produtores de α-amilase

Foram coletadas amostras de raspas de casca de tubérculo, raízes e, também, do solo da plantação de milho e mandioca, amostras de pão embolorado, cereais, ração de peixe, farinha de tapioca, grãos de feijão e arroz. Estas amostras foram diluídas em água e inoculadas. A partir destas amostras foram isoladas, aproximadamente, 40 linhagens bacterianas, cujo processo de seleção, encontra-se esquematizado na tabela 03.

Etapa da seleção	Linhagens
Linhagens	40
Pré seleção – Linhagens formadoras de halo de hidrólise	12
Linhagem selecionada	1

Tabela 03. Processo de seleção da linhagem bacteriana

As linhagens isoladas foram testadas, inicialmente, quanto a sua capacidade de utilização do amido como fonte de energia através do teste da solução de iodo-KI, ou seja, por índice de atividade enzimático (IE), sendo a medida realizada no período de 72 horas. A partir deste experimento (seleção de microrganismos produtores de amilase) foram obtidos 12 isolados (denominados de cepa 1 a 12), conforme tabela 04.

Isolados	IE em 72 horas	Origem
Cepa 1	2,51	Tubérculo mandioca
Cepa 2	3,60	Raiz mandioca
Cepa 3	1,42	Solo (plantação mandioca)
Cepa 4	2,43	Grão milho
Cepa 5	4,06	Raiz milho
Cepa 6	1,08	Solo (plantação milho)
Cepa 7	2,06	Cereais
Cepa 8	1,76	Pão
Cepa 9	2,10	Ração de peixe
Cepa 10	1,89	Farinha de tapioca
Cepa 11	1,05	Grãos de arroz
Cepa 12	0,54	Grãos de feijão

Tabela 04. Índice IE, calculado após 72 horas de cultivo, em relação à produção de amilase

Observa-se, que 6 isolados (60%) apresentaram IE superior a 2,0, após 72 horas de incubação. Os valores encontrados foram superiores aos descritos por Oliveira et al. (2007), que identificaram atividade enzimática maior que 2,0 somente em 37% das cepas isoladas, demonstrando os potenciais desses isolados na produção da enzima, assim como a adequação das fontes para o isolamento. Para avaliação do potencial enzimático, alguns autores recomendam o índice enzimático (IE) maior ou igual a 2,0. Dessa forma, os isolados que exibiram os maiores IE nos meios de crescimento, são os que possuem maior atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA et al. 2006).

Dentre as cepas de maior IE, a cepa 5 foi a que apresentou melhor resultado (4,06 cm), sendo esta escolhida para continuidade da pesquisa. Os demais isolados, que apresentaram um IE superior a 2,0, foram congelados e armazenados para trabalhos futuros.

3.2 Identificação parcial dos microrganismos

Foi realizado o estudo morfológico das colônias analisando as características apresentadas pelos microrganismos ao crescerem em meios de cultura, as quais demonstrem expressões fenotípicas do seu material genético, tornando-se uteis a sua identificação. Embora muitas vezes elas sejam consideradas de importância secundária e

utilizadas apenas na identificação preliminar, em muitos casos, são essenciais e, às vezes, representam a única característica que permite a distinção e a identificação das espécies (ANDRADE, 2008).

Na tabela 05, estão apresentadas as características morfológicas observadas para os isolados.

Bactéria	Cor	Elevação	Borda	Opaca/ translúcida	Úmida/ seca	Ácido/ Alcalino
Cepa 1	Amarela	Elevada	Irregular	Opaca	**Úmida**	**Ácido**
Cepa 2	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	**Úmida**	Alcalino
Cepa 3	Branca	Elevada	Irregular	Opaca	**Úmida**	Alcalino
Cepa 4	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	**Úmida**	Alcalino
Cepa 5	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	**Úmida**	Alcalino
Cepa 6	Branca	Elevada	Irregular	Opaca	**Úmida**	Alcalino
Cepa 7	Branca	Achatada	Puntiforme	Opaca	**Úmida**	Alcalino
Cepa 8	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	Seca	Alcalino
Cepa 9	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Seca	Alcalino
Cepa 10	Amarela	Achatada	Puntiforme	Opaca	**Úmida**	Alcalino
Cepa 11	Branca	Achatada	Irregular	Translúcida	Seca	Alcalino
Cepa 11	Branca	Achatada	Irregular	Translúcida	Seca	Alcalino
Cepa 12	Branca	Elevada	Puntiforme	opaca	**Úmida**	Alcalino

Tabela 05. Avaliação morfológica dos isolados e avaliação quanto à produção de ácido/base

Dos 12 microrganismos isolados, 50% apresentaram coloração amarela e os outros 50% coloração branca. Foram observadas colônias achatadas e elevadas, com bordas puntiforme, circular e irregular. Em relação a umidade, 25% das colônias são secas e 75% são úmidas, apresentando aspecto opaco e translúcido. No que concerne ao pH, somente a cepa 1 exibiu caráter ácido, sendo as demais caráter básico.

Após a seleção do microrganismo desejado (cepa 5), está, também, foi identificada por microscopia ótica. A técnica de coloração de Gram aliada à observação de lâminas a fresco foi utilizada para diferenciar os grupos de bactérias (FREITAS; PICOLI, 2007).

A análise da cultura microbiana selecionada, através de preparações coradas pelo método de Gram, revelou a presença de formas de bastonetes retos, pequenos e finos, de mesma morfologia e Gram-negativa. Baseando-se, nas características morfológicas microscópicas e macroscópicas apresentadas pelos microrganismos foram identificados como *Bacillus* sp (Figura 01).

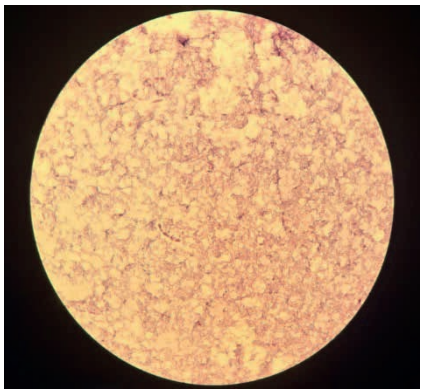

Figura 01. Bactéria MR1 gram-negativa

Fonte: (Autor, 2022).

De acordo com Van Der Maarel, et al. (2002) as amilases são encontradas em micróbios, plantas e animais, mas industrialmente importantes enzimas comerciais são produzidas a partir de micróbios. Entre todas as fontes de amilase, as bactérias são as mais significativas por causa do espaço limitado e curto período de tempo necessário para o seu cultivo e sua viabilidade para a genética manipulação (SELVAMOHAN; SHERIN, 2010).

Vários microrganismos diferentes são relatados para produzir amilases extracelulares. Comercialmente, a α-amilase é produzida, principalmente, a partir do gênero *Bacillus*. Entre muitas espécies, *Bacillus subtilis, B. stearothermophilus, B. licheniformis e B. amyloliquefaciens* são relatados extensivamente como produtores industriais de amilase (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

4 | CONCLUSÃO

Das quarenta colônias isoladas, doze apresentaram índice de atividade enzimático, sendo que a bactéria isolada da raiz de milho (*Bacillus* sp. MR1) produziu maior o índice enzimático com valor de 4,06 cm, demostrando, assim, maior potencial para produzir a enzima α-amilase. Além disso, a bactéria isolada *Bacillus* sp. MR1, através de preparações coradas pelo método de Gram, revelou a presença de formas de bastonetes retos, pequenos e finos, de mesma morfologia e gram-negativa.

AGRADECIMENTOS

A Pró-Reitora de pesquisa do Instituto Federal do Mato Grosso (PROPES), a Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado do Mato Grosso (FAPEMAT), além do IFMT Campus Cáceres.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. M. **Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina.** 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

BARATTO C. M. et al. **Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil**. Evidência, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.

FREITAS, R. F.; PICOLI, S. U. **A coloração de Gram e as variações na sua execução**. Centro Universitário de Fevale – Laboratório de Biomedicina. News Lab. Ed. 82, p. 124-128. 2007.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic**. Bacteriology, v. 1, London, Baltimore, 1984.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 10. ed. New York: Prentice Hall, 2003.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

ODEE, D. W. et al. **Phenotipic Characteristics and Composition of Rhizobia Associated with Woody Legumes Growing in Diverse Kenyan Conditions**. Plant and Soil, v.188, p.65-75, 1997.

OLIVEIRA, A. N. et al**. Atividade Enzimática de Isolados de Rizóbia Nativos da Amazônia Central Crescendo em Diferentes Níveis de Acidez.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 1, p. 204-210, 2006.

OLIVEIR, A. N. et al. **Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

PELCZAR, Jr. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 4. ed. São Paulo: Makron Books, 1998.

RODRÍGUEZ, V. B. et al., **Enzymatic hydrolysis of solublestarch with an α-Amylase from** *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Progress, v. 22, n. 3, 718-722, 2006.

SELVAMOHAN, T.; SHERIN, S. **Optimization of protease production from Bacillus cereus using different substrates.** Plant Archives, v. 10, n. 2, p. 651-656, 2010.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. **Application of microbial amilase in industry – A review**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, n. 4, p. 850-861, March. 2010.

VAN DER MAAREL, M. J. et al. **Applications of starch-converting enzymes of the a-amylase family**. Journal of Biotechnology, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2001.

IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE DE RAIZ FORTE POR APRISIONAMENTO E LIGAÇÃO COVALENTE EM SUPORTE HÍBRIDO DE ALGINATO-PECTINA E ALGINATO-PECTINA-AMIDO

Data de aceite: 21/03/2024

Ani Caroline Weber
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/8238624023188773

Bruno Eduardo da Silva
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/9474409267081328

Joana Elisa Willrich
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
https://lattes.cnpq.br/3752000520359166

Bruna Costa
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/2255574648252180

Cristiano de Aguiar Pereira
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/4370455437960177

Giovana Schneider
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
https://lattes.cnpq.br/4269473693605873

Sabrina Grando Cordeiro
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/2337098282279202

Daniel Augusto Weber
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/6003642280026432

Jéssica Samara Herek dos Santos
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/8038392775385994

Eduardo Miranda Ethur
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/0536800052883688

Elisete Maria de Freitas
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/7345668866571738

Filipa Rego Pinto Gomes
Instituto Politécnico de Leiria – IPLeiria
Leiria - Portugal
https://www.cienciavitae.pt/6F1C-0BAD-DC72

Lucélia Hoehne
Universidade do Vale do Taquari
Lajeado – Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/1088266827926373

RESUMO: A peroxidase de raiz forte (HRP) é uma enzima com excelente atividade biocatalítica e potencial de aplicação industrial. Visando aplicações em grande escala, a imobilização enzimática surge como uma alternativa para recuperação e reutilização de enzimas, viabilizando a empregabilidade e diminuindo custos. Neste sentido, o emprego de biopolímeros tem se demonstrado interessante, pois são atóxicos, biodegradáveis, renováveis e com elevada disponibilidade. No entanto, ainda se carece de estudos visando a imobilização de HRP em biopolímeros híbridos contendo alginato, pectina e/ou amido. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo imobilizar a HRP, por meio de aprisionamento e ligação covalente, em grânulos de alginato-pectina e alginato-pectina-amido, além de um controle (alginato). Para isto, diferentes composições de géis foram preparadas e extrudadas em solução de cloreto de cálcio por meio de uma seringa e agulha (Ø = 1 mm). Os grânulos foram reticulados por meio da inserção em solução de glutaraldeído 0,02%. Os parâmetros rendimento, eficiência e recuperação da atividade foram avaliados no tempo 0 h (inicial) e após sete dias de armazenamento. A imobilização de HRP nos grânulos de alginato-pectina-amido demonstrou-se superior em relação aos grânulos de alginato-pectina quando avaliado o conjunto de parâmetros, resultando em uma recuperação de atividade de 11,21% no tempo 0 h e 10,51% após sete dias de armazenamento. No entanto, é importante destacar que a formulação controle (alginato), dentre todas, apresentou a melhor recuperação da atividade após o período de armazenamento. Assim, de modo geral, pode-se concluir que a adição de pectina e/ou amido na composição de géis híbridos de alginato apresenta potencial, no entanto, estudos mais aprofundados e otimizações se fazem necessárias.
PALAVRAS-CHAVE: Horseradish peroxidase. *Armoracia rusticana*. Biopolímero. Suporte híbrido.

IMMOBILIZATION OF HORSERADISH PEROXIDASE BY ENTRAPMENT AND COVALENT BONDING ON ALGINATE-PECTIN AND ALGINATE-PECTIN-STARCH HYBRID SUPPORT

ABSTRACT: Horseradish peroxidase (HRP) is an enzyme with excellent biocatalytic activity and potential industrial application. Aiming at large-scale applications, enzymatic immobilization emerges as an alternative for recovery and reuse of enzymes, enabling employability and reducing costs. In this sense, the use of biopolymers has been shown to be interesting, as they are non-toxic, biodegradable, renewable and highly available. However, there is still a lack of studies aimed at immobilizing HRP in hybrid biopolymers containing alginate, pectin and/or starch. Thus, the present study aimed to immobilize HRP, through entrapment and covalent binding, in beads of alginate-pectin and alginate-pectin-starch, in addition to a control (alginate). For this, different gel compositions were prepared and extruded in calcium chloride solution using a syringe and needle (Ø = 1 mm). The beads were cross-linked by inserting them in a 0.02% glutaraldehyde solution. The yield, efficiency and activity recovery parameters were evaluated at time 0 h (initial) and after seven days of storage. The immobilization of HRP in alginate-pectin-starch beads was superior to alginate-pectin when evaluating the set of parameters, resulting in an activity recovery of 11.21% at time 0 h and 10.51% after seven days of storage. However, it is important to highlight that the control formulation (alginate), among all, presented the best activity recovery after the storage time. Thus, in general, it can be concluded that the addition of pectin and/or starch in the composition of hybrid alginate

gels has potential, however, further studies and optimizations are necessary.
KEYWORDS: Horseradish peroxidase. *Armoracia rusticana*. Biopolymer. Hybrid support.

1 | INTRODUÇÃO

A peroxidase de raiz forte (Horseradish peroxidase - HRP) é uma enzima pertencente à família das peroxidases, obtida a partir das raízes da espécie *Armoracia rusticana*. A HRP possui eficiente atividade biocatalítica, sendo um biocatalisador ecológico amplamente estudado devido ao constante aumento de seu uso em indústrias, uma vez que a disponibilidade enzimática é de baixo custo e a extração e purificação são relativamente fáceis (LENG *et al.*, 2020). No entanto, para aplicações em grande escala, alguns entraves são observados no emprego da enzima em sua forma livre, como impossibilidade de recuperação e reutilização, uma vez que a HRP é solúvel em água, além de observar-se uma baixa estabilidade ao longo do tempo (LI *et al.*, 2019). Buscando solucionar estes problemas, a imobilização enzimática tem-se demonstrado como uma alternativa promissora.

A imobilização enzimática corresponde ao processo de conversão de uma enzima de sua forma solúvel para uma forma insolúvel, comumente realizada por meio da ligação enzimática a um material sólido e que permite, em muitos casos, a obtenção de um biocatalisador estável com atividade catalítica superior à da enzima livre, capaz de ser reutilizado por diversos ciclos subsequentes (PETRONIJEVIĆ *et al.*, 2021). Diversas técnicas de imobilização são conhecidas e utilizadas, como por exemplo, o aprisionamento e a ligação covalente. Quando imobilizada covalentemente, a enzima fica fortemente ligada ao suporte, minimizando a lixiviação e o vazamento enzimático, favorecendo para que não ocorra a contaminação proteica do produto (ZAHIRINEJAD *et al.*, 2021). No método de aprisionamento, a enzima é aprisionada em uma rede polimérica, conferindo-lhe proteção devido a ausência de contato direto com o meio externo, melhorando a estabilidade e diminuindo o risco de desnaturação e lixiviação (RIBEIRO *et al.*, 2021).

Para a imobilização, inúmeros suportes podem ser empregados, como por exemplo, os biopolímeros. A imobilização de enzimas em biopolímeros é bem estabelecida e tem sido objeto de inúmeros estudos, pois os biomateriais são atrativos devido à sua atoxicidade, biodegradabilidade, flexibilidade e disponibilidade. Dentre os materiais mais promissores para a imobilização de enzimas estão aqueles à base de carboidratos, como alginato, celulose, quitosana, quitina e agarose (IMAM; MARR P.; MARR A., 2021). O alginato é um polissacarídeo carregado negativamente, composto por dois resíduos de isômeros (ácido β-D-manurônico e ácido α-L-gulurônico) ligados por ligações glicosídicas (1 → 4), que na presença de íons metálicos bivalentes se reticula, formando um gel de biopolímero (CHENG *et al.*, 2020). Para a imobilização enzimática, o alginato pode ser combinado com outros materiais, formando-se os suportes híbridos (IMAM; MARR P.; MARR A., 2021),

com maior resistência mecânica e menor lixiviação enzimática durante a aplicação (BILAL; IQBAL, 2019).

Neste sentido, alguns biopolímeros que surgem como uma alternativa interessante para combinação ao alginato são o amido e a pectina. O amido é um polissacarídeo natural, produzido pelas plantas como armazenamento de energia, sendo extensivamente empregado em indústrias alimentícias e não alimentícias devido à atoxicidade, baixo custo, ampla acessibilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (SHOKRI *et al.*, 2022). As pectinas são um grupo de polissacarídeos complexos intimamente relacionados, sendo constituintes estruturais das paredes celulares primárias e secundárias e lamelas médias em tecidos vegetais. Devido às suas excelentes propriedades gelificantes e citocompatibilidade, as pectinas têm sido estudas em aplicações biomédicas e farmacêuticas, bem como na imobilização enzimática, pois são biocompatíveis, biodegradáveis, de baixo custo, atóxicas e renováveis (BILAL; IQBAL, 2019; NEMIWAL; ZHANG; KUMAR, 2021).

Apesar de o alginato, o amido e a pectina demonstrarem-se como potenciais alternativas para a imobilização enzimática, poucos estudos envolvendo a combinação destes biopolímeros para a formação de um suporte híbrido visando a imobilização de HRP foram encontrados. Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar a imobilização da HRP comercial por aprisionamento e ligação covalente em um suporte híbrido de alginato-pectina e alginato-pectina-amido.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais/reagentes químicos

A peroxidase de raiz forte (Horseradish peroxidase - HRP, CAS 9003-99-0, 77332, pó liofilizado, 40 kDa, 173 U/mg), a albumina sérica bovina (CAS 9048-46-8, A2153, pó liofilizado, 66 kDa, ≥96%) e o glutaraldeído foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O alginato de sódio grau alimentício foi adquirido da GastronomyLab (Distrito Federal, Brasil), o amido de batata P.A. da Cinética (São Paulo, Brasil), a pectina alimentícia da Mago (São Paulo, Brasil), o fosfato de sódio dibásico anidro P.A. (Na_2HPO_4) e o cloreto de cálcio anidro P.A. da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil), o ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) 85% P.A. da Nuclear (SP, Brasil), o hidróxido de sódio (NaOH) P.A. da Êxodo Científica (SP, Brasil), o guaiacol ($C_7H_8O_2$) da Neon (SP, Brasil), o peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2) da Química Moderna (SP, Brasil) e o corante de Bradford da Bio-Rad (CA, EUA).

2.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão de proteína a albumina de soro bovino (BSA). A curva de calibração foi construída empregando-se concentrações de BSA equivalentes a 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e

1,0 mg/mL. Para isto, adicionou-se à placa de 96 poços 4 µL de solução de BSA de cada concentração (ou de amostra) em quintuplicata e 200 µL do corante de Bradford (azul brilhante de Coomassie G250). Aguardou-se 10 minutos e procedeu-se com a leitura da absorbância em 595 nm, utilizando-se leitor de microplacas Spectramax (Spectramax i3, Molecular Devices, CA, EUA). Por meio da curva de calibração e das absorbâncias das amostras obtidas, calculou-se a concentração de proteínas.

2.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática da HRP livre ou imobilizada foi determinada conforme metodologia adaptada de Queiroz *et al.* (2018), utilizando-se o guaiacol como substrato. Assim, em uma cubeta foram adicionados 2700 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0), 100 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,01 M, 100 µL de guaiacol 0,1 M e 100 µL de solução enzimática ou 0,1 g de derivado (suporte + enzima imobilizada). Após 1 min de reação, realizou-se a leitura da absorbância em Espectrofotômetro de Absorção Molecular na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA), em 470 nm. Para o branco, substituiu-se a solução enzimática por tampão fosfato de sódio (HRP livre) ou por grânulos de suporte sem a presença de enzima (HRP imobilizada). Por meio das absorbâncias obtidas e empregando-se a Equação 1, calculou-se a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de 1 µmol de guaiacol por minuto.

$$A.E.(U/mL) = \frac{(Abs\,(t) - Abs\,(0)) * V_{total} * 1000}{\varepsilon * V_{enzima} * t} \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde *Abs (t)* é a absorbância verificada após 1 minuto de reação, *Abs (0)* a absorbância no tempo 0, V_{total} o volume total na cubeta (3 mL), ε o coeficiente de absortividade molar do guaiacol (26600 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$), V_{enzima} o volume (mL) de solução enzimática adicionada à cubeta e *t* ao tempo (min) transcorrido.

2.4 Imobilização enzimática

A imobilização enzimática foi realizada conforme metodologia adaptada de Bilal *et al.* (2016). Foram preparadas duas formulações de géis híbridos (alginato-pectina e alginato-pectina-amido), além de uma formulação contendo somente alginato (controle) e o branco (sem enzima), conforme a Tabela 1.

Formulação	Alginato de sódio (% m/v)	Amido (% m/v)	Pectina (% m/v)	Glutaraldeído (% v/v)	HRP(U/mL)
Branco	4	-	-	0,02	-
Alginato	4	-	-	0,02	7,5
Alginato-pectina	4	-	1	0,02	7,5
Alginato-pectina-amido	4	1	1	0,02	7,5

Tabela 1 - Composição das diferentes formulações de géis de alginato para imobilização enzimática

Para todos os géis preparou-se um volume total de 25 mL, de modo que todos os reagentes foram adicionados considerando-se este volume final. Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente (22 ± 2 °C), exceto quando descritos valores diferentes deste. Deste modo, adicionou-se em 20 mL de água ultrapura (18,2 $M\Omega.cm^{-1}$, Milli-Q, Millipore, EUA) quantidades apropriadas de alginato de sódio, amido e/ou pectina, e agitou-se em chapa magnética até a completa homogeneização do gel (inobservância de grumos). Em seguida, quantidade adequada de solução enzimática de HRP previamente preparada em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0) (com atividade de 80,2 U/mL) foi inserida. Agitou-se em chapa magnética por 15 minutos, adicionou-se glutaraldeído 50% (v/v), de modo a se obter uma concentração de 0,02% (v/v) no gel, e completou-se o volume total até 25 mL com água ultrapura. Homogeneizou-se por 2 horas em chapa magnética e deixou-se o gel em repouso a 4 °C por 15 horas, para eliminação de bolhas.

O gel obtido para cada formulação foi extrudado separadamente, empregando-se uma seringa e agulha (diâmetro igual a 1 mm), em 150 mL de solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,2 M sob agitação magnética branda e mantida a 4 °C por meio de banho de gelo. Manteve-se os grânulos sob agitação por 30 minutos, e em seguida, filtrou-se, lavou-se com água ultrapura e inseriu-se em 50 mL de solução de glutaraldeído 0,02% (v/v) à 4 °C por 30 minutos, para reticulação. Por fim, os grânulos foram lavados extensivamente com água ultrapura até não se verificar a presença de proteínas nas soluções de lavagem (por meio de leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis a 280 nm), e então, armazenados em tubos de polipropileno à 4 °C e ao abrigo da luz.

2.4.1 Rendimento, eficiência de imobilização e recuperação da atividade

O rendimento, a eficiência de imobilização e a recuperação da atividade enzimática foram avaliados conforme metodologia proposta por Sheldon e Van Pelt (2013). Todos estes parâmetros foram avaliados no tempo inicial (logo após o preparo dos grânulos de HRP imobilizada) e após 7 dias de armazenamento. O rendimento foi calculado por meio da relação entre a atividade imobilizada (atividade inicial total disponibilizada para a imobilização subtraída da atividade enzimática total das soluções remanescentes da

imobilização) e atividade inicial total da solução de enzima livre, conforme a Equação 2.

$$Rendimento\ (\%)\ = \frac{Atividade\ imobilizada}{Atividade\ inicial} * 100 \qquad \text{(Equação 2)}$$

Para a determinação da eficiência de imobilização empregou-se a relação entre a atividade observada no suporte (correspondendo a atividade enzimática que se manteve após a imobilização) e a atividade imobilizada, conforme a Equação 3.

$$Eficiência\ (\%)\ = \frac{Atividade\ observada}{Atividade\ imobilizada} * 100 \qquad \text{(Equação 3)}$$

A recuperação da atividade corresponde ao rendimento de imobilização multiplicado pela eficiência da imobilização. Este parâmetro possibilita que se tenha uma ideia geral do sucesso da imobilização, sendo calculado conforme a Equação 4.

$$Recuperação\ da\ atividade\ (\%)\ = \frac{Rendimento\ (\%) * Eficiência\ (\%)}{100} \qquad \text{(Equação 4)}$$

2.5 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 95% de confiança, empregando-se o *software Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis* - PAST 4.3 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a HRP foi imobilizada em um suporte híbrido de alginato-pectina e alginato-pectina-amido. Para fins de comparação, realizou-se ainda a imobilização enzimática em grânulos sem a presença de amido e/ou pectina. Os parâmetros rendimento, eficiência e atividade recuperada para o processo de imobilização foram avaliados no tempo inicial (0 h) e após 7 dias, buscando-se avaliar a estabilidade do derivado. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 1.

Formulação	Inicial			7 dias		
	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)
Alginato	61,31 ± 0,64^{bA}	15,86 ± 0,17^{bB}	9,72 ± 0,01^{bB}	61,01 ± 0,16^{bA}	19,04 ± 0,05^{aA}	11,62 ± 0,01^{aA}
Alginato-pectina	82,26 ± 1,74^{aA}	6,83 ± 0,14^{cB}	5,62 ± 0,01^{cB}	70,39 ± 2,18^{aB}	14,77 ± 0,45^{cA}	10,39 ± 0,01^{cA}
Alginato-pectina-amido	61,65 ± 1,15^{bA}	18,18 ± 0,34^{aA}	11,21 ± 0,01^{aA}	61,33 ± 0,66^{bA}	17,14 ± 0,19^{bB}	10,51 ± 0,01^{bB}

Média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas em uma mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p<0,05) para um mesmo parâmetro entre as diferentes formulações. Diferentes letras maiúsculas em uma mesma linha para um mesmo parâmetro indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os tempos avaliados (inicial e 7 dias) para uma mesma formulação.

Tabela 1 - Rendimento, eficiência e atividade enzimática recuperada após o processo de imobilização da HRP em alginato, alginato-pectina e alginato-pectina-amido (tempo inicial - 0 h e 7 dias)

A partir dos resultados obtidos para o tempo 0 h, observou-se que a formulação que apresentou o maior rendimento de imobilização foi a contendo alginato-pectina (82,26%), indicando que a combinação destes dois biopolímeros contribuiu para uma maior fixação/imobilização da HRP no suporte. Apesar de a formulação alginato-pectina apresentar o maior rendimento, esta formulação, no presente estudo, resultou na menor eficiência de imobilização, ou seja, apesar de haver um considerável percentual enzimático imobilizado, apenas uma pequena quantidade de enzima permaneceu funcional. A recuperação da atividade sofreu grande influência da baixa eficiência, resultando em 5,62%. Matto, Satar e Husain (2009) imobilizaram peroxidase de cabaço amargo (*Momordica charantia*) e concavalina A em grânulos de alginato-pectina (2,5% de alginato e 2,5% de pectina) e observaram uma eficiência de 51%, valor superior ao observado para o presente estudo (6,83%). A maior eficiência observada por Matto, Satar e Husain (2008) pode estar relacionada às diferenças de composição do gel de alginato ou às características da enzima imobilizada.

Os grânulos imobilizados em alginato-pectina-amido apresentaram um rendimento de imobilização de 61,65%, eficiência de 18,18% (superior à composição alginato-pectina) e recuperação da atividade de 11,21%. Assim, quando observados todos os parâmetros em conjunto (rendimento, eficiência e recuperação da atividade) para o tempo 0 h, a melhor composição foi de alginato-pectina-amido, sendo superior ao controle (alginato). Estes resultados indicam que a adição de amido à composição contribuiu para que a HRP imobilizada permanecesse com uma maior atividade catalítica, ou ainda, para que os grânulos formados apresentassem menor resistência à difusão de substrato/produto, maior transferência de massa e afinidade com o substrato (IMAM; MARR C. P; MARR C.

A., 2021).

Após sete dias de armazenamento, os grânulos de HRP imobilizada em alginato-pectina apresentaram redução no rendimento de imobilização em comparação ao tempo 0 h, enquanto para o alginato-pectina-amido e controle (alginato) valores semelhantes foram observados (sem diferença estatística significativa). A redução observada pode ser justificada pelo vazamento enzimático da HRP da matriz de suporte para o meio externo, um problema comumente relatado e observado em imobilizações desta enzima (MATTO; HUSAIN, 2009; URREA *et al.*, 2021). Com relação a eficiência, pode-se verificar um aumento após 7 dias em relação ao tempo 0 h para formulação alginato-pectina e o controle, relacionado às mudanças estruturais internas nos grânulos do derivado, de modo a possibilitar uma maior atividade catalítica. Ainda, os grânulos de alginato-pectina-amido apresentaram redução de cerca de 1% da atividade catalítica após 7 dias, que pode ser justificada por mudanças estruturais nos grânulos de alginato ou desnaturação enzimática. Uma redução da atividade catalítica ao longo do tempo de armazenamento é comumente observada em imobilizações enzimáticas, no entanto, menos pronunciada do que para as enzimas livres (BILAL; ASGHER, 2015; YAPAOZ; ATTAR, 2020; LATIF *et al.*, 2022).

Refletindo os resultados observados para o rendimento e a eficiência, observou-se um aumento na atividade enzimática recuperada para os grânulos de alginato-pectina e controle, e uma redução para alginato-pectina-amido, de modo que após 7 dias a formulação controle tenha apresentado o maior valor de recuperação da atividade (11,62%), seguida dos grânulos de alginato-pectina-amido (10,51%) e alginato-pectina (10,39%). De modo geral, a adição de pectina e amido aos géis de alginato tem se demonstrado uma potencial alternativa para imobilizações enzimáticas. No entanto, é importante destacar que o presente estudo consiste em uma investigação inicial, de modo que mais pesquisas empregando-se amido e pectina na composição de biopolímeros híbridos se fazem necessárias, bem como a avaliação de outros parâmetros (como pH e temperatura ótimos, cinética e termodinâmica, tempo de armazenamento e potenciais aplicações) e/ou outras enzimas para a imobilização, para que assim se possa verificar com maior embasamento a empregabilidade destes materiais em imobilizações enzimáticas.

4 | CONCLUSÃO

A partir dos ensaios realizados no presente estudo pode-se concluir que a adição de pectina ao alginato, formando-se um gel híbrido de alginato-pectina, contribui para um maior rendimento de imobilização. No entanto, problemas como baixa eficiência e vazamento enzimático são observados. Quando adicionado o amido à composição, além da pectina (alginato-pectina-amido), nota-se um rendimento de imobilização inferior ao observado para alginato-pectina, no entanto, uma eficiência de imobilização superior. Após sete dias de armazenamento, os grânulos de alginato-pectina-amido não apresentaram vazamento

enzimático expressivo, enquanto os grânulos de alginato-pectina apresentaram cerca de 11,9% de vazamento. Por outro lado, a eficiência enzimática apresentou-se superior para os grânulos de alginato-pectina após sete dias em relação ao tempo 0 h, e inferior para alginato-pectina-amido, indicando que mudanças estruturais e conformacionais ocorrem durante o tempo de armazenamento, influenciando na atividade catalítica. Por fim, destaca-se que estudos mais aprofundados, bem como a avaliação de outros parâmetros de imobilização e do imobilizado se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

BILAL, M.; ASGHER, M. Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 111, 2015. https://doi.org/10.1186/s12896-015-0227-8

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 462-482, 2019. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; SHAH, S. Z. H.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 183, n. 3, p. 836-842, 2016. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.040

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

CHENG, D.; JIANG, C.; XU, J.; LIU, Z.; MAO, X. Characteristics and applications of alginate lyases: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1304-1320, 2020. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.199

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

IMAM, H. T.; MARR, P. C.; MARR, A. C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. **Green Chemistry**, v. 23, p. 4980-5005, 2021. https://doi.org/10.1039/D1GC01852C

LATIF, A.; MAQBOOL, A.; SUN, K.; SI, Y. Immobilization of Trametes versicolor laccase on Cu-alginate beads for biocatalytic degradation of bisphenol A in water: optimized immobilization degradation and toxicity assessment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 1, 107089, 2022. https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107089

LENG, Y.; BAO, J.; XIAO, H.; SONG, D.; DU, J.; MOHAPATRA, S.; WERNER, D.; WANG, J. Transformation mechanisms of tetracycline by horseradish peroxidase with/without redox mediator ABTS for variable water chemistry. **Chemosphere**, v. 258, n. 127306, 2020. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112038

LI, J.; CHEN, X.; XU, D.; PAN, K. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun magnetic nanofibers for phenol removal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 716-721, 2019. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112038

MATTO, M.; HUSAIN, Q. Calcium alginate-starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 164-170, 2009. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.011

MATTO, M.; SATAR, R.; HUSAIN, Q. Application of calcium alginate-starch entrapped bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase for the removal of colored compounds from a textile effluent in batch as well as in continuous reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 512-523, 2009. https://doi.org/10.1007/s12010-008-8396-8

NEMIWAL, M.; ZHANG, T. C.; KUMAR, D. Pectin modified metal nanoparticles and their applications in property modification of biosensors. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, n. 100164, 2021. https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100164

PETRONIJEVIĆ, M.; PANIĆ, S.; SAVIĆ, S.; AGBABA, J.; JAZIĆ, J. M.; MILANOVIĆ, M.; ĐURIŠIĆ-MLADENOVIĆ, N. Characterization and application of biochar-immobilized crude horseradish peroxidase for removal of phenol from water. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 208, n. 112038, 2021. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112038

QUEIROZ, M. L. B.; CONCEIÇÃO, K. C.; MELO, M. N.; SÁNCHEZ, O. C.; ALVAREZ, H. M.; SOARES, C. M. F.; FRICKS, A. T. Imobilização de peroxidase de raiz forte em bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 41, n. 9, 2018. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170279

RIBEIRO, E. S.; FARIAS, B. S.; CADAVAL JUNIOR, T. R. S.; PINTO, L. A. A.; DIAZ, P. S. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1959-1970, 2021. https://doi.org/10.1039/D1GC01852C

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. https://doi.org/10.1039/c3cs60075k

SHOKRI, Z.; SEIDI, F.; SAEB, M. R.; JIN, Y.; LI, C.; XIAO, H. Elucidating the impact of enzymatic modifications on the structure, properties, and applications of cellulose, chitosan, starch and their derivatives: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 24, n. 100780, 2022. https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.100780

URREA, D. A. M.; GIMENEZ, A. V. F.; RODRIGUEZ, Y. E.; CONTRERAS, E. M. Immobilization of horseradish peroxidase in Ca-alginate beads: Evaluation of the enzyme leakage on the overall removal of an azo-dye and mathematical modeling. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 156, p. 134–143, 2021. https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.10.006

YAPAOZ, M. A.; ATTAR, A. An accomplished procedure of horseradish peroxidase immobilization for removal of acid yellow 11 in aqueous solutions. **Water Science & Technology**, v. 81, n. 12, p. 2664-2673, 2020. https://doi.org/10.2166/wst.2020.326.

ZAHIRINEJAD, S.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; HOSSEINKHANI, S.; MOHAMMADI, S.; VIANELLO, F. Nano-organic supports for enzyme immobilization: scopes and perspectives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, n. 111774, 2021. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111774

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TEOR DE CORANTE AMARELO TARTRAZINA EM PREPARADO SÓLIDO PARA REFRESCO POR ANÁLISE QUÍMICA INSTRUMENTAL

Data de aceite: 21/03/2024

Victória Mel Prado
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, *Campus* Cuiabá – Bela Vista.

Beatriz B. Klein
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, *Campus* Cuiabá – Bela Vista.

Jorge N. Ganiko
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, *Campus* Cuiabá – Bela Vista.

Jaqueline N. de Sousa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, *Campus* Cuiabá – Bela Vista.

Elaine de A. O. Coringa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, *Campus* Cuiabá – Bela Vista.

RESUMO: O corante amarelo tartrazina é um corante artificial usado no mundo todo e muito aplicado a alimentos industrializados, como por exemplo, o preparado sólido para refresco (PSR), conhecido como suco em pó. O PSR, apesar de não ser uma opção saudável devido à grande quantidade de açucares e aditivos em sua composição, é um produto muito comum nas casas da sociedade, devido sua praticidade e baixo custo. O presente trabalho objetificou determinar a concentração do corante amarelo tartrazina em PSR de diferentes sabores e marcas por espectrofotometria UV/Vis e verificar se está dentro do limite recomendado pela legislação, assim como mensurar seu pH, condutividade elétrica e teor de sólidos solúveis totais (SST). Para a determinação, foi utilizado um espectrofotômetro analógico. A concentração do corante encontrada em todas as marcas atende ao limite mínimo exigido pela ANVISA. Contatou-se também a necessidade da implantação de limite mínimo para o teor de SST, para redução de danos à saúde a longo prazo, visto que não há preocupação em controlar a adição de açucares em um produto basicamente constituído por aditivos, sem nenhuma função de nutrir.

PALAVRAS-CHAVE: Análises; PSR; Aditivo; Concentração; Legislação.

1 | INTRODUÇÃO

O preparo sólido para refresco (PSR), consiste numa mistura constituída por açúcar, polpa desidratada e aditivos, tais como: acidulantes, antioxidantes, reguladores de acidez, aromas, antiumectantes, espessantes, edulcorantes e corantes. A classificação correta do popularmente chamado suco em pó é “preparado sólido saborizado”, que é definido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como um produto que deve atender ao padrão da bebida composta pronta para o consumo quando dissolvido ou diluído em água potável de acordo com orientação do fabricante.

A crescente representatividade do consumo de alimentos industrializados no país tem merecido um enfoque maior aos aditivos adicionados e suas respectivas análises de quantificação. É permitido no Brasil o uso de 8 corantes artificiais em alimentos, listados no anexo III da Resolução 04/88 do CNS/M, estando entre eles o amarelo tartrazina, um corante com boa solubilidade em água, estável a variações de pH, luz, oxigênio, e possui baixos custos de produção (AL-SHABIB et al., 2017), que vem sendo estudado por sua possível toxicidade, tendo relatos de reações alérgicas, hiperatividade em crianças, genotoxicidade, tumor de tireoide, TDAH e urticária (AL-SHABIB et al., 2017). No Brasil, segundo a IDA (Ingestão Diária Aceitável), é permitido um limite de consumo de 7,5 mg/kg de tartrazina. Já para o PSR (Preparado Sólido para Refresco), a Anvisa estabelece 100mg/L como parâmetro de concentração.

Em consideração ao exposto, o objetivo deste trabalho é determinar as propriedades físico-químicas e a concentração do corante amarelo tartrazina em preparados sólidos para refresco (PSR) de diferentes sabores e marcas, comercializados em Cuiabá, MT, por meio de análises instrumentais rápidas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas 3 amostras de PSR para cada sabor: maracujá (A), manga (B), abacaxi (C) e laranja (D), coletadas em redes varejistas da cidade de Cuiabá-MT, sendo que todas as amostras por sabor são da mesma marca, lote e data de validade. Para todas as análises foi preparada uma solução do PSR de 0,5 g em 100 mL de água destilada, estimada pelo método de preparação do suco no rótulo.

O teor de amarelo tartrazina no PSR foi determinado por espectrofotometria de absorção visível, em espectrofotômetro Shangai Spectrum®, modelo SP-1105 em cubeta de vidro. As soluções padrões para construção da curva analítica de calibração foram preparadas utilizando o reagente amarelo tartrazina padrão (CI.19140) nas concentrações de 1, 5, 10,15, 20 e 25 mg/L e realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda 430 nm. Para determinar a concentração do corante amarelo tartrazina, foi construída a curva de calibração do corante que, após a regressão linear, obteve-se a equação da

reta: y=0,043x–0,0137 e R^2=0,9998. Os resultados obtidos foram comparados com o estabelecido na legislação (Instrução Normativa IN nº 211/2023 - ANVISA), cujo limite é de 100 mg/L para bebidas não alcoólicas não gaseificadas.

O pH foi obtido através de leitura direta das amostras, utilizando o pHmetro microprocessado marca Alfakit®, modelo AT-355, após calibração com tampões 4,00 e 7,00. Para a análise de condutividade elétrica foi utilizado o condutivímetro digital de bancada marca Instrutherm®, modelo CD-820, calibrado com solução padrão de condutividade (1,43 μS/cm) conforme as instruções do fabricante. Para essas análises instrumentais, transferiu-se 50 mL da amostra para um béquer, sendo realizada a imersão do eletrodo e obtendo-se a leitura. O teor de sólidos solúveis totais foi determinado em refratômetro manual marca Atago®, modelo MASTER-53ALPHA após a inserção de duas gotas da amostra diluída no prisma do refratômetro, sendo realizada a leitura direta na escala Brix. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva, em software Action (Estatcamp) em planilha Excel (Microsoft).

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das análises avaliadas estão descritos na tabela 1.

Amostra / unidade		Teor de corante (mg/L)	CE (μS/cm)	pH	SST (°Brix)
A (maracujá)	1	8,76	683,40	2,94	3,32
	2	8,38	524,60	2,98	3,32
	3	7,69	512,50	3,00	3,32
	$\bar{x} \pm s$	**8,28±0,03**	**573,5±77,8**	**2,97±0,01**	**3,32±0,00**
B (manga)	1	2,73	306,70	3,49	3,56
	2	5,46	279,30	3,47	3,48
	3	3,50	245,10	3,41	3,48
	$\bar{x} \pm s$	**3,89±1,28**	**277,03±30,86**	**3,49±0,01**	**3,50±0,04**
C (abacaxi)	1	6,12	413,00	3,01	3,32
	2	4,92	434,50	3,01	3,32
	3	6,30	418,60	3,02	3,24
	$\bar{x} \pm s$	**5,78±0,75**	**422,03±11,15**	**3,01±0,00**	**3,29±0,05**
D (laranja)	1	23,96	541,20	3,14	3,40
	2	14,40	534,20	3,29	3,40
	3	14,33	534,60	3,12	3,40
	$\bar{x} \pm s$	**17,56±5,54**	**534,4±0,28**	**3,18±0,09**	**3,40±0,0**

Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas das amostras de preparado sólido para refresco (PSR) de diferentes sabores e suas respectivas médias±desvio padrão.

Todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de tartrazina dentro do limite permitido pela legislação (até 100 mg/L), com valores decrescentes: PSR de laranja (17,56±5,54 mg/L) > PSR de maracujá (8,28±0,03mg/L) > PSR de abacaxi (5,78±0,75 mg/L) > PSR de manga (3,89±1,28 mg/L). Também foi possível observar a grande variabilidade na concentração de tartrazina em produtos da mesma marca e sabor, como nos PSR de manga e laranja, ambos com Coeficiente de Variação de 36% e 31%, respectivamente.

A condutividade elétrica para as marcas não condiz com os resultados obtidos por Gonçalves et. al. (2020), que obteve valores maiores (960 a 1100 μS/cm) para os sabores analisados. O pH das amostras variaram de 2,94 (maracujá) a 3,49 (manga), com pouca variação nas determinações. De acordo com Catão et al (2013) os preparados sólidos para refresco possuem pH mais ácido do que os sucos industrializados, geralmente abaixo de pH 4,0, contribuindo para cáries dentárias.

O teor de SST (°Brix) apresentou pouca variação nos produtos analisados, na faixa de 3,24 a 3,56 ºBrix, corrigido a 20ºC. O Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Preparado Sólido para Refresco não estabelece valores mínimos para os parâmetros físico-químicos avaliados neste estudo, no produto pronto para o consumo.

4 | CONCLUSÃO

A partir dos resultados das análises instrumentais verificou-se que todas as amostras analisadas apresentaram concentrações do corante amarelo tartrazina dentro do limite permitido pela legislação, com maiores valores no PSR de sabor laranja. O pH do PSR pronto para o consumo o caracteriza o produto de acidez elevada (pH abaixo de 4,0).

Percebe-se por fim, uma necessidade de normatização da legislação brasileira em virtude de que a indústria trabalha à risca da lei, para estabelecer um limite do pH e do teor de SST (°Brix), visto que por ser um produto industrializado, o PSR possui em sua lista de ingredientes vários aditivos além do corante amarelo tartrazina, se tornando um produto muito prejudicial à saúde a longo prazo.

REFERÊNCIAS

AL-SHABIB, N. A. et. al. **Synthetic Food Additive Dye “Tartrazine” Triggers Amorphous Aggregation In Cationic Myoglobin. International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p 277-286, Amsterdam, jan. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa n° 211, de 1° de março de 2023**. Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria MAPA n° 123, de 13 de maio de 2021**. Estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade para bebidas composta, chá, refresco, refrigerante, soda e, quando couber, os respectivos preparados sólidos e líquidos. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução CNS/MS n° 04, de 24 de novembro de 1988**. Aprova o uso de Aditivos Intencionais. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

Catão MHCV, Silva ADL, Oliveira RM. **Propriedades físico-químicas de preparados sólidos para refrescos e sucos industrializados**. RFO UPF 2013 18(1):12-7.

GONÇALVES, Jackeline. **Estudo sensorial, físico-químico e quimiométrico de sucos de limão em pó.** Brazilian Applied Science Review, Curitiba-Brasil, v. 4, n. 3, p.1319-1333, mai./jun.2020.

CLEISEANO EMANUEL DA SILVA PANIAGUA - Técnico em Química pelo Colégio Profissional de Uberlândia (2008), Bacharel em Química pela Universidade Federal de Uberlândia (2010), licenciado em Química (2011) e Bacharel em Química Industrial (2023) pela Universidade de Uberaba, licenciado em Ciências Biológicas (2021) e em Física (2022) pela Faculdade Única. Especialista em Metodologia do Ensino de Química e em Docência do Ensino Superior pela Faculdade JK Serrana em Brasília (2012), especialista em Ensino de Ciências e Matemática pelo Instituto Federal do Triângulo Mineiro (2021), em Ciências Naturais e Mercado de Trabalho (2022) pela Universidade Federal do Piauí (UFPI) e em Química Analítica pela Faculdade Metropolitana do Estado de São Paulo (FAMES) em 2024. Mestre (2015) e doutor (2018) em Química Analítica pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Estágio Pós-Doutoral (de maio de 2020 a dezembro de 2023) na UFU com ênfase na aplicação de novos agentes oxidantes para remoção de Contaminantes de Preocupação Emergente (CPE) em efluentes de ETE, utilizando a radiação solar como catalisador. Atuou como Técnico de Laboratório/Química no Instituto Federal de Goiás (junho/2010 até janeiro/2022), instrutor de Formação no Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) em Minas Gerais e Goiás e químico e responsável técnico pelos laboratórios da Unicesumar/Polo Patrocínio (março/2023 a janeiro/2024). Atualmente, é professor concursado e lotado no Colégio Militar de Araguaína/TO. Atuando nas seguintes linhas de pesquisa: *(i*) Desenvolvimento de novas metodologias para tratamento e recuperação de resíduos químicos;; (*ii*) Desenvolvimento de novas tecnologias avançadas para remoção de CPE em diferentes matrizes aquáticas; (*iii*) Aplicação de processos oxidativos avançados (H_2O_2/UV-C, TiO_2/UV-A e foto-Fenton e outros) para remoção de CPE em efluentes de estação de tratamento de efluentes para reuso; (i*v*) Estudo e desenvolvimento de novos bioadsorventes para remediação ambiental de CPE em diferentes matrizes aquáticas; (*v)* Educação Ambiental e; (*vii*) alfabetização científica e processos de alfabetização na área de Ciências da Natureza, em especial biologia e química. É membro do corpo editorial da Atena Editora desde 2021 e já organizou mais de 75 e-books e publicou 40 capítulos de livros nas diferentes áreas de Ciências da Natureza, Engenharia Química e Sanitária/Ambiental, Meio ambiente dentre outras áreas afins.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abacaxi 31, 32, 33

Absortividade molar 23

Água destilada 31

Água ultrapura 24

Alginato 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28

Alginato-pectina-amido 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28

Amarelo tartrazina 30, 31, 33

Amido 11, 12, 13, 15, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28

Amilases 11, 12, 17

Armoracia rusticana 20, 21

Atividade catalítica 21, 26, 27, 28

Atoxicidade 21, 22

Azul de bromotimol 14

B

Bacillus subtilis 17

Biocatalítica 20, 21

Biocompatibilidade 22

Biodegradabilidade 21, 22

Biodiversidade 12

Biopolímeros 20, 21, 22, 26, 27

Business Intelligence 1, 2, 3

Business Intelligence - BI 1, 3

C

Coloração de Gram 16, 18

Corante 22, 23, 30, 31, 32, 33

D

Dextrinas 11, 12

E

Enzima 11, 12, 15, 17, 20, 21, 23, 25, 26, 27

Espectrofotometria UV/Vis 30

ÍNDICE REMISSIVO

F

Fermentação 11, 12

G

Glicose 11, 12

Gram-negativa 16, 17

Grânulos 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28

H

Horseradish peroxidase 20, 21, 22, 28, 29

I

Imobilização enzimática 20, 21, 22, 23, 24, 25

Índice enzimático 14, 15, 17

L

Laranja 31, 32, 33

M

Manga 31, 32, 33

Maracujá 31, 32, 33

Microrganismos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 31, 34

P

Pectina 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28

Preparado Sólido para Refresco (PSR) 30, 31, 32, 33

R

Renováveis 20, 22

S

Saneamento 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10

Sistema de Informações Geográficas (GISCOMP) 1, 3

Sistema Eletrônico de Informações (SEI) 1, 4, 10

Sólidos Solúveis Totais (SST) 30, 32

ENGENHARIA QUÍMICA

QUALIDADE, PRODUTIVIDADE
E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2024

ENGENHARIA QUÍMICA

QUALIDADE, PRODUTIVIDADE
E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2024