



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Hidrólise de Sacarose por Invertase Imobilizada em Duolite A-568 por Adsorção e Ligação Cruzada

Bruna Vieira Cabral

UBERLÂNDIA – MG
JULHO DE 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Hidrólise de Sacarose por Invertase Imobilizada em Duolite A-568 por Adsorção e Ligação Cruzada

Bruna Vieira Cabral

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Co-orientadora: Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

UBERLÂNDIA – MG

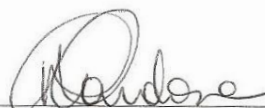
JULHO DE 2012

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BRUNA VIEIRA CABRAL SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 26/07/2012.

BANCA EXAMINADORA:



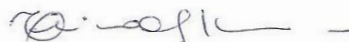
Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
(Orientador – PPGEQ/UFU)



Profª. Drª. Vicelma Luís Cardoso
(Coorientadora – PPGEQ/UFU)



Profª. Drª. Miriam Maria de Resende
(PPGEQ/UFU)



Profª. Drª. Eliana Setsuko Kamimura
(FZEA/USP)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

- C117h Cabral, Bruna Vieira, 1986-
2012 Hidrólise de sacarose por invertase imobilizada em Duolite A-568 por
adsorção e ligação cruzada / Bruna Vieira Cabral. - 2012.
115 f. : il.
Orientadores: Eloízio Julio Ribeiro e Vicelma Luiz Cardoso.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.
1. Engenharia química - Teses. 2. Hidrólise - Teses. 3. Sacarose - Teses. 3. Invertase - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Julio. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais e irmão, pela ajuda, compreensão e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Solange e Joselias, que jamais mediram esforços para tornar meus objetivos mais próximos e meus desejos reais. Ao meu irmão, pelo constante incentivo. Ao Gustavo, pela presença, paciência e carinho em cada passo desta caminhada. A toda minha família que através de simples gestos me apoiaram e acreditaram no meu esforço.

Ao Prof. Eloízio Júlio Ribeiro pela orientação, paciência e dedicação que tornaram esta jornada mais suave e empolgante. Pelas palavras certas e carinhosos incentivos que contribuíram imensamente para minha formação pessoal e profissional. Obrigada por cada dia, cada conversa, cada gesto de confiança, os levarei por toda vida.

À Prof^a. Vicelma Luiz Cardoso, pelo constante esforço na realização deste trabalho e pela dedicação intensa em alcançar bons resultados. Pela paciência e compreensão eu lhe agradeço.

À Prof^a. Miriam Maria Resende um agradecimento especial, pelos valiosos ensinamentos e ajuda no fechamento deste trabalho.

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, contribuindo com informações valiosas para a realização deste estudo.

À Professora e amiga Líbia que desde sempre contribui para meu crescimento pessoal e acadêmico. Suas palavras doces e incentivadores, desde a graduação, tornaram este trabalho possível.

À amiga Larissa que tanto ajudou, com paciência e esforço em cada etapa desta jornada.

Aos colegas do NUCBIO, que estiveram presentes desde o início. Obrigada pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

Aos funcionários da FEQUI: Cléo, Roberta, Rodrigo, Silvino e Cecília pela colaboração.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A Dow Brasil S.A pela doação da resina Duolite A-568.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Sumário

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Enzimas	3
2.1.1 Enzimas como Biocatalisadores	3
2.1.2 Invertase	7
2.2 Açúcar Líquido	9
2.2.1 Açúcar Líquido Invertido	10
2.2.2 Propriedades físico-químicas do açúcar líquido e açúcar líquido invertido.....	11
2.2.3 Aplicações do açúcar líquido invertido	12
2.2.4 Processos de Fabricação de Açúcar Líquido Invertido	14
2.2.4.1 Inversão Ácida.....	14
2.2.4.2 Inversão com Resinas Catiônicas	15
2.2.4.3 Inversão por Via Enzimática	15
2.3 Enzimas Imobilizadas	16
2.3.1 Métodos de Imobilização de Enzimas	18
2.3.1.1 Tipos de Imobilização	19
2.3.1.1.1 Imobilização por retenção física.....	19
2.3.1.1.2 Ligação a Suportes Insolúveis	20
2.3.1.1.3 Ligação cruzada.....	24
2.4 Suportes para Imobilização	26
2.4.1 Métodos de ativação do suporte	28
2.4.2 Imobilização em Resinas	29
2.5 Efeitos da Imobilização nas Propriedades da Enzima	31
2.5.1 Efeitos dos métodos de imobilização na cinética e propriedades das enzimas	31
2.6 Reatores para biocatalisadores imobilizados.....	32
2.6.1 Reatores descontínuos	34
2.6.2 Reatores contínuos.....	35
2.6.3 Influência de alguns fatores na escolha do reator.....	36
2.7 Cinética Enzimática.....	37
2.7.1 Determinação dos Parâmetros Cinéticos	38
2.7.2 Influência do meio na atividade e estabilidade das enzimas	38
2.7.2.1 Influência do pH.....	38
2.7.2.2 Influência da temperatura	39
2.8 Planejamento Composto Central	43
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 Enzima e Reagentes.....	47
3.2 Suporte para Imobilização.....	47
3.3 Substratos.....	48
3.4 Unidades Experimentais	48
3.4.1 Reator batelada (descontínuo)	49
3.4.2 Reator tipo leito fixo (contínuo)	50
3.5 Determinação da Atividade pelo Método das Taxas Iniciais.....	51
3.6 Imobilização do biocatalisador.....	52

3.6.1 Ativação do suporte	52
3.6.2 Influência do tempo no processo de imobilização por adsorção iônica	52
3.6.3 Otimização do Processo de Imobilização	52
3.7 Testes em Reator Batelada	53
3.7.1 Estudo preliminar para o processo de ligação cruzada.....	53
3.7.2 Estabilidade de invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada em relação ao pH.....	53
3.7.3 Estabilidade térmica da enzima imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada	54
3.7.4 Otimização do processo de ligação cruzada	55
3.7.4.1 Influência da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação no processo de ligação cruzada	55
3.7.4.2 Influência da temperatura e do pH na atividade de invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada.....	57
3.7.4.3 Estudo da estabilidade de estocagem de invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada	58
3.8 Testes em Reator de Leito Fixo	59
3.8.1 Imobilização da invertase em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada	59
3.8.2 Influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura na conversão de sacarose	59
3.8.3 Estudo da estabilidade operacional da invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada	64
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1 Condições adotadas para a imobilização de invertase	66
4.2 Atividade da Invertase	66
4.3 Testes em Reator Batelada	67
4.3.1 Estudo preliminar para o processo de ligação cruzada.....	67
4.3.2. Estabilidade de invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada em relação ao pH	67
4.3.3 Estabilidade térmica da invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada	69
4.3.4 Otimização do processo de ligação cruzada	78
4.3.4.1 Influência da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação no processo de ligação cruzada	78
4.3.4.2 Influência da temperatura e do pH na atividade de Invertase imobilizada em duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada	83
4.3.5 Estudo da estabilidade de estocagem de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada	89
4.4 Testes em Reator Tipo Leito Fixo	90
4.4.1 Influência conjunta da concentração de substrato, tempo de residência e temperatura na conversão de sacarose	90
4.4.2 Estudo da estabilidade operacional da invertase imobilizada	105
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	102
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	102
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
APÊNDICE	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Comparação entre as características das enzimas e dos catalisadores químicos....	4
Tabela 2.2 - Principais classes de enzimas	6
Tabela 2.3 – Algumas propriedades da invertase.	8
Tabela 2.4 – Doçura relativa de diversos açúcares.....	12
Tabela 2.5 – Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização.	25
Tabela 2.6 - Classificação dos suportes de acordo com a composição.	27
Tabela 2.7 - Classificação de reatores enzimáticos.	33
Tabela 3.1 – Características da resina Duolite A-568 (Rohm Haas).....	48
Tabela 3.2 - Matriz Planejamento Composto Central do efeito conjunto da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação no processo de ligação cruzada.....	56
Tabela 3.3 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito conjunto da temperatura e do pH na atividade de invertase imobilizada na resina Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada.....	58
Tabela 3.4 – Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura na conversão de sacarose em reator tipo leito fixo.....	60
Tabela 3.5 – Comparação entre valores de conversão de substrato, em reator tipo leito fixo, para solução de sacarose em tampão acetato 10^{-1} M pH 4 e 5.....	62
Tabela 3.6 – Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura na conversão de sacarose em reator tipo leito fixo.....	63
Tabela 4.1 – Resultado preliminar para o processo de ligação cruzada com uso de glutaraldeído.	67
Tabela 4.2 – Ajustes dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série com uma única etapa para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada, nas temperaturas 51, 57, 60 e $63 \pm 1^{\circ}\text{C}$	71
Tabela 4.3 – Cálculo do tempo de meia vida para cada temperatura estudada na estabilidade em relação à temperatura.	76
Tabela 4.4 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central para a otimização do processo de ligação cruzada.....	78
Tabela 4.5 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros referentes à otimização do processo de ligação cruzada.	79

Tabela 4.6 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos aplicados ao PCC de otimização do processo de ligação cruzada.	80
Tabela 4.7 – Análise de Variância (ANOVA) para a resposta de atividade enzimática aplicada ao PCC de otimização do processo de ligação cruzada.	81
Tabela 4.8 – Matriz com resultados obtidos para avaliar a influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada.	84
Tabela 4.9 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.	85
Tabela 4.10 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.....	85
Tabela 4.11 – Análise da variância (ANOVA) para a resposta de atividade enzimática resultante da avaliação da influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.	86
Tabela 4.12 – Matriz do Planejamento Composto Central para a influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	91
Tabela 4.13 – Comparação entre valores de conversão de substrato, em reator tipo leito fixo, para solução de sacarose em tampão acetato pH 4 e 5.	92
Tabela 4.14 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	93
Tabela 4.15 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos aplicada ao PCC para avaliar influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	94
Tabela 4.16 – Análise de Variância (ANOVA) para valores de conversão de sacarose resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	95
Tabela 4.17 – Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta da concentração de sacarose, temperatura e tempo de residência no reator tipo leito fixo.	99
Tabela 4.18 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	100

Tabela 4.19 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	101
Tabela 4.20 – Análise de Variância (ANOVA) para valores de conversão de sacarose resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mecanismo para a formação do complexo ativo invertase-sacarose foi proposto por Laidler (1958) citado por Marquez (2007).	9
Figura 2.2 – Reação de hidrólise de sacarose com formação de glicose e frutose. Fonte: Adptado (PASCHOALIM, 1990).	11
Figura 2.4 – Métodos para imobilização de enzimas (FISCHER , 2010).	19
Figura 2.5- Representação de efeito negativo sobre enzima imobilizada e ausência deste efeito (Modificação de GUÍSAN <i>et al.</i> , 1997).	23
Figura 2.6 – Representação dos métodos de ativação. À esquerda estão os suportes, nas cores verde (gluteraldeído), azul (glicidol) e vermelho (epicloridrina) os agentes ativantes e na superfície do suporte os grupos reativos que irão reagir com os grupos amino da enzima (ADRIANO, 2008).	29
Figura 2.7 – Tipos de reatores enzimáticos (RIBEIRO, 1989).	32
Figura 2.8 – Representação da variação da constante de velocidade k com a temperatura absoluta T (BAILEY e OLLIS, 1986).	40
Figura 2.9 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.	46
Figura 3.1 – Enzima Invertase (β -frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26, Grau V, código 9001-57- 4, da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>), marca Sigma.	47
Figura 3.2 – Resina Duolite A-568 empregada para imobilização da enzima invertase.	48
Figura 3.3 – Foto dos reatores tipo mistura com operação batelada utilizados para realizar as reações de hidrólise de sacarose por invertase imobilizada.	49
Figura 3.4 – Representação esquemática da unidade experimental do reator tipo batelada utilizado para realizar a hidrólise de sacarose por invertase imobilizada (FISCHER, 2010).	50
Figura 3.5 – Foto do reator tipo leito fixo utilizado para realizar a conversão de sacarose por invertase imobilizada.	50
Figura 3.6 – Representação esquemática da unidade experimental do reator tipo leito fixo utilizado para realizar a conversão de sacarose por invertase imobilizada (FISCHER, 2010).	51
Figura 4.1 – Influência do pH na estabilidade de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. (Condições de determinação da atividade enzimática: Concentração de sacarose 50 g/L, temperatura: $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e tampão acetato 10^{-1}M , pH 4,9).	68

Figura 4.2 – Perfis de inativação térmica para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Incubação em tampão acetato 10^{-1} M, pH 4,7 e temperaturas 51, 57, 60 e $63 \pm 1^{\circ}\text{C}$	70
Figura 4.3 - Perfil da desativação térmica a $63 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 2.6 = modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 2.4 = modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.	71
Figura 4.4 - Perfil da desativação térmica a $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 2.6 = modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 2.4 = modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.	72
Figura 4.5 - Perfil da desativação térmica a $57 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 2.6 = modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 2.4 = modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.	74
Figura 4.6 - Perfil da desativação térmica a $51 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 2.6 = modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 2.4 = modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.	75
Figura 4.7 – Regressão linear da equação de Arrhenius.	77
Figura 4.8 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática da otimização do processo de ligação cruzada.....	81
Figura 4.9 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de valores de atividade enzimática resultantes da otimização do processo de ligação cruzada.	82
Figura 4.10 – Superfície de resposta da influência conjunta da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação na atividade de enzima imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.....	82
Figura 4.11 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática resultante da avaliação da influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.	87
Figura 4.12 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática resultante da avaliação da influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.	87

Figura 4.13 - Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.	88
Figura 4.14 – Estabilidade de estocagem de invertase imobilizada. Estocagem a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em tampão acetato 0,1 M, pH 4,9; testes em reator tipo cesta (batelada), meio reacional: 40°C , solução de sacarose 50 g/L (tampão acetato 0,1 M, pH 4,9).	90
Figura 4.15 – Valores preditos em função dos valores observados para valores de conversão de substrato resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	95
Figura 4.16 – Distribuição dos resíduos relativa para valores de conversão de substrato resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	96
Figura 4.17 – Superfície de resposta da influência da concentração de sacarose e do tempo de residência na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.	97
Figura 4.18 – Superfície de resposta da influência da concentração de sacarose e da temperatura na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.	97
Figura 4.19 – Superfície de resposta da influência do tempo de residência e da temperatura na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.	98
Figura 4.20 – Valores preditos em função dos valores observados para valores de conversão de substrato resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	102
Figura 4.21 – Distribuição dos resíduos relativa para valores de conversão de substrato resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.	103
Figura 4.22 – Superfície de resposta da influência da concentração de sacarose e do tempo de residência na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.	103
Figura 4.23 – Superfície de resposta da influência da concentração de sacarose e da temperatura na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.	104

Figura 4.24 – Superfície de resposta da influência do tempo de residência e da temperatura na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.....	105
Figura 4.25 – Estabilidade operacional da invertase imobilizada na hidrólise de sacarose em reator de leito fixo em regime contínuo. Condições experimentais: solução de sacarose 700 g/L (tampão acetato pH 5), tempo de residência igual a 95,3 min e temperatura igual a 38°C.	106

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta - formas anoméricas da enzima β -galactosidase
α	Alfa - formas anoméricas da enzima β -galactosidase
α_1	Relação entre a atividade da enzima no estado E_1 e a atividade da enzima nativa E_0
α_2	Relação entre a atividade da enzima no estado E_2 e a atividade da enzima nativa E_0
E_1	Atividade da enzima no estado E_1
E_2	Atividade da enzima no estado E_2
k_1	Coefficiente de velocidade de desativação de primeira ordem do estado E_0 para E_1
k_2	Coefficiente de velocidade de desativação de primeira ordem do estado E_0 para E_2
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida (min)
k_d	Constante cinética desativação térmica
A	Fator de frequência para a reação
E_a	Energia de ativação do processo de ativação térmica da enzima (kJ/mol)
R	Constante da lei dos gases
T	Temperatura absoluta
A/A_0	Atividade relativa da enzima
U	Atividade de invertase solúvel - grama de açúcar redutor produzido por litro, por minuto, por grama de invertase em pó comercial
U_S	Atividade de invertase imobilizada - grama de açúcar redutor por litro, minuto, grama de suporte
a	Fator de frequência para a reação
E_d	Energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima
R^2	Coefficiente de correlação
t	t de student
ρ	Nível de significância
$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	Somatória dos quadrados dos desvios
α	Alfa de ortogonalidade
X_1	Variável estudada 1
X_2	Variável estudada 2
X_n	Valor da variável no experimento na forma codificada
X_0	Valor real da variável no ponto central
X_{+1}	Valor real da variável no nível superior
X_{-1}	Valor real da variável no nível inferior
F_{calc}	Valor calculado do teste F para um conjunto de pontos experimentais
F_T	Valor tabelado do teste F de estatística para hipóteses

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a hidrólise de sacarose por invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por adsorção iônica em resina de troca iônica Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada com uso de glutaraldeído. Esta combinação de processos de imobilização levou a um aumento da atividade e estabilidade da enzima invertase. O intervalo de estabilidade da invertase imobilizada em relação ao pH foi entre 3 e 6, em tampão acetato 10^{-1} M. Foi verificada uma forte dependência da estabilidade do biocatalisador imobilizada em relação à temperatura. A estabilidade térmica da enzima foi estudada na faixa de 51 a $63 \pm 1^\circ\text{C}$. O modelo de desativação térmica de primeira ordem descreveu de forma significativa a cinética de desativação térmica da enzima imobilizada em todas as temperaturas estudadas. O valor da energia de ativação de desativação térmica de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada foi 373,73 kJ/mol ou 89,32 kcal/mol, utilizando uma concentração inicial de sacarose de 50 g/L em solução tampão acetato pH 4,9, com tempo de meia vida igual a 8,08 horas para a temperatura de $51 \pm 1^\circ\text{C}$. Ao otimizar o processo de ligação cruzada através de um Planejamento Composto Central (PCC), a concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação que maximizaram a atividade enzimática, foram respectivamente, 0,6 g/L e 6 horas. A temperatura e pH em que a invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada apresentou maior atividade foram respectivamente, 50°C e pH tampão acetato 4, valores obtidos através de um novo PCC. O biocatalisador imobilizado manteve sua atividade após 60 dias de armazenamento, em tampão acetato 10^{-1} M pH 4,9 a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, indicando a manutenção da estabilidade na estocagem. A influência da concentração de sacarose, do tempo de residência e da temperatura na conversão da sacarose em reator de leito fixo, operando em regime contínuo, com escoamento ascendente foi estudada empregando um Planejamento Composto Central (PCC). A melhor condição para conversão de sacarose foi: concentração de sacarose igual a 700 g/L, tempo de residência de 95,3 minutos e temperatura de $38 \pm 1^\circ\text{C}$ atingindo a conversão de 98,7%. A enzima imobilizada, manteve sua atividade durante 73,58 horas de operação em reator de leito fixo, com vazão de alimentação de solução de sacarose de 700 g/L, tempo de residência de 95,3 min e temperatura de $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

Palavras-chave: invertase, hidrólise de sacarose, açúcar invertido, imobilização, Duolite A-568, reator de leito fixo.

ABSTRACT

In this work was studied the sucrose's hydrolysis by invertase of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized by adsorption and cross-linking with glutaraldehyde, using as carrier the ion exchange resin Duolite A568. This combination of immobilization procedures has led to an increase of activity and stability of the invertase. The influence of pH on the stability of invertase with the cross-linking process was studied for the range of 3 to 7, and the biocatalyst was stable in the range of 3 to 6. The thermal stability of enzyme was studied in the range of 51 to 63°C. The thermal deactivation model of first order described significantly the kinetics of thermal deactivation from immobilized enzyme at all temperatures studied. The activation energy of thermal deactivation process from invertase immobilized was 373.73 kJ/mol or 89.32 kcal/mol with times of half life from 8.08 hours in $51 \pm 1^\circ\text{C}$. The optimization of cross-linking process was studied by a Central Composite Design (CCD), where the glutaraldehyde concentration and time of cross-linking processes that maximized the enzyme activity were respectively 0.6 g/L and 6 hours. The temperature and pH of maximum activity for the immobilized enzyme were respectively $50 \pm 1^\circ\text{C}$ and 4. It was studied by a Central Composite Design (CCD). The immobilized enzyme kept its activity after 60 days of storage, in acetate buffer pH 4.9 in $4 \pm 2^\circ\text{C}$. The influence of sucrose concentration, residence time and temperature in the sucrose's conversion in fixed bed reactor, operating in continuous duty, with upflow was studied by a Central Composite Design (CCD). The best condition for the sucrose's conversion was: 700 g/L of sucrose concentration, 95.3 min of residence time and temperature equal to $38 \pm 1^\circ\text{C}$, reaching a conversion of 98.7%. The immobilized enzyme kept its activity during 73.58 hours by operation in fixed bed reactor, 700 g/L of sucrose concentration, 95.3 min of residence time and $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

Keywords: invertase, sucrose hydrolysis, invert sugar, immobilization, Duolite A-568, fixed bed reactor.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O açúcar invertido é uma solução mais densa comparada à sacarose, capaz de minimizar a cristalização e o crescimento de micro-organismos. Corresponde a uma mistura de açúcares em solução, constituída principalmente de glicose, frutose e sacarose residual, sendo 20% mais doce que a sacarose além de diminuir a temperatura de congelamento devido a sua afinidade com água. A hidrólise da sacarose, cujo produto é o açúcar invertido, pode ser catalisada por enzimas, por ácidos ou por resinas trocadoras de cátions (CADENA *et al.*, 2010). A obtenção de açúcar invertido por via enzimática apresenta como vantagem a obtenção de um produto de maior qualidade quando comparado ao obtido por hidrólise ácida (EMREGUL, SUNGUR e AKBULUT, 2006).

A invertase ou β -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) catalisa a reação de hidrólise da sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose. A enzima invertase pode ser obtida de diferentes micro-organismos. A maioria das pesquisas referentes a esta enzima estudam, principalmente, invertase extracelular. *Saccharomyces cerevisiae* é uma fonte de invertase bastante conhecida, contendo duas formas desta enzima. Uma delas é intracelular e pobre em carboidrato, a outra corresponde a invertase extracelular rica em carboidrato, sendo esta última a mais utilizada em indústrias de bebidas e alimentos (KARKAS e ONAL, 2012).

O uso de catalisadores relativamente caros como enzimas, requer um efetivo reaproveitamento capaz de tornar o processo economicamente viável (FREITAS *et al.*, 2011). O uso de enzimas solúveis como catalisadores em processos industriais é limitado pelo seu alto custo de produção e baixa estabilidade de estocagem. Assim o uso de enzimas em sua forma livre torna sua recuperação e reuso ao final do processo inviável economicamente (KOTWAL e SHANKAR, 2009). A utilização de biocatalisadores em escala industrial pode ser aumentada caso estes sejam imobilizados e mantenham-se ativos (VUJCIC *et al.*, 2011).

O processo de imobilização tem sido amplamente empregado para facilitar o uso de biocatalisadores em processos industriais, em substituição a processos enzimáticos com técnicas convencionais de imobilização (CADENA *et al.*, 2011). A imobilização de enzimas apresenta vantagens em relação as aplicações comerciais, já que biocatalisadores imobilizados são facilmente separados do produto ao final da reação, são facilmente reutilizados, podem ser usados repetida e continuamente e apresentam um potencial aumento na estabilidade térmica e em relação ao pH (ANSARI e HUSAIN, 2012). Enzimas imobilizadas apresentam um

enorme potencial como catalisadores em processos químicos ligados a indústria e a medicina. Oferecem uma distinta vantagem sobre catalisadores clássicos devido a sua alta especificidade e alta eficiência catalítica a baixas temperaturas (VUJCIC *et al.*, 2011).

Diferentes métodos de imobilização têm sido estudados, sendo que escolha de um processo de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais do processo, tais como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Adsorção física em suportes insolúveis, encapsulamento, ligação cruzada com uso de agentes bi ou multifuncionais, são alguns métodos conhecidos de imobilização de enzimas (VUJCIC *et al.*, 2011).

Diante do amplo uso da invertase em indústrias alimentícias, diversos estudos foram feitos referentes à sua imobilização em diferentes suportes, objetivando analisar sua estabilidade enzimática e seu potencial de reuso. Um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para fixação da enzima. Assim o método escolhido deve atender a duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa ao controle do processo (AZODI, FALAMAKI e MOHSENFAR, 2011).

A imobilização por adsorção iônica envolve a exposição da solução enzimática ao suporte sob condições apropriadas, como, pH da solução, tipo de solvente, força iônica da solução, concentração enzimática, temperatura e tempo de contato. A fraca interação entre enzima e suporte durante o processo de adsorção resulta no desprendimento da enzima, enquanto fortes interações podem causar alterações conformacionais na enzima adsorvida (RAJ *et al.*, 2012).

A ativação do suporte com o uso do glutaraldeído é uma das técnicas de imobilização de enzimas mais populares. A metodologia é bastante simples e eficiente, capaz de aumentar a estabilidade através da formação de ligações multipontuais. O agente glutaraldeído tem sido bastante usado para introduzir ligações cruzadas intermoleculares em proteínas ou modificar proteínas adsorvidas em suportes contendo grupos aminos (MATEO *et al.*, 2007).

A combinação de métodos de imobilização de enzimas como, por exemplo, a ligação iônica seguida de ligação cruzada entre as moléculas da enzima com glutaraldeído, é realizada para melhorar a estabilidade da proteína imobilizada e para obter enzimas imobilizadas com maior atividade (MATEO *et al.*, 2000a).

Logo, baseando-se nas considerações expostas, o objetivo geral desse trabalho foi estudar o processo de hidrólise de sacarose por invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada.

Como objetivos específicos dessa dissertação podem ser citados:

- Avaliar a estabilidade da enzima imobilizada em relação a temperatura e ao pH em função do tempo;
- Estudar a influência da concentração de glutaraldeído e do tempo de reticulação no processo de ligação cruzada em função da atividade enzimática;
- Analisar a influência conjunta da temperatura e pH na atividade do biocatalisador imobilizado;
- Avaliar a estabilidade a estocagem de invertase imobilizada;
- Avaliar a conversão de sacarose em açúcar invertido utilizando invertase imobilizada em reator de leito fixo;
- Avaliar a estabilidade operacional em processo contínuo, empregando reator de leito fixo, da enzima imobilizada na conversão de sacarose.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

2.1.1 Enzimas como Biocatalisadores

As enzimas, importantes componentes do metabolismo de todos os seres vivos, têm a capacidade de promover e acelerar reações químicas. Essas proteínas especiais são úteis inclusive na indústria, não apenas na área de alimentos, mas em muitos outros setores (MUSSATO, FERNANDES e MILAGRES, 2009).

Na indústria para a obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial, são empregados catalisadores químicos que são poucos versáteis, exigem altas temperaturas para que a reação atinja razoável velocidade e possuem baixa especificidade, oferecendo assim produtos de composição química mista que requerem uma etapa posterior de purificação. As principais vantagens do uso de enzimas como catalisadores nestas reações são a redução do custo final do processo devido ao consumo menor de energia, redução na formação de subprodutos indesejáveis (elevada especificidade que resulta em maior rendimento do processo), obtenção de produtos biodegradáveis e redução da quantidade de resíduos (KRAJEWSKA, 2004).

Neste contexto, o enfoque biotecnológico vem se apresentando como uma opção interessante para a exploração de enzimas em diversos tipos de reações. As enzimas utilizadas nos setores industriais são na sua grande maioria produzidas por micro-organismos. A tecnologia enzimática apareceu na área de investigação durante a década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). Desde então, os processos enzimáticos tem sido aplicados em diversos setores, incluindo construção de biosensores, terapia enzimática, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais como curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos entre outras aplicações.

Todas as enzimas são proteínas com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA (ribozimas) (GALVÃO, 2004). Existem inúmeras diferenças entre catalisadores químicos e enzimas (Tabela 2.1). A utilização das enzimas na indústria é vantajosa, já que são naturais, não tóxicas e específicas para determinadas ações. Além disso,

são capazes de alterar as características de variados tipos de resíduos, contribuindo para reduzir a poluição ambiental.

Tabela 2.1 - Comparação entre as características das enzimas e dos catalisadores químicos.

Característica	Enzimas	Catalisadores químicos
Especificidade ao substrato	Alta	Baixa
Natureza da estrutura	Complexa	Simples
Sensibilidade à temperatura	Alta	Baixa
Condições de reação	Suaves	Drástica (geralmente)
Custo de obtenção	Alto	Moderado
Consumo de energia	Baixo	Alto
Formação de subprodutos	Baixa	Alta
Separação catalisador/produto	Difícil e cara*	Simples
Atividade em temperatura ambiente	Alta	Baixa
Presença de cofatores	Sim	Não
Estabilidade	Baixa*	Alta
Energia de ativação	Baixa	Alta
Velocidade de Reação	Alta	Baixa

* enzimas solúveis. Enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas e apresentam alta estabilidade (ZANIN e MORAES, 2004).

Fonte: ZANIN e MORAES, 2004.

Para atuar corretamente, as enzimas precisam de condições específicas, pois são ativas apenas em uma faixa estreita de acidez-alcalinidade e são sensíveis a mudanças nesse fator e na temperatura do meio. Os micro-organismos são a principal fonte de enzimas de aplicação industrial, mas diversas podem ser obtidas de animais (pancreatina, tripsina, quimotripsina, pepsina, renina e outras) ou vegetais (papaína, bromelina e outras). Hoje, porém, como é possível modificar geneticamente os micro-organismos para que forneça qualquer enzima, a tendência é substituir as produzidas por vegetais e animais pelas de origem microbiana.

Segundo Mariotto (2006), as principais características das enzimas são:

- Produtos naturais biológicos;
- Apresentam alto grau de especificidade;
- Reações com enzimas são baratas e seguras;
- Apresentam mecanismo de “turnover”, desempenham a mesma função consecutivamente, sem serem consumidas no processo;
- São altamente eficientes, acelerando a velocidade das reações de 10^8 a 10^{11} vezes;
- São econômicas, reduzindo a energia de ativação necessária à reação;
- Não são tóxicas.

As enzimas apresentam essencialmente três propriedades principais: estabilidade, atividade e especificidade (BAILEY e OLLIS, 1986; GALVÃO, 2004):

Estabilidade: a capacidade de uma enzima depende de sua estrutura nativa, a qual é mantida por meio de forças de interação (pontes de hidrogênio e ligações de sulfeto, forças de Van der Waals, interações apolares e iônicas). Alterações no ambiente reacional podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e ocasionando perda parcial ou total da sua funcionabilidade biológica. Assim a estabilidade pode ser afetada por variação de temperatura, pH e presença de solventes polares.

Atividade: esta propriedade de uma enzima atuar na diminuição da energia de ativação requerida para transformar um substrato em produto, aumentando a velocidade de reação. A capacidade catalítica da enzima reside no seu sítio ativo e este compreende um número pequeno de aminoácidos. O sítio ativo é uma estrutura complexa cuja configuração permite alojar a molécula de substrato na posição correta para que os grupos funcionais da enzima efetuem sua transformação química.

Especificidade: a especificidade define a afinidade de uma enzima por grupos específicos em um determinado substrato. Esta é uma propriedade imprescindível das enzimas enquanto catalisadores. Duas características estruturais são determinantes na especificidade da enzima: o substrato possui ligações químicas que podem ser atacadas pelos grupos funcionais do sítio ativo da enzima e o substrato possui grupos funcionais que se unem à enzima, permitindo seu correto alinhamento no sítio ativo para que a reação possa ocorrer.

A Comissão de Enzimas (CE) da União Internacional de Bioquímica (IUB) coloca todas as enzimas em seis grandes classes (Tabela 2.2), cada uma delas comportando subclasses conforme o tipo de reação catalisada.

Tabela 2.2 - Principais classes de enzimas

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada	Atuação
Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons	CH-OH
		C=O
		C=O-
		CH-NH ₂
		CH-NH-
Transferases	Transferem grupos funcionais entre moléculas	NADH, NADPH
		Grupos com um carbono
		Grupos aldeído ou cetona
		Grupos acil
		Grupos glicosil
Hidrolases	Reações de hidrólise	Grupos fosfatos
		Grupos contendo enxofre
		Ésteres
		Ligações glicosídicas
		Ligações peptídicas
Liasas	Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico	Outras ligações C-N
		Anidridos ácidos
		=C=C=
		=C=O
		=C=N-
Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros	racemases

Fonte: MARIOTTO, 2006.

Em relação à ação catalítica das enzimas o primeiro ponto a considerar é a grande diferença de tamanho entre a enzima e seus substratos. Segundo DALLA-VECCHIA *et al.*, (2004), as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos e biológicos, seja quando estocadas ou durante o uso. O investimento energético para a síntese de uma molécula protéica justifica-se pela obtenção de uma estrutura muito precisa, com reentrâncias de forma apropriada e com grupos químicos localizados em posições exatas para servir à catálise.

2.1.2 Invertase

Uma das enzimas com aplicabilidade industrial é a β -frutofuranosidase (E. C. 3.2.1.26). Também chamada invertase não só catalisa a hidrólise de sacarose formando uma mistura de glicose e frutose, mas em algumas condições também é capaz de catalisar a transfrutossilação para produzir frutooligossacarídeos (FOS) como a kestose (GF2), nistose (GF3) e 1F frutofuranosilnistose (GF4) (NGUYEN *et al.*, 2005). Ashokkumar, Kayalvizhi e Gunasekaran, (2001), afirmam que a β -frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) catalisa a hidrólise da sacarose em quantidades equimolares de frutose e glicose, processo conhecido como inversão.

Invertase é um biocatalisador potencialmente útil na produção de xaropes com alto teor de frutose e glicose a partir da sacarose como matéria-prima (RUBIO, RUNCO e NAVARRO, 2002). Tomatoni e Vitolo (2007) destacaram o uso da invertase na produção de xarope de frutose usando invertase imobilizada em um biorreator de membrana. O xarope de frutose é empregado como adoçante em indústrias alimentícias e farmacêuticas e também é usado para obter frutose cristalina (ASHOKKUMAR, KAYALVIZHI e GUNASEKARAN, 2001). Merecem ser lembrados, também, outros usos da invertase, como, em produtos para higiene bucal com o objetivo de evitar a formação das placas dentárias, na hidrólise da rafinose, no preparo de meios de cultivo para a propagação de micro-organismos não produtores de invertase e em biosensores (SAID e PIETRO, 2004).

A invertase é encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Saccharomyces cerevisiae* (sua principal fonte), invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos. A principal fonte de invertase industrial são as leveduras, 80% das enzimas são extracelulares e os 20% restantes são intracelulares. Algumas propriedades da invertase extracelular e intracelular estão apresentadas na Tabela 2.3 (GÁSCON *et al.*, 1981).

Tabela 2.3 – Algumas propriedades da invertase.

Propriedades	Invertase extracelular	Invertase intracelular
Massa molecular (kDa)	270	135
Carboidrato (%)	50	3
Atividade específica (U/mg de proteína)	2700	2900
K _m [mM] (sacarose)	26	25
pH - estabilidade	3,0 – 7,5	6,0 – 9,0
pH ótimo - atividade	3,5 – 5,5	3,5 – 5,5

U = micromol sacarose hidrolisado por minuto.

Fonte: GÁSCON, NEUMANN e LAMPEN, 1981.

Invertase de levedura geralmente apresenta uma faixa de estabilidade ao pH que varia de 3,5 a 5,5, podendo ser utilizadas a 65-70°C se a solução de sacarose for concentrada. Invertase imobilizada pode ser utilizada para a inversão da sacarose em larga escala, com rendimento de 80% quando uma solução a 50% é introduzida em um reator contendo 1L da enzima imobilizada, com fluxo de 6 L/h, a 40°C. (UHLIG, 1990).

Isoformas distintas da invertase existem no vacúolo, citoplasma e apoplasto das células de plantas. As isoformas ácidas (pH ótimo entre 4,5 a 5,5) estão presentes no vacúolo e apoplasto, enquanto que as Isoformas de invertases neutras e alcalinas (pH ótimo 8,0) estão localizadas no citoplasma (HAIDER e HUSAIN, 2008).

O mecanismo de ação da invertase não é totalmente conhecido, mas estudos com a enzima têm sugerido o envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica. Um mecanismo para a formação do complexo ativo invertase-sacarose foi proposto por Laidler (1958) citado por Marquez (2007), o qual está representado na Figura 2.1. Pode-se observar a influência do pH no mecanismo de ligação do sítio ativo da invertase com grupos ácidos e básicos.

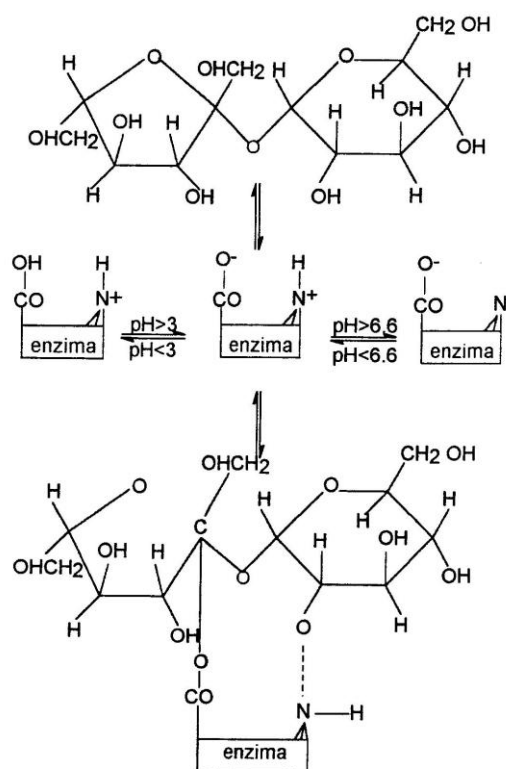


Figura 2.1 - Mecanismo para a formação do complexo ativo invertase-sacarose foi proposto por Laidler (1958) citado por Marquez (2007).

Neste mecanismo mostrado na Figura 2.1 observa-se que as formas carregadas eletricamente são ativas. Assim existe um pH no qual a concentração da forma ativa é máxima, sendo este considerado como pH ótimo, acarretando a atividade máxima (CABRAL, 1989).

A invertase tem sido estudada principalmente em sua forma imobilizada, diante das vantagens apresentadas pelo método em relação a sua forma solúvel. De acordo com BAGAL *et al.*; (2006), a invertase imobilizada pode ser usada em biosensores de sacarose, muito importante para indústrias de alimentos e bebidas. A adição de invertase ao suco de fruta promove aumento de teores de glicose e frutose. A hidrólise da sacarose a 30 - 40°C reduz custos de produção quando se utiliza invertase imobilizada, devido à reutilização deste biocatalisador e o uso de um processo contínuo (TOMATONI e VITOLO, 2007).

2.2 Açúcar Líquido

O açúcar líquido é uma solução de açúcar em água, podendo ser constituído apenas por um açúcar ou uma mistura de dois ou mais açúcares. O açúcar líquido pode ser formado por sacarose, glicose ou frutose, ou ainda uma mistura destes três açúcares e finalmente por

glicose enriquecida com frutose (DAVIS e PRINCE, 1955; MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80).

O açúcar líquido de sacarose é produzido a partir da dissolução do açúcar refinado granulado em água até obter uma solução de 67,5 °Brix. Caso o açúcar usado não seja branco, a solução pode adquirir uma coloração amarelada obrigando a passagem do produto em carvão vegetal (DAVIS e PRINCE, 1955; MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80).

Os açúcares na forma líquida apresentam vantagens em relação ao açúcar a granel como facilidade do manuseio e dosagem, espaço reduzido para a armazenagem, redução das perdas, custos e mão de obra, melhora na sanitização, além das propriedades microbiológicas conhecidas e da grande variação possível nas proporções de diferentes misturas de açúcares. As desvantagens deste produto são: a baixa solubilidade da sacarose, a susceptibilidade ao ataque microbiano e a necessidade de equipamentos especiais para armazenagem e manuseio (DAVIS e PRINCE, 1955; MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80; BRUDER e MOROZ, 1981). Os açúcares líquidos têm aplicações variadas. Sendo utilizados como matéria-prima em biscoitos, produtos assados e de confeitaria, enlatados, bebidas, como: aguardente, refrigerantes, cervejas e sucos de frutas, laticínios, sorvetes, manteiga e indústria de frutas geladas. A baixa viscosidade aliada às propriedades umectantes permite o emprego desta matéria-prima em geléias, bolos, produtos contendo gelatina e doces aerados. (DAVIS e PRINCE, 1955; MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80).

2.2.1 Açúcar Líquido Invertido

O desenvolvimento das indústrias de alimentos e bebidas, que são as principais consumidoras do açúcar líquido invertido, impulsionou o interesse por este produto (JUNK, NELSON e SHERRILL, 1947; DAVIS e PRINCE, 1955). O açúcar líquido contendo uma mistura em diferentes proporções de frutose, glicose e sacarose, é conhecido como invertido. As misturas de açúcares presentes no xarope invertido deram ao produto características únicas como: alta higroscopicidade, resistência a cristalização e doçura que permitiram a longa vida deste produto no mercado.

O açúcar invertido é produzido pela hidrólise da molécula de sacarose em solução. A quebra da sacarose ocorre na ligação entre o núcleo de piranose e furanose, com a liberação de uma molécula de glicose e uma de frutose (MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80). A reação de hidrólise está representada na Figura 2.2.

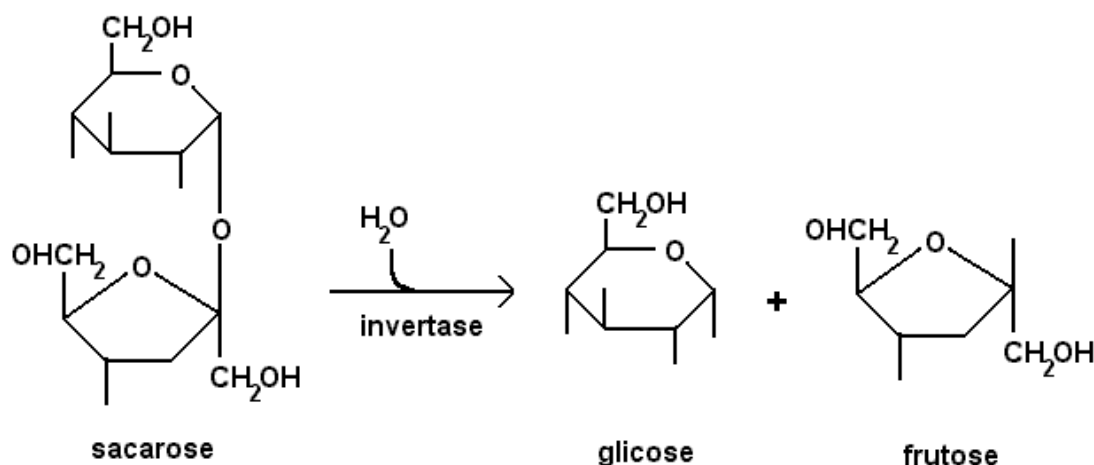


Figura 2.2 – Reação de hidrólise de sacarose com formação de glicose e frutose. Fonte: Adptado (PASCHOALIM, 1990).

A mistura de açúcares obtida após a inversão é denominada de açúcar líquido invertido, pois ocorre uma inversão do poder óptico rotatório da solução. Um feixe de luz polarizada ao atravessar uma solução de sacarose pura desvia o feixe de luz para a direita, após a hidrólise a solução equimolar de glicose e frutose obtida, passa a desviar o feixe de luz para a esquerda.

A inversão da sacarose é uma estratégia usada na fabricação de bombons com recheio pastoso. Durante o processo de fabricação, o bombom é recheado com uma pasta de sacarose, água e invertase. Até a sua venda, ocorrerá, no interior do bombom, a inversão da sacarose com formação de uma mistura de glicose e frutose. Esses açúcares de seis carbonos são mais solúveis em água do que o de doze carbonos e, então, como consequência de sua dissolução na água, existente na pasta, a mistura passa a ser mais doce e ter uma consistência líquida. A doçura relativa da mistura de iguais proporções dos dois monossacarídeos, glicose e frutose, é maior do que a doçura da sacarose (CHEMELLO, 2006).

2.2.2 Propriedades físico-químicas do açúcar líquido e açúcar líquido invertido

O xarope invertido com maior valor comercial é aquele em que 55% da sacarose é convertida em glicose e frutose possibilitando trabalhar com 76,5% de sólidos solúveis, sem riscos de cristalização (RODRIGUES *et al.*, 2000).

A solubilidade da sacarose a 20°C é 67,1%. Este valor estabelece a máxima concentração permitida para evitar a cristalização durante a armazenagem e o transporte. Os açúcares líquidos contendo glicose e frutose podem ser produzidos com alto conteúdo de

sólidos devido a alta solubilidade da frutose. A glicose apesar de ser o menos solúvel dos açúcares quando comparado com a sacarose e a frutose, pode permanecer em solução por longos períodos de tempo, mesmo em condições de saturação.

A viscosidade das soluções de açúcares é uma propriedade importante para a indústria, pois está diretamente relacionada à fluidez do xarope, determinando as condições de estocagem, o projeto de equipamentos, de bombas e das tubulações. O xarope contendo açúcar invertido contém maior teor de sólidos se comparado com o xarope contendo apenas sacarose, portanto sua viscosidade é maior. Porém, se comparados dois xaropes com a mesma concentração de sólidos, o xarope de sacarose terá maior viscosidade já que é constituído por moléculas maiores que a glicose e a frutose (DAVIS e PRINCE, 1955).

O açúcar invertido é extremamente higroscópico devido à presença de frutose, sendo capaz de absorver água mesmo em umidades relativas inferiores a 60%. Esta propriedade permite que o mesmo seja empregado em produtos alimentícios e não alimentícios, já que a umidade do alimento pode ser regulada através da quantidade de açúcar invertido dosado (DAVIS e PRINCE, 1955; MOROZ *et al.*, 1973).

O índice de qualidade do produto está diretamente relacionado com sua utilidade, sendo a cor do açúcar um indicador deste. A cor muito forte é uma característica indesejada no produto, sendo influenciada pela temperatura e tempo aplicados durante a inversão de sacarose e o pH da solução. Períodos de aquecimento longos durante o processo de inversão e valores de pH neutros favorecem a formação de cor (DAVIS e PRINCE, 1955).

As soluções contendo até 10% de sacarose são mais doces que o açúcar invertido, enquanto que acima de 10% o xarope invertido é mais doce (MOROZ *et al.*, 1973). A doçura relativa de vários componentes está representada na Tabela 2.4 a seguir:

Tabela 2.4 – Doçura relativa de diversos açúcares.

Açúcares	Doçura relativa
Frutose	1,1 a 1,8
Sacarose	1,0
Açúcar invertido	0,9
Glicose	0,7

Fonte: PASCHOALIM, 1990.

2.2.3 Aplicações do açúcar líquido invertido

O açúcar invertido líquido apresenta algumas características específicas como: higroscopicidade, solubilidade, resistência à cristalização, viscosidade, doçura, atividade redutora e estabilidade. A sacarose pode sofrer hidrólise após a sua adição em bebidas ou outros alimentos com caráter ácido, demonstrando assim a maior estabilidade deste xarope em relação à sacarose (MOROZ *et al.*, 1973).

Na indústria de panificação o xarope invertido é escolhido em relação à sacarose devido a sua habilidade em absorver a umidade, apesar de que a sacarose também pode ser utilizada já que é invertida durante a fermentação (DAVIS e PRINCE, 1955; MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80; GROVES, 1998).

A produção de cookies também utiliza o açúcar invertido, em que reduz a cristalização de sacarose, influencia positivamente no tempo de prateleira, na cor e na diminuição de quebras do produto (MOROZ *et al.*, 1973).

Outra aplicação do açúcar líquido invertido é em produtos confeitados. Utiliza-se entre 0 – 10% de açúcar invertido em balas, *fondants* e entre 15-25% em doce de leite, caramelo, *nougat*, *marshmallow* e geléias a base de Agar. A adição de pequenas quantidades de açúcar líquido invertido durante a fabricação de produtos assados, como bolos, melhora a cremosidade dos açúcares e gorduras, assim como a rápida e uniforme distribuição dos ingredientes. (MOROZ *et al.*, 1973).

Se comparado o açúcar invertido com o açúcar cristal, o invertido apresenta diversos benefícios, tais como (MARQUEZ, 2007):

- Melhoria do controle do processo de fabricação e da manutenção de condições higiênicas nas indústrias alimentícias;
- Alta pureza química evitando a geração de precipitados indesejáveis em função de elevados teores de ferro, cobre ou cálcio;
- Alto controle microbiológico, devido à menor atividade de água, dispensando a necessidade de pasteurização por parte do cliente;
- Menor espaço necessário para a estocagem;
- Economia de despesas operacionais para o tratamento de açúcar cristal, como gastos com energia, água e vapor;
- Elimina a necessidade de investimentos em equipamentos para a dissolução e filtração do açúcar;
- Redução das perdas, menor poluição e gastos com seu controle.

Além destes benefícios, em diversas aplicações industriais o açúcar invertido apresenta propriedades mais interessantes se comparado à solução de sacarose, tais como (MARQUEZ, 2007):

- Apresenta maior higroscopicidade, retendo umidade mesmo em ambientes muito secos;
- Maior solubilidade, atuando como inibidores de cristalização e reduzindo custos com frete;
- Reduz o ponto de congelamento, propriedade útil em produtos que são conservados em congeladores;
- Em produtos com baixo teor de gordura, sua utilização evita que esses comecem a quebrar e secar;
- Possui viscosidade baixa, conferindo plasticidade a sorvetes, cremes e *fondants*;

2.2.4 Processos de Fabricação de Açúcar Líquido Invertido

A inversão da sacarose para produção do açúcar invertido pode ser realizada em meio ácido a quente, em resina de troca catiônica fortemente ácida ou por ação da enzima invertase (MOROZ *et al.*, 1973; MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80). O processo enzimático pode ocorrer pela adição direta da enzima ou pela imobilização da mesma em suportes inertes (AKGOL *et al.*, 2001; RODRIGUES, 2000). A inversão pode ser realizada diretamente em uma solução de sacarose ou em alimentos contendo este açúcar (RODRIGUES *et al.*, 2000).

Algumas matérias primas podem ser utilizadas na fabricação de açúcar invertido como, por exemplo, o melado de cana e beterraba, tâmaras, uvas e xarope de milho por isomerização enzimática (MOROZ *et al.*, 1973; MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80). Desde 1951, em que se iniciou a produção de açúcar invertido na Irlanda, novas técnicas de fabricação do açúcar líquido invertido têm sido descritas na literatura. Algumas delas são apresentadas a seguir.

2.2.4.1 Inversão Ácida

A inversão ácida é o método mais antigo e mais econômico para produzir açúcar invertido a partir da sacarose, em que o ácido age como um catalisador da reação.

A concentração dos reagentes e do ácido, a temperatura e o tempo de reação são as principais variáveis que controlam a inversão química. A inversão ácida pode gerar um produto altamente colorido, em que o aumento da temperatura e redução do pH causam um aumento da velocidade de inversão (RODRIGUES *et al.*, 2000). Este tipo de inversão resulta em um produto de qualidade inferior, além do inconveniente de utilizar altas temperaturas e agentes corrosivos que comprometem a segurança dos operários e a manutenção dos equipamentos (AKGOL *et al.*, 2001). Existe ainda a necessidade da neutralização final do produto e a geração de subprodutos, como furfurais e outros aromáticos indesejáveis, além de oligossacarídeos por reação de polimerização (VICENTE, 2000). Geralmente o problema de neutralização é resolvido adicionando cal ao xarope, o que provoca incrustações nos equipamentos, além de ocasionar perda de açúcares no armazenamento devido à presença de sais insolúveis de cálcio.

2.2.4.2 Inversão com Resinas Catiônicas

A inversão com resinas de troca iônica é outra técnica para a produção do açúcar invertido. Segundo VICENTE (2000), este método foi desenvolvido e patenteado por HUGHES em 1952, para a produção contínua de xaropes de açúcar invertido. A operação é contínua e o xarope de sacarose passa através de uma coluna vertical contendo íons hidrogênio necessários para a inversão. O meio ácido promovido pela resina catiônica pode causar degradação do açúcar resultando em hidroximetilfurfural com a subsequente formação de cor no xarope (RODRIGUES *et al.*, 2000). O grau de inversão depende do tempo de contato, temperatura, concentração de íons hidrogênio na resina, grau de reticulação e porosidade da resina (MOROZ *et al.*, 1973). A eficiência da inversão da sacarose reduz com a exaustão da resina, que pode ser regenerada com ácido sulfúrico ou clorídrico (MOROZ *et al.*, 1973; BRUDER e MOROZ, 1981, PASCHOALIM, 1990).

A mudança de cor durante o processo de inversão, em meio ácido ou com resina catiônica, pode ser reduzida mantendo o pH e a temperatura baixos. O teor de cinzas do açúcar invertido é função da qualidade do açúcar e da água utilizados (MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80).

2.2.4.3 Inversão por Via Enzimática

A produção do açúcar líquido invertido pode ser realizada ainda através de um terceiro processo, a hidrólise enzimática. A hidrólise catalisada pela enzima invertase produz um xarope de alta qualidade com baixas concentrações de hidroximetilfurfural e sem desenvolvimento de cor. Os métodos enzimáticos empregam as enzimas livres ou imobilizadas. (CHEN *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Este processo é utilizado quando se deseja produzir pequenas quantidades de xarope e um produto com características especiais de aroma e cor, os quais poderiam ser prejudicados pela hidrólise ácida (MOROZ *et al.*, 1973; PASCHOALIM, 1990). O processo de inversão enzimática apresenta vantagens em relação ao método ácido. Na inversão enzimática não ocorre alteração na cor do produto ou no *flavor* do xarope, é menos corrosivo aos equipamentos da planta e por ser um método mais brando não decompõe os carboidratos e não há a formação de compostos indesejáveis, como o furfural. O produto apresenta baixo teor de cinzas, pois não ocorre a utilização de ácido para a inversão, nem de base para a neutralização (MOROZ *et al.*, 1973; MARIGNETTI e MANTOVANI, 1979/80; GROVES, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2000).

2.3 Enzimas Imobilizadas

Biocatalisadores, enzimas ou células, têm sido amplamente utilizadas em diversos processos, seja em escala laboratorial ou industrial. Há muitos anos, esforços intensivos têm sido empreendidos não somente no desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades superiores, mas também na elucidação de técnicas que permitam o seu uso repetido ou em processos contínuos. Apesar destes esforços intensivos, amplamente documentados na forma de publicações técnicas e registros de patentes, poucos processos baseados em técnicas de imobilização, seja de enzimas ou de células, foram implementados em escala industrial (CANILHA, CARVALHO e SILVA, 2006).

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

A imobilização é um processo que pode ser definido como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro

ou na superfície do agente imobilizador (TAMPIOM e TAMPIOM, 1988). A imobilização pode ser definida também como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (CANTARELLI, 1989). O uso em processo contínuo, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do biocatalisador são as principais vantagens propiciadas pela imobilização (CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006).

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização. A enzima imobilizada pode ser reutilizada e é normalmente mais estável em relação à enzima livre, com a vantagem adicional de possibilitar a utilização de processo contínuo (CANILHA, CARVALHO e SILVA, 2006).

As enzimas imobilizadas possuem várias vantagens sobre as enzimas livres (BERGAMASCO *et al.*, 2000; AKGOL *et al.*, 2001; GÜRSEL *et al.*, 2003; GÓMEZ *et al.*, 2005; SZYMANSKA *et al.*, 2007), tais como:

- Processos com enzimas imobilizadas podem ser conduzidos preferencialmente de modo contínuo, usando leitos fixos ou fluidizados, por serem facilmente controlados;
- Reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- É possível usar alta dosagem de enzima por volume de reator, comparada ao uso de enzimas livres;
- Os produtos são facilmente separados do meio reacional;
- Em alguns casos a estabilidade e a atividade são aumentadas pela imobilização;
- Esta técnica permite a redução do capital operacional já que a vida útil de uma enzima imobilizada é suficientemente longa.

As principais desvantagens da imobilização são: a possível perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização e os efeitos difusionais devido ao transporte do substrato e do produto ao sítio ativo da enzima imobilizada (RIBEIRO, 1989; BAYRAMOGLU *et al.*, 2003).

O primeiro trabalho sobre imobilização de enzimas data do início do século XX, quando Nelson e Griffin (1916) adsorveram invertase em carvão ativado e alumina, com retenção de atividade na inversão de sacarose.

2.3.1 Métodos de Imobilização de Enzimas

O método e o tipo de suporte a serem empregados em um determinado processo de imobilização devem ser estabelecidos empiricamente, recaindo a escolha do binômio suporte-método sobre aquele que apresentar maior retenção de atividade. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá basicamente de dois fatores. Primeiramente, das características peculiares do material biológico, e em seguida das condições de uso do sistema imobilizado. Diante da variabilidade destes fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal, adequados para qualquer processo (CORCORAN, 1985; VITOLO, 2001).

De acordo com Brena e Batista-Vieira (2006), o histórico do desenvolvimento dos procedimentos de imobilização pode ser dividido em três fases: a) 1815: uso empírico para produção de ácido acético e tratamento de águas residuais; b) 1960: produção de L-aminoácidos e isomerização da glicose através de imobilização de uma enzima; c) 1985-1995: imobilização de múltiplas enzimas, incluindo cofatores regeneradores e imobilização de células para a produção de L-aminoácidos a partir de ceto-ácidos em reatores de membrana. Mas ainda na década de 1970, a enzima penicilina-G-acilase passou a ser imobilizada e utilizada na produção de ácido amino-penicilínico (6-APA), que é precursor de penicilinas semi-sintéticas. Isso aconteceu na Inglaterra e, ao mesmo tempo nos Estados Unidos, quando teve início a produção de xarope de alto teor de frutose a partir da isomerização de glicose com a enzima glicose isômeras imobilizada. Estes processos estão plenamente ativos e comprovam a eficiência da utilização de enzimas imobilizadas (UHLIG, 1998).

A imobilização pode afetar a estabilidade, o pH, a temperatura ótima, as constantes cinéticas e a máxima velocidade de reação da enzima (DANISMAN *et al.*, 2004; ERGINER *et al.*, 2000). A imobilização pode oferecer uma estabilidade adicional para uma variedade de enzimas sendo que essa é influenciada pelo número de laços formados entre a enzima e o suporte, a natureza dos laços (covalentes, não-covalentes), o grau de aprisionamento das moléculas de enzima na matriz e as condições de imobilização (DANISMAN *et al.*, 2004; CAO, 2005).

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização estão: retenção física, que consiste no aprisionamento das moléculas da enzima em matriz polimérica, microcápsula ou membrana; a imobilização por ligação da enzima a um

material insolúvel, e pelo uso de um reagente multifuncional por ligações cruzadas (HAIDER e HUSAIN, 2008), conforme pode ser verificado na Figura 2.4.

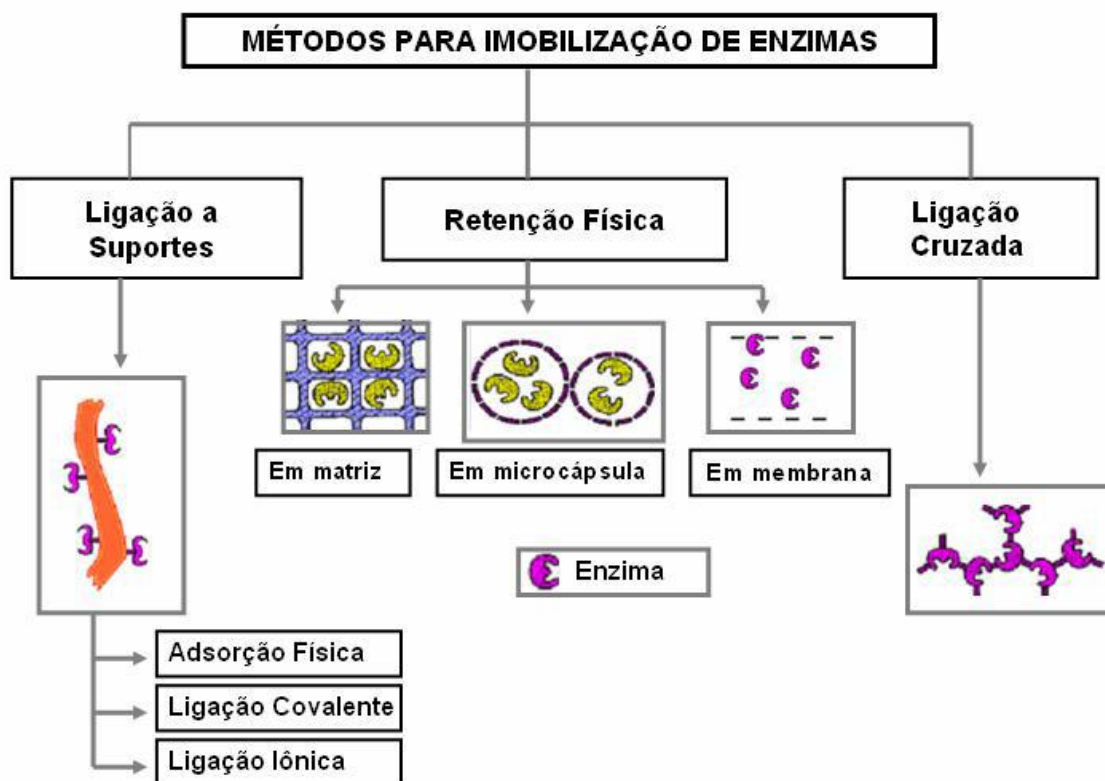


Figura 2.4 – Métodos para imobilização de enzimas (FISCHER , 2010).

2.3.1.1 Tipos de Imobilização

2.3.1.1.1 Imobilização por retenção física

O aprisionamento consiste em separar o biocatalisador do meio reacional por meio de um envoltório semipermeável. O material da película envolvente deve possuir porosidade adequada para reter o biocatalisador e, ao mesmo tempo, deixar a passagem livre para moléculas de baixa massa molar. A imobilização por aprisionamento tem como vantagens principais: o mesmo processo pode ser usado para imobilizar enzimas, células ou organelas; facilidade de preparação da membrana envolvente semipermeável; a disponibilidade no mercado dos materiais para confeccionar o suporte; o biocatalisador uma vez envolto pela membrana fica protegido do ataque de hidrolases (sobretudo de proteases) e/ou de inibidores de alta massa molar; o procedimento de imobilização não afeta seriamente a estrutura macromolecular do biocatalisador. Entretanto, apresenta como principais desvantagens a não

recuperabilidade do suporte e de não poder ser usado para aprisionar enzimas que atuam sobre substratos de alta massa molar. Esse método inclui encapsulação (em gel e em fibras) e a microencapsulação (ROSEVEAR, KENNEDY e CABRAL, 1987).

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa (HANEFELD, GARDOSI e MAGNER, 2009; LOPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Uma técnica de imobilização denominada microencapsulação consiste em aprisionar a enzima em membranas poliméricas semipermeáveis, com grande superfície de contato. É um sistema limitado para substrato com baixa massa molecular, pois este precisa atravessar a membrana para ter acesso à enzima. Há uma grande vantagem na utilização desta técnica; a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, há a possibilidade de haver incorporação da enzima na parede da membrana (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MARIOTTI, 2000).

2.3.1.1.2 Ligação a Suportes Insolúveis

Pode ser dividido em cinco categorias de acordo com o tipo de interação enzima-suporte (adsorção física, ligação iônica, ligação metálica, ligação covalente e ligações cruzadas e co-cruzadas).

O método de ligação a suportes insolúveis pode ser dividido em adsorção física, ligação metálica, ligação covalente e ligação iônica:

- *Adsorção física*: É o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A adsorção da enzima é dependente do pH, da natureza do solvente, força iônica,

concentração de enzimas e temperatura. O controle dessas variáveis é requerido para a adsorção otimizada e retenção da atividade, devido à ligação fraca entre suporte e enzima.

Embora este tipo de imobilização seja fácil de executar, os mecanismos envolvidos na união suporte/enzima são complexos, pois envolvem vários tipos de ligações não covalentes atuando simultaneamente, a saber, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo, forças eletrostáticas e forças hidrofóbicas. Todas estas ligações são rompidas com facilidade através da variação do pH, da força iônica, temperatura e da natureza do solvente. A fraqueza da interação suporte/enzima é o fator responsável pela fragilidade apresentada por este tipo de sistema imobilizado. Para que o mesmo seja estável é indispensável que as condições de adsorção da enzima ao suporte sejam idênticas às do sistema reacional no qual se utilizará o sistema imobilizado. Caso a interação suporte/enzima seja de natureza essencialmente iônica, uma ligeira mudança do pH ou da força iônica do meio de reação será suficiente para causar a dessorção da proteína (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; JEGANNATHAN *et al.*, 2008).

No trabalho de D'Souza e Godbole (2002) a invertase foi imobilizada em casca de arroz por adsorção seguida de ligação cruzada utilizando 2% de glutaraldeído. Como a casca de arroz possui sílica obteve ótimas características de estabilidade. Oosterom *et al.*, (1998) também utilizou a adsorção seguida da ligação cruzada para imobilizar a enzima β -galactosidase em uma resina de troca iônica tipo Duolite S-761 para utilizar na síntese de galactosídeos.

- *Ligação metálica*: Neste método usa-se um metal de transição como ativador da superfície do suporte, permitindo o acoplamento direto da enzima. Também é um método de simples preparação e força de ligação intermediária. Mantém a atividade da enzima, porém a estabilidade operacional obtida, quando se trabalha com substratos de alta massa molecular, é baixa, devido aos metais envolvidos (ZANIN e MORAES, 2004).

- *Ligação covalente*: A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e

influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização (JEGANNATHAN *et al.*, 2008; MATEO *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2011).

Amaya-Delgado, Hidalgo-Lara e Montes-Horcasistas, (2005) imobilizaram invertase covalentemente em nylon-6, a qual foi estável em uma ampla faixa de pH e temperatura similar a da enzima livre e Coutinho Filho, Ribeiro e Maugeri Filho, (2005) imobilizaram invertase em sílica de porosidade controlada, a qual mostrou ser um excelente suporte para imobilização desta enzima.

-*Ligação iônica*: O princípio envolvido no método de imobilização por ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido, que contém resíduos para troca iônica. A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a energia envolvida entre a enzima e o suporte, pois as ligações iônicas são mais fortes do que as forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, porém mais fracas do que a ligação covalente (FERNANDES *et al.*, 2006).

O procedimento deste método é feito da mesma forma que no processo de adsorção física. Como desvantagem, neste método também pode haver a liberação da enzima pelo suporte, por variações de pH e força iônica do meio, visto que para este método há total dependência destes. As vantagens são: possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo, simplicidade do método, disponibilidade de suportes, pouca mudança conformacional na enzima, devido ao caráter iônico da ligação e as condições amenas de imobilização, o que conduz à obtenção de derivados imobilizados com altas atividades enzimáticas (WEETALL, 1975).

- *Ligações covalentes multipontuais*: O estudo de métodos de imobilização torna-se cada vez mais importante diante da busca pela estabilidade enzimática. A imobilização multipontual tem sido constantemente estudada como um método que leva à estabilização enzimática. A imobilização multipontual consiste na formação de várias ligações covalentes entre grupos reativos da enzima e vários grupos ativos do suporte. Para se obter o derivado estável pela técnica de imobilização multipontual, deve-se selecionar um suporte morfolologicamente apropriado. Suportes porosos, cuja estrutura interna tem grande área superficial, como por exemplo, sílica, alumina e géis de agarose, promovem congruência geométrica entre a enzima e o suporte, aumentando a rigidez de uma pequena parte da área superficial da enzima (aumento de 10 a 20%), que é transladada para toda a estrutura terciária,

devido às fortes interações entre todas as partes da molécula de proteína (GUISÁN *et al.*, 1991).

A ligação da enzima ao suporte dá-se entre grupos amino da enzima e grupos aldeído alifáticos pequenos do suporte. Com o uso do sistema insolubilização-estabilização de enzimas proposto por Guisán (1988), e controle das variáveis que definem a intensidade das multi-interações enzima (amino) suporte (aldeído), como por exemplo, a densidade superficial dos grupos aldeído no gel ativado, o tempo de contato enzima insolubilizada-suporte ativado, a temperatura e o pH, é possível preparar derivados mais ativos e mais estáveis. Como exemplos tem-se, penicilina G-acilase (BLANCO e GUISÁN, 1989), quimotripsina (GUISÁN *et al.*, 1991), esterase termofílica (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1995), carboxipeptidase A (PEDROCHE *et al.*, 2002), alcalase (TARDIOLI *et al.*, 2003) e lipase (PALOMO *et al.*, 2005).

A imobilização covalente multipontual de biocatalisadores pode melhorar fortemente a estabilidade, a atividade e a seletividade de enzimas (MATEO *et al.*, 2000b).

A imobilização covalente multipontual em suporte sólido é uma técnica que utiliza “braços” moleculares ligados ao suporte que permitem a orientação da enzima através da seleção dos diferentes resíduos de aminoácidos de sua superfície. As diferentes formas de ativação do suporte é que vão determinar por quais resíduos a enzima vai ser imobilizada, evitando efeitos estéricos, como mostrado na Figura 2.5 (GUISÁN *et al.*, 1997).

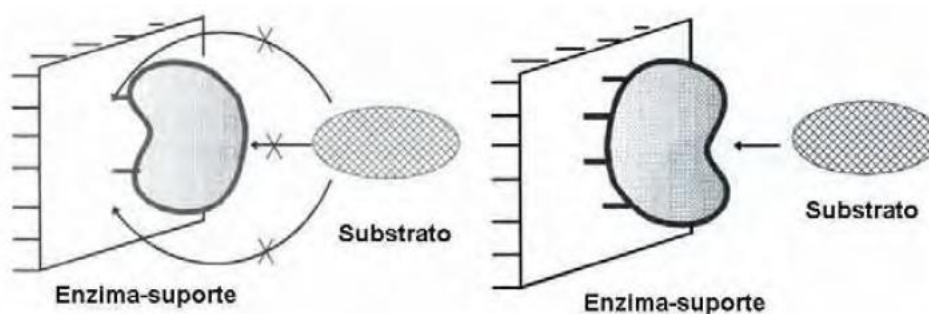


Figura 2.5- Representação de efeito negativo sobre enzima imobilizada e ausência deste efeito (Modificação de GUISÁN *et al.*, 1997).

A reação enzima-suporte é muito rápida e facilmente hidrolisável. A ligação unipontual enzima-suporte é reversível, mas a imobilização torna-se irreversível quando ocorre através de dois ou mais pontos de ligação (GUISÁN, 1988). A ativação da ligação covalente multipontual entre a enzima e o suporte não é um problema trivial. Deve-se escolher o método adequado, através da análise das características do suporte, grupos reativos

e condições de imobilização, para que seja envolvido um número máximo de grupos reativos da enzima no processo (MATEO *et al.*, 2007).

Ligações covalentes multipontuais podem aumentar a rigidez da estrutura tridimensional da molécula de enzima, e por consequência, aumentar a estabilidade da enzima imobilizada frente a diferentes agentes inativantes, tais como, temperatura, pH, solventes orgânicos entre outros (MATEO *et al.*, 2007).

Este processo consiste na imobilização e estabilização da enzima através da formação de ligação covalente entre os grupos amino da enzima ($-NH_2$) e grupos aldeído do suporte. Os grupos aldeídos que se encontram ligeiramente afastados da superfície do suporte são introduzidos através de sua ativação prévia, e tornam o suporte fortemente eletrofílico para se ligar aos grupos doadores de elétrons dos aminoácidos da superfície da enzima. O ligeiro distanciamento dos grupos aldeído provocado pela ativação permite a formação de ligações multipontuais – bases de Schiff – entre enzima e suporte. Ligações estas que são menos estáveis, porém aumentam consideravelmente a estabilidade do derivado obtido, em relação à enzima livre. A possibilidade de que ligações adicionais sejam efetivadas aumenta diante do aumento da densidade superficial de grupos aldeídos ativados no suporte (GUISÁN, 1988).

2.3.1.1.3 Ligação cruzada

O nome de ligações cruzadas se dá devido às ligações das moléculas de enzimas entre si, por meio de reagentes bi ou multifuncionais na ausência de suportes sólidos, formando géis de alta pureza. É também comum adicionar ao suporte outra proteína, como a albumina, de menor custo, para aumentar as interações e assim promover maior estabilidade. Entre os agentes de ligação cruzada mais usados está o glutaraldeído (KENNEDY e CABRAL, 1987). O glutaraldeído também é muito utilizado juntamente com outro método de imobilização, principalmente com a ligação covalente (AHMAD, ANWAR e SALEEMUDDIN, 2001) e com adsorção (D'SOUZA e GODBOLE, 2002).

A maior vantagem deste método é a obtenção da enzima quase pura, pois requer apenas um agente bi ou multifuncional para uma reação muito simples de imobilização. A desvantagem apresentada é a necessidade de grande quantidade de enzima, além da perda de atividade provocada pela participação do sítio ativo na ligação e as propriedades mecânicas indesejáveis da enzima imobilizada obtida, na forma de um produto gelatinoso (KENNEDY e CABRAL, 1987).

O glutaraldeído foi utilizado por Akgol *et al.*, (2001) para imobilizar invertase em microesferas de polivinilalcool, conseguindo uma retenção de atividade de 74%.

Chang e Juang (2005) compararam a imobilização das enzimas α -amilase, β -amilase e glucoamilase em quitosana, com ligações cruzadas com glutaraldeído. Em geral as enzimas imobilizadas alcançaram altas atividades em faixas maiores de temperatura e pH se comparada com as livres.

Emregul, Sungur e Akbulut, (2006) imobilizaram invertase em gelatina e poliacrilamida utilizando como agentes da ligação cruzada, acetato de cromo III, sulfato de cromo III e ou sulfato potássio de cromo III. A máxima atividade de invertase imobilizada foi obtida quando utilizou-se acetato de cromo III.

Cada método tem suas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas e investigadas para todos os biocatalisadores e reação enzimática de acordo com critérios propostos de imobilização, atividade, rendimento, estabilidade, simplicidade e viabilidade econômica (SCOUTEN, 1987). A Tabela 2.5, apresenta algumas vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização.

Tabela 2.5 – Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização.

Características	Ligações Cruzadas	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Metálica	Ligação Covalente	Oclusão
Preparação	Intermediário	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força da Ligação	Forte	Fraca	Intermediário	Intermediário	Forte	Intermediário
Atividade	Baixa	Intermediário	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação do Suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediário	Intermediário	Alta	Baixa
Aplicabilidade Geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção Microbiana	Intermediário	Não	Não	Não	Não	Sim

Fonte: KENNEDY e CABRAL, 1987.

2.4 Suportes para Imobilização

Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas em função dos princípios de imobilização. O desenvolvimento de novos suportes para a imobilização de biocatalisadores, juntamente com as técnicas elaboradas especificamente para a imobilização nestes suportes, tem sido objeto de intenso estudo nos últimos anos. Estima-se que estes novos suportes e técnicas possam contribuir para a implementação de novos processos em escala industrial. Como exemplos, podem ser citados o uso de membranas catalíticas biofuncionais contendo arranjos enzimáticos imobilizados através de sítios específicos (BUTTERFIELD *et al.*, 2001), o uso de Eupergit C como um suporte de imobilização para enzimas de interesse industrial (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000) e o uso de criogéis de poli-vinil-álcool como matrizes para a imobilização de células (LOZINSKY e PLIEVA, 1998).

Os materiais mais utilizados como suporte deveriam idealmente ser encontrados com facilidade e abundância, ter baixo custo, resultar em baixo custo de imobilização, facilidade de operação em grande escala, não apresentar toxidez às células, apresentar alta capacidade de retenção e ter resistência mecânica para uma longa vida operacional (NAGASHIMA, 1984; PRADELLA, 2001).

Os suportes inorgânicos são mais vantajosos que os orgânicos pela durabilidade, densidade, estabilidade e controle de porosidade (NAGASHIMA, 1984). Segundo Moueddeb *et al.*, (1996), os materiais inorgânicos também apresentam como vantagem a facilidade de esterelização e limpeza.

Vários suportes, naturais ou sintéticos, têm sido utilizados para a imobilização de enzimas. Embora se saiba que não existe um suporte universal, existem características primordiais a serem observados para a escolha de um suporte, baseados em diferentes propriedades que afetam o processo de produção (MESSING, 1978; GALVÃO, 2004; CAO, 2005), como:

- *Área de superfície e porosidade:* é desejável ter materiais com alta área superficial ($>100 \text{ m}^2/\text{g}$) para cargas de enzima altas e alta porosidade para promover o acesso da enzima ao substrato. Os poros $>30 \text{ nm}$ são ideais para a difusão da enzima durante o processo de imobilização;
- *Grupos funcionais na superfície:* a quantidade de enzima que se une à matriz de um suporte depende da densidade de carga de grupos funcionais na superfície e sua

distribuição. A escolha dos grupos funcionais, também afeta o rendimento e a estabilidade do material;

- *Estabilidade mecânica e química:* para prevenir a perda de enzimas, a integridade do suporte deve ser mantida e deve ser resistente à degradações químicas que possam ocorrer durante o processo;
- *Tamanho e forma:* é ideal ter partículas de tamanho uniforme, preferencialmente esferas para facilitar os propósitos de modelagem;
- *Resistência microbiana:* uma das principais preocupações de qualquer sistema de enzimas imobilizadas é a presença de micro-organismos. A durabilidade do suporte é afetada pela resistência à degradação microbiana;
- *Natureza hidrofóbica e hidrofílica:* a compatibilidade do suporte com a fase líquida é importante para assegurar a troca do substrato e do produto na matriz. Também pode determinar o tempo de vida do complexo enzima-suporte a partir da adsorção ou de ligações não específicas.

Os suportes podem ser classificados de acordo com sua composição e morfologia. A Tabela 2.6 ilustra os diferentes tipos de suportes classificados.

Tabela 2.6 - Classificação dos suportes de acordo com a composição.

Suportes				
Orgânicos		Inorgânicos		
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro (PC)
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Bentonita	Cerâmica (PC)
Agarose	Albumina	Polivinilos	Homeblenda	Sílica (PC)
Agar	Gelatina	Nylon	Pedra-pome	Aluminossilicato
Quitosana	Seda	Poliamidas		Óxido de Ferro
Amido		Vinil		Óxido de Níquel
		Policrilamidas		

Fonte: GALVÃO, 2004.

Os suportes podem ser classificados como porosos ou não-porosos. Os porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização e protege a enzima contra turbulências externas, já os não-porosos têm a desvantagem de não possuir grande área para a imobilização, mas elimina o problema de transferência de massa interna, devido à diminuição

do tamanho das partículas e pelo aumento de velocidade de escoamento do fluido (GALVÃO, 2004).

A maior parte dos suportes não permite o acoplamento direto da enzima, necessitando de uma etapa de ativação do mesmo. Utilizam para isso reagentes ativadores como os brometos de cianogênio e reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos (GALVÃO, 2004).

Entre os suportes orgânicos e inorgânicos, os últimos apresentam melhores características para serem utilizados nos processos industriais, principalmente pela sua estabilidade à degradação física, química, térmica e microbiana, além da resistência mecânica e estabilidade industrial, que evita a compactação em processos contínuos e a possibilidade de regeneração do suporte por processo pirolítico (CABRAL, 1982; MESSING, 1978; RIBEIRO, 1989; COUTINHO FILHO, RIBEIRO e MAUGERI FILHO, 2005).

2.4.1 Métodos de ativação do suporte

Os métodos de ativação introduzem grupos reativos na superfície do suporte capazes de reagirem com os grupos reativos da enzima. As ativações mais usadas são com reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos. Suportes ativados com grupos epóxidos possuem baixa reatividade (mesmo podendo reagir com vários grupos reativos da enzima), requerendo longos tempos de imobilização, excesso de enzima e condições drásticas de reação para favorecer o acoplamento enzima-suporte, como por exemplo, alta força iônica (MATEO *et al.*, 2000c).

Variáveis como pH e temperatura podem interferir na reação dos agentes de ativação do suporte. Como a reatividade dos grupos epóxidos do suporte com proteínas solúveis é muito baixa, estes processos de imobilização devem ocorrer mediante um mecanismo composto por duas etapas: a primeira em que a enzima seria adsorvida hidrofobicamente (ou ionicamente) sobre a superfície do suporte, e uma segunda etapa em que se promoveria a reação covalente entre grupos reativos da proteína e o suporte. A ativação com glutaraldeído forma grupos aldeídos no suporte ativado que irão reagir com grupos aminos da enzima por meio de ligações covalentes reativas (bases de Schiff) que podem ser facilmente hidrolisadas. Embora seja o método de ativação mais utilizado em imobilização de enzimas, apresenta alguns problemas, tais como: moléculas de enzimas podem ser imobilizadas com diferentes orientações, tornando o sítio ativo delas inaccessíveis para grandes substratos (TARDIOLI *et al.*, 2003); podem ser formadas múltiplas camadas de enzima e/ou aglomerações excessivas

das moléculas no interior dos poros, dificultando o acesso ao sítio ativo (BETANCOR *et al.*, 2006); produzem derivados que são poucas vezes mais estáveis que a enzima solúvel; e a alta reatividade e instabilidade de grupos reativos requerem rápido contato com a enzima.

Na Figura 2.6, observa-se a ativação dos suportes pelos agentes e em sua superfície os grupos reativos utilizados na interação com a enzima para promover o processo de imobilização.

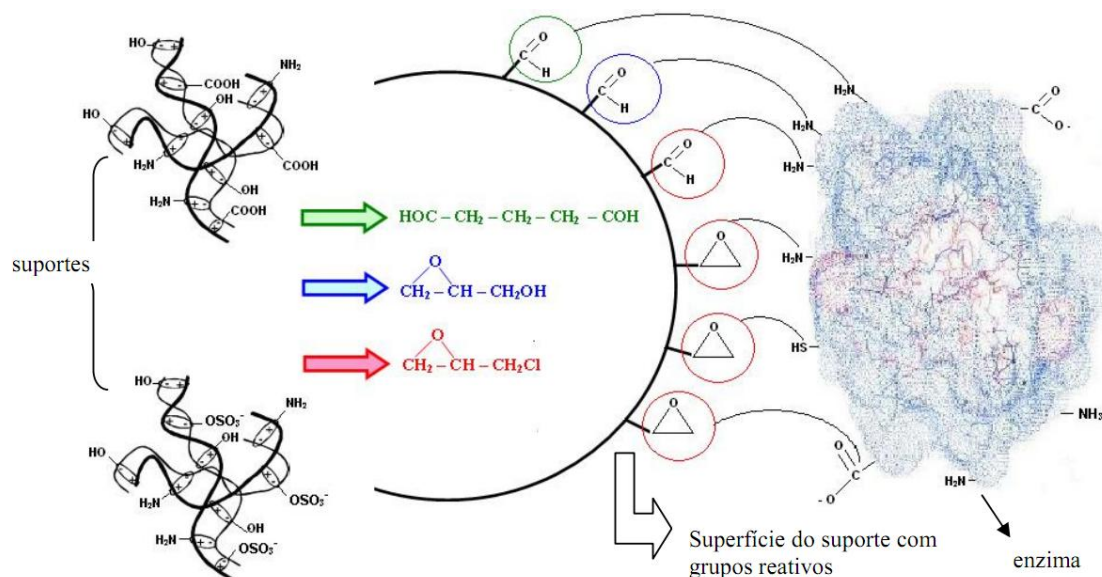


Figura 2.6 – Representação dos métodos de ativação. À esquerda estão os suportes, nas cores verde (glutaraldeído), azul (glicidol) e vermelho (epícloridrina) os agentes ativantes e na superfície do suporte os grupos reativos que irão reagir com os grupos amino da enzima (ADRIANO, 2008).

2.4.2 Imobilização em Resinas

Resinas de troca iônica são matrizes sólidas que contêm sítios ativos. A operação de troca iônica é a troca entre íons presentes numa solução e os íons sólidos presentes na resina. A resina trocadora de íons deve conter íons próprios para efetuar a troca com rapidez suficiente, sendo necessária uma estrutura molecular aberta e permeável, de modo que as moléculas possam mover-se livremente. A natureza do trocador de íons é complexa e, em sua maioria são polímeros. Os íons ativos são cátions em um trocador catiônico e ânions em um trocador aniônico (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1993).

As propriedades físicas das resinas trocadoras de íons são determinadas pelo grau de reticulação, este determina a preferência de uma resina por um íon e o grau de intumescimento da resina quando esta entra em contato com a água. As resinas altamente

reticuladas são, geralmente, quebradiças, mais duras e mais impermeáveis que as de baixa reticulação (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1993).

As resinas catiônicas trocam seu cátion disponível com o cátion do meio até atingir o equilíbrio. As resinas aniônicas são semelhantes, trocam ânions, seu caráter básico deve-se à presença de grupos amônio quaternária, amina substituída e amina, sendo aquelas que têm amônio quaternário uma resina fortemente básica (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1993).

As resinas aniônicas trocam seus ânions disponíveis (OH-) com os ânions do meio até atingir o equilíbrio. As resinas catiônicas são semelhantes, trocam cátions (Na+ ou H+) com o meio (KREMER, 2007). Entre os grupamentos básicos inseridos nas cadeias das resinas aniônicas, tem-se aminas terciárias que produzem resinas fracamente básicas e os quaternários de amônio, que produzem resinas fortemente básicas. Entre os grupamentos ácidos, o mais comum é o ácido sulfônico, produzindo a resina catiônica fortemente ácida e o menos comum, o ácido carboxílico, produzindo a resina catiônica fracamente ácida (GONZALES, 2011).

Duolite A-568 é uma resina de troca aniônica, fracamente básica, granular e altamente porosa, com matriz de fenol-formaldeído policondensado. Sua estrutura hidrofílica, combinada com uma distribuição controlada do tamanho dos poros, torna esta resina mais adequada para ser utilizada como suporte para imobilização de enzimas em muitos bioprocessos. A força iônica, o tamanho das partículas, tamanho e volume de poro da Duolite A-568, foram projetados para otimizar a imobilização de enzimas utilizadas em indústrias de amido, gordura, entre outras indústrias de alimentos (FISCHER, 2010).

Oosterom *et al.*, (1998) imobilizaram as enzimas comercialmente disponíveis, β -galactosidases de *Aspergillus oryzae* e de *Kluyveromyces fragilis* em uma resina de troca iônica, fenol-formaldeído, tipo Duolite S-761 e Duolite A-7, respectivamente.

Ozdural *et al.*, (2003) estudaram os parâmetros cinéticos da reação de hidrólise de lactose utilizando a enzima β -galactosidase imobilizada em uma resina de troca iônica fracamente básica, Duolite S-568, em um processo utilizando um reator de leito empacotado.

Letca *et al.*, (2004) testaram algumas resinas de troca iônica em inulase II a partir de uma cepa *Escherichia coli* geneticamente modificada e obteve a melhor atividade para a resina Duolite A-568.

Rocha *et al.*, (2006) utilizaram a resina Amberlite IRC da Rohm and Haas para imobilizar a inulinase de *Aspergillus niger* e estudar a cinética e as condições ótimas da enzima imobilizada, comparando-as com a livre.

Marquez *et al.*, (2008) estudaram a imobilização de invertase em resinas de troca iônica para a hidrólise de sacarose e obtiveram melhor atividade com a resina Duolite A-568.

Özdural *et al.*, (2008) imobilizaram β -galactosidase em uma resina de troca iônica fracamente básica, Duolite A-568, em um reator contínuo. Concluiu-se que o modelo que melhor se ajustou ao estudo cinético foi a de Michaelis- Menten.

Guidini *et al.*, (2010) estudaram a imobilização β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica para a hidrólise de lactose e obtiveram melhor atividade com a resina Duolite A-568.

2.5 Efeitos da Imobilização nas Propriedades da Enzima

2.5.1 Efeitos dos métodos de imobilização na cinética e propriedades das enzimas

As propriedades químicas e físicas das enzimas podem sofrer modificações após a imobilização. Devem ser considerados os efeitos da imobilização sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade, além da produtividade da enzima. As mudanças nas propriedades das enzimas podem ser causadas por diversos fatores (KENNEDY e CABRAL, 1987; SHELDON, 2007), tais como:

a) *Efeitos conformacionais*: quando mudança conformacional na molécula da enzima ocorre devido à alteração de aminoácidos no centro ativo da enzima e mudança na proteína da enzima.

b) *Efeitos estereoquímicos*: uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível.

c) *Efeitos de partição*: este efeito é relatado para a natureza química do material do suporte, podendo surgir interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a matriz e moléculas de baixo peso molecular presente na solução, levando a uma modificação de microambiente.

d) *Efeitos difusionais ou transferência de massa*: surge a partir da resistência de difusão de solução de substrato para os sítios catalíticos e difusão de produtos.

A mudança observada das propriedades das enzimas na imobilização é o resultado das interações destes fatores. Todos esses fatores podem influenciar nas propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de K_{max} e V_{max} , deslocamento dos valores de pH e comportamentos diferentes de acordo com temperatura (KENNEDY e CABRAL, 1987; MARKOGLOU e WAINER, 2003).

2.6 Reatores para biocatalisadores imobilizados

Define-se como biorreator, um reator químico convencional adaptado para operar com biocatalisadores (células, enzimas, organelas). O reator enzimático, portanto, é um biorreator no qual a reação é catalisada por uma enzima.

Deve-se avaliar a conveniência de se empregar a enzima na forma solúvel ou imobilizada em biorreatores. Neste caso, os aspectos a serem considerados são:

- alteração do perfil catalítico da enzima após a imobilização;
- o tipo de processo no qual a enzima vai ser utilizada (por exemplo, no processo de amaciamento de carnes somente o uso da enzima na forma solúvel tem importância);
- a estabilidade operacional apresentada por ambas as formas da enzima;
- a origem da enzima, se extracelular (pode ser usada na forma solúvel ou imobilizada) ou intracelular (usada na forma imobilizada) (BAILEY e OLLIS, 1986).

Os reatores enzimáticos podem ser divididos em dois grupos, descontínuos e contínuos conforme Figura 2.7, os contínuos, por sua vez, podem ser do tipo leito agitado ou fixo. Quando a enzima encontra-se na forma livre o único reator utilizável é o reator em batelada. Os processos que utilizam enzimas imobilizadas podem ser conduzidos de forma descontínua (batelada) ou contínua.

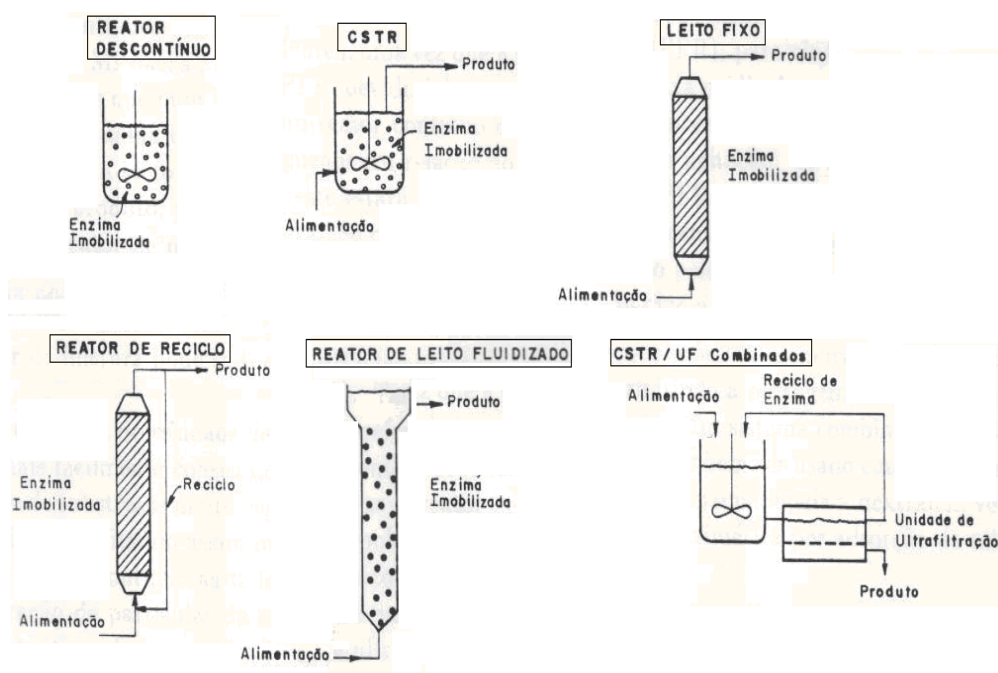


Figura 2.7 – Tipos de reatores enzimáticos (RIBEIRO, 1989).

Embora vários tipos de reatores possam ser selecionados para um dado sistema imobilizado, a eficiência ótima requer uma escolha adequada. A escolha inadequada do reator pode provocar rompimento do suporte de imobilização. (PILKINGTON, MARGARITIS e MENSOUR, 1998; CAO, 2005).

Os fatores a serem considerados para escolher o tipo de reator são:

- a) modo de operação: descontínuo (mais barato e de multiuso) e contínuo (mais caro e desenhado para um processo específico);
- b) custo do catalisador frente ao custo total do processo;
- c) estabilidade da enzima ao longo do processo;
- d) requisitos operacionais, a saber, possibilitar pleno controle do pH e da temperatura, permitir operar em concentrações não inibitórias de substrato, ser adequado frente às características da matéria-prima e permitir a substituição do catalisador desgastado pelo uso sem interrupção do processo (LIMA *et al.*, 2001). Na Tabela 2.7 mostra a classificação de reatores levando em conta o modo de operação e as características hidrodinâmicas.

Tabela 2.7 - Classificação de reatores enzimáticos.

Modo de operação	Características hidrodinâmicas	Tipo de reator
Descontínuo	Mistura perfeita	Reator batelada de tanque agitado (BSTR)
	Tipo tubular	Reator batelada com recirculação (BRR)
Contínuo	Mistura Perfeita	Reator contínuo de tanque agitado (CSTR)
		Reator contínuo com agitação e membranas de ultrafiltração (CSTR-UF)
	Tubular	Reator de leito fixo (PBR), leito fluidizado (PFR) e de membranas

Fonte: ZANIN, 1989.

2.6.1 Reatores descontínuos

São reatores utilizados, em sua maioria, para processos com enzimas em solução, onde o substrato e a enzima são introduzidos juntos no reator e o conteúdo é descarregado quando se atinge o grau de conversão desejado.

Como vantagem o reator batelada possui alta eficiência da transferência de calor e massa devido à boa agitação do sistema. E como principais desvantagens têm-se (ZANIN, 1989):

- Mudanças nas condições no decorrer da reação, o que acarreta equipamentos de controle mais complexos;
- Problemas na ampliação de escala, pois é difícil manter a entrada proporcional de potência à medida que o volume do reator aumenta;
- Variação da qualidade do produto de uma batelada à outra;
- Presença de tempo morto entre as bateladas.

Um reator batelada tipo tanque agitado (“BSTR”- Batch Stirred Tank Reactor) é de concepção bastante simples, pois trata-se de um tanque com um agitador mecânico, que permite um bom grau de mistura. Quando as enzimas imobilizadas são utilizadas neste reator estas devem ser separadas em uma etapa subsequente, podendo ser por filtração ou centrifugação, o que pode provocar perdas de partículas do catalisador, bem como a desativação parcial das enzimas imobilizadas. Ainda pode haver a quebra de alguns suportes devido ao contato com o agitador. Para superar ou minimizar alguns desses problemas foram criados outros modelos de reatores descontínuos. Um desses é o reator com agitação provido de um cesto (“basket reactor”) que retém as enzimas imobilizadas, impedindo sua perda por atrito com o agitador ou no processo de separação de produtos (CARBERRY, 1976; MESSING, 1978).

Bergamasco *et al.*, (2000) utilizaram o reator batelada com a invertase livre e imobilizada covalentemente em sílica de poros controlados, com volume de solução de substrato de 50 mL, onde a reação ocorreu com intensa agitação e com o controle de temperatura.

Já no trabalho de Tanriseven e Dogan (2001) a atividade da invertase imobilizada em cápsulas de gel foi determinada em um reator de mistura com agitação magnética de 450 rev./min, de volume de 1000 μL , 50 μL de mistura de reação e 950 μL de água destilada.

Marquez *et al.*, (2008) utilizaram o reator batelada com a invertase livre e imobilizada por adsorção iônica em Duolite A-568, com volume de solução de substrato de 100 mL, onde a reação ocorreu com intensa agitação e com o controle de temperatura.

2.6.2 Reatores contínuos

A maior parte dos processos industriais é operada em reatores contínuos, pois este oferece vantagem superior às bateladas, pois possibilita o controle automático facilitando a obtenção de um produto de qualidade. Os reatores de fluxo contínuo podem ser divididos em: reator contínuo tipo tanque agitado (“CSTR” – Continuous Stirred Tank Reactor), com mistura completa e o reator tipo tubular, em que a mistura ocorre radialmente (VICENTE, 2000).

O reator CSTR consiste em um tanque bem agitado contendo a enzima imobilizada. O fluxo de substrato é continuamente bombeado para o reator, ao mesmo tempo em que o fluxo do produto é removido.

A vantagem do CSTR é a sua facilidade de construção, versátil e barato, a qual permite a catalise simples, carregamento e fácil substituição. Permite controle simples sobre a temperatura, pH da reação e do fornecimento ou remoção de gases. Neste tipo de reator não existem gradientes de temperatura ou de concentração, devido à eficiente agitação que promove contato íntimo entre a enzima e o meio de reação (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987; NAJAFPOUR, 2007).

O reator PBR (Continuous Packed Bed Reactor) é o mais amplamente utilizado para enzimas imobilizadas e células microbianas. Neste caso é necessário considerar a queda de pressão em todo o leito e o efeito das dimensões da coluna na taxa da reação. No que se refere ao fluxo do substrato, há três possibilidades: método de fluxo ascendente, fluxo descendente e reciclo (CHIBATA, 1978).

O método contínuo tem as seguintes vantagens:

- Fácil controle automático e operacional;
- Redução dos custos de trabalho;
- Estabilização das condições de operação;
- Fácil controle na qualidade dos produtos.

O reator FBR (Fluidized Bed Reactor) é usado quando a solução de substrato tem alta viscosidade e quando há substrato ou produtos gasosos. Neste sistema devem-se tomar alguns cuidados para não haver destruição e decomposição de enzima imobilizada (CHIBATA, 1978).

O reator de membrana é um sistema contínuo, sendo utilizado para substrato de alto peso molecular e um produto de baixo peso molecular. A enzima usada neste caso é solúvel, e um não melhoramento da estabilidade da enzima é esperado.

Özdural *et al.*, (2003) estudaram os parâmetros cinéticos de uma inibição competitiva do produto por uma enzima β -galactosidase imobilizada covalentemente em uma resina utilizando um reator de leito empacotado de fluxo contínuo.

A estabilidade da invertase imobilizada foi estudada utilizando um reator de leito empacotado, a 30°C e observou-se um decréscimo de 20% em relação à atividade inicial após as 50 h em um processo contínuo (GOMÉZ *et al.*, 2005).

Bayramoglu *et al.*, (2003) utilizaram um reator contínuo de leito fixo para hidrolisar a sacarose com invertase imobilizada em um filme de HEMA-GMA (poli (hidroximetil metacrilato-co-glicidil metacrilato)).

Fisher (2010) utilizaram um reator contínuo de leito fixo para hidrolisar soro de leite com β -galactosidase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada com o uso do agente reticulante glutaraldeído.

2.6.3 Influência de alguns fatores na escolha do reator

Os fatores que devem ser considerados quanto à escolha de um determinado tipo de reator para enzimas imobilizadas são:

- Requerimento de transferência de massa;
- Método de imobilização empregado;
- Natureza do substrato;
- Característica do suporte de imobilização utilizado;
- Facilidade de substituição do biocatalisador e sua regeneração;
- Facilidade de construção do reator e custo do mesmo.

A escolha inadequada do reator pode provocar rompimento do suporte de imobilização. Desta forma é importante escolher um reator que permita uma adequada mistura do meio sem provocar danos ao suporte de imobilização (PILKINGTON, MARGARITIS e MENSOUR, 1998; CAO, 2005).

2.7 Cinética Enzimática

Entende-se por cinética enzimática a análise quantitativa do efeito de cada um dos fatores que influencia a atividade enzimática avaliada através do aumento ou da redução da reação catalisada. A atividade da enzima, e, portanto a cinética enzimática é determinada pela concentração de enzima, concentração de cofatores, concentração e tipo de inibidores (quando presentes) e ainda pH, temperatura e força iônica (BAILEY e OLLIS, 1986).

O estudo da cinética enzimática faz-se necessário para conhecer as melhores condições para a ação da enzima e os efeitos de diversos fatores sobre ela (DIXON e WEBB, 1979; SEGEL, 1993). Dentre os seus objetivos estão:

- Estudar a influência de condições de trabalho: concentrações de reagentes e das enzimas, temperatura, pH, concentrações de ativadores e inibidores;
- Medir as velocidades das transformações que se processam;
- Contribuir para a otimização do processo;
- Estabelecer critérios para o controle do processo;
- Projetar o reator mais adequado.

Qualquer taxa de reação catalisada por enzima depende diretamente da concentração desta. Uma técnica experimental muito utilizada em cinética enzimática é a determinação das taxas iniciais de reação. A taxa de formação de produto ou de consumo de substrato deve ser constante em toda a faixa de tempo de estudo para se medir a verdadeira taxa inicial. Assim, é preciso estabelecer o limite de linearidade para utilizar o procedimento de taxas iniciais, antes que a concentração de produtos (P) versus tempo (t) e velocidade (v) versus concentração de enzimas (E_t) se tornem não lineares.

Na reação catalisada por enzimas, sabe-se que esta combina com o substrato de maneira muito específica. Dentre as várias maneiras que tentam explicar a especificidade da enzima e sua atividade, o conceito de sítio ativo e complexo enzima-substrato são universalmente aceitos e são a base para os diversos modelos de equações propostos (CARBERRY, 1976; SEGEL, 1979).

A equação de Michaelis-Menten é muito utilizada para modelar diversas reações enzimáticas, mas sabe-se que para ser aplicada com sucesso a concentração da enzima deve ser pequena se comparada àquela do substrato e ainda a concentração de produto deve ser desprezível, ou seja, nos instantes iniciais da reação. Para situações em que as concentrações

de enzimas e substratos são comparáveis, a equação de Michaelis e Menten pode ser inapropriada, como ocorre nos finais dos processos enzimáticos conduzidos em batelada. Para situações de processos industriais, em presença de altas concentrações de substrato ou de produtos e em presença de inibidores presentes no meio reacional, devem-se utilizar modelos cinéticos mais elaborados, porém a maioria destes tem como ponto de partida a equação de Michaelis-Menten, na qual são inseridos termos de correção, para levar em conta os inibidores, ativadores e múltiplos substratos (RIBEIRO, 1989).

2.7.1 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Cada sistema enzima-substrato apresenta valores característicos dos parâmetros cinéticos para cada modelo cinético considerado, para condições específicas de pH, temperatura e concentração de substrato.

2.7.2 Influência do meio na atividade e estabilidade das enzimas

A estrutura e a forma do sítio ativo são decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isto torna a atividade e estabilidade enzimática dependente do meio ambiente, notadamente do pH e da temperatura (MARIOTTO, 2006).

2.7.2.1 Influência do pH

Geralmente as enzimas são ativas numa faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido. Como as enzimas são proteínas contém muitos grupos ionizáveis, elas existem em diferentes estados de ionização, por isso, a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH. A atividade enzimática deve ser então medida no pH ótimo. Os vários aminoácidos que compõe a proteína possuem grupos laterais básicos, neutros ou ácidos, portanto a enzima pode ser carregada positivamente ou negativamente, dependendo do pH. Tais grupos ionizáveis são frequentemente parte do sítio ativo, já que um mecanismo catalítico ácido-base está ligado à catálise enzimática. Assim a enzima para estar cataliticamente ativa só existe um estado particular de ionização. Dessa forma, a enzima ativa será uma fração maior ou menor da concentração total da enzima, dependendo do pH. A taxa da reação aumenta com pH até um valor ótimo a partir do qual a taxa decresce, ou devido à

desnaturação ou a existência de estados de ionização inadequados (SEGEL, 1979; DIXON & WEBB, 1979).

Bora, Kannan, e Nahar (2005) obtiveram o pH ótimo tanto para a invertase livre quanto para a imobilizada igual a 5,0, embora as atividades residuais da enzima imobilizada foram menores do que a solúvel.

Marquez *et al.*, (2008) estudaram a influência do pH na atividade e estabilidade de invertase solúvel e imobilizada. O pH ótimos para a atividade de invertase solúvel foi 4,7, já para invertase imobilizada o pH ótimo foi 4,9. O intervalo de estabilidade da invertase solúvel em relação ao pH foi entre 5,5 a 7,5, enquanto o intervalo para invertase imobilizada foi de 5,5 a 6,0.

2.7.2.2 Influência da temperatura

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais, porém, à medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente:

- A taxa de reação aumenta como se observa na maioria das reações químicas;
- A estabilidade da proteína decresce devido à desativação térmica.

A influência da temperatura sobre a atividade da enzima é geralmente, representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta (SEGEL, 1979).

Todo biocatalisador apresenta uma temperatura ótima par que atinja sua atividade máxima, ou seja, temperatura ótima é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma velocidade constante por um período de tempo.

Amaya-Delgado Hidalgo-Lara e Montes-Horcasistas (2005) observaram a influência da temperatura na atividade da invertase na hidrólise de sacarose. A temperatura de maior atividade da invertase foi na faixa de 65 a 70°C para a imobilizada e 55 a 65°C para a livre, e ambas tiveram uma rápida queda a partir de 70°C.

Marquez *et al.*, (2008) estudaram a influência da temperatura na atividade e estabilidade de invertase solúvel e imobilizada. A temperatura ótima para a atividade de

invertase solúvel foi 47°C, já para invertase imobilizada houve uma redução da temperatura ótima para 40°C.

As constantes de taxa de reação variam com a temperatura segundo o modelo de Arrhenius, Equação 2.2.

$$k = A * e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (2.2)$$

Sendo:

k = constante de velocidade;

A = fator de frequência para a reação;

E_a = constante de energia de ativação;

R = constante da lei dos gases;

T = temperatura absoluta.

O intervalo de validade do referido modelo é bastante limitado, pois qualquer temperatura significativa superior aquela do ambiente biológico natural, pode desnaturar a enzima (BAILEY e OLLIS, 1986).

Na reação enzimática a constante de velocidade k é função crescente da temperatura do sistema. A Figura 2.8 representa a Equação 2.2 (MARIOTTO, 2006):

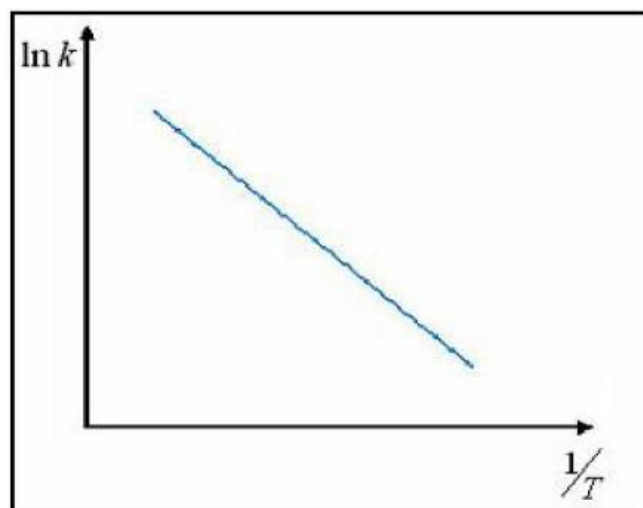
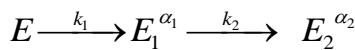


Figura 2.8 – Representação da variação da constante de velocidade k com a temperatura absoluta T (BAILEY e OLLIS, 1986).

O conhecimento da cinética de desativação das enzimas é de grande importância no projeto de reatores enzimáticos. A estabilidade das enzimas é um dos fatores primordiais na determinação da possibilidade de sua aplicação em muitos processos biotecnológicos. Segundo HENLEY & SADANA (1985) o modelo de desativação de primeira ordem é freqüentemente adequado para representar a cinética de desativação enzimática. No entanto, por uma revisão na literatura disponível, verificaram que a taxa de decréscimo em atividade não é sempre constante. Esses autores classificaram as curvas de desativação em dois casos. Num deles, a atividade é sempre menor que a inicial e no outro, a atividade pode ser maior que a inicial num período de tempo e propõem uma cinética de desativação em série e agrupam os casos de desativação, encontrados nesta literatura, em várias categorias diferentes. O modelo de desativação térmica em série está representado no mecanismo seguinte.



Sendo: α_1 e α_2 as taxas específicas de atividade $\frac{E_1}{E}$ e $\frac{E_2}{E}$ respectivamente;

k_1 e k_2 os coeficientes da taxa de desativação de primeira ordem;

E , E_1 e E_2 os estados de enzima que possuem diferentes atividades específicas.

O estado intermediário E_1 e o estado final E_2 são ambos homogêneos. Este modelo considera duas etapas de primeira ordem irreversíveis na presença da enzima ativa (E), tanto quanto as espécies modificadas (E_1 e E_2), sendo estas com atividades específicas diferentes da enzima na sua forma nativa (JURADO *et al.*, 2004). A Equação 2.3 ilustra a expressão da atividade média que foi obtida derivando o estado final E_2 , admitindo valor específico de atividade diferente de zero GIACOMINI *et al.*, (2001):

$$A = \left[1 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \right] \exp(-k_1 t) - \left(\frac{k_1}{k_2 - k_1} \right) (\alpha_1 - \alpha_2) \exp(-k_2 t) + \alpha_2 \quad (2.3)$$

Se k_2 for igual a zero a Equação 2.3 se reduz à 2.4:

$$A = (1 - \alpha_1) \exp(-k_1 t) + \alpha_1 \quad (2.4)$$

Na maioria dos estudos de desativação térmica de enzimas, considera-se cinética de primeira ordem para relacionar atividade enzimática com o tempo, a uma dada temperatura (RIBEIRO, 1989). Supondo desativação de primeira ordem, obtém-se a Equação 2.5.

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A \quad (2.5)$$

Integrando a Equação 2.5 para o intervalo de tempo $t = 0$ até t , obtém-se a Equação 2.6.

$$A = A_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad (2.6)$$

Sendo k_d a constante cinética de desativação térmica, ou taxa específica de inativação térmica, representada na equação 2.4 por k_1 .

Um conceito comum em cinética química e enzimática é o tempo de meia vida, $t_{1/2}$, que é o tempo necessário para que a atividade relativa da enzima (A/A_0), da Equação 2.6, seja igual a 0,5, ou seja, o tempo necessário, a uma temperatura T , sob condições específicas, para que a atividade catalítica seja reduzida à metade da inicial. Da Equação 2.6, e com o conceito de tempo de meia vida, tem-se a Equação 2.7.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (2.7)$$

Por outro lado, k_d varia com a temperatura segundo o modelo de Arrhenius, dado pela Equação 2.8.

$$k_d = A \cdot \exp\left(\frac{-E_d}{R \cdot T}\right) \quad (2.8)$$

A Equação 2.8 na forma linearizada pode ser representada pela Equação 2.9, na qual é possível determinar a energia de ativação do fenômeno de desativação térmica da enzima estudada.

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (2.9)$$

Sendo:

k_d = constante cinética de desativação térmica;

A = fator de frequência para a reação;

E_d = energia de ativação do processo de desativação térmica;

R = constante da lei dos gases;

T = temperatura absoluta.

2.8 Planejamento Composto Central

Segundo Oliveira (2004), deve-se seguir duas etapas em qualquer análise experimental: o planejamento experimental e a análise estatística dos dados, esta última é dependente do tipo de planejamento realizado. Além disso, a utilização de um método científico de planejamento leva a realização de experimentos significativos e confiáveis, ainda mais quando o problema envolve dados que podem conter erros experimentais.

As vantagens do uso do planejamento experimental são:

- Redução do tempo de experimentação, pois permite a otimização do número de experimentos;
- Redução dos custos relativos à execução dos ensaios, fato que está relacionado à redução da quantidade de experimentos;
- Permite a avaliação e minimização do erro experimental;
- Permite uma otimização multivariada;
- Permite a verificação conjunta da influência das variáveis estudadas.

Supondo que dentro da região experimental a atividade enzimática pode ser ajustada por uma superfície de resposta de 2ª ordem, optou-se por estudar as variáveis que influenciam na imobilização. Neste caso em particular a temperatura e o pH que propiciam um melhor resultado de atividade enzimática para condições de enzimas livre e imobilizada, por um Planejamento Composto Central.

Esse tipo de planejamento estatístico estuda os efeitos da interação dos parâmetros em questão. Cada variável é estudada com 5 diferentes níveis ($-\alpha$, -1, 0, 1, $+\alpha$), cada nível possui seu respectivo valor nominal. O parâmetro α utilizado foi o ortogonal de modo a se obter um planejamento, onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si (BOX, HUNTER e HUNTER 1978).

O valor de α , foi calculado pela Equação 3.1:

$$\alpha = \left(\frac{Q \cdot G}{4} \right)^{1/4} \quad (3.1)$$

$$\text{Sendo: } Q = \left[(G+T)^{1/2} - G^{1/2} \right]^2 \quad (3.2)$$

G = número de pontos fatoriais ($G = 2^k$, se completo);

T = número de pontos adicionais no PCC;

$T = 2k + \text{número de réplicas centrais.}$

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a Equação geral de codificação (3.3).

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.3)$$

Sendo: X_n é o valor da variável no experimento na forma codificada;

X é o valor real da variável a ser calculado;

X_0 é o valor real da variável no ponto central;

X_{+1} é o valor real da variável no nível superior;

X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

As variáveis dependentes, atividade enzimática e conversão de substrato são representadas pela resposta (Y). A equação do modelo polinomial de segunda ordem obtido por um método de regressão múltipla é representada pela Equação 3.4.

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k \sum_{m=1}^k b_{jm} x_j x_m + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \quad (3.4)$$

Sendo: Y = atividade enzimática

k = nº de variáveis independentes

x = variáveis independentes

b_0, b_j, b_{ij}, b_{jj} = parâmetros do modelo

Com a equação empírica da regressão múltipla é possível construir uma superfície de resposta que permite verificar a existência de uma região ótima para a atividade enzimática onde se encontra uma faixa de combinação das variáveis em questão, além de fornecer informações sobre a robustez do processo, ou seja, qual a variação de uma variável que pode ser admitida ao redor do valor ótimo que mantém o processo na condição otimizada.

A esta equação foram aplicados os resultados experimentais obtidos e feita uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros por meio dos valores de *t de Student* para cada um, sendo eliminados aqueles com nível de significância (p) superior a 10%, ou seja, as variáveis relacionadas a estes são consideradas não relevantes quando (p) superior a 10%. Assim os parâmetros não significativos são eliminados, obtendo-se assim, uma equação que representa os efeitos das variáveis em determinado estudo. Pode-se ainda, prever qual a melhor condição para este processo. O valor do coeficiente de determinação (R^2) e a comparação entre F calculado (superior ao tabelado) e F tabelado foram utilizados para constatação da significância ou não do modelo conforme descrito por Rodrigues e Iemma (2005).

Com o objetivo de encontrar o valor do ponto estacionário da resposta estudada deriva a equação da resposta Y pela variável X_k , isto é:

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \frac{\partial Y}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial Y}{\partial X_k} = 0 \quad (3.5)$$

$$\text{Sendo, } Y = b_0 + x'b + x'Bx \quad (3.6)$$

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (3.7)$$

Sendo: b_0 é o termo independente;

$x'b$ são os termos de 1ª ordem na função de resposta;

$x'Bx$ é a contribuição quadrática.

Então, o ponto estacionário será dado por: $x_0 = - (1/2) B^{-1}b$, onde B é a matriz (k x k) na qual a diagonal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da equação e os termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2 (ex: a_{12} e a_{21} correspondem a metade do coeficiente da interação X_1X_2). A matriz b é uma matriz coluna composta pelos coeficientes associados às variáveis isoladas (variáveis lineares).

O ponto estacionário (x_0) pode ser:

- Um ponto onde a superfície atinge um **máximo**;
- Um ponto onde a superfície atinge um **mínimo**, ou
- Um ponto nem de máximo, nem de mínimo \Rightarrow **Ponto de sela** (*saddle point*).

Para determinar a natureza desse ponto estacionário foi necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem (X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, ..., 0) para o ponto estacionário x_0 (Figura 3.7). Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis, w_1, w_2, \dots, w_k .

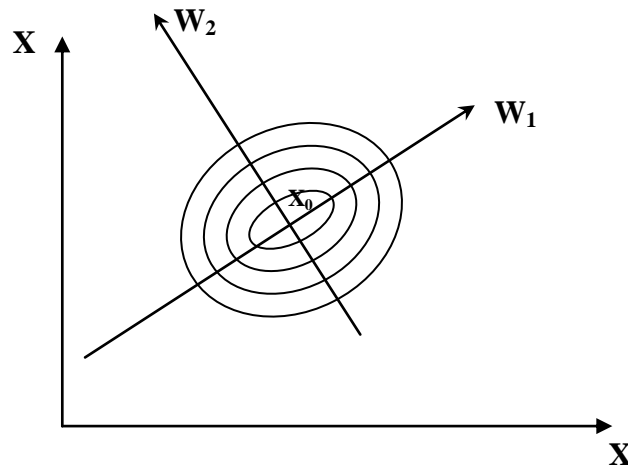


Figura 2.9 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Enzima e Reagentes

A enzima utilizada neste trabalho foi invertase (β -frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26, Grau V, código 9001-57-4, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*), da marca Sigma, (Figura 3.1). A atividade enzimática declarada no rótulo pelo fabricante era de 46 U/mg de sólido, sendo U definido como 1 micromol de sacarose hidrolisada a açúcar invertido por minuto a pH 4,5 e 55°C. Esta enzima é utilizada na forma de pó e por todo trabalho a concentração da mesma refere-se a grama do produto comercial por litro (g/L).



Figura 3.1 – Enzima Invertase (β -frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26, Grau V, código 9001-57- 4, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*), marca Sigma.

3.2 Suporte para Imobilização

A escolha do suporte, tempo e demais condições para imobilização de invertase foram estudadas por MARQUEZ *et al.*, (2008). A resina de troca iônica Duolite A-568 foi doada pela Dow Chemical Company. Esta resina é um trocador aniônico fracamente básico, com ligações cruzadas de fenol-formaldeído, usado como suporte de enzimas em várias aplicações de bioprocessos, possui um tamanho médio de poro de 0,78 mL/ grama de volume de poro. Uma amostra desta resina esta apresentada na Figura 3.2, cujas principais características indicadas pelo fabricante são apresentadas na Tabela 3.1.



Figura 3.2 – Resina Duolite A-568 empregada para imobilização da enzima invertase.

Tabela 3.1 – Características da resina Duolite A-568 (Rohm Haas).

Características	Propriedades
Estrutura hidrofílica	Matriz: Fenol – formaldeído
	Grupo funcional: Amina terciária
Alta porosidade	Forma física: Granular
	Cor: Verde e cinza
	pH: 7,0 – 9,0
	Tamanho de poro: 15 a 25 nm
Distribuição do tamanho e volume dos poros	Volume de poro: 0,78 a 1 mL/g
	Densidade: 1,10 a 1,14 g/mL
	Capacidade total de troca iônica: $\geq 1,20$ equivalente/litro

3.3 Substratos

O substrato utilizado em testes de reator batelada foi sacarose de grau analítico das marcas Isofar e Vetec, já em reator tipo leito fixo utilizou-se açúcar refinado comercial. Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

3.4 Unidades Experimentais

Utilizaram-se as unidades experimentais montadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química.

3.4.1 Reator batelada (descontínuo)

A unidade experimental, representada pelas Figuras 3.3 e 3.4, consistia em um bio-reator de mistura de volume reacional de 100 mL. O mesmo possuía uma camisa externa para circulação de água proveniente de um banho termostatzado para controle de temperatura. Nos experimentos de hidrólise da sacarose os bio-reatores foram submetidos à agitação magnética. Nos ensaios com a enzima imobilizada, as partículas contendo o biocatalisador imobilizado eram retidas em uma cesta de aço inox de 100 mesh, evitando assim as colisões entre o agitador e as partículas catalíticas. Os bio-reatores de mistura possuem alturas 8,2 cm, diâmetros internos de 5,5 cm e as cestas de aço inox possuíam alturas iguais a 6,7 cm e diâmetros de 2,4 cm.



Figura 3.3 – Foto dos reatores tipo mistura com operação batelada utilizados para realizar as reações de hidrólise de sacarose por invertase imobilizada.

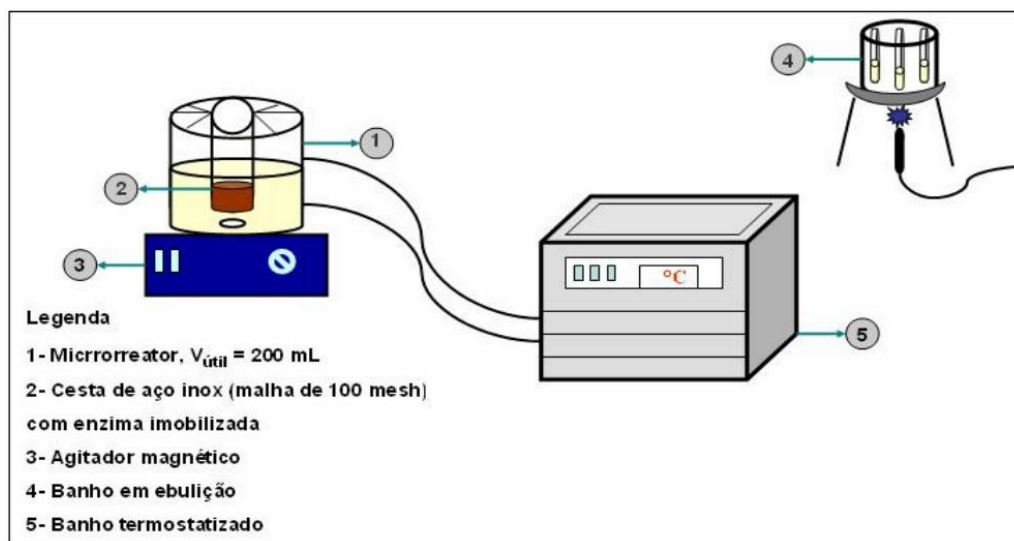


Figura 3.4 – Representação esquemática da unidade experimental do reator tipo batelada utilizado para realizar a hidrólise de sacarose por invertase imobilizada (FISCHER, 2010).

3.4.2 Reator tipo leito fixo (contínuo)

A unidade experimental apresentadas nas Figuras 3.5 e 3.6, ilustrava um reator tipo leito fixo, de volume útil de 21,93 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatzado para controle de temperatura. O reator tipo leito fixo apresentava 14,55 cm de altura e 1,38 cm de diâmetro. A enzima imobilizada em Duolite A-568 foi empacotada no reator, ocupando um volume de 16,93 mL, o substrato era bombeado com o auxílio de uma bomba peristáltica, com escoamento ascendente.



Figura 3.5 – Foto do reator tipo leito fixo utilizado para realizar a conversão de sacarose por invertase imobilizada.

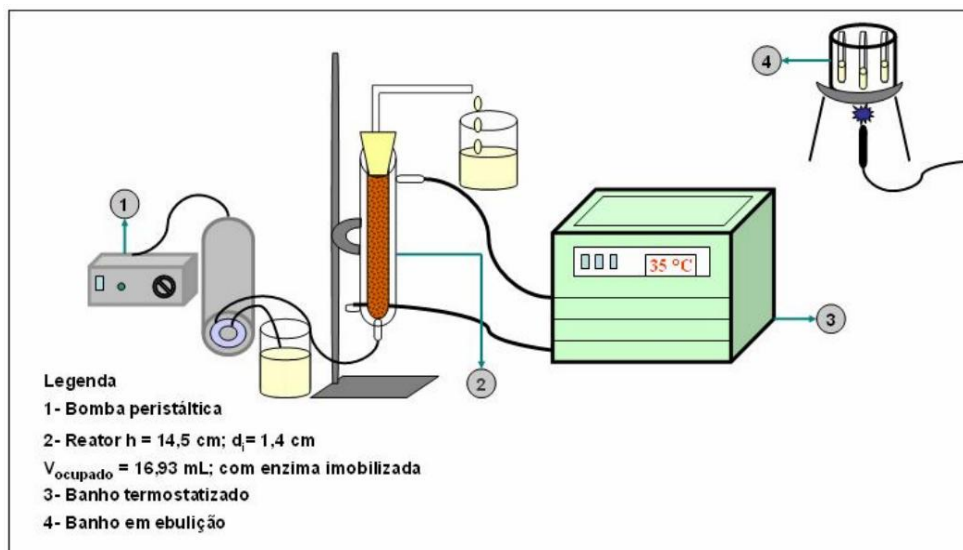


Figura 3.6 – Representação esquemática da unidade experimental do reator tipo leito fixo utilizado para realizar a conversão de sacarose por invertase imobilizada (FISCHER, 2010).

3.5 Determinação da Atividade pelo Método das Taxas Iniciais

A atividade da enzima invertase em sua forma imobilizada foi determinada pelo método das taxas iniciais de reação, para hidrólises de sacarose realizadas em reatores tipo batelada.

A reação de hidrólise de sacarose por invertase era realizada em pH, temperatura e concentração de substrato definidas para cada experimento. Inicialmente colocava no reator a solução de sacarose no tampão adequado, após atingir a temperatura desejada para o experimento, adicionava ao reator uma cesta de aço inox com a enzima imobilizada, usando para todos os experimentos 0,5 gramas de partículas de resina.

As amostras foram tomadas, normalmente em número de cinco, a intervalos de três em três minutos. Cada amostra foi introduzida em um tubo de ensaio tampado, os quais imediatamente eram colocados em um banho de água em ebulição por 10 minutos para a completa inativação da invertase. A glicose formada nas amostras foi dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO *et al.*, 2004) conforme Apêndice A. A concentração de açúcar redutor (glicose e frutose) correspondia a soma da concentração de glicose e frutose.

A atividade a partir do método das atividades iniciais, para cada reação da hidrólise da sacarose, era obtida por meio das inclinações das retas de concentração de açúcar redutor em função do tempo de reação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para

uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. A atividade foi calculada com a curva de calibração, conforme Apêndice B. A hidrólise da sacarose foi realizada nas condições ótimas encontradas por Marquez *et al.*, (2008), que avaliou a influência da temperatura, pH e concentração de sacarose na atividade da enzima imobilizada. Marquez *et al.*, (2008) encontrou as seguintes condições que maximizaram a atividade enzimática:

- Temperatura ótima de hidrólise da sacarose: $40 \pm 1^\circ\text{C}$;
- pH da solução de sacarose: 4,9 (tampão acetato 10^{-1} M);
- Concentração de sacarose no meio: 50 g/L.

A unidade de atividade (U_S) foi definida como grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de enzima imobilizada ($\text{g}_{\text{açúcar redutor}}/\text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{resina}}$).

3.6 Imobilização do biocatalisador

3.6.1 Ativação do suporte

A resina Duolite A-568 foi ativada de acordo com a metodologia do fabricante: ácido clorídrico 1M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina, durante 30 minutos sob agitação de 100 rpm. Em seguida adicionou-se hidróxido de sódio 1M nas mesmas proporções e procedimento realizados para o tratamento básico. Entre os tratamentos ácidos e básicos, e no final do processo as resinas foram lavadas com água destilada. Após lavadas as resinas foram filtradas à vácuo e posteriormente secas a temperatura ambiente.

3.6.2 Influência do tempo no processo de imobilização por adsorção iônica

No procedimento de imobilização por adsorção iônica em Duolite A-568 utilizou-se um tempo de 24 h, tempo ótimo de imobilização encontrado por Marquez *et al.*, (2008).

3.6.3 Otimização do Processo de Imobilização

Marquez *et al.*, (2008) estudaram a influência conjunta da temperatura, pH e concentração de enzima no processo de imobilização através de um Planejamento Composto Central (PCC) com 17 experimentos, visando otimizar o processo de imobilização de invertase em Duolite A-568. Marquez *et al.*, (2008) obtiveram as seguintes condições ótimas para as variáveis estudadas:

- **Temperatura de imobilização:** $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- **pH de imobilização (tampão acetato 10^{-1}M):** 5;
- **Concentração de enzima no meio:** 12,5 g/L;
- **Tempo de imobilização:** 24 horas.

No processo de imobilização por adsorção iônica apresentado por Marquez *et al.*, (2008), em 0,5 g de resina Duolite A-568 adicionou-se 10 mL de solução de invertase, preparada a partir da enzima comercial, nas condições ótimas de imobilização. Em todos os procedimentos de imobilização por adsorção iônica adotou-se as condições ótimas encontradas por Marquez *et al.*, (2008).

3.7 Testes em Reator Batelada

3.7.1 Estudo preliminar para o processo de ligação cruzada

Visando estudar a influência do agente reticulante glutaraldeído na atividade da invertase realizou-se um teste preliminar para avaliar a influência na atividade enzimática do processo de ligação cruzada após a imobilização por adsorção iônica. Para realização deste estudo seguiu-se as condições ótimas encontradas por Guidini *et al.*, (2010) que estudou a imobilização de β -galactosidase em Duolite A-568.

A imobilização da enzima invertase em 0,5g de resina Duolite A-568 de acordo com as condições apresentadas em 3.6.3, seguida da adição de 5 mL de solução de glutaraldeído com concentração de 3,5 g/L em um tempo de reticulação de 1,5 h, sob agitação de 150 rpm em incubadora. Entre os procedimentos de imobilização lavou-se as amostras com tampão acetato pH 4,9.

Ao final do procedimento, realizou-se a determinação da atividade conforme item 3.5. A hidrólise da sacarose foi realizada nas condições ótimas encontradas por Marquez *et al.*, (2008), condições estas apresentadas no item 3.5.

3.7.2 Estabilidade de invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada em relação ao pH

Após estudar-se a influência do agente bifuncional glutaraldeído na atividade enzimática, estudou-se o efeito do mesmo sobre a estabilidade do biocatalisador em relação

ao pH. Inicialmente imobilizou-se a invertase em Duolite A-568 nas condições ótimas de imobilização definidas em 3.6.3 por Marquez *et al.*, (2008). Posteriormente, realizou-se a reticulação por ligação cruzada de acordo com as condições ótimas encontradas por Guidini *et al.*, (2010) para β -galactosidase apresentadas em 3.7.1. A enzima imobilizada e reticulada era lavada e incubada em 10 mL de tampão acetato 10^{-1} M para a faixa de pH 3,0 a 6,0 em intervalos de 0,5 e tampão citrato-fosfato 10^{-1} M para a faixa de pH 6,5 a 7,0 em intervalos de 0,5. Estas amostras de enzima imobilizada incubadas nos respectivos tampões foram mantidas à temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período, os biocatalisadores imobilizados foram lavados com tampão acetato pH 4,9 e colocados na cesta de aço inox para a determinação da atividade residual com uma solução de sacarose 50 g/L, pH 4,9 à temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$, visando encontrar o valor do pH de maior estabilidade. A atividade relativa para cada valor de pH foi determinada pela relação entre a atividade residual e a atividade antes da incubação (atividade inicial).

3.7.3 Estabilidade térmica da enzima imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada

Analizou-se também a influência do processo de ligação cruzada na estabilidade térmica do biocatalisador, utilizando como agente de reticulação o glutaraldeído. A enzima invertase foi imobilizada em amostras de 0,5 g Duolite A-568 nas condições apresentadas no item 3.6.3 e em seguida realizou-se a imobilização por ligação cruzada de acordo com as condições colocadas em 3.7.1. Posteriormente, as amostras foram lavadas com tampão de pH de maior estabilidade encontrado em 3.7.2, incubadas em 10 mL do referido tampão na temperatura do respectivo experimento em um banho termostatizado.

A temperatura de cada incubação variou entre as temperaturas de 51, 57, 60 e $63 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo que as amostras foram retiradas em intervalos adequados de tempo e em seguida resfriadas rapidamente em banho de gelo. Para temperaturas maiores utilizou-se menores tempos de incubação. Após o resfriamento, as amostras foram novamente lavadas com o tampão de pH de maior estabilidade encontrado em 3.7.2, transferidas para a cesta de aço inox e a atividade residual foi determinada em reator batelada utilizando 100 mL de solução de sacarose a 50 g/L, pH 4,9 e temperatura igual a $40 \pm 1^\circ\text{C}$.

Utilizando-se as equações 2.4 e 2.6 e os resultados de atividade enzimática relativa obtidos para cada temperatura determinou-se os melhores ajustes e parâmetros cinéticos por meio de regressões não lineares e modelagem em série. Os tempos de meia vida, foram

também determinados para cada temperatura, de acordo com o melhor ajuste dos resultados de atividade enzimática às equações para o cálculo da constante de desativação térmica (Equações 2.4 e 2.6). A equação de Arrhenius (2.9) foi utilizada para se obter a energia de ativação do processo de desativação térmica por meio de regressão linear.

3.7.4 Otimização do processo de ligação cruzada

3.7.4.1 Influência da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação no processo de ligação cruzada

Com o objetivo de estudar a influência da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação no processo de ligação cruzada realizou-se um Planejamento Composto Central (PCC) com três réplicas centrais e duas variáveis totalizando 11 experimentos, 2² ensaios para investigação de um modelo linear, 3 réplicas centrais e 4 ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais) a uma distância α do ponto central, com α de ortogonalidade igual a 1,14744. As variáveis estudadas foram a concentração de glutaraldeído no intervalo de 0,6 ($-\alpha$) a 3,4 g/L (α) e o tempo de reticulação na faixa de 1,8 ($-\alpha$) a 10,2 horas (α), em temperatura fixa de $29 \pm 1^\circ\text{C}$. As faixas de concentração de glutaraldeído e tempo no processo de ligação cruzada escolhidas para cada variável foram obtidas com base no trabalho de Guidini (2009), o que sugere o uso de glutaraldeído para a resina Duolite A-568 como um ligante entre enzima e suporte.

O processo de ligação cruzada foi realizado incubando-se as amostras do biocatalisador previamente imobilizado em 0,5 g de Duolite A-568 em 5 mL solução de glutaraldeído sob temperatura de $29 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de 150 rpm, nas condições definidas pelo Planejamento Composto Central apresentadas na Tabela 3.2.

Ao final do processo de ligação cruzada o biocatalisador foi lavado com tampão acetato 10^{-1} M pH 4,9 determinando-se a atividade conforme item 3.5, a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 4,9 e concentração inicial de sacarose de 50 g/L no meio reacional. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 = concentração de glutaraldeído (g/L) e X_2 = tempo de reticulação (h)) estão apresentados na Tabela 3.2. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 3.2 - Matriz Planejamento Composto Central do efeito conjunto da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação no processo de ligação cruzada

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)	
	Concentração de Glutaraldeído (g/L)	Tempo (h)
1	1 (-1)	3 (-1)
2	1 (-1)	9 (1)
3	3 (1)	3 (-1)
4	3 (1)	9 (1)
5	0,6 (- α)	6 (0)
6	3,4 (α)	6 (0)
7	2 (0)	1,8 (- α)
8	2 (0)	10,2 (α)
9	2 (0)	6 (0)
10	2 (0)	6 (0)
11	2 (0)	6 (0)

As equações de codificação da concentração de glutaraldeído e tempo são apresentadas nas Equações 3.9 e 3.10, respectivamente.

$$X_1 = \frac{[Glut] - 2}{1} \quad (3.9)$$

$$X_2 = \frac{Tempo - 6}{3} \quad (3.10)$$

Os resultados experimentais obtidos foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistic® 7.0* e pela avaliação estatística da estimação dos parâmetros por meio dos valores de *t de Student*, sendo eliminados aqueles com nível de significância (valor-p) superior a 10%. Assim, com os parâmetros significativos obteve-se uma equação que representa os efeitos das variáveis em estudo. Com a equação empírica da regressão múltipla foi possível construir as superfícies de resposta para verificar a existência de uma região ótima para a resposta atividade que se encontra em uma faixa de combinação das variáveis estudadas, além de deter informações sobre a robustez do processo, ou seja, qual a

variação de uma variável que pode ser admitida ao redor do valor ótimo que mantém o processo na condição otimizada.

3.7.4.2 Influência da temperatura e do pH na atividade de invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada

Um segundo Planejamento Composto Central (PCC) foi realizado visando determinar as melhores condições operacionais do processo de hidrólise de sacarose por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. O PCC estudou o efeito conjunto de duas variáveis: temperatura e pH, totalizando 11 ensaios, 2² ensaios para investigação de um modelo linear, 3 réplicas centrais e 4 ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais) a uma distância α do ponto central, apresentados na Tabela 3.3. O valor do α ortogonal foi de 1,1474.

A atividade enzimática foi obtida pelo método das taxas iniciais de reação de hidrólise de sacarose apresentado em 3.5, num minireator de mistura, com agitação controlada e operação batelada, contendo 100 mL de sacarose a 50 g/L, pH e temperatura variáveis de acordo com a Tabela 3.3.

Os experimentos foram realizados utilizando tampão acetato 10⁻¹M com pH variável entre 3,85 a 5, e no intervalo de pH variável entre 6 a 6,15 utilizou-se tampão fosfato 10⁻¹M. O efeito da temperatura foi analisado para temperaturas variáveis entre 22 a 68 ± 1°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As equações de codificação da temperatura °C (X_1) e do pH (X_2) são apresentadas nas Equações 3.11 e 3.12, respectivamente.

$$X_1 = \frac{T - 45}{20} \quad (3.11)$$

$$X_2 = \frac{pH - 5}{1} \quad (3.12)$$

Tabela 3.3 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito conjunto da temperatura e do pH na atividade de invertase imobilizada na resina Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada.

Experimentos	Valor real (valor codificado)	
	Temperatura (°C)	pH
1	25 (-1)	4 (-1)
2	25 (-1)	6 (1)
3	65 (1)	4 (-1)
4	65 (1)	6 (1)
5	22 (- α)	5 (0)
6	68 (+ α)	5 (0)
7	45 (0)	3,85 (- α)
8	45 (0)	6,15 (+ α)
9	45 (0)	5 (0)
10	45 (0)	5 (0)
11	45 (0)	5 (0)

Os resultados experimentais obtidos foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistic® 7.0* com uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros dada por meio dos valores de *t de Student*, sendo eliminados aqueles com nível de significância (valor-p) superiores a 10%. Assim, com os parâmetros significativos obteve-se uma equação que representa os efeitos das variáveis em determinado estudo. Com a equação empírica da regressão múltipla foi possível construir as superfícies de resposta para verificar a existência de uma região ótima para a resposta em questão, na qual se encontra uma faixa de combinação das variáveis estudadas, além de deter informações sobre a robustez do processo, ou seja, qual a variação que pode ser admitida ao redor do valor ótimo e que mantém o processo na condição otimizada.

3.7.4.3 Estudo da estabilidade de estocagem de invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada

O biocatalisador imobilizado em Duolite A-568 nas condições ótimas apresentadas em 3.6.3 seguida pelo processo de ligação cruzada nas condições apresentadas em 3.7.1, foi estocada sob a temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$, em tampão acetato pH 4,9, por um período de 60 dias.

Inicialmente a atividade residual foi medida a cada 7 dias, posteriormente a cada 14 dias, pelo método das taxas iniciais (3.5), sob as condições ótimas de hidrólise encontradas por Marquez *et al.*, (2008) (temperatura de reação de $40 \pm 1^\circ\text{C}$, concentração de sacarose no meio de 50 g/L em tampão acetato 10^{-1}M pH 4,9).

3.8 Testes em Reator de Leito Fixo

3.8.1 Imobilização da invertase em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada

Utilizou-se o procedimento de imobilização em Duolite A-568 de acordo com as condições ótimas de imobilização encontradas por Marquez *et al.*, (2008), seguido pelo processo de ligação cruzada nas condições ótimas encontradas em 3.7.4.1. Para testes em reator tipo leito fixo, incubou-se 110 mL de solução de invertase a 12,5 g/L (em tampão acetato pH 5) com 5,5 g de Duolite A-568 ativada, com tempo de imobilização de 24 h, agitação de 150 rpm à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora rotativa. Na sequência, a enzima imobilizada em Duolite A-568 foi lavada com tampão acetato 10^{-1}M pH 4 (pH ótimo encontrado em 3.7.2) e realizado o processo de ligação cruzada, no qual adicionou-se 27,5 mL de glutaraldeído na concentração de 0,6 g/L durante um tempo de reticulação de 6 h (concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação ótimos encontrados em 3.7.4.1).

3.8.2 Influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura na conversão de sacarose

Com base na metodologia apresentada por Fischer (2010), estudou-se a influência conjunta da concentração de sacarose, vazão de alimentação de sacarose e temperatura no reator tipo leito fixo por um Planejamento Composto Central (PCC) com três réplicas centrais e três variáveis, totalizando 17 experimentos, com α de ortogonalidade igual a 1,35313.

As equações codificadas para concentração de sacarose em g/L (X_1), tempo de residência em min (X_2) e temperatura em $^\circ\text{C}$ (X_3) são demonstradas pelas Equações 3.13, 3.14 e 3.15, respectivamente:

$$X_1 = \frac{[\text{Sacarose}] - 550}{150} \quad (3.13)$$

$$X_2 = \frac{t - 40}{10} \quad (3.14)$$

$$X_3 = \frac{T-38}{8} \quad (3.1)$$

Na Tabela 3.4 é apresentada a matriz do planejamento composto central, com 17 experimentos. Estes experimentos foram realizados na faixa de 347 (- α) a 753 g/L (+ α) para a concentração de sacarose, de 26,5 (- α) a 53,5 min (+ α) para o tempo de residência e de 27 (- α) a 49 \pm 1°C (+ α) para temperatura. A faixa adotada para a concentração de sacarose foi baseada no trabalho de Podadera (2007), o qual mostrou que xaropes comerciais de açúcar invertido apresentam cerca de 70 a 80% de açúcares redutores, justificando assim os altos valores para variável X_1 (Concentração de Sacarose).

Tabela 3.4 – Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura na conversão de sacarose em reator tipo leito fixo.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	X_1	X_2	X_3
	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo de residência (min)	Temperatura (°C)
1	400 (-1)	30 (-1)	30 (-1)
2	400 (-1)	30 (-1)	46 (1)
3	400 (-1)	50 (1)	30 (-1)
4	400 (-1)	50 (1)	46 (1)
5	700 (1)	30 (-1)	30 (-1)
6	700 (1)	30 (-1)	46 (1)
7	700 (1)	50 (1)	30 (-1)
8	700 (1)	50 (1)	46 (1)
9	347 (- α)	40 (0)	38 (0)
10	753 (α)	40 (0)	38 (0)
11	550 (0)	26,5 (- α)	38 (0)
12	550 (0)	53,5 (α)	38 (0)
13	550 (0)	40 (0)	27 (- α)
14	550 (0)	40 (0)	49 (α)
15	550 (0)	40 (0)	38 (0)
16	550 (0)	40 (0)	38 (0)
17	550 (0)	40 (0)	38 (0)

Os experimentos foram realizados em reator tipo leito fixo, operando em regime contínuo, com escoamento ascendente, (Figura 3.5). As amostras eram retiradas na saída do reator, a cada tempo de residência do respectivo experimento após circulação de no mínimo um tempo de residência para obtenção do estado estacionário.

Para o preparo das soluções de sacarose utilizou-se tampão acetato em pH ótimo encontrado em 3.7.4.2, para a solução de sacarose.

Os resultados experimentais obtidos foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistic® 7.0* e realizada uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros por meio dos valores de *t de Student*, sendo eliminados aqueles com nível de significância (valor-p) superior a 10%. Assim, com os parâmetros significativos obteve-se uma equação que representa os efeitos das variáveis em determinado estudo. Com a equação empírica da regressão múltipla foi possível construir as superfícies de resposta para verificar a existência de uma região ótima para a resposta em questão, na qual se encontra uma faixa de combinação das variáveis estudadas, além de deter informações sobre a robustez do processo, ou seja, qual a variação de uma variável que pode ser admitida ao redor do valor ótimo que mantém o processo na condição otimizada.

Diante dos resultados de conversão obtidos em 3.8.2, observou-se que para algumas concentrações de sacarose combinadas a maiores tempos de residência dentro da faixa estudada, obteve-se conversão total de substrato em xarope de açúcar invertido.

Para a preparação das soluções de sacarose estudadas no PCC apresentado na Tabela 3.4 utilizou-se tampão acetato 10^{-1} M pH 4, pH ótimo encontrado em 3.7.4.2. De acordo com Moroz *et al.*, (1973), o pH de xaropes comerciais de açúcar invertido varia em torno de 4,5 a 5,5. Assim, ao preparar as soluções de sacarose para o PCC apresentado na Tabela 3.5 utilizou-se tampão acetato 10^{-1} M pH 5, em que a conversão de sacarose neste pH foi comparada com a conversão de soluções de sacarose em tampão acetato 10^{-1} M pH 4 (Tabela 3.5). Com o objetivo de avaliar a influência do tampão acetato 10^{-1} M pH 5 na conversão de sacarose em xarope de açúcar invertido, repetiu-se os experimentos 7, 8 e 3 apresentados na Tabela 3.5. Sendo que a solução de sacarose nos novos experimentos apresentados na Tabela 3.5 foram preparados com tampão acetato 10^{-1} M pH 5, buscando aproximar ainda mais o produto deste trabalho de um produto comercial.

Tabela 3.5 – Comparação entre valores de conversão de substrato, em reator tipo leito fixo, para solução de sacarose em tampão acetato 10^{-1} M pH 4 e 5.

Solução de Sacarose em tampão acetato 10^{-1}M pH 4			
Experimentos	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo de Residência (min)	Temperatura (°C)
1	700 (+1)	50 (1)	30 (-1)
2	700 (+1)	50 (1)	46 (1)
3	400 (-1)	50 (1)	30 (-1)

Solução de Sacarose em tampão acetato 10^{-1}M pH 5			
Experimentos	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo de Residência (min)	Temperatura (°C)
1	700 (+1)	50 (1)	30 (-1)
2	700 (+1)	50 (1)	46 (1)
3	400 (-1)	50 (1)	30 (-1)

Assim, buscando a produção de xaropes comerciais altamente ricos em glicose e frutose, aumentou-se os valores para a faixa de concentrações de sacarose bem como para a faixa de tempo de residência a partir de um novo Planejamento Composto Central (PCC) com três variáveis com três réplicas centrais e três variáveis totalizando 17 experimentos, com α de ortogonalidade igual a 1,35313. Em que X_1 corresponde a concentração de sacarose em g/L, X_2 tempo de residência em min e X_3 temperatura em °C. As equações codificadas para concentração de sacarose em g/L (X_1), tempo de residência em min (X_2) e temperatura em °C (X_3) são demonstradas pelas Equações 3.16, 3.17 e 3.18, respectivamente:

$$X_1 = \frac{[\text{Sacarose}] - 700}{100} \quad (3.16)$$

$$X_2 = \frac{t - 75}{15} \quad (3.17)$$

$$X_3 = \frac{T-38}{8} \quad (3.18)$$

Na Tabela 3.6 é apresentada a matriz do planejamento composto central, com três réplicas centrais, totalizando 17 experimentos. Os experimentos foram realizados na faixa de 564,7 (- α) a 853,3 g/L (+ α) para a concentração de sacarose, de 54,7 (- α) a 95,3 min (+ α) para o tempo de residência e de 27 (- α) a 49 °C (+ α) para temperatura.

Tabela 3.6 – Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura na conversão de sacarose em reator tipo leito fixo.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	X ₁	X ₂	X ₃
	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo de Residência (min)	Temperatura (°C)
1	600 (-1)	60 (-1)	30 (-1)
2	600 (-1)	60 (-1)	46 (1)
3	600 (-1)	90 (1)	30 (-1)
4	600 (-1)	90 (1)	46 (1)
5	800 (1)	60 (-1)	30 (-1)
6	800 (1)	60 (-1)	46 (1)
7	800 (1)	90 (1)	30 (-1)
8	800 (1)	90 (1)	46 (1)
9	564,7 (- α)	75 (0)	38 (0)
10	853,3 (α)	75 (0)	38 (0)
11	700 (0)	54,7 (- α)	38 (0)
12	700 (0)	95,3 (α)	38 (0)
13	700 (0)	75 (0)	27 (- α)
14	700 (0)	75 (0)	49 (α)
15	700 (0)	75 (0)	38 (0)
16	700 (0)	75 (0)	38 (0)
17	700 (0)	75 (0)	38 (0)

Ajustou-se os resultados experimentais obtidos por regressão múltipla, utilizando o *software Statistic® 7.0* em que estimou-se os parâmetros por meio dos valores de *t de Student*, eliminando aqueles com nível de significância (valor-p) superior a 10%. Obteve-se uma equação com os parâmetros significativos que representa os efeitos das variáveis em determinado estudo. Com a equação empírica da regressão múltipla foi possível construir as superfícies de resposta para verificar a existência de uma região ótima para a resposta em questão, na qual se encontra uma faixa de combinação das variáveis estudadas, além de deter informações sobre a robustez do processo.

3.8.3 Estudo da estabilidade operacional da invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada

A viabilidade de reutilização da enzima imobilizada foi analisada durante aproximadamente 3 dias. O biocatalisador foi previamente ativado conforme item 3.6.1, imobilizado em Duolite A-568 conforme item 3.6.3 seguido pelo processo de ligação cruzada diante das condições ótimas encontradas em 3.7.4.1, colocado no reator de leito fixo, operando em regime contínuo, escoamento ascendente, nas condições ótimas encontradas em 3.8.2:

- Temperatura $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Concentração da solução de sacarose: 700 g/L;
- Tampão acetato 10^{-1}M pH 5;
- Tempo de residência de 95,3 min (vazão de alimentação de 0,178 mL/min).

A atividade residual foi determinada diariamente de acordo com item 3.5 a fim de acompanhar a conversão de sacarose em xarope de açúcar invertido rico em glicose e frutose, para estudo da viabilidade em trabalhar de forma contínua com o biocatalisador imobilizado em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada em reator tipo leito fixo.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições adotadas para a imobilização de invertase

O suporte, o tempo e as condições para imobilização de invertase foram obtidas por Marquez *et al.*, (2008). Entre as resinas estudadas a que apresentou os melhores resultados na imobilização de invertase por adsorção e ligação iônica foi a Duolite A-568. As condições que otimizaram o processo de imobilização foram: tempo de imobilização de 24 horas, temperatura $29 \pm 1^\circ\text{C}$, tampão acetato 10^{-1}M pH 5,0 e concentração da enzima no meio de 12,5 g/L.

4.2 Atividade da Invertase

Marquez *et al.*, (2008) obtiveram uma atividade média de 4,06 U (grama de açúcar redutor produzido por litro, por minuto, por grama de invertase em pó comercial), ao realizar a hidrólise de sacarose com invertase solúvel em reator batelada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, solução de sacarose de concentração a 50 g/L, em tampão acetato pH 4,5.

Ao imobilizar o biocatalisador em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada realizou-se, inicialmente, o teste de proteína segundo o Método de Lowry (1951) (Apêndice B), em que determinou-se o teor de proteína inicial presente na solução de invertase a 12,5 g/L e no sobrenadante após realizada a imobilização. Obteve-se 14,72% de proteína na solução de invertase a 12,5 g/L em sua forma livre e no sobrenadante obteve-se 11,03% de proteína. Assim, o processo de imobilização de invertase por adsorção iônica em Duolite A-568 alcançou uma eficiência de 25%.

A temperatura e o pH ótimos de atividade de invertase imobilizada em Duolite A-568 encontrados por Marquez *et al.*, (2008) foram respectivamente, $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e 4,9 (tampão acetato). Nos experimentos apresentados em 3.7.1, 3.7.2 e 3.7.3 utilizou as condições ótimas encontradas por Marquez *et al.*, (2008) de hidrólise enzimática de sacarose.

4.3 Testes em Reator Batelada

4.3.1 Estudo preliminar para o processo de ligação cruzada

Com a realização dos experimentos conforme item 3.7.1, pode-se notar (Tabela 4.1) que a atividade enzimática sofreu um aumento com o processo de ligação cruzada após a imobilização de invertase em Duolite A-568 por adsorção iônica. Assim, justifica-se em relação à atividade enzimática, o uso combinado do método de adsorção iônica e ligação cruzada com glutaraldeído no processo de imobilização de invertase.

Tabela 4.1 – Resultado preliminar para o processo de ligação cruzada com uso de glutaraldeído.

Processo de imobilização	Atividade (U_S)
Imobilização sem ligação cruzada	0,732
Processo de ligação cruzada após a imobilização	0,808

$$U_S = (\text{g açúcar redutor/L.min.g resina})$$

4.3.2. Estabilidade de invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada em relação ao pH

A influência do pH na estabilidade de invertase imobilizada por adsorção iônica seguida pelo processo ligação cruzada foi estudada incubando-se amostras de invertase imobilizada e reticulada em 10 mL de tampão, utilizando tampão acetato 10^{-1} M para a faixa de pH 3,0 à 6,0 em intervalos de 0,5 e utilizando tampão citrato-fosfato 10^{-1} M para a faixa de pH 6,5 à 7,0 em intervalos de 0,5. Após 24 horas, foram determinadas suas atividades residuais a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando solução de sacarose 50 g/L em tampão acetato pH 4,9. A atividade relativa para cada valor de pH foi determinada pela relação entre a atividade residual e a atividade antes da incubação.

Na Figura 4.1 são representadas as atividades relativas, A/A_0 , definidas pela relação entre a atividade após 24 horas de incubação em pH determinado para cada experimento apresentado em 3.7.2 e a atividade inicial.

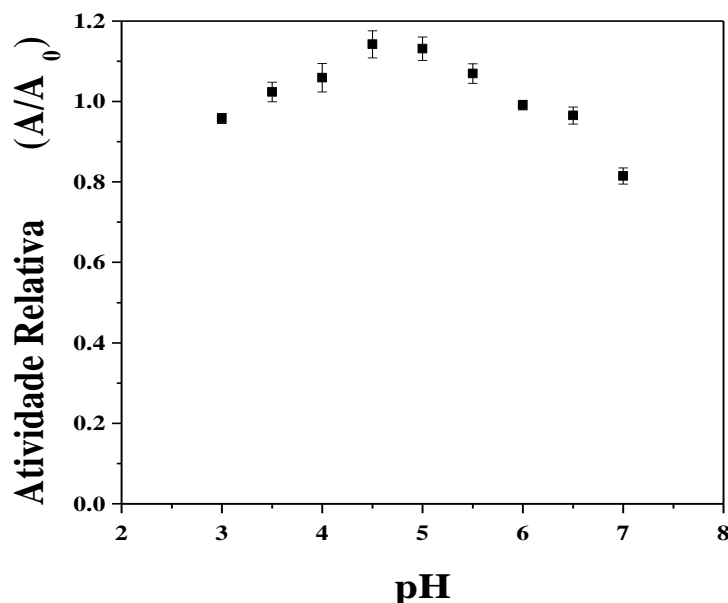


Figura 4.1 – Influência do pH na estabilidade de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. (Condições de determinação da atividade enzimática: Concentração de sacarose 50 g/L, temperatura: $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e tampão acetato 10^{-1}M , pH 4,9).

Observa-se na Figura 4.1 um aumento de atividade de invertase imobilizada e reticulada em relação a sua atividade inicial (A_0) para pH variando de 3,5 a 5,5. Os valores de atividade relativa (A/A_0) foram justados através do polinômio representado pela Equação 4.1, apresentando um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,95.

$$A/A_0 = -0,0107(\text{pH})^2 + 0,1013(\text{pH}) - 0,0271 \quad (4.1)$$

Através do ajuste do polinômio aos resultados da Figura 4.1, obteve-se o pH de maior atividade igual 4,7.

Pode-se verificar que na faixa de pH 3 a 4,5 houve um aumento na atividade enzimática de 16,14% e para faixa de pH 4,5 a 7 houve uma queda de 28,64%. Marquez *et al.*, (2008) obteve uma faixa de estabilidade de 5,5 a 6 para invertase imobilizada apenas por adsorção iônica em Duolite A-568, enquanto o uso do agente reticulante glutaraldeído aumentou a faixa de estabilidade de invertase imobilizada, para a faixa de 3,5 a 6, como mostra a Figura 4.1. Coutinho Filho *et al.*, (2005), encontrou a faixa de 4,5 a 5,0 com

invertase imobilizada em sílica de porosidade controlada sem processo de ligação cruzada, faixa esta ainda inferior ao intervalo encontrado neste trabalho.

O método de ligação cruzada com uso de glutaraldeído mostrou-se eficaz na manutenção da estabilidade da enzima em relação a diferentes valores de pH, quando comparado com os resultados sem o referido tratamento. Ao estudar a imobilização de β -galactosidase por adsorção iônica em Duolite A-568, Guidini *et al.*, (2010) obteve também maior estabilidade ao utilizar o processo de ligação cruzada com glutaraldeído após a adsorção iônica. Os resultados obtidos estão de acordo com os trabalhos de Oosterom (1998), Letca (2004) e Haider e Husain (2008), que observaram uma maior estabilidade da enzima β -galactosidase de *Escherichia coli*, após o tratamento do suporte com glutaraldeído. Segundo Tomotani e Vitolo (2006), Arica e Bayramoglu (2006), o *pI* (ponto isoelétrico) de invertase situa-se na faixa de pH 3,4 a 4,5, o que significa que para valores baixos de pH há um predomínio de cargas positivas nas moléculas da enzima, facilitando o seu desprendimento da resina. Por outro lado para valores altos de pH ocorre uma tendência de ligação dos grupos $(OH)^-$ presentes no meio na resina competindo com a ligação da enzima na resina.

4.3.3 Estabilidade térmica da invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada

A estabilidade térmica da invertase imobilizada foi analisada conforme descrito no item 3.7.3. Os resultados de atividade relativa em função do tempo, a várias temperaturas, são apresentados na Figura 4.2.

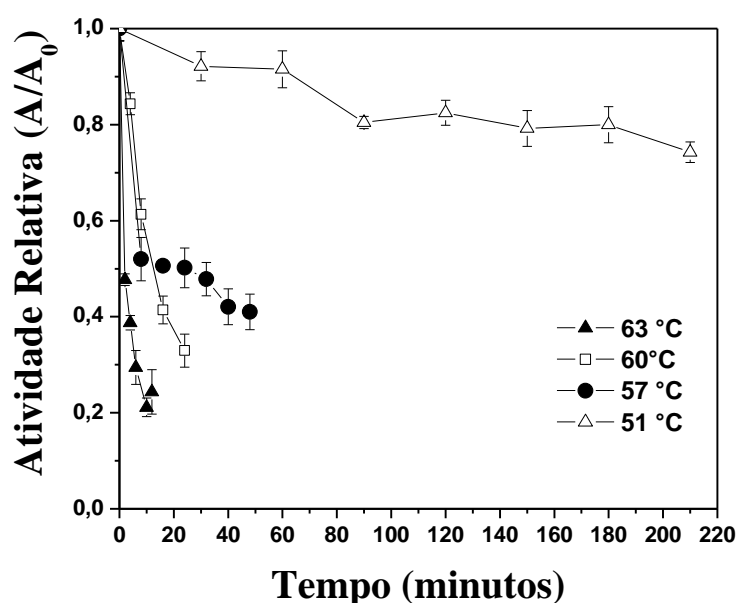


Figura 4.2 – Perfis de inativação térmica para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Incubação em tampão acetato 10^{-1} M, pH 4,7 e temperaturas 51, 57, 60 e $63 \pm 1^\circ\text{C}$.

Uma análise da Figura 4.2 evidencia a forte dependência da estabilidade da invertase imobilizada em relação à temperatura. Temperaturas maiores que $57 \pm 1^\circ\text{C}$ implicam em rápida desnaturação da proteína enzimática.

Observa-se que para a temperatura de $51 \pm 1^\circ\text{C}$ em 210 minutos houve uma queda de apenas 25,74% na atividade em relação à inicial. Em 48 minutos, observou-se uma queda de 58,99% de atividade em relação à inicial para a temperatura de $57 \pm 1^\circ\text{C}$. Para as temperaturas mais altas a perda de atividade mostrou-se maior em um menor intervalo. Para a temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$ houve uma queda de 67,06% de atividade em 24 minutos e para a temperatura de $63 \pm 1^\circ\text{C}$ a atividade da enzima imobilizada diminuiu em 78,87% em apenas 10 minutos.

Os resultados de atividade relativa (A/A_0) para invertase imobilizada para as temperaturas estudadas em função do tempo foram ajustados às Equações 2.4 e 2.6 por uma regressão não-linear pelo método Levenberg-Marquardt (MORE, 1977) utilizando o *software Statistica 7.0*. Os resultados dos melhores ajustes alcançados para cada temperatura com os coeficientes de determinação para cada equação, os quadrados dos desvios, os respectivos parâmetros ajustados e a análise de significância utilizando o teste *t-Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentam níveis de significância menores que 10%, estão apresentados na Tabela 4.17.

Para nenhuma das temperaturas estudadas foi possível ajustar a cinética de desativação segundo a Equação 2.3, com todos os parâmetros significativos ($p < 10\%$), o que pode ser explicado pela pequena quantidade de dados experimentais para cada temperatura. Este fato também ocorreu no trabalho de Marquez *et al.*, (2008), considerando o modelo com dois estágios intermediários como representativo da desativação da invertase imobilizada em Duolite A-568.

Para todas as temperaturas estudadas foi possível ajustar a cinética segundo a Equação 2.6, com parâmetros significativos ($p < 10\%$), como pode ser visualizado pelos valores dos níveis de significância na Tabela 4.2. Já o ajuste para o modelo em série com uma única etapa apresentou parâmetros significativos apenas para as temperaturas de 57 e 63°C . Optou-se pelo ajuste que mais se adequava aos dados experimentais, adotando resultados que apresentaram significados físicos juntamente com maior coeficiente de determinação.

Tabela 4.2 – Ajustes dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série com uma única etapa para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada, nas temperaturas 51, 57, 60 e 63 ± 1°C.

Temperatura 63°C							Temperatura 60°C						
R^2 $\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$							R^2 $\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$						
Eq.							Eq.						
2.6	k_1	0,2359	p	0,003	0,91	0,0379	2.6	k_1	0,0455	p	0	0,97	0,0094
2.4	k_1	0,5079	p	0,011	0,98	0,0052	2.4	k_1	0,0591	p	0,199	0,97	0,0089
	α_1	0,2404	p	0,007				α_1	0,1401	p	0,649		
Temperatura 57°C							Temperatura 51°C						
R^2 $\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$							R^2 $\Sigma(V - V_{\text{modelo}})^2$						
Eq.							Eq.						
2.6	k_1	0,0223	p	0	0,95	0,0118	2.6	k_1	0,0014	p	0	0,96	0,0012
2.4	k_1	0,0662	p	0,004	0,99	0,0005	2.4	k_1	0,0061	p	0,175	0,98	0,0007
	α_1	0,3858	P	0				α_1	0,6754	p	0,001		

p – valor de **p** encontrado na análise de t-student.

Os ajustes dos resultados experimentais e os previstos pelos modelos representados pelas Equações 2.4 e 2.6 para as temperaturas 63, 60, 57 e 51 ± 1°C estão representados respectivamente, nas Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6.

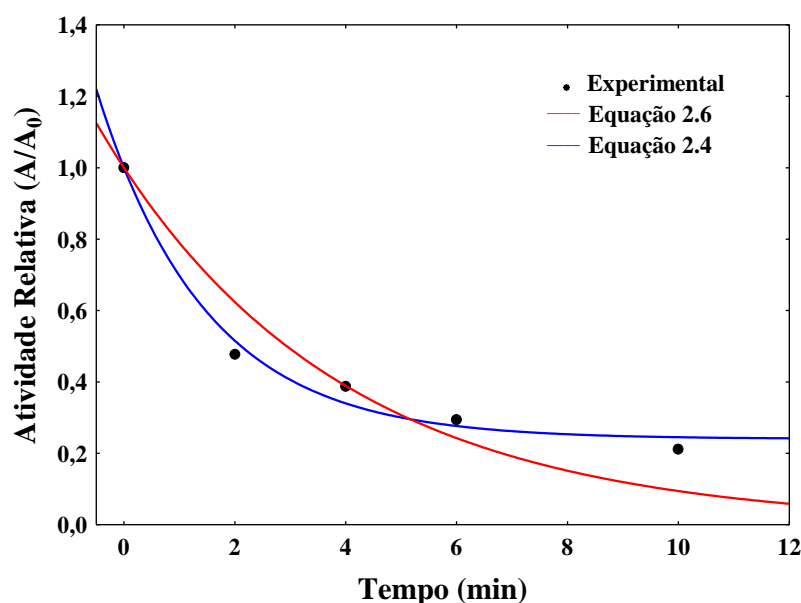


Figura 4.3 - Perfil da desativação térmica a 63 ± 1°C para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Ajuste de modelo matemático aos dados

experimentais: Equação 2.6 = modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 2.4 = modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.

Analisando a Figura 4.3 e a Tabela 4.2, observa-se que os dados experimentais para a temperatura de 63°C foram ajustados para ambos os modelos apresentados, em que todos os parâmetros calculados foram significativos. Verifica-se que o melhor ajuste entre os valores experimentais e teóricos são obtidos com o modelo representado pela Equação 2.6, com coeficiente de determinação de 0,98. Os parâmetros ajustados ao modelo estão representados na Equação 4.2.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,2404) \cdot e^{(-0,5079t)} + 0,2404 \quad (4.2)$$

Para a temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$ o modelo cinético da Equação 2.6 se ajustou de maneira significativa aos dados experimentais, com coeficiente de determinação de 0,97 e soma dos quadrados dos desvios de 0,0094. Apesar do coeficiente de correlação obtido para o modelo em série com uma única etapa ter sido igual a 0,94, os parâmetros obtidos pelo modelo não foram significativos, ou seja, apresentaram valor p para a análise de *t-student* superior a 10%, conforme visto na Tabela 4.2. Assim os ajustes aos modelos cinéticos, para a temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$ estão representados na Figura 4.4.

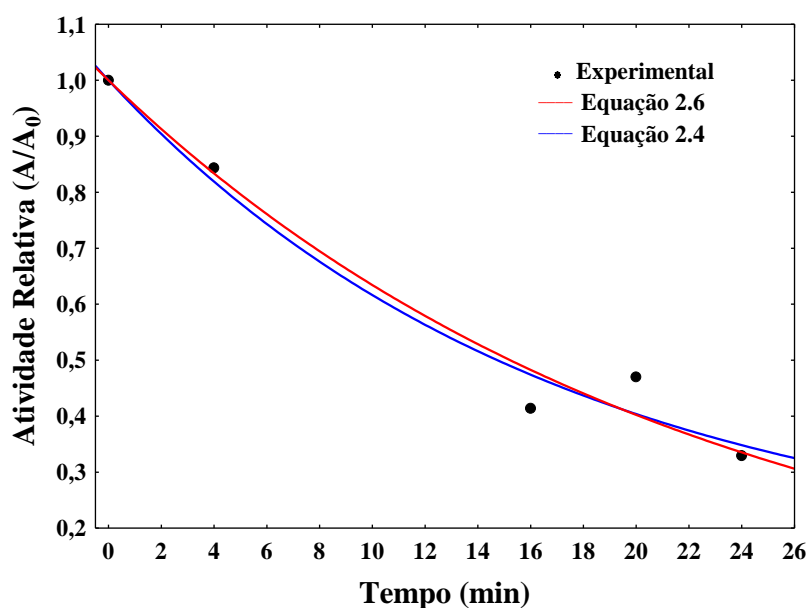


Figura 4.4 - Perfil da desativação térmica a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 2.6 = modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 2.4 = modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.

Analisando a Figura 4.4 observa-se que o modelo cinético de desativação térmica de primeira ordem ajustou adequadamente aos dados experimentais para a temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$. Com um R^2 de 0,97 os parâmetros ajustados ao modelo apresentado na Equação 2.6 estão representados na Equação 4.3.

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-0,0455.t) \quad (4.3)$$

No trabalho desenvolvido por Marquez *et al.*, (2008) para a temperatura de 60°C o modelo cinético da Equação 2.4 não se ajustou de maneira significativa, pois apesar de terem obtido coeficientes de determinação de 0,97, os parâmetros obtidos não apresentaram significado físico. Para a temperatura 60°C Marquez *et al.*, (2008) obtiveram valor negativo para o parâmetro α_1 , o qual é a razão específica de atividade $\frac{E_1}{E}$, não apresentando portanto significado físico.

Ao avaliar a estabilidade térmica a $57 \pm 1^\circ\text{C}$ de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada obteve-se melhores resultados para o modelo cinético apresentado pela Equação 2.4 com o coeficiente de determinação de 0,99 e soma dos quadrados dos desvios de 0,0005, conforme apresentado na Tabela 4.2. O modelo cinético representado pela Equação 2.6 apresentou um coeficiente de determinação de 0,95 com todos os parâmetros significativos.

Para a temperatura de 57°C , Marquez *et al.*, (2008) obtiveram maior coeficiente de determinação para o modelo cinético da Equação 2.6, igual a 0,99 e valor da somatória dos quadrados dos desvios igual a 0,000002. Marquez *et al.*, (2008) obtiveram pela Equação 2.6 o valor da constante cinética de desativação térmica (k_d) igual a 0,027.

Assim os ajustes aos modelos cinéticos apresentados pelas Equações 2.6 e 2.4, para $57 \pm 1^\circ\text{C}$ estão representados na Figura 4.5.

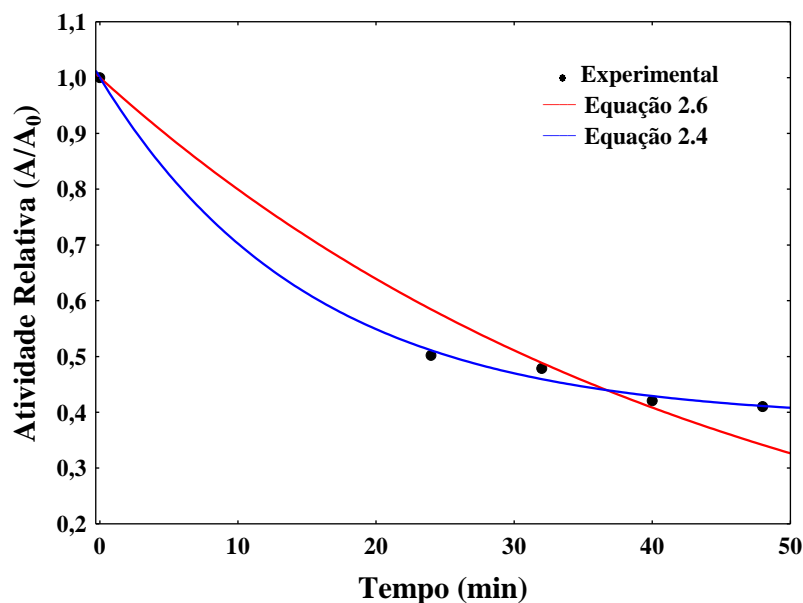


Figura 4.5 - Perfil da desativação térmica a $57 \pm 1^\circ\text{C}$ para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 2.6 = modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 2.4 = modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.

Como já visto a partir do valor do coeficiente de determinação apresentado na Tabela 4.2, confirma-se pela análise da Figura 4.5 que para temperatura de $57 \pm 1^\circ\text{C}$ o melhor ajuste aos valores experimentais foi pela Equação 2.4. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.4.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,3858) \cdot e^{(-0,0662t)} + 0,3858 \quad (4.4)$$

A menor temperatura utilizada no estudo de estabilidade térmica deste trabalho foi $51 \pm 1^\circ\text{C}$, em que os dados experimentais apresentaram melhores ajustes ao modelo de desativação térmica de primeira ordem (Equação 2.6) como pode ser observado na Figura 4.6. Apresentando um coeficiente de determinação igual a 0,97 para a Equação 2.6 e igual a 0,97 para o modelo cinético em série com uma etapa. Apesar do alto valor obtido para o coeficiente de correlação referente a Equação 2.4, ao ajustar os dados experimentais os parâmetros obtidos não foram significativos ($p < 10\%$) como pode ser visto na Tabela 4.2.

Marquez *et al.*, (2008) obtiveram para a temperatura de 51°C um coeficiente de determinação de 0,25 para o ajuste da cinética de desativação de primeira ordem apresentada

na Equação 2.6, já para a Equação 2.4 obtiveram um R^2 de 0,84, um k_d de 0,023 e o valor de 0,85 para o parâmetro α_1 .

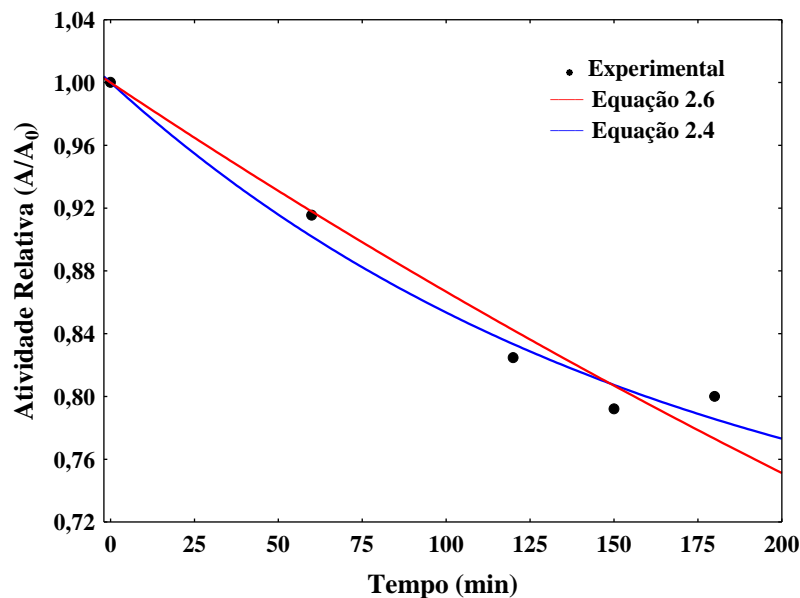


Figura 4.6 - Perfil da desativação térmica a $51 \pm 1^\circ\text{C}$ para invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 2.6 = modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 2.4 = modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.

Os parâmetros ajustados ao modelo da Equação 2.6 para a temperatura de $51 \pm 1^\circ\text{C}$ estão representados pela Equação 4.5.

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-0,0014.t) \quad (4.5)$$

As atividades relativas encontradas por Marquez *et al.*, (2008) para a temperatura de $51 \pm 1^\circ\text{C}$ decaíram lentamente em relação as outras temperaturas praticamente, constante com o tempo. Após 4 horas de incubação da enzima imobilizada em Duolite A-568 nesta temperatura, a atividade relativa encontrada por Marquez *et al.*, (2008) foi da ordem de 90% e não apresentou tendência de queda.

Quanto maior a temperatura maior o parâmetro da constante da taxa de desativação térmica (k_d), como visto na Figura 4.2, pois de acordo com Arrhenius k_d é diretamente proporcional à temperatura.

Para o cálculo do tempo de meia vida para as temperaturas 51, 57, 60 e 63°C utilizou-se as constantes de ativação do processo de desativação térmica obtidas pelo modelo cinéticos de primeira ordem, já que ao ajustar os dados experimentais obteve-se parâmetros significativos para a Equação 2.7. Os tempos de meia vida foram calculados pela Equação 2.5 e apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Cálculo do tempo de meia vida para cada temperatura estudada na estabilidade em relação à temperatura.

Temperatura (°C)	Equação do Modelo	k_d	R^2	$t_{1/2}$ (min)	$t_{1/2}$ experimental (min)
63	2.4	0,508	0,902	2,937	2,108
60	2.4	0,045	0,972	15,226	19,687
57	2.4	0,022	0,952	30,972	25,612
51	2.4	0,001	0,961	484,718	*

* Não foi possível calcular o tempo de meia-vida pelos resultados experimentais, indicando um tempo de meia-vida alto.

Ao analisar a Tabela 4.3 pode-se observar que os valores de tempos de meia vida calculados pelo modelo de desativação térmica de primeira ordem apresentaram-se bem próximos aos resultados experimentais. De acordo com o modelo de Arrhenius, o valor da constante cinética de desativação térmica k_d , aumenta, com o aumento da temperatura, assim o tempo de meia vida diminui, o que ocorreu com os valores encontrados para os valores calculados pela Equação 2.7.

Marquez *et al.*, (2008) obtiveram respectivamente, para as temperaturas 63, 60, 57 e $\pm 1^\circ\text{C}$ os tempos de meia-vida de 3,33; 10,66; 25,67, sendo que para a temperatura de 51°C não foi possível calculá-lo.

Ao analisar os tempos de meia-vida obtidos por Marquez *et al.*, (2008) para as temperaturas de 60 e 57 $\pm 1^\circ\text{C}$ nota-se que os mesmos foram inferiores aos encontrados neste trabalho pela Equação 2.7, iguais a 15,226 e 30,972 min, respectivamente. Pode-se interpretar que ao imobilizar invertase pelo processo de adsorção iônica em Duolite A-568 combinado com o processo de ligação cruzada, aumentou-se a estabilidade térmica da enzima para as temperaturas estudadas. Este biocatalisador imobilizado com uso do agente bifuncional

glutaraldeído mostrou-se resistente a altas temperaturas por tempos mais longos quando comparado a trabalhos em que foi imobilizado apenas por adsorção iônica.

No trabalho de Amaya-Delgado *et al.*, (2005), tanto para temperaturas mais altas quanto para as mais baixas o tempo de meia vida obtido para invertase imobilizada covalentemente em Nylon-6 foi maior se comparada à solúvel. O mesmo ocorreu no trabalho de Danisman *et al.*, (2004), para invertase imobilizada por ligação covalente em membranas de poli hidroximetacrilato.

Para encontrar a energia de ativação do processo de desativação térmica realizou-se uma regressão linear na equação de Arrhenius (Equação 2.9), utilizando as constantes de desativação térmica calculadas pela Equação 2.6 apresentados na Tabela 4.3, como pode ser observado na Figura 4.7.

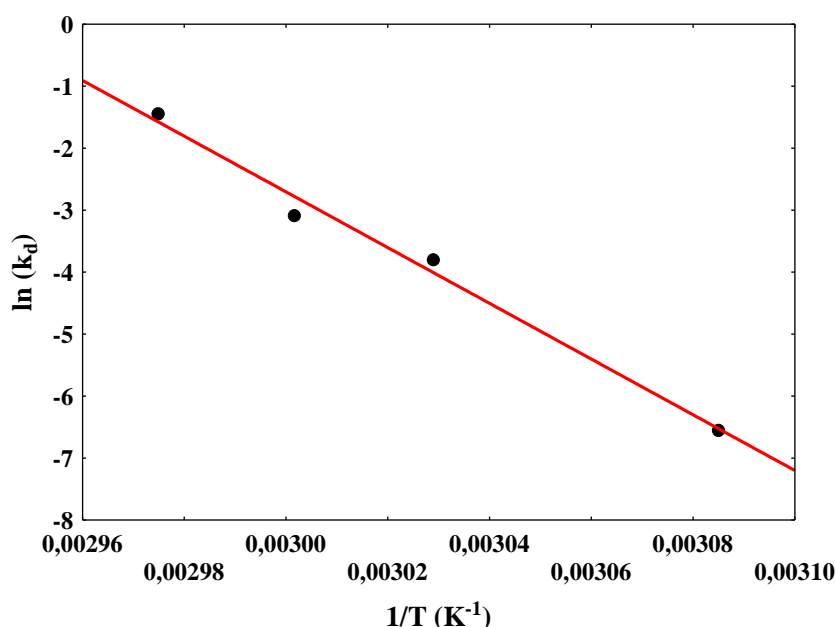


Figura 4.7 – Regressão linear da equação de Arrhenius.

O ajuste linear obtido alcançou uma determinação linear de 0,99 e está representada na Equação 4.7.

$$\ln(k_d) = 132,14 - 44949,21\left(\frac{1}{T}\right) \quad (4.6)$$

Assim a energia de ativação encontrada foi da ordem de 373,73 kJ/mol ou 89,32 kcal/mol.

Marquez *et al.*, (2008) obtiveram um valor de 415 kJ/mol para a energia de ativação térmica com um coeficiente de determinação de 0,97 ao imobilizar invertase apenas por

adsorção iônica em Duolite A-568. Ao comparar o valor da Energia de ativação encontrado por Marquez *et al.*, (2008) ao valor encontrado neste trabalho, pode-se observar um aumento na estabilidade do biocatalisador obtido a partir da combinação do método de adsorção iônica e ligação cruzada. Visto que diante do aumento da Energia de Ativação, obteve-se uma enzima menos sensível à temperatura, apresentando-se mais estável a elevadas temperaturas.

4.3.4 Otimização do processo de ligação cruzada

4.3.4.1 Influência da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação no processo de ligação cruzada

Com o intuito de otimizar o processo de ligação cruzada, foi proposto um estudo da influência conjunta da concentração de glutaraldeído em g/L (X_1) e tempo de reticulação em horas (X_2) utilizando-se um Planejamento Composto Central (PCC), conforme apresentado em 3.7.4.1. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento composto central para a otimização do processo de ligação cruzada.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	Concentração de Glutaraldeído (g/L)	Tempo (h)	Atividade (U_s)
1	1 (-1)	3 (-1)	0,884
2	1 (-1)	9 (1)	0,926
3	3 (1)	3 (-1)	0,72
4	3 (1)	9 (1)	0,77
5	0,6 ($-\alpha$)	6 (0)	1,002
6	3,4 (α)	6 (0)	0,7924
7	2 (0)	1,8 ($-\alpha$)	0,8084
8	2 (0)	10,2 (α)	0,8828
9	2 (0)	6 (0)	0,9412
10	2 (0)	6 (0)	0,9368
11	2 (0)	6 (0)	0,9504

$$U_s = (\text{g açúcar redutor} / \text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g resina})$$

Observando a Tabela 4.4 pode-se notar que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,72U_S a 1,002U_S. Verifica-se que o maior valor encontrado foi no experimento 5, que corresponde à concentração de glutaraldeído de 0,6g/L (-α) e tempo de 6 h (0) de processo de ligação cruzada. Nota-se que altas concentrações de glutaraldeído não apresentaram influência tão significativa quanto o tempo de reticulação, o que é demonstrado no experimento 3, no qual a menor atividade foi encontrada com a concentração de glutaraldeído de 3 g/L (+1) e tempo de 3 horas (-1).

Os resultados experimentais de atividade enzimática foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o *software Statistica 7.0*. Na Tabela 4.5 estão representados os termos lineares, os termos quadráticos, as interações das duas variáveis estudadas e as respectivas análises no teste *t – Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentam níveis de significância menores que 10%.

Tabela 4.5 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros referentes à otimização do processo de ligação cruzada.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,944563	0,005679	0,000000
X ₁ (L)	-0,084499	0,008043	0,000005
X ₁ (Q)	-0,038912	0,011125	0,000920
X ₂ (L)	0,026739	0,008043	0,001160
X ₂ (Q)	-0,078103	0,011125	0,000033
X ₁ X ₂	0,002000	0,010357	0,715236

Após realizar a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.7 completa com todos os parâmetros:

$$Atividade = 0,944563 - 0,084499X_1 - 0,038912X_1^2 + 0,026739X_2 - 0,078103X_2^2 + 0,002X_1X_2 \quad (4.7)$$

Observa-se na Tabela 4.5 que as seguintes variáveis do modelo foram significativas: concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação, ambos em seus termos lineares (X₁ (L) e X₂ (L)) e quadráticos (X₁ (Q) e X₂ (Q)), as quais estão apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos aplicados ao PCC de otimização do processo de ligação cruzada.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,944563	0,005261	0,000000
X ₁ (L)	-0,084499	0,007451	0,000000
X ₁ (Q)	-0,038912	0,010306	0,000280
X ₂ (L)	0,026739	0,007451	0,000370
X ₂ (Q)	-0,078103	0,010306	0,000005

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.8 com apenas os parâmetros significativos:

$$Atividade = 0,9444563 - 0,084499X_1 - 0,038912X_1^2 + 0,026739X_2 - 0,078103X_2^2 \quad (4.8)$$

Foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). O coeficiente de determinação R^2 obtido foi de 0,99, o que indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da atividade da enzima imobilizada, mostrando que 99,301% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.7, verifica-se que o F_{calc} foi altamente significativo ($p < 0,0007$). O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.9.

Tabela 4.7 – Análise de Variância (ANOVA) para a resposta de atividade enzimática aplicada ao PCC de otimização do processo de ligação cruzada.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	0,0785	4	0,0196	852,7252	0,0006
Resíduos	0,0005	6	0,0001		
Total	0,0790	10			

$$F_T = F_{4; 6; 0,1} = 3,18$$

A Figura 4.8 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.9 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

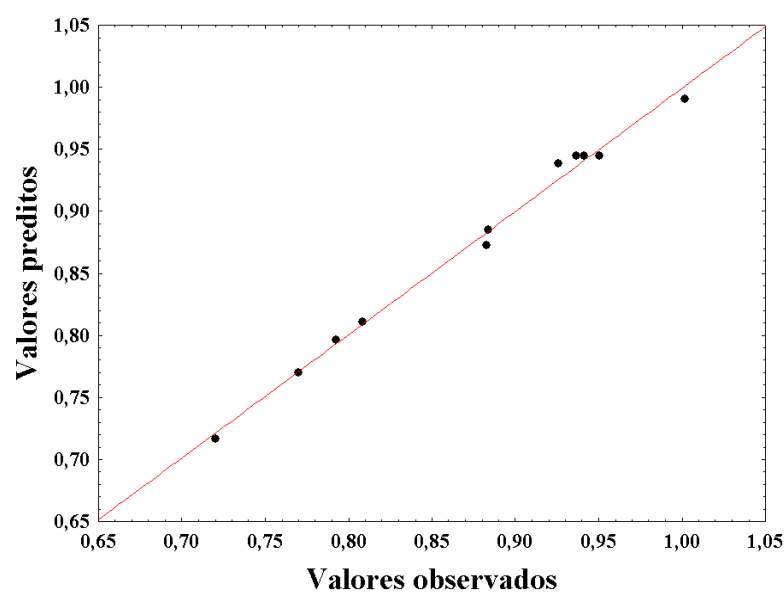


Figura 4.8 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática da otimização do processo de ligação cruzada.

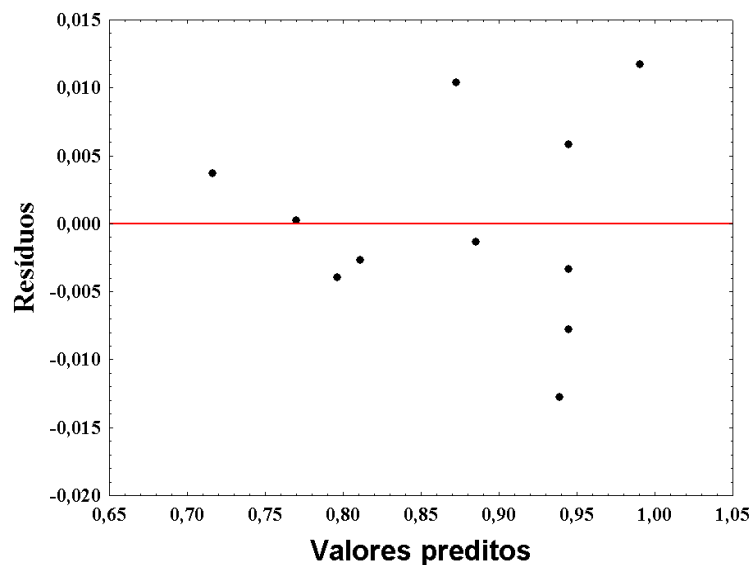


Figura 4.9 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de valores de atividade enzimática resultantes da otimização do processo de ligação cruzada.

Observando a Figura 4.8, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação 4.8. Na Figura 4.9, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir a superfície de resposta apresentada na Figura 4.10 e otimizar os parâmetros estudados no processo de ligação cruzada.

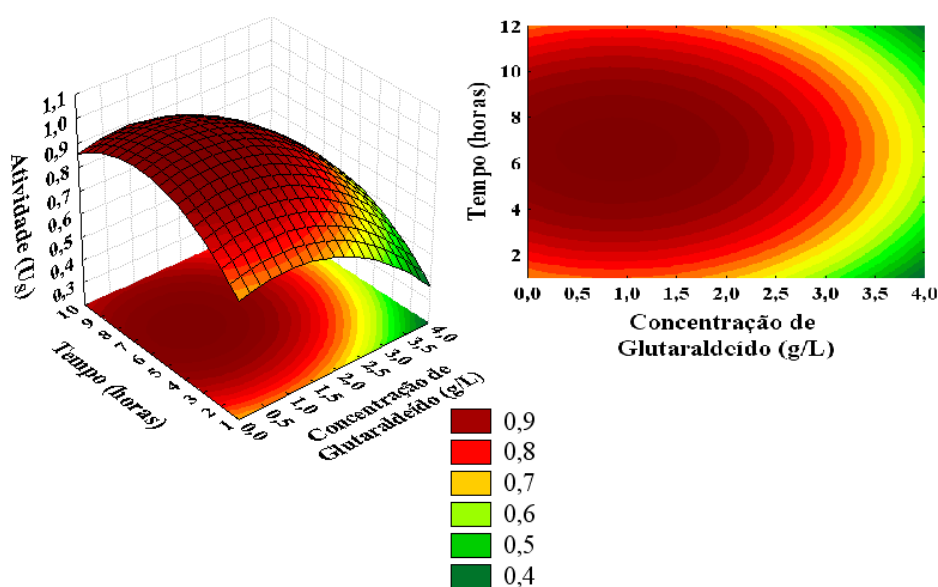


Figura 4.10 – Superfície de resposta da influência conjunta da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação na atividade de enzima imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.

Ao observar a Figura 4.10 pode-se observar que a concentração de glutaraldeído de 0,6 g/L e tempo de reticulação de 6 h correspondem ao ponto ótimo de atividade enzimática. Sendo a região de ótimo correspondente à faixa de 0 a 2 g/L para a concentração de glutaraldeído de 4 a 8 h para o tempo de reticulação.

Para validar o modelo, foram realizados três experimentos nas condições ótimas do Planejamento Composto Central (PCC), concentração de glutaraldeído de 0,6 g/L e tempo de reticulação de 6 h, obtendo-se as atividades experimentais iguais a 1,104U_s (erro relativo igual a 0,089); 1,04U_s (erro relativo igual a 0,036) e 1,036U_s (erro relativo igual a 0,033). Estes resultados indicam a boa reprodutibilidade do experimento, permitindo assim trabalhar com concentrações de glutaraldeído entre 0,2 e 0,8 g/L e tempos de ligação cruzada na faixa de 6 a 8 horas para otimizar o processo de ligação cruzada combinado a adsorção iônica na imobilização e invertase. A metodologia utilizada está de acordo com o trabalho de Letca (2004), que sugere o uso de glutaraldeído no tratamento da resina Duolite A-568 como um ligante entre enzima e suporte.

Guidini *et al.*, 2010, estudaram a imobilização de β -galactosidase em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada utilizando o glutaraldeído como agente reticulante. Obtiveram, respectivamente, como pontos ótimos de concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação 3,5 g/L e 1,5 h. O processo de ligação cruzada não causou uma queda na atividade do biocatalisador imobilizado apenas por adsorção iônica em Duolite A-568.

Para os estudos subsequentes de imobilização de invertase em Duolite A-568 com posterior adição de glutaraldeído foi utilizado para este último a concentração de 0,6 g/L e tempo de reticulação de 6 horas.

4.3.4.2 Influência da temperatura e do pH na atividade de Invertase imobilizada em duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada

Os resultados da influência simultânea do pH e da temperatura na atividade enzimática de invertase solúvel, definidos pelo Planejamento Composto Central conforme item 3.7.4.2, estão representados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Matriz com resultados obtidos para avaliar a influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada.

Experimentos	Valor real (valor codificado)		
	Temperatura (°C) (x_1)	pH (x_2)	Atividade enzimática (U_S)
1	25 (-1)	4,0 (-1)	0,512
2	25 (-1)	6,0 (1)	0,364
3	65 (1)	4,0 (-1)	1,016
4	65 (1)	6,0 (1)	0,66
5	22 (- α)	5,0 (0)	0,388
6	68 (+ α)	5,0 (0)	0,756
7	45 (0)	3,85 (- α)	1,316
8	45 (0)	6,15 (+ α)	0,72
9	45 (0)	5,0 (0)	0,948
10	45 (0)	5,0 (0)	0,982
11	45 (0)	5,0 (0)	1,08

Ao analisar a Tabela 4.8 nota-se que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,364 U_S , temperatura de 25°C e pH 4,0, a 1,316 U_S , para a temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$ e pH 3,85.

Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função do pH e temperatura realizou-se uma regressão múltipla utilizando o *software Statistica 7.0* e analisou os valores de **p** encontrados pelo teste *t-Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentam níveis de significância menores que 10%. Em que X_1 representa a temperatura em °C e X_2 representa o pH. Na Tabela 4.9 estão apresentados os parâmetros lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações das variáveis estudadas.

Tabela 4.9 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	1,012557	0,050782	0,000006
X ₁ (L)	0,184262	0,071916	0,003694
X ₁ (Q)	-0,349987	0,099475	0,000895
X ₂ (L)	-0,179079	0,071916	0,004175
X ₂ (Q)	-0,011242	0,099475	0,830129
X ₁ X ₂	-0,052000	0,092611	0,312455

Ao utilizar os resultados da atividade enzimática apresentados na Tabela 4.8, após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, obteve-se a Equação 4.9 completa com todos os parâmetros:

$$Atividade = 1,012557 + 0,184262X_1 - 0,349987X_1^2 - 0,179079X_2 - 0,011242X_2^2 - 0,052X_1X_2 \quad (4.9)$$

As variáveis significativas, que apresentaram nível de significância inferior a 10%, e seus respectivos coeficientes de regressão são apresentados na Tabela 4.10. O modelo com apenas variáveis significativas codificadas está representado na Equação ajustada 4.10.

Tabela 4.10 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	1,005777	0,038914	0,000000
X ₁ (L)	0,184262	0,068292	0,001012
X ₁ (Q)	-0,349987	0,094461	0,000148
X ₂ (L)	-0,179079	0,068292	0,001193

$$Atividade = 1,00577 + 0,184262X_1 - 0,349987X_1^2 - 0,179079X_2 \quad (4.10)$$

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,94 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na obtenção da atividade de enzima imobilizada, mostrando que 94% da variabilidade dos dados foram explicadas pela Equação 4.10.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.11, verifica-se que o F_{calc} foi altamente significativo ($p < 0,003$). O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.12.

Tabela 4.11 – Análise da variância (ANOVA) para a resposta de atividade enzimática resultante da avaliação da influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	0,8630	3	0,2877	111,5358	0,0023
Resíduos	0,0541	7	0,0077		
Total	0,9171	10			

$$F_T = F_{3; 7; 0,1} = 3,07$$

A Figura 4.11 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.12 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

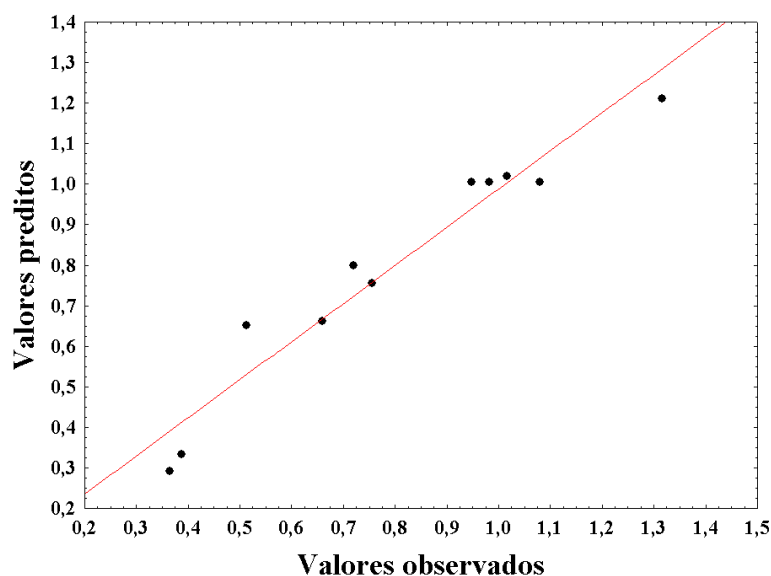


Figura 4.11 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática resultante da avaliação da influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.

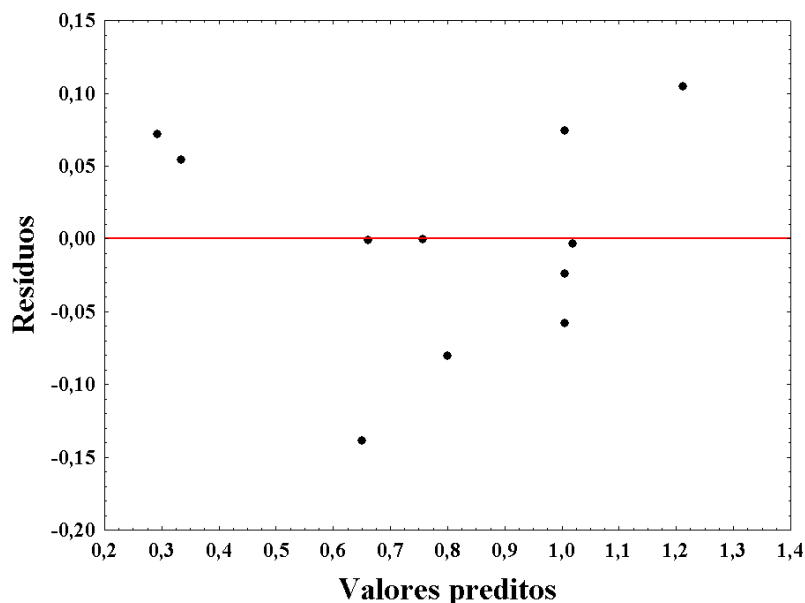


Figura 4.12 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática resultante da avaliação da influência conjunta da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada.

Observando a Figura 4.11, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na Figura 4.12, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir a superfície de resposta e estudar a influência da temperatura e pH na atividade de enzima imobilizada em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada.

Como o modelo foi significativo, assim foi possível construir uma superfície de resposta para analisar a região de interesse, com o uso da Equação 4.10. A superfície esta representada na Figura 4.13.

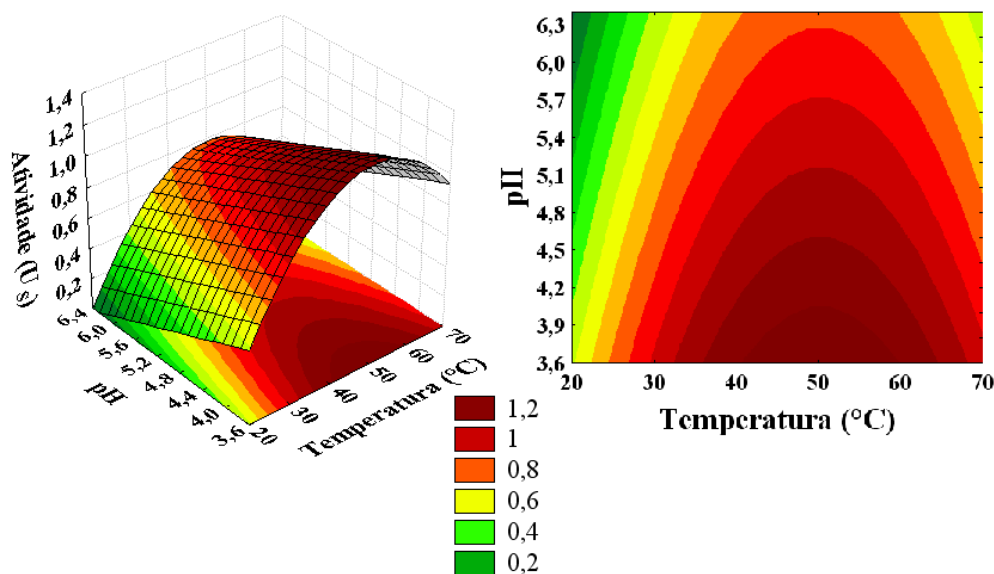


Figura 4.13 - Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.

Observa-se pela superfície de resposta apresentada na Figura 4.13 que para uma faixa de temperatura e pH próximos ao ponto central do PCC, a atividade enzimática obtida é máxima. Assim a faixa de temperatura que alcança a máxima atividade está entre $40 \text{ a } 60 \pm 1^\circ\text{C}$ e o intervalo de pH está compreendido entre 3,6 e 4,0.

Na maioria dos trabalhos citados na literatura as faixas de temperatura e pH ótimos estão próximos à encontrada neste trabalho. No trabalho de Bagal e Karve (2006), as influências da temperatura e do pH foram analisadas isoladamente uma da outra, mas mesmo assim obtiveram resultados próximos aos deste estudo. Bagal e Karve (2006) obtiveram uma faixa de temperatura entre $30 \text{ e } 50^\circ\text{C}$ que resultou em alta atividade e o pH 4,5 foi o responsável pela maior atividade enzimática.

Ao observar a superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de invertase imobilizada seguida do processo de ligação cruzada, nota-se que a faixa de temperatura que maximiza a atividade enzimática é de $40 \text{ a } 60^\circ\text{C}$ combinada a valores de pH entre 3,6 e 4,2..

Para a validação do modelo, foram realizados experimentos nas condições do ponto ótimo encontrado e as atividades obtidas foram $1,3808U_s$ e $1,4216U_s$. Realizou-se também experimentos nas temperaturas de $55 \text{ e } 60 \pm 1^\circ\text{C}$ com o objetivo de observar o comportamento de invertase imobilizada com o aumento da temperatura em tampão acetato pH 4, obtendo-se respectivamente $1,332U_s$ (erro relativo igual a 0,238); e $1,144U_s$ (erro relativo igual a 0,111). Estes resultados indicam a boa reprodutibilidade do experimento,

permitindo assim trabalhar com temperaturas mais altas e menores valores de pH para estudar a influência da temperatura e pH na atividade de invertase imobilizada com o uso do processo de ligação cruzada combinado a adsorção iônica em Duolite A-568. Estes valores confirmam a tendência apresentada pela superfície de resposta apresentada na Figura 4.14, em que valores de temperaturas maiores que $55 \pm 1^\circ\text{C}$ causam uma queda na atividade enzimática.

Li *et al.*, (2010) imobilizaram nuclease P1 em resina de macroporos absorventes fortemente polar (SPPSD). A maior atividade obtida para o biocatalisador livre e imobilizado foi a pH 4,5.

Vujcic *et al.*, (2011) estudaram o efeito do pH na atividade de invertase livre e imobilizada em paredes celulares (CWI) a diferentes valores de pH a 25°C . O biocatalisador livre e imobilizado apresentou máxima atividade na faixa de pH de 4 a 5.

Karkas *et al.*, (2012) obtiveram a máxima atividade de invertase na faixa de pH de 5 a 7, com o pH ótimo de 5,5. A temperatura ótima encontrada foi de 60°C . Geralmente, invertase de diferentes micro-organismos apresentam altas atividades na faixa de temperatura de $50 - 90^\circ\text{C}$.

Raj *et al.*, (2011) estudaram o efeito da temperatura na atividade de invertase livre e imobilizada covalentemente em funções de nanogel na faixa de 25 a 75°C . Uma rápida perda na atividade foi observada em temperaturas acima de 45°C no caso da enzima livre e um aumento na atividade da enzima imobilizada na faixa de 60 a 65°C .

4.3.5 Estudo da estabilidade de estocagem de invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada

A invertase imobilizada nas condições ótimas apresentadas em 3.6.3 seguida do processo de ligação cruzada nas condições ótimas encontradas em 3.7.4.1, foi estocada em geladeira (temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$), tampão pH 4,9 (pH ótimo encontrado por Marquez *et al.*, (2008)), por um período de 60 dias. Inicialmente a atividade residual foi medida a cada 7 dias, posteriormente a cada 14 dias, pelo método das taxas iniciais (3.2.1), sob as condições ótimas de hidrólise encontradas por Marquez *et al.*, (2008); temperatura ótima de hidrólise da sacarose: $49 \pm 1^\circ\text{C}$, tampão acetato pH da solução de sacarose: 4,9, concentração de sacarose no meio: 50g/L. O perfil da atividade relativa (A_0) ao longo do tempo está representada na Figura 4.14.

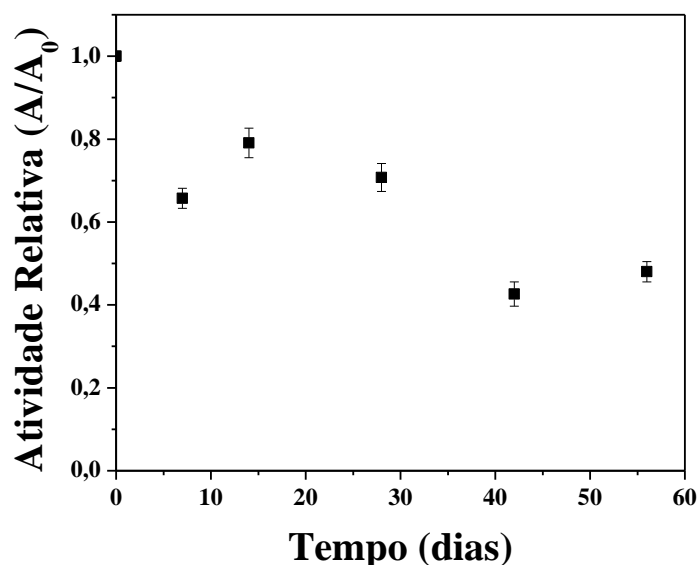


Figura 4.14 – Estabilidade de estocagem de invertase imobilizada. Estocagem a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ em tampão acetato 0,1 M, pH 4,9; testes em reator tipo cesta (batelada), meio reacional: 40°C , solução de sacarose 50 g/L (tampão acetato 0,1 M, pH 4,9).

Segundo Zanin e Moraes (2004) a estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas em solução ou secas, geralmente é superior àquela da enzima livre, porém, isto depende do método de imobilização, do suporte e da solução em que está estocada. Ao analisar a Figura 4.14, nota-se que a invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada após 60 dias, apresentou uma queda de 55,97% em sua atividade, indicando a baixa manutenção da estabilidade da mesma frente à estocagem diante das condições adotadas.

Haider e Hussain (2007) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por oclusão em alginato de cálcio, reticulado com concanavalina A e obtiveram uma atividade de 93% em relação à inicial após 2 meses de estocagem a 4°C .

4.4 Testes em Reator Tipo Leito Fixo

4.4.1 Influência conjunta da concentração de substrato, tempo de residência e temperatura na conversão de sacarose

Um Planejamento Composto Central (PCC) foi proposto para o estudo da influência conjunta da concentração de sacarose em g/L (X_1), tempo de residência em minutos (X_2) e temperatura em $^\circ\text{C}$ (X_3), na hidrólise de sacarose pela invertase imobilizada em Duolite A-

568 seguida pelo processo de ligação cruzada, em reator de leito fixo. A matriz do PCC e a conversão de sacarose em xarope de açúcar invertido está apresentada na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Matriz do Planejamento Composto Central para a influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			Conversão (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	
	Concentração de Sacarose (g/L)	Tempo de Residência (min)	Temperatura (°C)	
1	400 (-1)	30 (-1)	30 (-1)	100
2	400 (-1)	30 (-1)	46 (1)	100
3	400 (-1)	50 (1)	30 (-1)	100
4	400 (-1)	50 (1)	46 (1)	100
5	700 (1)	30 (-1)	30 (-1)	59,66
6	700 (1)	30 (-1)	46 (1)	79,81
7	700 (1)	50 (1)	30 (-1)	76,1
8	700 (1)	50 (1)	46 (1)	96,7
9	347 (- α)	40 (0)	38 (0)	100
10	753 (α)	40 (0)	38 (0)	79,8
11	550 (0)	26,5 (- α)	38 (0)	96,7
12	550 (0)	53,5 (α)	38 (0)	99,59
13	550 (0)	40 (0)	27 (- α)	73,51
14	550 (0)	40 (0)	49 (α)	89,56
15	550 (0)	40 (0)	38 (0)	91,68
16	550 (0)	40 (0)	38 (0)	91,79
17	550 (0)	40 (0)	38 (0)	93

Ao observar-se a Tabela 4.12 nota-se que para concentrações de sacarose de 347 e 400 g/L obteve-se conversões totais, justificando o aumento dos valores da faixa de concentração de sacarose e tempo de residência empregados no PCC apresentado em 3.7.4.1.

Inicialmente como apresentado em 3.2.5.2 utilizou-se o tampão acetato pH 4, pH ótimo de atividade enzimática encontrado em 3.2.4.4.2. Porém, com o objetivo de se obter um xarope com alto teor de glicose e frutose a nível comercial (pH entre 4,5 e 5,5 (MOROZ *et*

al., 1973)), realizou-se testes comparativos com tampão acetato 10^{-1}M pH 5, como pode ser visto na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Comparação entre valores de conversão de substrato, em reator tipo leito fixo, para solução de sacarose em tampão acetato pH 4 e 5.

Solução de Sacarose em Tampão acetato 10^{-1}M pH 4				
Experimento	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo de Residência (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Conversão (%)
1	700 (+1)	50 (1)	30 (-1)	73,23
2	700 (+1)	50 (1)	46 (1)	75,94
3	400 (-1)	50 (1)	30 (-1)	100
4	400 (-1)	50 (1)	46 (1)	92,11

Solução de Sacarose em Tampão acetato 10^{-1}M pH 5				
Experimento	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo de Residência (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Conversão (%)
1	700 (+1)	50 (1)	30 (-1)	76,10
2	700 (+1)	50 (1)	46 (1)	75,96
3	400 (-1)	50 (1)	30 (-1)	100
4	400 (-1)	50 (1)	46 (1)	100

Ao observar a Tabela 4.13 nota-se que os valores de conversão para os experimentos realizados com solução de sacarose em tampão acetato 10^{-1}M pH 4 e tampão acetato 10^{-1}M pH 5 apresentaram-se bastantes próximos. Para o experimento com concentração de 700 g/L de sacarose, tempo de residência de 50 min e temperatura de 46°C , realizado em tampão acetato pH 4 obteve-se uma conversão de 75,95%, já o experimento realizado em tampão acetato pH 5, obteve-se uma conversão de 75,97%, apresentado um erro relativo de 0,026%. Assim diante dos resultados apresentado na Tabela 4.13, utilizou-se tampão acetato 10^{-1}M pH 5 no preparo da solução de sacarose dos experimentos subseqüentes.

Para a conversão de sacarose em glicose e frutose, conforme a Tabela 4.12, pode-se observar que os resultados de conversão de sacarose variaram de 59,66 a 100%. Obteve-se total conversão nos experimentos 1,2,3 e 4, todos com concentração de sacarose de 400g/L, tempos de residência de 30 e 50 min e temperaturas de 30 e 46°C. No experimento 9, também obteve-se conversão total, com a menor concentração de sacarose estudada no PCC, igual a 347 g/L, tempo de residência de 40 min e temperatura do ponto central de $38 \pm 1^\circ\text{C}$. A menor conversão obtida igual a 59,66% foi no experimento 5, com concentração de sacarose de 700 g/L, tempo de residência de 30 min e temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Com os resultados experimentais de conversão de substrato em função da concentração de sacarose, temperatura e tempo de residência realizou-se uma regressão múltipla utilizando o *software Statistica 7.0* e analisou os valores de p encontrados pelo teste *t-Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentam níveis de significância menores que 10%. Em que X_1 representa a concentração de sacarose em g/L, X_2 tempo de residência em minutos e X_3 a temperatura em $^\circ\text{C}$. Estão representados na Tabela 4.14 os parâmetros lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações das três variáveis estudadas.

Tabela 4.14 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	91,96432	1,498636	0,000000
X_1 (L)	-9,86658	1,691043	0,000008
X_1 (Q)	-0,99267	2,230219	0,402917
X_2 (L)	3,19335	1,691043	0,006921
X_2 (Q)	3,51046	2,230219	0,016195
X_3 (L)	5,35656	1,691043	0,000391
X_3 (Q)	-5,56133	2,230219	0,001588
$X_1 X_2$	4,16625	2,041712	0,004683
$X_1 X_3$	5,09375	2,041712	0,001584
$X_2 X_3$	0,05625	2,041712	0,957598

Utilizando os resultados de conversão de sacarose apresentados na Tabela 4.14, após a realização da regressão múltipla pelo *software Statistica 7.0*, obteve-se a Equação 4.11 completa com todos os parâmetros:

$$\text{Conversão} = 91,96432 - 9,86658X_1 - 0,99267X_1^2 + 3,19335X_2 + 3,51046X_2^2 + 5,35656X_3 + -5,56133X_3^2 + 4,16625X_1X_2 + 5,09375X_1X_3 + 0,05625X_2X_3 \quad (4.11)$$

Tabela 4.15 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos aplicada ao PCC para avaliar influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	91,28336	1,199367	0,000000
X ₁ (L)	-9,86658	1,573820	0,000001
X ₂ (L)	3,19335	1,573820	0,002850
X ₂ (Q)	3,51046	2,075620	0,008094
X ₃ (L)	5,35656	1,573820	0,000078
X ₃ (Q)	-5,56133	2,075620	0,000457
X ₁ X ₂	4,16625	1,900180	0,001758
X ₁ X ₃	5,09375	1,900180	0,000456

O modelo com apenas as variáveis significativas codificadas e seus respectivos coeficientes de regressão está representado na Equação ajustada 4.12.

$$\text{Conversão} = 91,28336 - 9,86658X_1 + 3,19335X_2 + 3,51046X_2^2 + 5,35656X_3 + -5,56133X_3^2 + 4,16625X_1X_2 + 5,09375X_1X_3 \quad (4.12)$$

Ao ajustar os dados experimentais obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,975 indicando um ajuste adequado dos dados experimentais na obtenção da conversão de sacarose em açúcar redutor, mostrando que 97,54% da variabilidade dos dados foram explicadas pela Equação 4.12.

Através da Equação 4.12 pode-se notar a forte dependência da conversão de sacarose em relação à concentração de substrato. Já que o coeficiente de regressão desta variável

apresentou o maior valor em módulo. Sendo que o aumento desta variável causa uma diminuição na resposta.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.16, verifica-se que o F_{calc} foi altamente significativo ($p < 0,02$). O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.15 e 4.16.

Tabela 4.16 – Análise de Variância (ANOVA) para valores de conversão de sacarose resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	2225,238	7	317,8911	308,1462	0,0137
Resíduos	64,992	9	7,5546		
Total	2290,230	16			

$$F_T = F_{7;9; 0,1} = 2,51$$

A Figura 4.15 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.16 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

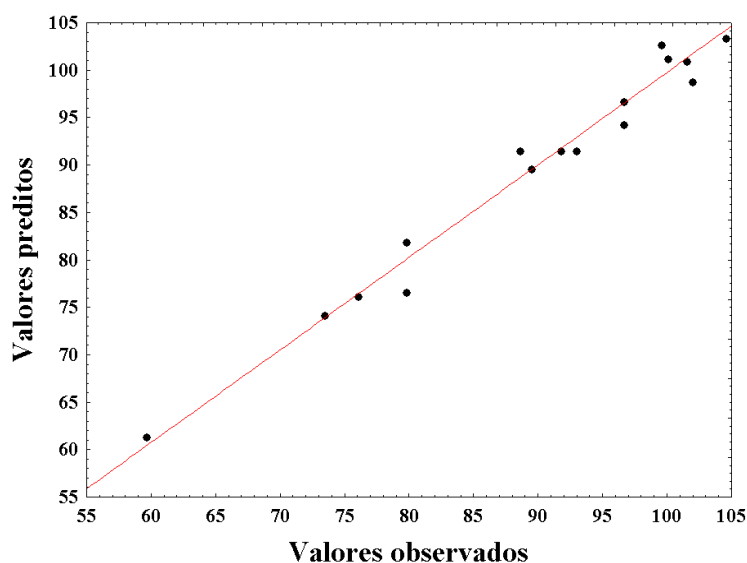


Figura 4.15 – Valores preditos em função dos valores observados para valores de conversão de substrato resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

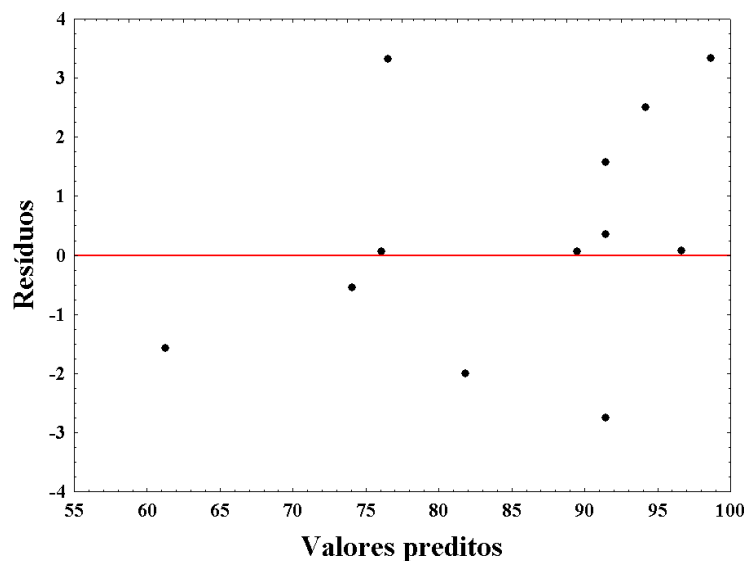


Figura 4.16 – Distribuição dos resíduos relativa para valores de conversão de substrato resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Observando a Figura 4.15, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na Figura 4.16, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir as superfícies de resposta e estudar a influência dos parâmetros dois a dois na conversão de sacarose em açúcar redutor para analisar as regiões de interesse. As superfícies estão representadas nas Figuras 4.17, 4.18, 4.19.

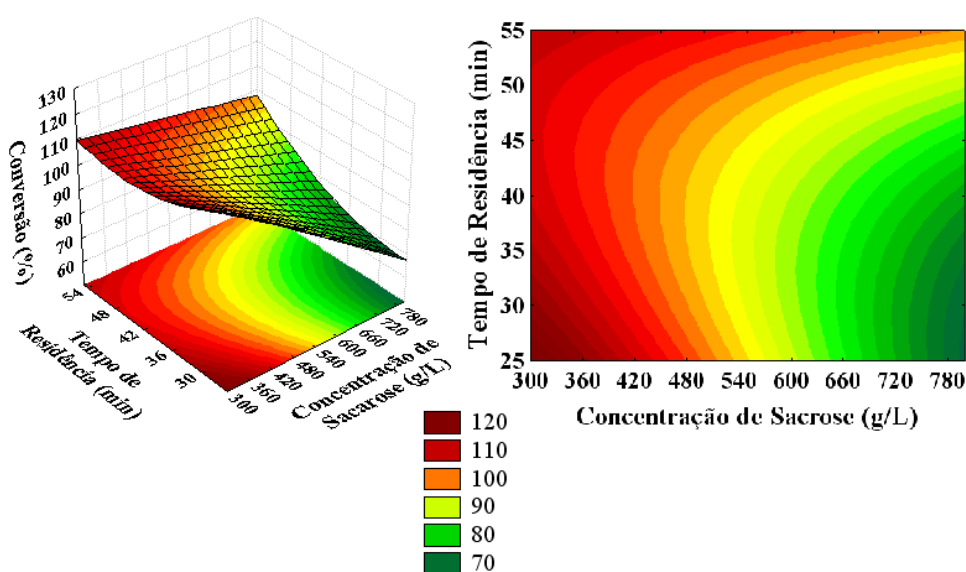


Figura 4.17 – Superfície de resposta da influência da concentração de sacarose e do tempo de residência na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.

Observa-se pela superfície de resposta apresentada na Figura 4.17 que para uma faixa de concentração de sacarose menores de 300 a 420 g/L combinadas a tempos de residência entre 25 e 30 min a conversão de sacarose em xarope de açúcar invertido obtida é máxima.

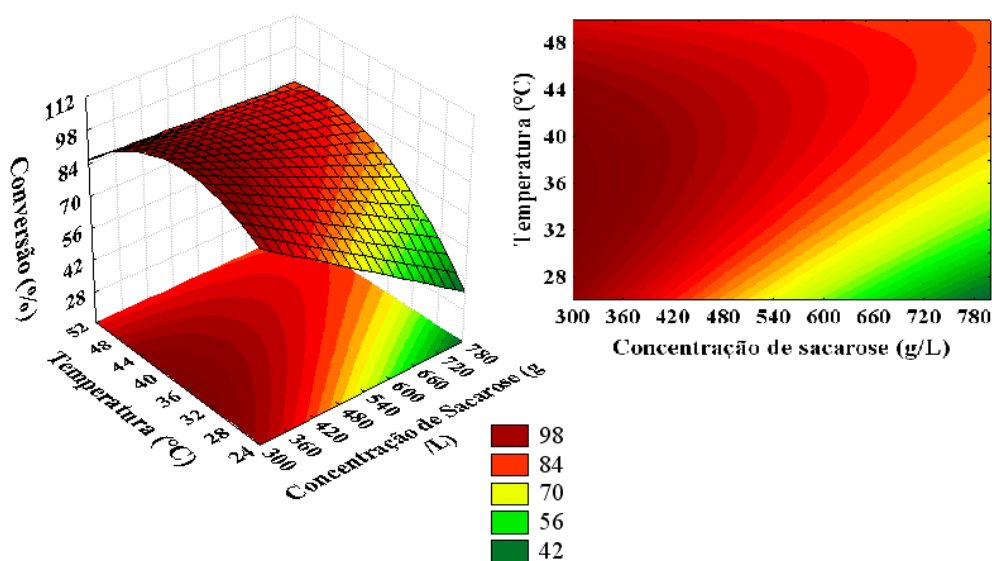


Figura 4.18 – Superfície de resposta da influência da concentração de sacarose e da temperatura na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.

Ao observar a influência conjunta da concentração de sacarose e temperatura na conversão de substrato na Figura 4.18, observa-se uma região de máxima conversão para temperaturas entre 30 e 45°C combinadas a concentrações inferiores a 420 g/L de sacarose.

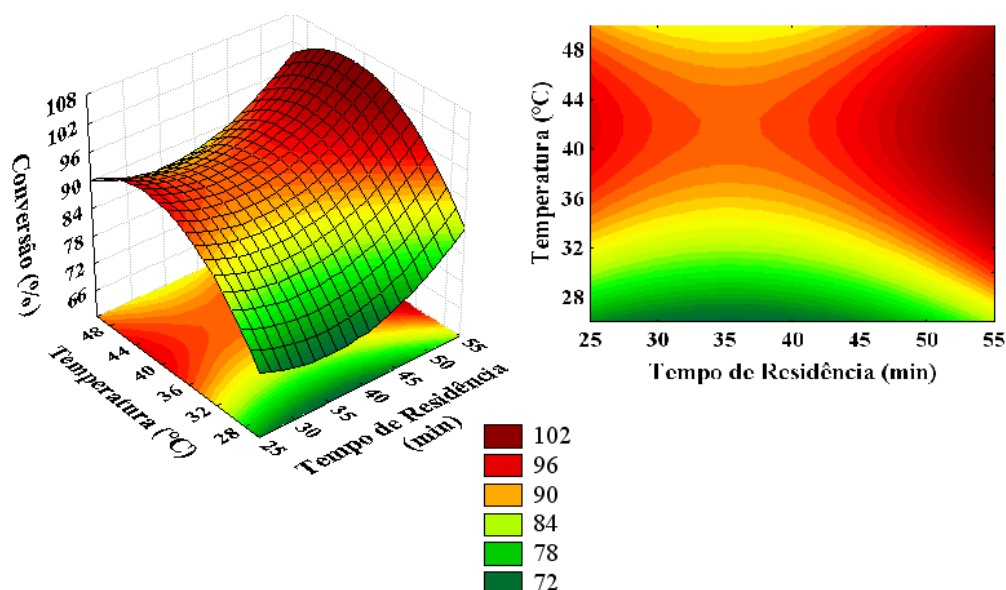


Figura 4.19 – Superfície de resposta da influência do tempo de residência e da temperatura na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.

Analisando a Figura 4.19 observa-se a influência conjunta do tempo de residência e da temperatura na conversão de substrato. Nota-se que para obter-se altas conversões de sacarose devem-se combinar temperaturas na faixa de 38 a 46°C a tempos de residências em torno de 55 min.

Com o objetivo de se obter xarope de açúcar invertido a concentrações de interesse comercial (xaropes com 70% a 80% de açúcares redutores (PODADERA, 2007)) explorou-se maiores concentrações de substrato a partir de um novo PCC com três variáveis com três réplicas centrais e três variáveis totalizando 17 experimentos, com α de ortogonalidade igual a 1,35313. Em que X_1 corresponde a concentração de sacarose em g/L, X_2 tempo de residência em min e X_3 temperatura em °C. Os valores de conversão de sacarose em glicose e frutose para os 17 experimentos estão representados na Tabela 4.17 abaixo.

Tabela 4.17 – Matriz Planejamento Composto Central da influência conjunta da concentração de sacarose, temperatura e tempo de residência no reator tipo leito fixo.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			Conversão (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	
	Concentração de sacarose (g/L)	Tempo de Residência (min)	Temperatura (°C)	
1	600 (-1)	60 (-1)	30 (-1)	90,715
2	600 (-1)	60 (-1)	46 (1)	92,35
3	600 (-1)	90 (1)	30 (-1)	91,56
4	600 (-1)	90 (1)	46 (1)	94,01
5	800 (1)	60 (-1)	30 (-1)	69,97
6	800 (1)	60 (-1)	46 (1)	91,68
7	800 (1)	90 (1)	30 (-1)	77,06
8	800 (1)	90 (1)	46 (1)	98,7
9	564,7 (- α)	75 (0)	38 (0)	91,41
10	853,3 (α)	75 (0)	38 (0)	77,02
11	700 (0)	54,7 (- α)	38 (0)	85,24
12	700 (0)	95,3 (α)	38 (0)	100
13	700 (0)	75 (0)	27 (- α)	85,33
14	700 (0)	75 (0)	49 (α)	93,81
15	700 (0)	75 (0)	38 (0)	91,55
16	700 (0)	75 (0)	38 (0)	91,61
17	700 (0)	75 (0)	38 (0)	90,82

Para a conversão de sacarose em glicose e frutose, conforme a Tabela 4.17, pode-se observar que os resultados de conversão de sacarose variaram de 69,97 a 100%. Obteve-se total conversão no experimento 12, com concentração de sacarose de 700g/L, tempo de residência de 95,3 min e temperatura de 38°C. No experimento 8, alcançou-se uma conversão de 98,7%, com concentração de sacarose de 800 g/L, tempo de residência de 90 min e temperatura de 46°C. A menor conversão obtida de 69,97 % foi no experimento 5, com concentração alta de sacarose de 800 g/L, tempo de residência de 60 min e temperatura de 30°C. Os resultados de conversão apresentados na Tabela 4.18 expressam a inter dependência das variáveis na influência da conversão de sacarose. Como visto nas Figuras 4.15, 4.16 e

4.17 para altas concentrações de sacarose devem-se combinar maiores temperaturas e tempos de residência. Como no experimento 8, em que combinou-se o tempo de 90 min (+1) com a temperatura de 46 °C (+1) e obteve-se uma das maiores conversões do PCC.

Para validar o modelo foram realizados dois experimentos ambos nas condições em que se alcançaram os maiores valores de conversão de sacarose. O primeiro foi na concentração de 700 g/L, tempo de residência de 95,3 min e temperatura de 38°C, o qual apresentou uma conversão de 99,105%, com erro relativo de 0,895%. O segundo experimento de validação foi a 800 g/L, tempo de residência de 90 min e temperatura de 46°C, alcançando uma conversão de 97,839%, com erro relativo de 0,00872. Os valores de erros relativos calculados indicam uma boa reprodutibilidade dos experimentos.

Com os resultados experimentais de conversão de sacarose em função da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura realizou-se uma regressão múltipla utilizando o *software Statistica 7.0* e analisou os valores de **p** encontrados pelo teste *t- Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentam níveis de significância menores que 10%. Estão representados na Tabela 4.18 os parâmetros lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das duas variáveis estudadas.

Tabela 4.18 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	91,02011	1,472316	0,000000
X ₁ (L)	-4,34719	1,661344	0,001208
X ₁ (Q)	-3,50188	2,191051	0,015139
X ₂ (L)	3,15682	1,661344	0,006712
X ₂ (Q)	1,13451	2,191051	0,334840
X ₃ (L)	5,05145	1,661344	0,000500
X ₃ (Q)	-0,57717	2,191051	0,614581
X ₁ X ₂	1,45062	2,005854	0,191315
X ₁ X ₃	4,90813	2,005854	0,001766
X ₂ X ₃	0,09312	2,005854	0,928622

Utilizando os resultados de conversão de sacarose apresentados na Tabela 4.14, após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, obteve-se a Equação 4.13 completa com todos os parâmetros:

$$\begin{aligned} \text{Conversão} = & 91,02011 - 4,34719X_1 - 3,50188X_1^2 + 3,15682X_2 + 1,13451X_2^2 + 5,05145X_3 - 0,57717X_3^2 + \\ & + 1,45062X_1X_2 + 4,90813X_1X_3 + 0,09312X_2X_3 \end{aligned} \quad (4.13)$$

Tabela 4.19 – Resultados da regressão múltipla com os parâmetros significativos aplicada ao PCC para avaliar a influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	91,38077	0,984286	0,000000
X ₁ (L)	-4,34719	1,604922	0,000211
X ₁ (Q)	-3,48469	2,116639	0,007171
X ₂ (L)	3,13732	1,604922	0,002436
X ₃ (L)	5,05145	1,604922	0,000059
X ₁ X ₃	4,90812	1,937732	0,000363

O modelo com apenas as variáveis significativas codificadas está representado na Equação ajustada 4.14.

$$\text{Conversão} = 91,38077 - 4,34719X_1 - 3,48469X_1^2 + 3,13732X_2 + 5,05145X_3 + 4,90812X_1X_3 \quad (4.14)$$

A obtenção do valor de 0,9165 para o coeficiente de determinação (R^2) indica um ajuste adequado dos dados experimentais na obtenção da conversão de sacarose em glicose e frutose, mostrando que 91,65% da variabilidade dos dados foram explicadas pela Equação 4.14.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.20, verifica-se que o F_{calc} foi altamente significativo ($p < 0,02$). O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa

concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.21.

Tabela 4.20 – Análise de Variância (ANOVA) para valores de conversão de sacarose resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	905,7249	5	181,145	118,9461	0,010389
Resíduos	83,7609	11	7,6146		
Total	989,4858	16			

$$F_T = F_{5;11;0,1}=2,45$$

A Figura 4.20 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.21 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero.

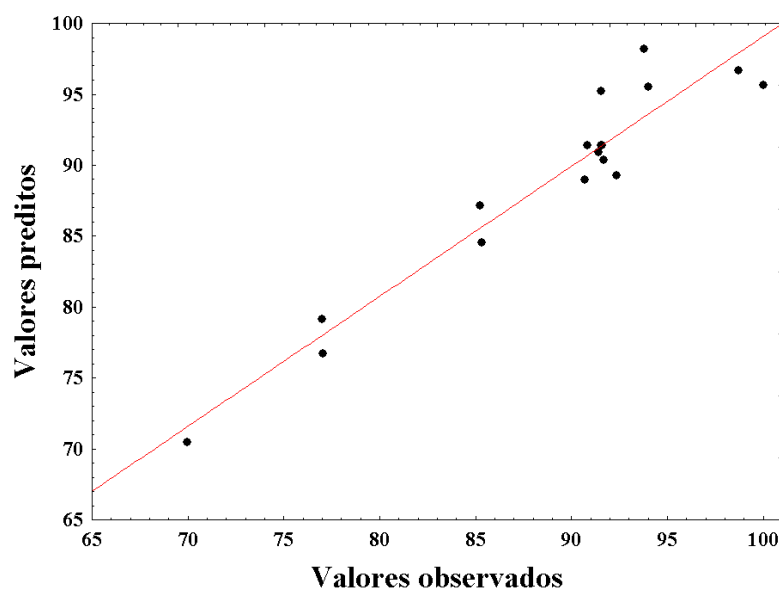


Figura 4.20 – Valores preditos em função dos valores observados para valores de conversão de substrato resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

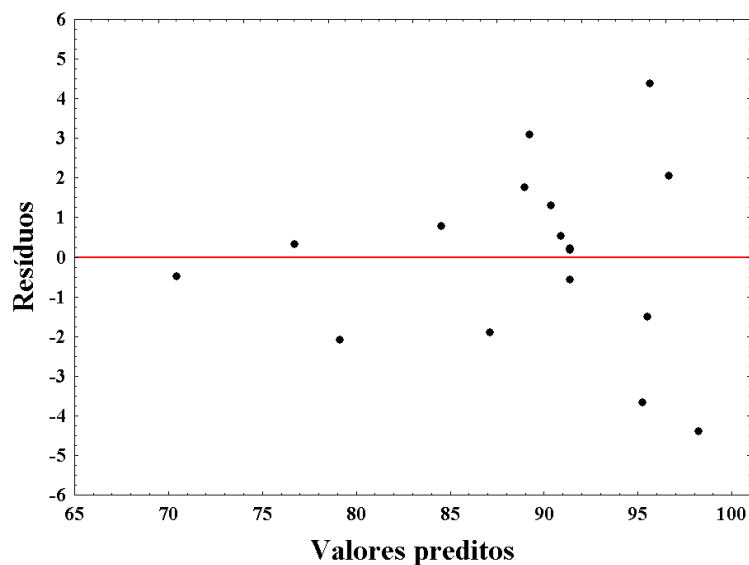


Figura 4.21 – Distribuição dos resíduos relativa para valores de conversão de substrato resultantes da influência conjunta da concentração de sacarose, tempo de residência e temperatura no reator tipo leito fixo.

Observando a Figura 4.20, nota-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica e na Figura 4.21, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo mostrou-se significativo foi possível construir as superfícies de resposta e estudar a influência das variáveis X_1 , X_2 e X_3 tomadas duas a duas na conversão de sacarose em açúcar redutor para analisar as regiões de interesse. As superfícies estão representadas nas Figuras 4.22, 4.23, 4.24.

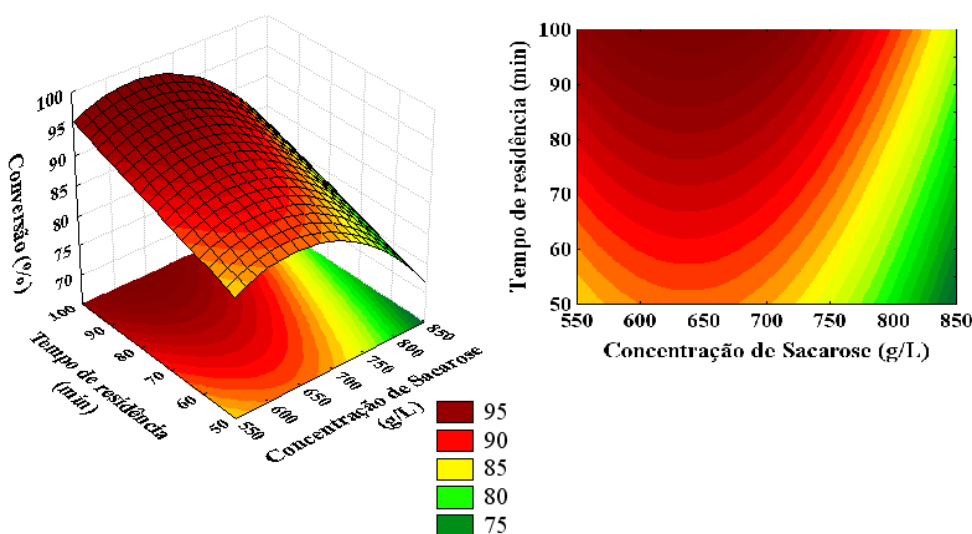


Figura 4.22 – Superfície de resposta da influência da concentração de sacarose e do tempo de residência na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.

Observa-se pela superfície de resposta apresentada na Figura 4.22 que para uma faixa de concentração de sacarose de 600 a 700 g/L e tempo de residência entre 85 e 100 min a conversão de sacarose obtida é máxima.

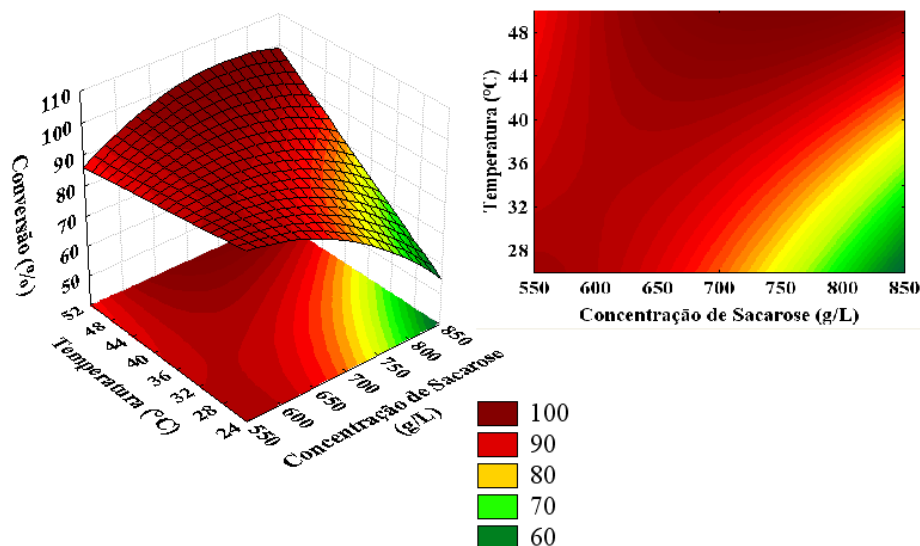


Figura 4.23 – Superfície de resposta da influência da concentração de sacarose e da temperatura na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.

Ao observar a influência conjunta da concentração de sacarose e temperatura na conversão de substrato na da Figura 4.23, observa-se uma região de máxima conversão para temperaturas superiores a 45°C combinadas a concentrações superiores a 700g/L de sacarose. Pode-se observar a temperaturas inferiores a 28°C, combinadas a concentrações de substrato, inferiores a 550g/L, uma região de máxima conversão de sacarose em xarope de açúcar invertido.

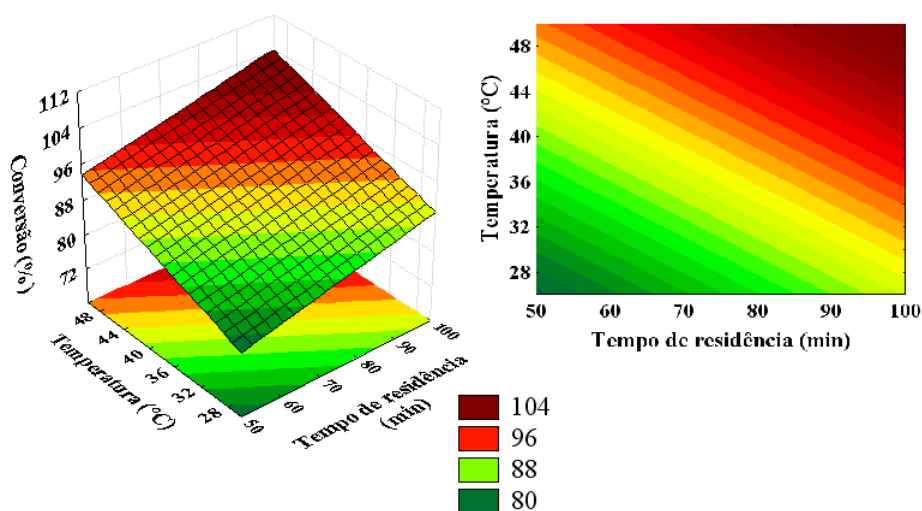


Figura 4.24 – Superfície de resposta da influência do tempo de residência e da temperatura na conversão de substrato por invertase imobilizada em Duolite A-568 seguida do processo de ligação cruzada.

Analisando a Figura 4.24 observa-se a influência conjunta do tempo de residência e da temperatura na conversão de substrato. Nota-se que para obter-se altas conversões de sacarose deve-se combinar temperaturas superiores a 40°C com tempos de residências superiores a 80 min. Ao trabalhar com temperaturas superiores a 40°C deve-se atentar à estabilidade do biocatalisador, propriedade está importante para a operação do reator de leito fixo. Assim como visto nas Figuras 4.22 e 4.23 ao trabalhar com altas concentrações de sacarose, deve-se também trabalhar com altas temperaturas e longos tempos de residências para obtenção de altas conversões de substrato, evidenciando alta atividade do biocatalisador imobilizado.

Pode-se então obter xarope de açúcar invertido de interesse comercial, como visto nas Figuras 4.22, 4.23 e 4.24 em que se obtiveram elevadas conversões de substrato, resultando xaropes com alto teor de açúcares redutores.

Fischer (2010) estudou a conversão de lactose em reator de leito fixo preenchido por β -galactosidade imobilizada por adsorção iônica em Duolite A-568 seguida pelo processo de ligação cruzada. Obtiveram como melhor condição reacional concentração de lactose igual a 50 g/L, e vazão de alimentação igual a 6 mL/min, atingindo uma conversão de 65%.

Tomatoni e Viltolo (2007) estudaram a produção de xarope com alto teor de frutose a partir de invertase imobilizada utilizando um reator de membrana. Concluíram que a conversão de sacarose é dependente da concentração de substrato e da vazão de alimentação. Alcançaram máxima atividade enzimática em tampão acetato pH 5,5, temperatura igual a 30°C, obtendo xaropes com 70% de teor de frutose .

4.4.2 Estudo da estabilidade operacional da invertase imobilizada

A viabilidade de reutilização da enzima imobilizada foi analisada durante aproximadamente 3 dias. O biocatalisador foi previamente ativado conforme item 3.6.1, imobilizado em Duolite A-568 conforme item 3.6.3 seguido pelo processo de ligação cruzada diante das condições ótimas encontradas em 3.7.4.1, colocado no reator de leito fixo, operando em regime contínuo, escoamento ascendente, nas condições ótimas encontradas em 3.8.1:

- Temperatura $38 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Concentração da solução de sacarose: 700 g/L;
- Tampão acetato 10^{-1}M pH 5;
- Tempo de residência de 95,3 min (vazão de alimentação de 0,178 mL/min).

A glicose em cada amostra na saída da coluna foi determinada diariamente de acordo com item 3.5 a fim de acompanhar a conversão de sacarose em glicose e frutose, para estudo da viabilidade em reutilizar-se a enzima imobilizada. O perfil de conversão de sacarose ao longo do tempo está demonstrado na Figura 4.25.

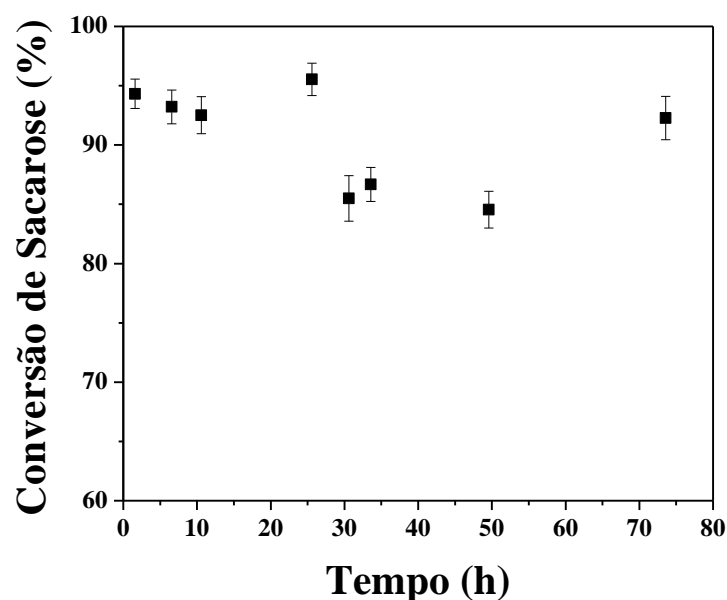


Figura 4.25 – Estabilidade operacional da invertase imobilizada na hidrólise de sacarose em reator de leito fixo em regime contínuo. Condições experimentais: solução de sacarose 700 g/L (tampão acetato pH 5), tempo de residência igual a 95,3 min e temperatura igual a 38°C .

A enzima imobilizada manteve sua atividade hidrolítica durante 73,58 horas, nas condições citadas anteriormente, demonstrando uma queda de 2,17% na conversão de substrato ao longo do período de operação. O menor valor de conversão de sacarose apresentado foi igual a 84,54 %. Esse resultado evidencia que o processo de imobilização foi eficaz na manutenção da estabilidade operacional da enzima imobilizada.

Mariotti *et al.*, (2008) estudaram a estabilidade operacional da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em sílica, em reator de leito fixo, utilizando solução de lactose 45 g/L a pH 4,5, na temperatura de 40°C . Obtiveram como resultado, para vazão de

alimentação de 0,5 mL/min uma redução de 24% após 130 dias de operação. Para a vazão de alimentação de 5 mL/min o reator operou 130 dias como uma redução de 32% na atividade.

Fischer (2010) estudou a estabilidade operacional da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A-568, em reator de leito fixo com vazão de alimentação de solução de lactose 50 g/L igual a 0,3 mL/min. A enzima imobilizada, manteve sua atividade durante 30 dias de operação.

Almeida (2003), obteve 62% de rendimento de açúcar invertido por via enzimática ao operar um sistema de leito fixo utilizando uma concentração inicial de 100 g/L de substrato e tempo de residência de 31,6 minutos, com invertase auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides* 4331. Ao utilizar uma concentração 200g/L de sacarose obteve um rendimento de hidrólise de 38%. Observou também que após a primeira hora de processo o perfil de concentração demonstrou um comportamento estacionário.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A combinação do processo de imobilização por adsorção iônica em Duolite A-568 com o processo de ligação cruzada empregando o agente glutaraldeído levou a um aumento da atividade e estabilidade da enzima invertase.
- O intervalo de estabilidade da invertase imobilizada em relação ao pH foi entre 3,5 e 6, em tampão acetato 10^{-1} M.
- Observou-se uma forte dependência da estabilidade do biocatalisador imobilizada em relação à temperatura. A 63°C , em 10 minutos houve uma queda de 78,87% da atividade em relação à inicial. Para temperatura de 51°C , após 180 minutos, ocorreu queda de apenas 25,74% na atividade.
- O modelo de desativação térmica de primeira ordem descreveu de forma significativa a cinética de desativação térmica da enzima imobilizada em todas as temperaturas estudadas.
- Ao estudar o processo de *cross-linking* a concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação que maximizaram a atividade enzimática, foram respectivamente, 0,6 g/L e 6 horas.
- A temperatura em que a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada apresentou maior atividade foi 50°C . Combinado a esta temperatura o pH ótimo para invertase imobilizada foi igual a 4 (tampão acetato 10^{-1} M).
- Ao estudar a conversão de sacarose em processo contínuo, observou-se que a combinação de altas concentrações de sacarose (700 – 800 g/L), com altos tempo de residência (90 – 95,3 min) e altas temperaturas ($38 - 45^{\circ}\text{C}$) alcançou-se conversões próximas a 100%, resultando em açúcares invertidos com alto teor de glicose e frutose.
- A enzima imobilizada, manteve sua atividade durante 73,58 horas de operação em reator de leito fixo, com vazão de alimentação de solução de sacarose de 700 g/L, tempo de residência de 95,3 min e temperatura de 38°C .
- Com base nos altos valores obtidos de conversão de sacarose em açúcar invertido em processo contínuo combinados a concentrações de substratos na faixa de 700 a

800 g/L, pode-se afirmar que a invertase imobilizada em Duolite A-568 apresenta potencial industrial para produção de xarope com altos teores de glicose e frutose.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o modelo cinético que melhor descreve a hidrólise em reator do tipo leito fixo. Avaliar a influência da concentração de substrato e produtos na cinética da reação da enzima imobilizada em Duolite A-568 por adsorção iônica e ligação cruzada.
- Estudar o reator tipo leito fixo com reciclo com objetivo de minimizar o tempo de residência na conversão de sacarose por invertase imobilizada.
- Avaliar a utilização de reator de leito fluidizado na conversão de sacarose em açúcar invertido.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W.S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. 25 de abril de 2008. 161f. Tese Faculdade de Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

AHMAD, S.; ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Immobilization and stabilization of invertase *Cajanus cajan* lectin support. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 121-127, 2001.

AKGÖL, S.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol micropheres. **Food Chemistry**, v. 74, p. 281-288, 2001.

ALMEIDA A. C. S.; ARAÚJO L. C.; COSTA A. M.; ABREU C. A. M.; LIMA M. A. G. A.; PALHA M. L. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Process Biotechnology**, v. 8, 2005.

ALMEIDA, S. A. C. **Estudo do Processo Contínuo para Produção de Açúcar Invertido por via Enzimática**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

AMAYA-DELGADO, L.; HIDALGO-LARA, M. E.; MONTES-HORCASISTAS, M. C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. **Food Chemistry**, v.99, p. 299-304, 2005.

ANSARI, S. A. e HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**. v.30, p. 512–523, 2012.

ARICA M. Y.; BAYRAMOGLU G. Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly (GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, p. 131-138, 2006.

ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for b-fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v.37, p. 331–338, 2001.

AZODI, M.; FALAMAKI, C.; MOHSENIFAR, A. Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on functionalized porous silicon. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 69, p. 154–160, 2011.

BAGAL, D.; KARVE, M. S. Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose-gvar gum biopolymer membrane. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p.316-321, 2006.

BAILEY, J.E. e OLLIS D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2 ed. New York, McGraw-Hill, 1986.

BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K. A., KOUMATSU, K., YOSHIMOTO, M. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, pp. 33-41, 2004.

BAYRAMOĞLU, G.; AKGÖL, S.; BULUT, A.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Covalente immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl metacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 117-126, 2003.

BERGAMASCO R.; BASSETTI F.J.; MORAES F.; ZANIN G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brazil Journal Chemical Engineering**, v.17, p. 4-7, 2000.

BETANCOR, L.; FUENTES, M.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, C.; GUIÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 32, p. 97-101, 2006.

BLANCO, R. M. e GUIÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme Microbial Technology**, 11:360-366, 1989.

BORA, U.; KANNAN, K.; NAHAR, P. A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. **Journal of Membrane Science**, v. 250, p. 215-222, 2005.

BOX G. E. P., HUNTER W. G., HUNTER T.S. Statistics for Experimenters. United States of America and Canada, John Wiley & Sons, Inc, 1978.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: GUIÁN, J. M. (Ed.). Immobilization of enzymes and cells. **Totowa: Humana Press**. cap. 2, p. 15-30, 2006.

BRUDER, F.; MOROZ, R.D. Production of liquid sugar from raw sugar. **Sugar y Azúcar**, v.76, n.3, p.34-40, 1981.

BUTTERFIELD, DA; BHATTACHARYYA, D; DAUNERT, S; BACHAS, L. Catalytic biofunctional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays: a review. **Journal of Membrane Science**. v.181, p.29-37, 2001.

CABRAL, J. M. F. Estudos de imobilização de enzimas pelo método dos metais de transição. 1982. Tese - Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa, 1982.

CABRAL, F. A. **Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio. 1989. Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), Campinas.

CADENA, D.P.G.; JERONIMO, R.A.S.; MELO, J.M.; SILVA, R.A.; FILHO, J.L.L.; PIMENTEL, M.C.B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 1595–1602, 2010.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, A. B. J; Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos; **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ano IX, número 36, p. 48-57; 2006.

CANTARELLI, C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. **Journal of Food Science**, n.3, p.3-20, 1989.

CAO L. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. 2005.

CAO L. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 9, p. 217-226, 2005.

CARBERRY J.J. **Chemical and Catalytic Reaction Engineering**. New York, Mc-Graw-Hill, 1976.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de Biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos, **Revista Analytica**, N°23, p. 60-70; 2006

CHANG M., JUANG R. Activities, stabilities and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p. 75-82, 2005.

CHEMELLO, E. A química na cozinha apresenta: o açúcar. 2005. Disponível em: <http://www.ciadaescola.com.br/zoom/materia.asp?materia=291&pagina=6>. Acesso em: março, 2012.

CHEN, Y.; KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. **European Polymer Journal**, v. 36, p. 2095-2103, 2000.

CHIBATA I. **Immobilized Enzymes-Research and Development**. Tokyo. Kadansha Ltd, 1978.

COLLINS H.C.; BRAGA G. L.; BONATO P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Editora da Unicamp. Campinas, 1993.

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. England: Ellis Horwood. v.10, p.12-50, 1985.

COUTINHO FILHO, U.; RIBEIRO E. J.; MAUGERI FILHO F. Estabilidade de invertase imobilizada em sílica. **Anais do Simpósio Nacional de Fermentação**, 2005.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 52, p. 59-62, 2002.

DALLA-VECCHIA, R.; SEBRÃO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quím. Nova**. v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DANISMAN, T.; TAN, S.; KACAR, Y.; ERGENE, A. Analytical, Nutritional and Clinical Methods: Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA-GMA membrane. **Food Chemistry**, v. 85, p. 461-466, 2004.

DAVIS, P.R.; PRINCE, R.N. Liquid sugar in the food industry: use of sugars and other carbohydrates in the food industry. Washington: American Chemical Society. p. 35-42, 1955. (Advances in chemistry series).

DIXON, M.; WEBB, E. C. *Enzymes*. 3 ed. London, Longman Group Limited, 1979.

EMREGUL E., SUNGUR S., AKBULUT U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. **Food Chemistry**, v. 97, p. 591-597, 2006

ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. **Reactive & Functional Polymers**, v. 45, p. 227-233, 2000.

FERNANDES, P.; ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S. Desing and Characterisation of a Enzyme System for Inulin Hidrolysis. **Food Chemistry**. v. 95, p.77-82, 2006.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; COWAN, D. A.; WOOD, N. P. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. **Enzyme Microbial Technology**, 17:366-372, 1995.

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 136 p., 2010.

FOGLER, H .S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 2ª ed., 838p.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C., CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

FREITAS, L.; SILVA, G. S.; SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **European Food Research and Technology**. v. 233, Number 5, p. 743-750, DOI: 10.1007/s00217-011-1540-7, 2011.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes**. Tese - Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCAR), 2004.

GÁSCON, S.; NEUMANN N. P.; LAMPEN J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 3, p. 33-38, 1981.

GIACOMMINI, C.; IRAZOQUI, G.; BATISA-VIEIRA, F.; BRENA, B. M. Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. **Journal Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v. 11, p. 597-606, 2001.

GÓMEZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 22-27, 2005.

GONZALEZ, L. V. Troca Iônica. Rio Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Disponível em: <[http://www.dema.puc-rio.br/cursos/OUTecAmb/Troca Ionica.ppt](http://www.dema.puc-rio.br/cursos/OUTecAmb/Troca%20Ionica.ppt)>. Acesso em agosto/2011.

GROVES, R. Inversion, invert sugar and invertase. **Candy Industry**, v.163, pt.10, p.18, 1988.

GUIDINI, Z. C. **Imobilização de β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GUIDINI, Z.C; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking, **Biochemical Engineering Journal** (2010), doi:10.1016/j.bej.2010.07.013.

GUISÁN, J. M.; Aldehyde-agarose gels as activated support for immobilization-stabilization of enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J. M.; BASTIDA, A.; CUESTA, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSSEL, C. M. Immobilization-stabilization of α -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. **BioTechnology and Bioengineering**, v.38, p.1144-1152, 1991.

GUISÁN, J. M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. **Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates**. In: BICKERSTAFF, G. F. (Ed.). *Immobilization of enzymes and cells*. Totowa: Humana Press, 1997. cap. 30, p. 261-275.

GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAĞCI, Y.. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 57, p. 57-65, 2003.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. **Hydrolysis of Milk/whey Lactose by β -galactosidase: A Comparative Study of Stirred Batch Process and Packed Bed Reactor Prepared with Calcium Alginate Entrapped Enzyme**. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2008.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38(2), p. 453 – 468, 2009.

HENLEY J. P.; SADANA A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 7, p. 50-60, 1985.

JEFFREY G. H.; BASSET J.; MENDHAM J.; DENNEY R. C. Vogel, Análise Química Quantitativa. Traduzido por Horacio Macedo, 5 ed. Rio de Janeiro, LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1992.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 28(4), p. 253-64. 2008.

JUNK, W.R.; NELSON, O.M.; SHERRILL, M.H. Liquid sugar in food products. **Food Technology**, v1, p.506-518, 1947.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.33-40, 2004.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, v.10, p.157-176, 2000.

KARKAS, T.; ÖNAL, S. Characteristics of invertase partitioned in polyethylene glycol/magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**. v.60, p. 142– 150, 2012.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme Immobilization. **Biotechnology**, v. 7a, p. 347-404, 1987.

KOTWAL, S. M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. **Biotechnology Advances**. v.27, p. 311-322, 2009.

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

KREMER, T.O. **Resinas de Troca Iônica**. São Paulo: Kurita do Brasil, 2007.

LETCA, D.; HEMMERLING. C.; WALTER, M.; WULLBRAND, D.; BUCHHOLZ, K. Immobilization of Recombinant Inulase II from a Genetically Modified *Escherichia coli* Strain. **Roumanian Society of Biological Sciences**. v. 9, p. 1879-1886, 2004.

LI, B.; CHEN, Y.; CHEN, X.; LIU, D.; NIU, H.; XIONG, J.; WU, J.; XIE, J.; BAI, J.; YING, H. A novel immobilization method for nuclease P1 on macroporous absorbent resin with glutaraldehyde cross-linking and determination of its properties. **Bioresource Technology**. v.101, p. 1595–1602, 2010.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnología Industrial: Procesos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, vol. 3, 593p. 2001.

LOPEZ-GALLEGU, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal Biotechnology**. v.116, p. 1-10, 2005.

LOZINSKY, VI; PLIEVA, FM. Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization: Overview of recent research and developments. **Enzyme and Microbial Technology**. v.23, p.227-242, 1998.

MARIGNETTI, M.; MANTOVANI, G. Liquid sugar. **Sugar Technology Reviews**, v.7, p.3-47, 1979/80.

MARIOTTI, M.P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A.R.; and TREVISAN, H.C. Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized β -galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal**. v.51 n.6, p.1233-1240, 2008.

MARIOTTI, M. P. **Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada**. 2000. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

MARIOTTO, R. J. Estágio de Docência – Enzimas, Universidade de São Carlos; 2006.

MARKOGLOU, N.; WAINER, I. W. **Bioanalytical Separations**. New York: Elsevier Science, cap. 7, 2003.

MARQUEZ, L.D.S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

MARQUEZ, L. D. S.; CABRAL, B. V.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 51, p. 86-92, 2008.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBÁN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515, 2000a.

MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the support before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 739-745, 2000b.

MATEO, C.; Increase in conformational stability of enzymes on epoxy-activate supports by favouring additional multipoint covalent attachment, **Enzyme Microbial Technology**. 26, p. 509- 515, 2000c.

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

MESSING, R. A. Carriers for immobilized biologically active systems in advances in biochemical engineering, v. 10, 1978.

MORÉ J. J. The Levenberg-Marquardt Algorithm: Implementation and Theory. In G.A. Watson, (ed.), *Lecture Notes in Mathematics* 630, p. 105-116. Berlin: Springer-Verlag, 1977.

MOROZ, R.D.; SULLIVA, J.P.; TROY, J.P.; BROEG, C.B. Lévulose and invert sugars. **Sugar y Azúcar**, v.68, n.8, p.46-52, 1973.

MOUEDDEB, H.; SANCHEZ, J.; BARDOT, C.; FICK, M. Membrane bioreactor for latic acid production. **Journal of Membrane Science**, v.114, p.59-71, 1996.

MUSSATO I. S.; FERNANDES M.; MILAGRES F. M. A.; Enzimas – Poderosa ferramenta na indústria, **Revista Ciência Hoje**, Edição 285; 2009.

NAGASHIMA, M. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.49-58, 1984.

NAJAFPOUR, G. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. Boston: Elsevier, 2007. 421p.

NELSON J. M.; GRIFFIN E. G. Adsorption of invertase, **Journal American Chemical**, v. 38, p. 1109-1114, 1916.

NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABO, J. M.; BHAT, M. K., HOSCHKE, A. **Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386**. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2461-2466, 2005.

OLIVEIRA, M. dos Santos. **Flotação em colunado rejeito remóido do processo de concentração da apatita** (Cap. III e IV). Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 131p, 2004.

OOSTEROM M. W.; BELLE H. J. A.; RANTWIJL F.; SHELDON R.A. Immobilised β -galactosidases and their use in galactoside synthesis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v.134, p. 267-274, 1998.

ÖZDURAL, A. R.; ALKAN-SUNGUR, A.; BOYACI, I. H.; WEBB, C. Determination of Immobilized Enzyme Apparent Kinetic Parameters in Packed-bed Reactors: Presentation of a new Methodology. **Food and Bioproducts Processing**. v. 86, p. 104-108, 2008.

ÖZDURAL A. E.; TANYOLAÇ D.; BOYACI I. H.; MUTLU M.; WEBB C. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 27-36, 2003.

PASCHOALIM, S.A.C. Contribuição ao estudo da hidrólise enzimática da sacarose por células de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação). São Paulo, 1990. 67p. Dissertação de Mestrado - Escola Politécnica - Universidade de São Paulo.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUÍSAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme Microbial Technology*, 36(4):447-454, 2005.

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRON-CALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MATEO, C.; GUÍSAN, J. M.; MILLAN, F. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. *Enzyme Microbial Technology*, v. 31, p.711-718, 2002.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 18, p. 237-255, 1998.

PODADERA, P. **Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixe de elétrons**. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2007.

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Ed. Edgard Blucher. Cap. 16, p. 355-372. 2001.

RAI, A.; PRABHUNE, A.; PERRY, C. C. Entrapment of commercially important invertase in silica particles at physiological pH and the effect of pH and temperature on enzyme activity. *Materials Science and Engineering C*. v. 32, p. 785–789, 2012.

RAJ, L.; CHAUHAN, G. S.; AZMI, W.; AHN, J.-H.; MANUEL, J. Kinetics study of invertase covalently linked to a new functional nanogel. *Bioresource Technology*. v. 102, p.2177–2184, 2011.

RIBEIRO E. J. **Estudo cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), 1989.

ROCHA J.R.; CATANA R.; FERREIRA B. S.; CABRAL J. M. S.; FERNANDES P. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, v. 95, p. 77-82J, 2006.

RODRIGUES M. V. N.; RODRIGUES R. A. F.; SERRA G.E.; ANDRIETTA S. R.; FRANCO T. T. Produção de xarope de açúcar invertido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, p. 103-109, 2000.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Casa do Pão Editora. FEA – Campinas. 2005.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilized enzymes and cells**. Philadelphia: IOP Publishing Ltda., 1987.

RUBIO, M.C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A.R. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. **Phytochemistry**, v.61, p.605-609, 2002.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 4, p. 35-85.

SCOUTEN, W. H. **Methods in Enzymology**. Mosbach: K. ed., 1987. vol. 135, p.30-65.

SEGEL, I.H. **Enzyme Kinetics**: Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. New York: John Wiley and Sons, 1993.

SEGEL I. H. Bioquímica, Teoria e Problemas. Traduzido Grassiano D.M., Rio de Janeiro, Livros técnicos e Científicos Editora, 1979.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Adv. Synth. Catal.** v. 349, p. 1289-1307, 2007.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Bioquímica: Aspectos Gerais**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1985.

SZYMANSKA K.; BRYJAK J.; MROWIEC-BIALON J.; JARZEBSKI A. B. Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalysts. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 99, p. 167-175, 2007.

TAMPION, J.; TAMPION, M.D. Immobilized cells: principles and applications. Cambridge University Press. 257p., 1988.

TANRISEVEN, A.; DOĞAN, S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1081-1083, 2001.

TARDIOLI, P. W.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxylagarose. **Biotechnology Progress**, v.19, p. 352-360, 2003.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1325-1331, 2007.

UHLIG, H. Hydrolysis of proteins, fat, and cellulose, and inversion of sucrose. In: GERHARTZ, W. (Ed.). **Enzymes in industry**: production and applications. New York: VCH, 1990. cap. 4.8, p. 129-130.

UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley, p. 454, 1998.

VICENTE A. A. **Preparação de Açúcar Invertido por Meio de Invertase Imobilizada em Sílica**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química . Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2000.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 9, p. 113-148, 2000.

VITOLO, M. Aplicação de enzimas na Tecnologia de Alimentos, In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHMIDELL, W e LIMA, U.de A. Biotecnologia Industrial. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 4, pp. 387-418, 2001.

VUJCIC, Z.; MILORADOVIC, Z.; MILOVANOVIC, A.; BOZIC, N. **Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel**. Food Chemistry. v. 126, p. 236–240, 2011.

WEETALL H. H. Immobilized enzymes and their application in the food and beverage industry. **Process Biochemistry**, p. 3-30, 1975.

ZANIN, G. M. Sacarificação de amido em reator de leite fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 1989.

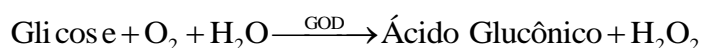
ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa. Cap. 4, p. 35-85, 2004.

APÊNDICE

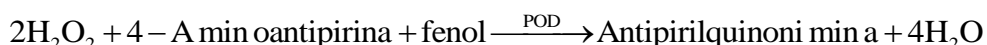
APÊNDICE A

DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A glicose-oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



O kit GLICOSE PAP Liquiform contém 1000 mL de Reagente 1 e 5 mL de Padrão. O Reagente 1 é apresentado pronto para uso utilizando metodologia enzimática de grande especificidade analítica, de simples e fácil aplicação em laboratório.

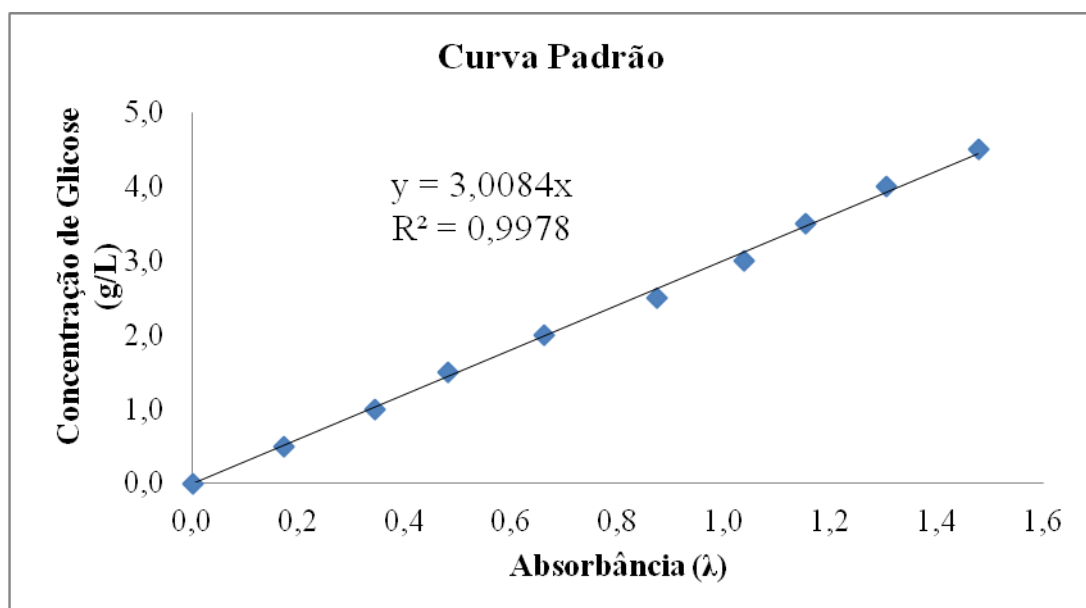
O método pode ser utilizado em técnica manual e é facilmente aplicável em analisadores semi-automáticos e automáticos capazes de medir com exatidão a absorbância entre 420 e 520 nm.

Para determinação de teor de glicose em uma amostra, o primeiro passo foi à determinação da curva padrão, de absorbância em função das concentrações de glicose. Para isso foram utilizados tubos de ensaios contendo 2 mL do Reagente 1, aos quais foram adicionados 20 µL de solução de glicose, na faixa de concentração de 0,0 a 4,5 g/L, com intervalos de 0,5 g/L, os tubos de ensaio foram agitados vigorosamente e incubados em banho-maria a 37 +/- 2°C durante 10 minutos. Após esse tempo, eram lidas as absorbâncias a 505 nm em espectrofotômetro, considerando como branco o Reagente 1. Com os valores de absorbância em função da concentração de glicose foi obtida a curva padrão, considerando o intervalo de concentração adotado.

Para uma amostra de concentração desconhecida de glicose seguia-se o procedimento supracitado, determinando-se a sua absorbância, e a partir da curva padrão, a concentração de glicose.

Os dados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

Curva Padrão	
Absorbância (λ)	Concentração Glicose (g/L)
0,0020	0,0
0,1733	0,5
0,3432	1,0
0,4801	1,5
0,6626	2,0
0,8739	2,5
1,0363	3,0
1,1523	3,5
1,3053	4,0
1,4769	4,5



APÊNDICE B

DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi realizada através do Método de Lowry (1951), constituídos das soluções A, B e AB.

Reativo A: 2 g de Na_2CO_3 seco mais 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de NaOH 0,1 M

Reativo B: 0,5 g de CuSO_4 mais 2 gotas de H_2SO_4 concentrado em 100 mL de água destilada.

Solução AB: 50 mL de reativo A e 1 mL de reativo B, preparado imediatamente antes da dosagem.

Reativo de Folin: preparava uma solução 1 N e era armazenado ao abrigo da luz.

Solução padrão de soro de albumina bovina (BSA) 100 mg/L. Adicionava-se cuidadosamente 100 mg de BSA em 1000 mL para evitar a formação de bolhas. Esta solução era conservada sob refrigeração.

Para a dosagem de proteína fazia-se a diluição das amostras para que a absorbância situasse na faixa de 0,0 a 1,0. Amostras de 1,0 mL contendo proteína a ser dosada eram adicionadas a um frasco tipo penicilina cor âmbar no qual eram acrescentados 3 mL de solução AB, cobertos com parafilm, homogeneizados, protegidos da luz e mantidos desta forma por 10 minutos. Após este tempo adicionava-se 0,3 mL de reativo Folin 1 N e deixava por mais 30 minutos ao abrigo da luz. Ao final efetuava a medida da absorbância a 760 nm em espectrofotômetro, utilizando cubetas de vidro.

A leitura da absorbância era convertida em concentração de proteína pela curva de calibração realizada anteriormente pelo mesmo procedimento, com medidas de absorbância em relação a concentrações de BSA na faixa de 0 a 100 mg/mL, que resultou em uma equação linear.

Os dados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

Curva Padrão	
Absorbância (λ)	Concentração BSA (mg/L)
0,0790	10,0
0,1310	20,0
0,1620	30,0
0,2085	40,0
0,2275	50,0
0,2775	60,0
0,2975	70,0
0,3340	80,0
0,3915	100,0

