



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



**Imobilização de  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* em suporte  
de quitosana por ligação cruzada**

**RODRIGO HIPÓLITO AZEVEDO DE OLIVEIRA**

Uberlândia – MG

2012



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



Imobilização de  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* em suporte de quitosana por ligação cruzada

Rodrigo Hipólito Azevedo de Oliveira

Orientadores:

Dra. Miriam Maria de Resende

Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

Dissertação submetida 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

Uberlândia – MG

2012

- O48i      Oliveira, Rodrigo Hipólito Azevedo de, 1985-  
            Imobilização de  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* em suporte  
            de quitosana por ligação cruzada / Rodrigo Hipólito Azevedo de  
            Oliveira. - 2012.  
            91 f. : il.  
            Orientadores: Miriam Maria de Resende e Eloízio Júlio Ribeiro.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
            grama de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
            Inclui bibliografia.
1. Engenharia química - Teses. 2. Enzimas imobilizadas - Teses.  
            I. Resende, Miriam Maria de. II. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1957- III. Uni-  
            versidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
            Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

---

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 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 7 DE DEZEMBRO DE 2012

BANCA EXAMINADORA



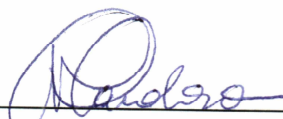
---

Prof.ª Dr.ª Miriam Maria de Resende  
Orientadora (PPGEQ/UFU)



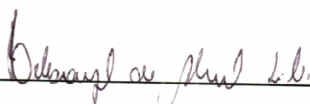
---

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro  
Co-orientador (PPGEQ/UFU)



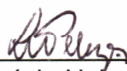
---

Prof.ª Dr.ª Vicelma Luiz Cardoso  
PPGEQ/UFU



---

Dr.ª Helisângela de Almeida Silva  
Bolsista pós-Doutorado (PNPD) – (FEQUI/UFU)



---

Prof.ª Dr.ª Lúcia Helena Pelizer Pasotto  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, UFTM

Dedico este trabalho à minha mãe, Tânia Hipólito de Azevedo, aos meus avós Francisco Hipólito de Azevedo e Sirlei Anderize de Azevedo, à minha tia Adriana Aparecida de Azevedo e ao meu grande irmão Douglas Ribeiro Carísio que sempre me apoiaram em minhas decisões e na busca de meus objetivos.

---

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** (por presentear-me com saúde e disposição nessa árdua guerra chamada vida); à minha mãe, **Tânia Hipólito de Azevedo** (pelo amor incondicional e dedicação em educar-me com princípios pautados na honestidade e transparência, além de apoiar-me nos momentos de certeza e incerteza, mãe te AMO, você é verdadeiro exemplo de vida), aos meus avós **Francisco Hipólito de Azevedo** (que me ensinou a importância de duas das mais importantes pilastras na vida de qualquer pessoa: trabalho e humildade) e **Sirlei Anderize de Azevedo** (minha segunda mãe, tenho a certeza de que mesmo distante, ao lado de nosso Senhor criador, continuou e continua me protegendo e abençoando, “Dona Sirlei” você é responsável por ensinar-me os verdadeiros valores da vida), à minha tia **Adriana Aparecida de Azevedo** (outra mulher guerreira e batalhadora da minha família, muito deste trabalho dedico a sua colaboração, você é modelo de honestidade, também te amo demais), a minha prima do coração **Roberta** (pela colaboração e torcida irrestrita pelo meu sucesso) e ao meu grande irmão **Douglas Ribeiro Carísio** (amigo inseparável de todos os momentos, sejam momentos bons ou, principalmente, nos ruins, “Douglão”, você sabe bem como foi difícil administrar minha vida em todos os seus momentos, muito obrigado irmão). Sou tão engenheiro químico como qualquer uma dessas pessoas acima citadas porque tenho a certeza absoluta de que sem elas não teria obtido êxito nessa minha longa jornada acadêmica.

É mais do que justo fazer um agradecimento especial aos meus amigos **Arthur Silva** (“Feio”, realmente conhecer você no ambiente acadêmico foi um dos acontecimentos mais importantes da minha vida, obrigado pela sua amizade incondicional), **Bruno Alves** (outro amigo dos momentos bons ou ruins, um verdadeiro gladiador, irmão, obrigado por tudo), **Hélcio Júnior** (“Coxinha”, companheiro de longa data e responsável por trazer alegria em vários momentos, valeu por tudo brother), **Tiago José Pires** (simplesmente um grande amigo presente desde os momentos finais de graduação e responsável direto por meu ingresso no mestrado, “Valadão”, te considero demais e você sabe que poderá sempre contar comigo), **Lidiane Bessa** (“amiga” que tive o privilégio de conhecer na reta final de meu mestrado e responsável por, relativamente em pouco tempo, proporcionar-me muita alegria e momentos de elevada intensidade, momentos realmente únicos nesses meus 27 anos de vida, “Guti Guti”, obrigado por tudo), agradeço também ao **João Tomizo** (japa, estivemos juntos praticamente todos os anos da graduação e vencemos essa batalha lado a lado).

Torna-se impossível citar o nome de todos, entretanto, agradeço aos vários amigos e familiares que de alguma maneira ajudaram-me em diversos momentos a tornar minha vida mais feliz! Muito obrigado mesmo!

Agradeço à professora orientadora Miriam Resende (pela orientação, paciência e amizade; Miriam te admiro e saiba que foi uma das responsáveis diretas pelo meu sucesso na graduação, obrigado por tudo); Eloízio Ribeiro (pelos importantes conselhos e informações

prestadas) e Vicelma Cardoso (pela colaboração e, principalmente, pela capacidade quase única nesses “dias atuais” em olhar nos olhos e sempre dizer o que deve ser dito).

Agradeço aos colegas da pós-graduação que estiveram presentes nos difíceis momentos do desenvolvimento desse projeto: Alex, Betânia, Bruna, Carla, Cleuton, Diego, Fernanda, Francielle, Henrique, Janaína (pessoa admirável por sua incansável alegria), Larissa, Líbia, Magno, Maurielem, Rafael, Romina, Taís, Tammayne, Verônica e Wesley.

Aos funcionários da FEQUI pela disposição e prontidão em ajudar-me sempre que precisei: Cecília, Cléo, Ione, Roberta, Silvino e Tiago.

Agradeço à Faculdade de Engenharia Química pela oportunidade em desenvolver esse trabalho e à CAPES pelo apoio financeiro.

*“Errei mais de 9.000 cestas e perdi quase 300 jogos. Em 26 diferentes finais de partidas fui encarregado de jogar a bola que venceria o jogo... e falhei. Eu tenho uma história repleta de falhas e fracassos em minha vida. E é exatamente por isso que sou um sucesso.”*

(Michael Jordan)

*"Antes as lágrimas do guerreiro derrotado em uma guerra do que o mesmo possuir em sua consciência a vergonha por não ter lutado."*

**FORÇA e HONRA!**



---

# SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	i
Lista de Tabelas .....	iii
Lista de Símbolos .....	iv
Resumo .....	vi
Abstract.....	vii
CAPÍTULO 1 .....	1
<b>1 Introdução</b> .....	1
1.1 Objetivos.....	3
CAPÍTULO 2 .....	4
<b>2 Revisão bibliográfica</b> .....	4
2.1 Soja .....	4
2.2 Oligossacarídeos e galacto-oligossacarídeos (GO) .....	5
2.2.1 Rafinose .....	7
2.3 Enzimas como catalisadores .....	7
2.3.1 Enzima $\alpha$ -galactosidase .....	10
2.4 Imobilização Enzimática .....	12
2.5 Métodos de imobilização enzimática.....	14
2.5.1 Ligação a suportes insolúveis .....	16

2.3.2	Imobilização por retenção física.....	19
2.5.3	Suportes para imobilização.....	21
2.5.4	Quitosana.....	23
2.5.5	Glutaraldeido.....	25
2.6	Hidrólise enzimática dos galacto-oligosacarídeos.....	27
2.7	Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas.....	29
CAPÍTULO 3 .....		31
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>31</b>
3.1	Materiais.....	31
3.1.1	Unidade experimental.....	31
3.1.2	Enzima.....	32
3.1.3	Suporte.....	32
3.1.4	Rafinose.....	33
3.1.5	Agente reticulante.....	33
3.2	Metodologia.....	33
3.2.1	Estudo preliminar para preparação das partículas de quitosana.....	33
3.2.2	Preparação das partículas de quitosana.....	34
3.2.3	Imobilização das enzimas em partículas de quitosana.....	34
3.2.4	Determinação da atividade de $\alpha$ -galactosidase pelo método das velocidades iniciais.....	35
3.2.5	Teste da influência do tempo de imobilização e da concentração de glutaraldeido no processo de imobilização.....	36
3.2.6	Teste da influência da temperatura, pH e concentração de enzima no processo de imobilização.....	38
3.2.7	Teste de estabilidade em relação ao pH da enzima imobilizada.....	41
3.2.8	Teste de estabilidade térmica da enzima imobilizada.....	42
3.2.9	Teste de resistência ao armazenamento.....	44
3.2.10	Teste de resistência ao número de repetições.....	44

CAPÍTULO 4 .....	45
<b>4 Resultados e discussões</b> .....	<b>45</b>
4.1 Estudo preliminar para a preparação das partículas de quitosana .....	45
4.2 Teste de influência do tempo de imobilização e da concentração de glutaraldeído no processo de imobilização .....	46
4.3 Teste de influência da temperatura, concentração da enzima e pH do meio no processo de imobilização .....	51
4.4 Teste de estabilidade em relação ao pH da enzima imobilizada .....	56
4.5 Teste de estabilidade em relação à temperatura .....	61
4.6 Teste de resistência ao armazenamento .....	72
4.7 Teste de resistência ao número de usos .....	73
CAPÍTULO 5 .....	75
<b>5 Conclusões e sugestões</b> .....	<b>75</b>
5.1 Conclusões .....	75
5.2 Sugestões para trabalhos futuros .....	76
APÊNDICE A .....	77
APÊNDICE B .....	78
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	79

---

# LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Esquema da Esquema da via metabólica de síntese dos oligossacarídeos de rafinose. UDP-Glc: uridina difosfato-glicose; UDP-Gal: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; Glc6P: glicose-6-fosfato. ....	6
Figura 2.2: Estrutura química da rafinose. ....	7
Figura 2.3: Vista tridimensional das fitas-modelo das $\alpha$ -galactosidases de arroz (A) e da <i>Trichoderma reesei</i> (B) complexadas com D-galactose.....	11
Figura 2.4: Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzimas; S: suportes; A: Albumina .....	16
Figura 2.5: Estrutura química da quitosana .....	23
Figura 2.6: Estrutura química da quitina .....	23
Figura 2.7: Esquema simplificado dos processos de fabricação industrial de quitosana .....	24
Figura 2.8: Estrutura química do glutaraldeído .....	26
Figura 2.9: Galacto-oligossacarídeos e sítios de clivagem para as enzimas hidrolíticas invertase e $\alpha$ -galactosidase .....	28
Figura 3.1: Unidade experimental .....	32
Figura 3.2: Reator utilizado para realizar os ensaios.....	32
Figura 3.3: Preparação das partículas de quitosana.....	34
Figura 4.1: Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática .....	48
Figura 4.2: Valores preditos pelo modelo versus valores observados experimentalmente .....	49
Figura 4.3: Superfícies de resposta da influência da concentração de glutaraldeído e do tempo de imobilização na atividade de $\alpha$ -galactosidase obtida pelo planejamento fatorial completo .....	49
Figura 4.4: Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.....	54

Figura 4.5: Valores preditos pelo modelo versus valores observados experimentalmente .....	54
Figura 4.6: Superfícies de resposta da influência da concentração de enzima e da temperatura de imobilização na atividade de $\alpha$ -galactosidase obtida pelo planejamento composto central.....	55
Figura 4.7: Superfícies de resposta da influência do pH e da temperatura de imobilização na atividade de $\alpha$ -galactosidase obtida pelo planejamento composto central.....	55
Figura 4.8: Superfícies de resposta da influência do pH e da concentração de enzima no processo de imobilização na atividade de $\alpha$ -galactosidase obtida pelo planejamento composto central.....	55
Figura 4.9: Valores absolutos para as atividades residuais obtidas experimentalmente para $\alpha$ -galactosidase imobilizada com glutaraldeído (●) e sem glutaraldeído (■) . .....	57
Figura 4.10: Atividade relativa da enzima imobilizada com glutaraldeído (5%) .....	58
Figura 4.11: Atividade relativa da enzima imobilizada sem glutaraldeído (0%) .....	58
Figura 4.12: Atividade residual ( $U/U_0$ ) de $\alpha$ -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana com glutaraldeído (5%) após diferentes tempos de incubação a 60°C (◆), 57°C (●), 55°C (■) e 50°C (▲).....	61
Figura 4.13: Perfil da desativação térmica para a temperatura de 60°C. Pontos experimentais (◆), Eq. 3.12 (—), Eq. 3.13 (—), Eq. 3.14 (—) .....	63
Figura 4.14: Perfil da desativação térmica para a temperatura de 58°C. Pontos experimentais (●), Eq. 3.12 (—), Eq. 3.13 (—), Eq. 3.14 (—) .....	65
Figura 4.15: Perfil da desativação térmica para a temperatura de 55°C. Pontos experimentais (■), Eq. 3.12 (—), Eq. 3.13 (—), Eq. 3.14 (—) .....	66
Figura 4.16: Perfil da desativação térmica para a temperatura de 50°C. Pontos experimentais (▲), Eq. 3.12 (—), Eq. 3.13 (—), Eq. 3.14 (—) .....	68
Figura 4.17: Regressão linear da equação de Arrhenius .....	71
Figura 4.18: Atividade relativa ( $U/U_0$ ) para enzima $\alpha$ -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana com 5% de glutaraldeído como ligação cruzada em função do tempo de armazenamento .....	72
Figura 4.19: Atividade relativa ( $U/U_0$ ) para enzima $\alpha$ -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana com 0% de glutaraldeído como ligação cruzada em função do tempo de armazenamento .....	73
Figura 4.20: Atividade relativa ( $U/U_0$ ) para enzima $\alpha$ -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana com 5% de glutaraldeído como ligação cruzada em função do número de repetições.....	74

---

# LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Exemplos de uso de enzimas nas indústrias.....	9
Tabela 2.2: Classificação dos suportes conforme a composição.....	22
Tabela 3.1: Matriz planejamento fatorial completo do efeito do tempo de imobilização e concentração de glutaraldeído na imobilização da $\alpha$ -galactosidase em suporte de quitosana.....	37
Tabela 3.2: Matriz planejamento composto central da influência das variáveis temperatura, concentração de enzima e pH no processo de imobilização da $\alpha$ -galactosidase .....	40
Tabela 4.1: Atividades ( $U_i$ ) obtidas nos métodos de produção de partículas de quitosana ....	45
Tabela 4.2: Matriz planejamento fatorial completo do efeito do tempo de imobilização e concentração de glutaraldeído na imobilização da $\alpha$ -galactosidase em suporte de quitosana .....	46
Tabela 4.3: Resultados da regressão múltipla aplicada ao PFC .....	47
Tabela 4.4: Resultados da regressão múltipla com variáveis significativas aplicada ao PFC .....	48
Tabela 4.5: Matriz planejamento composto central da influência das variáveis temperatura, concentração de enzima e pH no processo de imobilização da $\alpha$ -galactosidase .....	51
Tabela 4.6: Resultados da regressão múltipla aplicada ao PCC .....	52
Tabela 4.7: Resultados da regressão múltipla com variáveis significativas aplicada ao PCC .....	53
Tabela 4.8: Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 60 <sup>0</sup> C.....	62
Tabela 4.9: Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 58 <sup>0</sup> C.....	64
Tabela 4.10: Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 55 <sup>0</sup> C.....	65
Tabela 4.11: Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 50 <sup>0</sup> C.....	67
Tabela 4.12: Tempos de meia vida e constantes de desativação térmica a diferentes temperaturas.....	70

---

# LISTA DE SÍMBOLOS

- $\alpha$ : Alfa - formas anoméricas da enzima  $\alpha$ -galactosidase;
- $\alpha_1$ : Relação entre a atividade da enzima no estado E1 e a atividade da enzima nativa E0;
- $\alpha_2$ : Relação entre a atividade da enzima no estado E2 e a atividade da enzima nativa E0;
- $\beta$ : Beta – formas anoméricas da enzima  $\beta$ -galactosidase;
- $\beta_0$ : Valor médio da variável de resposta;
- A: Fator de frequência para a reação;
- A/A<sub>0</sub>: Atividade relativa;
- E: Concentração de enzima ativa;
- E<sub>0</sub>: Atividade da enzima no estado E<sub>0</sub>;
- E<sub>1</sub>: Atividade da enzima no estado E<sub>1</sub>;
- E<sub>2</sub>: Atividade da enzima no estado E<sub>2</sub>;
- E<sub>a</sub>: Constante de energia de ativação;
- E<sub>d</sub>: Energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima;
- [E]<sub>imob</sub>: Concentração de enzimas no processo de imobilização;
- GO: Galacto-oligossacarídeos;
- g<sub>RH</sub>: Quantidade de rafinose hidrolisada em gramas;
- g<sub>SQ</sub>: Quantidade do suporte de quitosana utilizado em gramas;
- [G]<sub>imob</sub>: Concentração de glutaraldeído no processo de imobilização;
- K: Constante de velocidade;
- K<sub>1</sub>: Constante de velocidade de desativação térmica – única etapa;
- K<sub>2</sub>: Constante de velocidade de desativação térmica – duas etapas;
- K<sub>d</sub>: Constante cinética de desativação térmica;
- K<sub>d0</sub>: Constante de proporcionalidade;
- PCC: Planejamento composto central;

PFC: Planejamento fatorial completo;

$\text{pH}_{\text{imob}}$ : pH do meio no processo de imobilização;

R: Constante dos gases;

rpm: Rotações por minuto;

T: Temperatura absoluta;

$T_{\text{imob}}$ : Temperatura no processo de imobilização;

t: Tempo;

$t_{1/2}$ : Tempo de meia vida;

$t_{\text{imob}}$ : Tempo de imobilização;

U: Atividade enzimática;

$U_i$ : Unidade da atividade enzimática ( $\text{g}_{\text{RH}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{SQ}}^{-1}$ );

$U/U_0$ : Atividade relativa;

Y: Variável de resposta (Atividade enzimática) para o modelo de regressão múltipla;



---

---

# RESUMO

---

Neste trabalho o objetivo geral foi estudar o processo de imobilização de  $\alpha$ -galactosidase em suporte de quitosana por meio de ligação cruzada utilizando glutaraldeído. A influência da concentração de glutaraldeído como agente reticulante e do tempo de reação na atividade do biocatalisador imobilizado foi estudada utilizando-se um planejamento fatorial. Na sequência, foi realizado um estudo sobre as influências da concentração da enzima, da temperatura e do pH no processo de imobilização utilizando-se, neste caso, um planejamento composto central. Tanto o planejamento fatorial como o planejamento composto central foram utilizados com o intuito de indicar a máxima atividade após a hidrólise enzimática cujo substrato foi a rafinose. Os resultados mostram que a concentração de glutaraldeído e o tempo de imobilização foram respectivamente 5% (v/v) e 24 horas. Já os resultados do planejamento composto central indicaram que a retenção da atividade catalítica no processo de imobilização foi máxima numa concentração de enzima na faixa de 12 a 20 g/L; pH de 6,5 a 8; e temperatura de 22 a 34°C. Posteriormente, desenvolveu-se o estudo tanto da estabilidade com relação ao pH como da estabilidade térmica da  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em quitosana. Avaliou-se a estabilidade com relação ao pH na faixa entre 3,0 a 9,0 tanto para a enzima imobilizada nas partículas com glutaraldeído (5% v/v) como para as imobilizadas sem glutaraldeído (0% v/v); e os testes referentes à estabilidade térmica ocorreram em temperaturas entre 50 e 60°C para as partículas imobilizadas com glutaraldeído. Os resultados indicaram que a enzima imobilizada com 5% de glutaraldeído foi estável em toda a faixa de pH estudada, já a enzima imobilizada com 0% de glutaraldeído apresentou-se estável nas faixas entre 5,0 e 9,0. Com relação ao tratamento térmico, durante os períodos de tempos estudados, verificou-se que a atividade da enzima diminuiu com o aumento da temperatura e tempo de exposição. Resultados referentes à resistência relacionada ao tempo de estoque de  $\alpha$ -galactosidase imobilizadas em quitosana tanto com glutaraldeído como sem glutaraldeído mostram que, após 50 dias, para o processo com o agente reticulante houve uma atividade residual de 76,73% e para o processo sem glutaraldeído a atividade residual foi de 14,38%. Já para o experimente de resistência em relação ao número de repetições, os resultados indicam que para a enzima imobilizada com glutaradeído a atividade residual foi de 82,56% após 20 usos.

Palavras-chave: imobilização enzimática,  $\alpha$ -galactosidase, glutaraldeído, quitosana, rafinose.

---

---

# ABSTRACT

---

The general aim of this work was to study the process of  $\alpha$ -galactosidase immobilization in support of chitosan by cross-linking using glutaraldehyde. The influence of glutaraldehyde concentration as crosslinker agent and activity time reaction on a immobilized biocatalyst were either studied using a factorial design. Further, a study on the influence of the enzyme concentration, temperature and pH on the immobilization process was done using a central composite planning. Both the factorial design and central composite planning were used to indicate the maximum activity after enzymatic hydrolysis, employing raffinose as substrate. The results show that the glutaraldehyde concentration and the immobilization time were 5% (v/v) and 24 hours, respectively. The central composite planning results indicated that the catalytic activity's retention in the immobilization process was utmost at a enzyme concentration range of 12 to 20 g/L, pH among 6.5 to 8, and temperatures amid 22 to 34<sup>o</sup>C. After, the stability study of  $\alpha$ -galactosidase immobilized on chitosan with respect to pH and temperature were either developed. In these scenarios the pH range was of 3.0 to 9.0 for both immobilized enzyme particles with glutaraldehyde (5% v/v) as for those immobilized without glutaraldehyde (0% v/v); and testing for thermal stability occurred at temperatures between 50 and 60<sup>o</sup>C for enzymes immobilized with glutaraldehyde. The outcomes indicated that the immobilized enzymes with 5% glutaraldehyde were stable throughout the pH range studied, since the immobilized enzymes without glutaraldehyde remained stable in the range between 5.0 and 9.0. Regarding the heat treatment during the time periods studied, it was found that the enzyme activity decreased with increasing temperature and time of exposure. Results related to the stock time resistance of immobilized  $\alpha$ -galactosidase on chitosan both with and without glutaraldehyde showed that, after 50 days, for the process with crosslinker there was residual activity of 73.77% and for the case lacking glutaraldehyde the residual activity was 14,38%. At the trial resistance concerning the number of repetitions, the results indicate that for the immobilized enzyme with glutaraldehyde the residual activity was 82,56% after 20 uses.

**Key-words:**  $\alpha$ -galactosidase; enzyme immobilization; glutaraldehyde; chitosan; raffinose.

---

---

# CAPÍTULO 1

---

## 1. Introdução

O uso de produtos à base de soja é restrito devido a alguns fatores antinutricionais. Dentre estes fatores, destaca-se a presença dos oligossacarídeos rafinose e estaquiase. Mamíferos de modo geral são deficientes na digestão destes carboidratos por não apresentarem enzimas pancreáticas capazes de hidrolisarem suas ligações  $\alpha$ -1,6. A não digestão destes açúcares provocam suas fermentações pela micro flora intestinal, resultando em produção excessiva de gases. Esta flatulência induzida é responsável pela diminuição do consumo destes alimentos pela população (NAGANAGOUDA, 2007). Como resultado, a demanda por produtos a base de soja livres em rafinose e estaquiase é grande. Entre todas as propostas para redução destes açúcares, o uso da enzima  $\alpha$ -galactosidase demonstrou-se a mais eficiente (VIANA *et. al*, 2007).

Dessa maneira, a indústria de alimentos, principalmente de derivados de soja, tem grande interesse de redução dos galacto-oligossacarídeos, pois produtos de soja hidrolisados com as  $\alpha$ -galactosidases, apresentam melhores propriedades nutricionais e redução de problemas digestivos, o que contribui para ampliação do mercado consumidor de soja e derivados.

O tratamento de farinha de soja com  $\alpha$ -galactosidase foi realizado, reduzindo o conteúdo de rafinose e estaquiase em 90,4% e 91,9%, respectivamente (MULIMANI *et al.*, 1997). Outros estudos foram realizados sobre a redução de oligossacarídeos não digeríveis em leite de soja, com aplicação de bactéria ácido láctica modificada (LEBLANC *et al.*, 2004). As  $\alpha$ -galactosidases são também usadas na indústria de açúcar de beterraba, para a hidrólise de rafinose presente no xarope. A rafinose inibe a cristalização da sacarose no xarope de beterraba. Desse modo, a hidrólise enzimática da rafinose aumenta o rendimento de sacarose, promovendo a cristalização normal do açúcar de beterraba (SAID e PIETRO, 2004).

A instabilidade das enzimas utilizadas em alimentos para consumo humano e animal tem sido uma questão importante tanto na preparação quanto no armazenamento de alimentos. Avanços recentes em nanotecnologia têm mostrado grandes vantagens na utilização de nanopartículas para encapsulamento e liberação controlada de proteína. (YONG LIU *et al*, 2010).

Os processos enzimáticos empregam as enzimas nas formas livre (solúveis) ou imobilizada. A utilização de enzimas livres em processos industriais tem certas limitações devido ao seu alto custo, a dificuldade de recuperação das mesmas no final do processo e ainda à sua instabilidade (HAIDER e HUSAIN, 2008). A aplicação da enzima na forma imobilizada pode apresentar diversas vantagens em relação à forma livre, tais como reutilização do biocatalisador heterogêneo, possibilidade de melhor controle de processo, operação contínua, aumento de estabilidade, dentre outras. Alguns fatores essenciais devem ser levados em consideração para a escolha do suporte adequado à imobilização, tais como compatibilidade suporte-enzima, eficiência, produtividade, estabilidade no processo, disponibilidade do suporte e custos (CAO, 2005; KRAJEWSKA, 2009).

Uma outra técnica utilizada para imobilizar enzimas é a utilização do glutaraldeído. A metodologia é bastante simples e eficiente permitindo, em alguns casos, melhorar a estabilidade da enzima através da imobilização multiponto (BARROS *et al*, 2003).

### 1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o processo de imobilização de  $\alpha$ -galactosidase em partículas de quitosana e a influência da ligação cruzada cujo agente reticulante foi o glutaraldeído.

Como principais objetivos específicos, podem ser citados:

- a) Estudar a influência concentração de glutaraldeído e do tempo no processo de imobilização da enzima  $\alpha$ -galactosidase, avaliando como resposta a atividade enzimática;
- b) Estudar a influência da concentração de enzima, pH e da temperatura no processo de imobilização em função da atividade enzimática;
- c) Determinar a estabilidade da enzima imobilizada nas condições ótimas em relação ao pH;
- d) Determinar a estabilidade da enzima imobilizada nas condições ótimas em relação à temperatura em função do tempo;

- e) Avaliar a estabilidade da enzima imobilizada em relação ao tempo de estocagem;
- f) Avaliar a estabilidade da enzima imobilizada em relação ao número de usos (processo de reutilização da enzima imobilizada).

---

---

# CAPÍTULO 2

---

## 2. Revisão Bibliográfica

Este capítulo tem por finalidade apresentar os trabalhos mais relevantes referentes à imobilização de  $\alpha$ -galactosidase em suporte de quitosana por meio de ligação cruzada utilizando como agente reticulante o glutaraldeído, discutindo e comentando as principais abordagens de diversos autores.

### 2.1 Soja

A soja é considerada um dos principais produtos agrícolas devido à sua alta produtividade, capacidade adaptativa e qualidade nutricional. É amplamente consumida pela população, na forma de óleo e seus derivados, como margarina e gordura hidrogenada, (KHARE *et al.*, 1994).

A soja é uma leguminosa considerada excelente fonte de alimentação em todo o mundo. No Japão é conhecida como "a carne do campo" e é tratada como fonte da vida de maneira similar aos ovos. A proteína da soja tem um padrão de ácido amino bem equilibrado (SMITH e CIRCLE, 1972.), além disso, o leite de soja é visto como um substituto de baixo custo para leite de vaca nos países em desenvolvimento e como um suplemento nutritivo para a população intolerante à lactose (KHARE *et al.*, 1994).

A soja possui alto valor nutritivo por conter, em suas proteínas, quantidade suficiente de inúmeros aminoácidos essenciais (COSTA e MIYA, 1972). Apesar de seu alto valor nutricional, uma série de fatores antinutricionais, tais como presença de galacto-oligossacarídeos, está presente nos grãos (SANNI *et al.*, 1997).

É importante determinar a composição de diferentes cultivos de soja para selecionar aqueles com altos níveis de proteína e óleo e baixo conteúdo de galacto-oligossacarídeos. Estudos revelaram que na soja var. Doko foram encontrados teores de 0,7 e 4,1 g% para rafinose e estaquiose, respectivamente (TRUGO *et al.*, 1995). Já em estudos desenvolvidos com a soja var. TGX536-02D o conteúdo de rafinose e estaquiose encontrados foram de 1,22

e 3,41 %, respectivamente (EGOUNLETY e AWORH, 2003). Devido à presença dos galactooligosacarídeos nas sementes de soja, a ingestão dos grãos pode provocar flatulência em humanos.

## 2.2 Oligossacarídeos e galacto-oligosacarídeos (GO)

Os oligossacarídeos são definidos estritamente como sendo carboidratos que contêm entre 2 e 10 monossacarídeos, covalentemente ligados através de ligações glicosídicas (MEHRA e KELLY, 2006).

Os oligossacarídeos ocorrem naturalmente em muitos alimentos e em tecidos vegetais, bem como são sintetizados no metabolismo de animais e micro-organismos. As propriedades biológicas e físico-químicas de seus componentes têm sido relatadas como equivalentes às fibras dietéticas, associando sua ação fisiológica com importantes aspectos da saúde humana (TUNGLAND e MEYER, 2002). Os oligossacarídeos podem ser obtidos por extração de tecidos vegetais, por fermentação microbiana, por catálise enzimática ou por reação química (MUSSATO e MANSILHA, 2007).

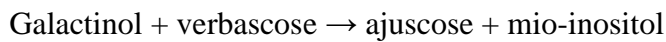
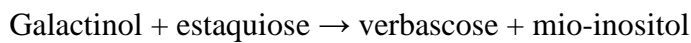
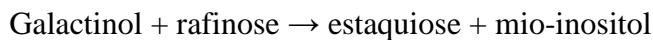
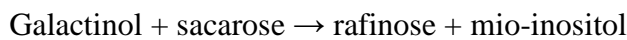
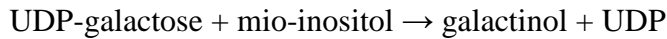
Dentre os oligossacarídeos destaca-se a inulina, cujo uso em alimentos e os efeitos fisiológicos associados aos seres humanos têm sido estudados nas últimas duas décadas. A inulina é reserva de carboidrato em muitas plantas dicotiledôneas. Atualmente é produzida via extração a partir de raízes de chicória e de outros vegetais (RUPÉREZ, 1998).

A oligofrutose é outro oligossacarídeo importante na indústria de alimentos funcionais. É constituída por 2 a 4 unidades de frutose ligadas a um resíduo terminal de glicose (PASSOS e PARK, 2003).

Os galacto-oligosacarídeos são formados pela transgalactosilação da galactose por ação da enzima  $\beta$ -galactosidase, a partir de substratos ricos em lactose (MAHONEY, 1998). A rafinose (também chamada de  $\alpha$ -galacto-oligosacarídeo) é obtida de extração vegetal, em especial da soja. Os xilo-oligosacarídeos são obtidos a partir de hidrólise parcial de polixilanos realizada pela  $\beta$ -xilanase. Os glicooligosacarídeos são obtidos por transglicosilação da glicose via  $\alpha$ -glicosidase (TUNGLAND e MEYER, 2002).

Os galacto-oligosacarídeos são sintetizados durante a formação das sementes, e degradados durante o processo de germinação (KANDLER e HOLF, 1980; SARAVITZ *et al.*, 1987). Eles são derivados da sacarose, e consiste da adição da galactose à sacarose por

uma ligação  $\alpha$ -1,6 formando a rafinose. Novas unidades de galactose são adicionadas por ligações  $\alpha$ -1,6 ao terminal galactose para formar os tetra e pentassacarídeos estaquiose e verbascose, respectivamente (HINCHA *et al.*, 2003). Portanto, os galacto-oligossacarídeos são considerados extensões da sacarose, variando apenas no número de resíduos de galactose (SPRENGER e KELLER, 2000). A via metabólica de síntese dos galacto-oligossacarídeos pode ser representada (DEY, 1985) como se segue:



Um esquema da via de síntese dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, está representado na Figura 2.1.

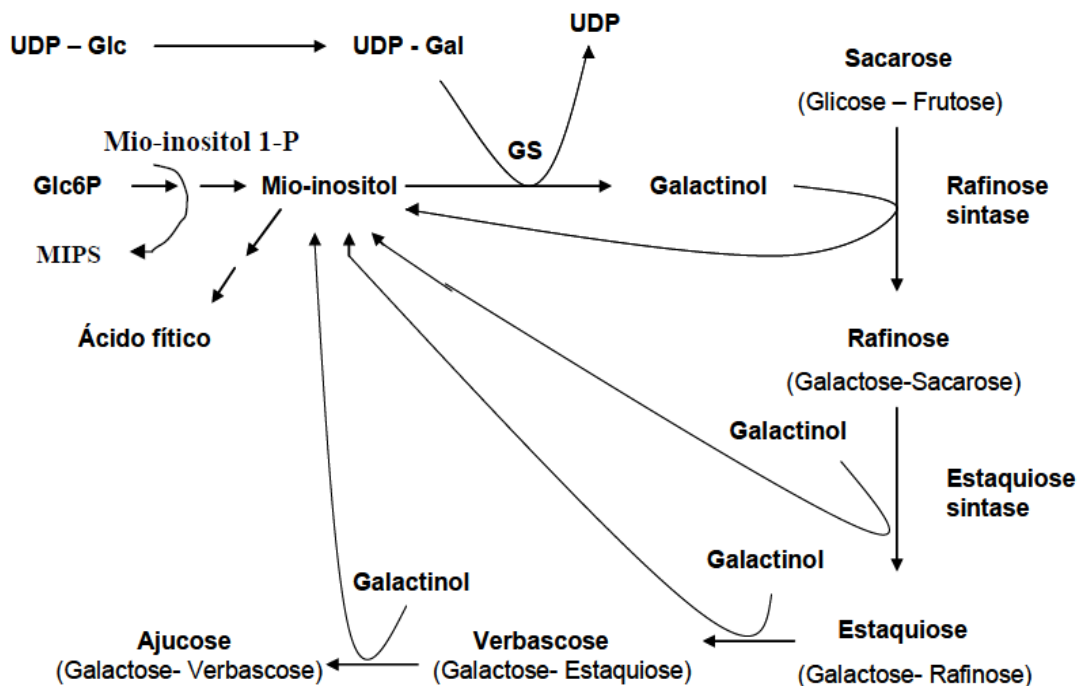


Figura 2.1: Esquema da via metabólica de síntese dos oligossacarídeos de rafinose. UDP-Glc: uridina difosfato-glicose; UDP-Gal: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; Glc6P: glicose-6-fosfato. (Adaptado de SUARES *et al.*, 1999).



### 2.2.1 Rafinose

A rafinose é o segundo açúcar solúvel mais encontrado na natureza, uma vez que o primeiro açúcar é a sacarose.

Nas plantas superiores, a rafinose ocorre nas folhas, caules e órgãos de reserva. O nível nas folhas é baixo, mas é translocado e se acumula em altas concentrações em órgãos de reserva durante o desenvolvimento da planta. Concomitante à perda de água, há aumento na concentração de rafinose em sementes maduras (DEY, 1985). Segundo o mesmo autor, em órgãos de reserva, rafinose pode ser utilizada como um precursor para a síntese de outros oligossacarídeos homólogos maiores ou ser hidrolisada por  $\alpha$ -galactosidases e invertases.<sup>b</sup>

A rafinose, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 2.2, é um trissacarídeo encontrado no repolho, brócolis, aspargo e outros vegetais. Também é encontrada principalmente em grãos, como o feijão e a soja (MOREIRA e MARIA, 2001), e em pequenas frações no mel. Ela pode ser hidrolisada por ácido, produzindo um mol de galactose, glicose e frutose, ou pela enzima  $\alpha$ -galactosidase, produzindo um mol de galactose e um mol de sacarose. Os seres humanos e outros mamíferos monogástricos não produzem a  $\alpha$ -galactosidase. Devido a isso, a rafinose permanece acumulada nos intestinos, onde microorganismos anaeróbicos promovem sua fermentação, causando má digestão (VIANA *et al*, 2005).

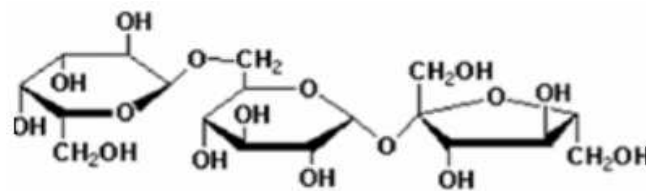


Figura 2.2: Estrutura química da rafinose.

Esse açúcar, amplamente encontrado na soja, é responsável por fatores antinutricionais como a flatulência, fato esse que pode acarretar em uma diminuição do consumo da soja pela população mundial.

### 2.3 Enzimas como catalisadores

Enzimas são moléculas quimicamente grandes, reativas com grupos iônicos, hidrofílicos e hidrofóbicos. São grupos de substâncias orgânicas de natureza protéica, com atividade intracelular ou extracelular que tem funções catalisadoras. A capacidade catalítica

das enzimas torna-se adequada para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou alimentar, e uma vantagem é que catalisam sob condições ambientais.

As enzimas convertem uma substância chamada de substrato para outra chamada de produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam. A velocidade de reação catalisada por uma enzima é aumentada devido à redução de energia de ativação necessária para converter o substrato no produto. Uma enzima é uma proteína que catalisa ou acelera uma reação biológica. Pode, portanto, ser definida como um biocatalisador, cuja natureza protéica determina algumas propriedades, tais como: especificidade de substrato, dependência da temperatura e pH (CHIBATA, 1978; BOBBIO e BOBBIO, 1995; FABER, 2004).

Na aplicação das enzimas é importante avaliar três características: estabilidade, atividade e especificidade (DIXON e WEBB, 1979; BOBBIO e BOBBIO, 1995; FURLONG, 2000; GALVÃO, 2004; BAILEY e OLLIS, 1986).

*Estabilidade:* a capacidade catalítica de uma enzima depende de sua estrutura nativa, a qual é mantida por forças de interação. 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:* É dada pela medição da velocidade inicial da reação sob uma faixa de condições determinadas. A atividade enzimática pode ser medida em condições tais que permitam que a velocidade da reação seja máxima, o que significa que o substrato deve estar em concentração elevada, de modo a permitir que toda a enzima seja transformada em um complexo ativado.

*Especificidade:* A especificidade enzimática consiste na capacidade da enzima ser seletiva a ligações, substratos ou grupos de substratos. Ela se baseia nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional.

A utilização das enzimas é antiga, antes dos próprios micro-organismos serem conhecidos. Um dos primeiros alimentos preparados pela humanidade que se tem notícia, o pão, utilizou a ação enzimática. Pasteur, no final do século XIX demonstrou a intervenção das

leveduras no processo de fermentação alcoólica e o trabalho que evidenciou a ação das enzimas fora das células (CABRAL, 1982).

Nos processos biológicos, as enzimas são preferíveis a catalisadores químicos, pois são mais seletivas, resulta em um produto mais limpo e tem um maior rendimento (MOFFAT *et al.*, 1994). A utilização de enzimas como catalisadores para processos industriais de grande escala são limitados pelo seu alto custo de estabilização em relação ao armazenamento.

Na indústria de alimentos o uso de enzimas é bastante comum devido sua alta especificidade e a não geração de subprodutos tóxicos, o que pode ocorrer se usar catalisadores sintéticos ou ácidos para catalisar as reações (SANJAY e SUGNAN, 2005).

Como as enzimas não são consumidas na reação, sua ação catalítica é semelhante aos catalisadores inorgânicos. Porém, é diferente dos catalisadores sintéticos comuns pela forma suave que realiza a catálise, geralmente em soluções aquosas neutras, temperatura e pressão ambiente e, principalmente, com elevado grau de especificidade em relação ao substrato (SEGEL, 1979; RIBEIRO, 1989; COUTINHO FILHO, 1996; VICENTE, 2000). O processo de imobilização tem sido bastante estudado para viabilizar o uso de enzimas industrialmente, permitindo a recuperação e o reaproveitamento da mesma, pois o uso da enzima livre é inviável economicamente. Na Tabela 2.1 verificam-se alguns exemplos de aplicações de enzimas na indústria.

Tabela 2.1 – Exemplos de uso de enzimas nas indústrias (DAVID, 2004).

<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>	<b>Produto</b>	<b>Escala (Ton/ano)</b>
Glicose isomerase	Glicose	Frutose	>10 <sup>6</sup>
Penicilina amidohidrolase	Penicilina	Ácido- aminopenicilânico	1000
Lipase	Triglicerídeo	Gordura de cacau	>10 <sup>6</sup>
Àcido aspártico Amônia liase	Ácido fumárico	L- ácido aspártico	1000
Subtilisina	-----	(S)-fenilalanina	-----

### 2.3.1 Enzima $\alpha$ -galactosidase

A  $\alpha$ -galactosidase pode ser obtida a partir de bactérias, fungos ou vegetais. Procurando otimizar a produção e obtenção desta enzima, estas diferentes fontes têm sido estudadas (SHIVANNA *et al.*, 1989). A enzima de origem bacteriana apresenta vantagens sobre a enzima de origem fúngica, uma vez que sua produção é maior (MANZANARES *et al.*, 1998). No entanto, galactosidases de fungos são obtidas mais facilmente devido à sua localização extracelular e seu amplo perfil de estabilidade, sendo portanto viável sua produção em grande escala (ANNUNZIATO *et al.*, 1986; SOMIARI e BALOGH, 1992).

Nas plantas, a  $\alpha$ -galactosidase apresenta diferentes funções, estando presente em todos os tecidos que contém  $\alpha$ -galactosídeos (ALANI *et al.*, 1989). Em hipótese, esta pode atuar como pesticida natural, pois se trata de uma lectina, e algumas lectinas são proteínas tóxicas de reserva (PORTER, 1992).

Na parede celular das plantas ocorrem reações enzimáticas que promovem a hidrólise de glucanos e a quebra das ligações de seus polissacarídeos. Esta é uma característica da autólise para promoção do crescimento das plantas. Este fato foi confirmado ao estudar a variedade *Pisum sativum*, com a participação da  $\alpha$ -galactosidase neste processo para o crescimento da planta (DOPICO *et al.*, 1989).

A  $\alpha$ -galactosidase atua no reconhecimento celular, no transporte de açúcares e como glicoproteína na organização de sistemas multienzimáticos. Pode, também, agir como antibiótico contra as bactérias do solo, protegendo a planta contra substâncias  $\alpha$ -galactosídicas fitotóxicas produzidas por micro-organismos invasores como *Didymella applanata* que infectam framboeseiras (PORTER *et al.*, 1992). Esta enzima apresenta ainda diversas aplicações tais como, estudo da estrutura molecular de açúcares; melhoramento da sacarose extraída de beterraba para diminuir o teor de rafinose, já que esta impede a cristalização da sacarose (ANNUNZIATO *et al.*, 1986; MULIMANI e RAMALINGAN, 1995); eliminar o sabor desagradável de feijão cru do leite de soja, além de desodorizá-lo (RUIZ *et al.*, 1995) e em produtos à base de soja diminuir o teor dos oligossacarídeos que causam flatulência (CRUZ e PARK, 1982).

A enzima  $\alpha$ -galactosidase está ausente no trato digestivo humano, hidrolisa ligações  $\alpha$ -(1,6) de oligossacarídeos da família da rafinose. Estes açúcares, chamados flatulentos, são encontrados em muitas leguminosas como a soja, uma rica fonte de proteína. Entretanto,

devido à presença desses açúcares, fatores antinutricionais como a flatulência são atribuídos à soja, diminuindo seu consumo. A  $\alpha$ -galactosidase produzida por alguns micro-organismos e vegetais pode ser empregada em alimentos a base de soja para reduzir a interação da flora intestinal com os oligossacarídeos, diminuindo assim a flatulência (GÓES e RIBEIRO, 2002).

Recentemente ocorreram trabalhos cujo intuito foi cristalizar e, posteriormente, determinar a estrutura tridimensional da  $\alpha$ -galactosidase. Dessa maneira, as estruturas tridimensionais provenientes de estudos desenvolvidos tanto para a  $\alpha$ -galactosidase purificada do arroz (FUJIMOTO *et al.*, 2003) quanto para o fungo *Trichoderma reesei* complexadas com D-galactose (GOLUBEV *et al.*, 2004) estão representadas na Figura 2.3.

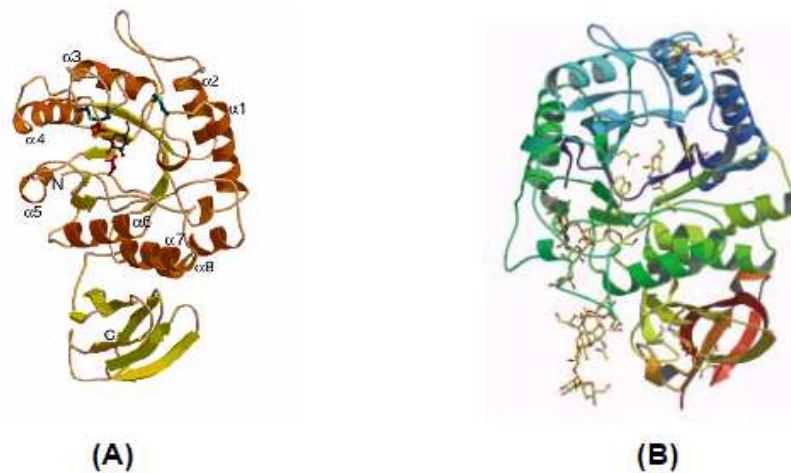


Figura 2.3: Vista tridimensional das fitas-modelo das  $\alpha$ -galactosidases de arroz (A) e da *Trichoderma reesei* (B) complexadas com D-galactose.

As  $\alpha$ -galactosidases apresentam grande potencial em várias aplicações industriais. Além do uso na hidrólise de rafinose e estaquiase de leite de soja (THANANUNKUL *et al.*, 1976), tais enzimas podem ser usadas, por exemplo, na hidrólise da rafinose de xarope de açúcar de beterraba para melhorar o valor do melado (KOBAYASHI e SUZUKI, 1972). Além disso, o xarope de beterraba é largamente utilizado para a produção comercial de leveduras pela conveniência comercial (BURROWS, 1979).

Essas enzimas também podem promover hidrólise de numerosas galactomananas, por exemplo, em goma guar, que contem em torno de 40 % de galactose com ligações  $\alpha$ -1,6 em uma cadeia  $\beta$ -manosil (SOMIARI e BALOGH, 1993). Modificações em galactomananas com as  $\alpha$ -galactosidases têm sido usadas para melhorar as propriedades gélidas desses polissacarídeos (BULPIN *et al.*, 1990). As  $\alpha$ -galactosidases também estão envolvidas em

modificação de materiais derivados da madeira porque galactomanas e galactoglicomananas são os grupos principais de hemiceluloses em plantas (CLARKE *et al.*, 2000).

A enzima  $\alpha$ -galactosidase pode ter aplicação na medicina (TOPALOGLU *et al.*, 1999). Algumas  $\alpha$ -galactosidases de eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose  $\alpha$ -1,3 terminais de glucanas, o que apresenta um potencial de uso médico em terapia de transfusão na conversão de sangue grupo B para O (ZHU e GOLDSTEIN, 1994; PUCHART *et al.*, 2000; VARBANETES *et al.*, 2001). Também  $\alpha$ -galactosidase proveniente de sementes de *Colocasia esculenta* capaz já foi isolada sendo capaz de converter sangue grupo B em sangue grupo O (CHIEN e LIN-CHU, 1991).

Outra aplicação industrial das  $\alpha$ -galactosidases é na usina açucareira. Pequenas quantidades de rafinose (ou estaquiose) afetam negativamente a cristalização da sacarose. Esses açúcares podem ser facilmente eliminados e convertidos à sacarose pelo tratamento com  $\alpha$ -galactosidase, porém é importante que o modo de ação e a estabilidade das  $\alpha$ -galactosidases sejam conhecidos, para uso industrial (PUCHART *et al.*, 2000). Outra possível aplicação industrial da enzima  $\alpha$ -galactosidase é na indústria de papel e de polpa, onde galactosidases podem aumentar a clarificação da polpa, efeito de endo- $\beta$ -1,4-mananases na polpa de papel Kraft.

## 2.4 Imobilização Enzimática

A enzima imobilizada é definida como "a enzima fisicamente confinada ou localizada em uma determinada região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser usada várias vezes e de forma contínua" (CHIBATA, 1978). Não existe um método universal de imobilização. Cada utilização exige avaliação de cada um dos passos de acordo com critérios propostos de imobilização, atividade, rendimento, estabilidade, simplicidade e viabilidade econômica. Cada método tem suas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas e investigadas para todos os biocatalisadores e reação enzimática (SCOUTEN, 1987).

O primeiro trabalho sobre imobilização de enzima foi no início do século XX, quando a invertase foi adsorvida em carvão ativado e alumina, com retenção de atividade na inversão de sacarose, embora o objetivo destes pesquisadores fosse a purificação da enzima (NELSON e GRIFFIN, 1916).

A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade (MATEO *et al.*, 2007).

Além de aplicações médicas, os biocatalisadores imobilizados têm sido amplamente usados em escala industrial, particularmente em biomateriais, bioseparadores e biosensores, por imobilização em vários suportes (CHEN *et al.* 2000; AKGOL *et al.* 2001; BAYRAMOGLU *et al.* 2003). A principal aplicação em larga escala de enzimas imobilizadas é na área de alimentos, como na produção de xarope de alto teor de frutose (“high fructose syrups”) usando glicose isomerase e na indústria farmacêutica, na produção de ácido 6-aminopenicilânico usando penicilina amidase imobilizada (TOMOTANI e VITOLO, 2006; DAVID *et al.* 2004).

Uma outra área em potencial é a construção de órgãos artificiais como o uso da urease imobilizada em rins artificiais que removem a uréia do sangue para uma desintoxicação extracorporeal (HEARN e NEUFELD, 2000).

As enzimas imobilizadas estão sendo aplicadas em indústrias alimentícias e se tornado uma importante tecnologia na indústria leiteira, sendo largamente utilizadas na hidrólise de lactose do leite, produtos lácteos, além de derivados de soja.

O uso de enzimas imobilizadas na área de alimentos cresce a cada dia, pois o controle dos custos do processo é muito rígido devido ao baixo valor agregado dos produtos (DAVID *et al.* 2004; SANJAY e SUGUNAN, 2005; OSMAN *et al.* 2005).

Diferentes métodos de imobilização foram desenvolvidos, como a oclusão em alginato e fibra, ligação sobre quitosana, espuma de poliuretano, gelatina, ossos em pó e adsorção em resinas de fenol / formaldeído. Alguns destes métodos sofrem baixo rendimento de imobilização ou desprendimento contínuo de enzima (CARPIO *et al.*, 2000). A enzima pode ser usada na forma solúvel, que é normalmente utilizada em processos batelada, enquanto a forma imobilizada tem uma operação contínua (BODALO *et al.*, 2001).

A desvantagem das enzimas imobilizadas é que elas são protegidas pelo suporte, o que limita as suas variações, mudanças e diminuição de suas propriedades características. Suportes também ofuscam a mudança de temperatura das enzimas, alternância de pH, condições de agitação e pode haver uma possível perda na atividade enzimática. Os efeitos difusionais devido ao transporte do substrato e do produto ao

sítio ativo da enzima imobilizada também se tornam uma desvantagem ao uso de imobilização (SECUNDO *et al.*, 2002; BAYRAMOGLU *et al.*, 2003).

A imobilização enzimática tem um custo elevado quando comparado ao uso da enzima livre, mas a imobilização de enzimas dá a possibilidade de utilizar o biocatalisador imobilizado repetidamente, em reações bateladas ou reações contínuas, e em sistemas de reatores tubulares (UHLIG, 1991). Algumas das principais vantagens da enzima imobilizada são citadas abaixo (ALEKSANYAN e MARKOSYAN, 1986; ALBAYRAK e YANG, 2002; GÓMEZ *et al.*, 2005; SZYMANSKA *et al.*, 2007).

- Permite processamento de grandes quantidades de substrato, uma vez que pode ser separado e recuperado o produto da mistura de substrato-produto;
- Transmite uma maior estabilidade para a enzima, de modo que possa ser utilizado em processos contínuos;
- Proporciona um maior controle do processo catalítico;
- Permite um grande aproveitamento econômico, pelo fato da possibilidade de sua reutilização;
- Flexibilidade do *design* do reator;
- Melhor controle operacional;
- Reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- É possível usar alta dosagem de enzima por volume de reator, comparado ao uso de enzimas livres;
- A enzima não contamina o produto.

## 2.5 Métodos de imobilização enzimática

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método único. Isto se deve às diferentes características e composição química das enzimas, às diferentes propriedades do substrato e do produto e à finalidade de aplicação do produto obtido. Assim, para cada aplicação de enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato, que resulte em uma imobilização com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

A estabilidade da enzima pode ser melhorada dramaticamente se uma técnica adequada de imobilização for empregada. No caso das  $\alpha$ -galactosidases, existem vários procedimentos para imobilização: fixação ou união a suportes porosos por adsorção, interação



iônica, formação de complexos com metais (quelação) e formação de ligações covalentes (LADERO *et al.*, 2000).

As diferenças no comportamento da enzima imobilizada, quando comparada à sua forma em solução, devem-se aos seguintes fatores: efeitos conformacionais - modificação conformacional da molécula de enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo; efeitos estereoquímicos - uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível; efeitos difusionais ou de transferência de massa - têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima e do produto da reação; efeitos microambientais - resultantes do método de imobilização utilizado ou da presença e natureza (hidrofóbica ou hidrofílica) do suporte na vizinhança da enzima. Todos esses fatores podem influenciar as propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  (velocidade máxima de reação enzimática), deslocamento dos valores de pH e comportamentos diferentes em relação à temperatura (MARKOGLOU e WAINER, 2003).

Para diminuir os efeitos do deslocamento de pH na atividade das enzimas imobilizadas, algumas análises devem ser realizadas: tipo e a força iônica do tampão de imobilização utilizado, possibilidade da alteração do tamanho da partícula do suporte e co-imobilização de enzimas que capturem os prótons gerados durante a reação de imobilização (TISCHER e KASCHE, 1999).

Existem várias formas de classificar os métodos de imobilização de enzimas, de acordo com a natureza da interação responsável pela imobilização. Podem ser classificadas em duas categorias: imobilização por ligação ou por retenção física, conforme pode ser verificado na Figura 2.4.

A imobilização por ligação envolve alteração na estrutura da enzima, através da ligação desta com o suporte insolúvel (ligação ao suporte) ou entre as moléculas da própria enzima (ligações cruzadas) (CAO, 2005).

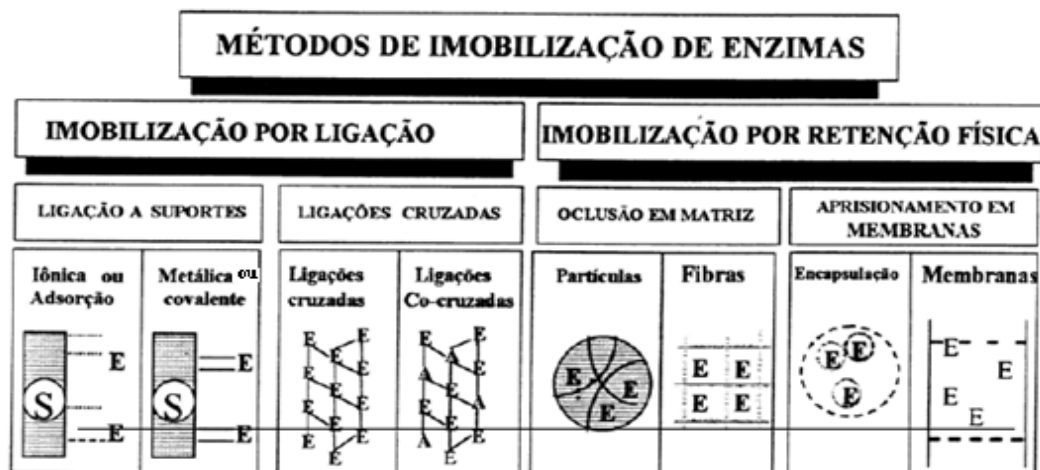


Figura 2.4 – Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzimas; S: suportes; A: Albumina. (BLANCH e KLARK, 1997; BULCHHOLZ *et al.*, 2005).

### 2.5.1 Ligação a suportes insolúveis

O método de ligação ao suporte pode ser dividido em quatro diferentes formas, sendo adsorção física, ligação iônica, ligação metálica e ligação covalente.

#### a) Adsorção física

O método de adsorção física para a imobilização de enzimas é baseado em adsorção física da proteína da enzima na superfície de suportes insolúveis. A enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Tal método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. Porém, apresenta como desvantagem a dessorção da enzima durante sua utilização (CHIBATA, 1978; BICKERSTAFF, 1997).

Os principais aspectos que devem ser analisados em um sistema de enzima imobilizada são o suporte (transportador), a enzima e o modo de interação da enzima com o suporte. O suporte pode ser uma membrana, um sólido insolúvel em água, ou uma matriz polimérica, classificados de acordo com sua morfologia (porosos, não porosos, ou tipo gel) e sua composição química (SCOUTEN, 1987).

Algumas vantagens podem ser destacadas neste método: é simples e de baixo custo, dispensabilidade de reagentes químicos e baixa probabilidade de desnaturação das enzimas (GÉKAS e LOPEZ, 1985).

O procedimento consiste em misturar a enzima e o material do suporte em condições apropriadas e seguindo um tempo de contato, separando o suporte imobilizado da solução em que ele se encontra, por centrifugação ou filtração. 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. A maior desvantagem desse método é a ligação fraca entre enzima-suporte e a preocupação com as condições de temperatura, pH, força iônica e tipo de solvente estar ou não em condições ótimas para não haver dessorção (KENNEDY e CABRAL, 1987). Uma etapa posterior com ligação cruzada contribui para a estabilidade do biocatalisador imobilizado no suporte. Reagente bi ou multifuncional, como glutaraldeído e disocianato de tolueno podem ser utilizados como agentes de ligação cruzada (BULCHHOLZ *et al.*, 2005; WOODWARD, 1984; CAO, 2005).

#### b) Ligação iônica

Este método é baseado principalmente em ligação iônica da enzima com o suporte sólido, contendo troca de íons. Na prática, tanto a iônica como a ligação de Van der Waals ocorrem juntas. A principal diferença entre absorção física e ligação iônica é a força de ligação da enzima e o suporte. O resultado das forças de ligação são mais fortes daquelas da adsorção física. Apesar de serem mais fortes, o processo de imobilização são os mesmos, as condições são brandas em comparação com os métodos que envolvem as ligações covalentes, e as mudanças de conformação produzidas são pequenas (KENNEDY e CABRAL, 1987; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Como desvantagem deste método também há a possibilidade de despreendimento da enzima do suporte, quando houver variação no pH e na força iônica do meio. As vantagens apresentadas são: possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo, simplicidade do método, disponibilidade de suportes e obtenção de enzimas imobilizadas com alta atividade (WEETALL, 1975).

Os suportes utilizados em menor escala são os suportes inorgânicos, principalmente sílica e resinas de troca iônica. De acordo com o tipo de trocadores eles são classificados como aniônicos ou catiônicos. O trocador aniônico mais comum contém grupos funcionais derivados de aminas, e o trocador catiônico contém como grupos funcionais sulfato, fosfato e seus derivados (KENNEDY e CABRAL, 1987). Na Tabela 2.2 são apresentados alguns exemplos de resinas trocadoras de íons adequadas para ligação iônica.

### c) Ligação metálica

Imobilização de enzimas por ligação metálica tem sido preparada usando compostos de metais de transição, principalmente sais metálicos, como de titânio e zircônio, para ativação da superfície de suportes orgânicos e inorgânicos ou usando o seu correspondente óxido metálico hidratado. Este método é baseado nas propriedades quelatantes de metais de transição, o qual pode ser empregado para ligar enzimas. Contudo, a estabilidade conseguida com tais catalisadores tem sido baixa devido à perda de enzimas para a solução (FLYNN e JOHNSON, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987).

### d) Ligação covalente

Ligação covalente entre suporte e enzimas é baseada na ligação entre moléculas de enzimas e suporte. A seleção das condições para imobilização de ligação covalente é mais dificultosa do que em outros métodos de ligação enzima-suporte. Para alcançar eficiente ligação à funcionalidade do suporte e da enzima deve-se fazer a ativação do suporte antes da imobilização. Alguns dos reagentes usados para ativação dos suportes contêm o grupo hidroxil ou amino (KENNEDY e CABRAL, 1987; CAO, 2005).

Enzimas covalentemente imobilizadas podem ser consideradas como quimicamente e fisicamente modificadas pelo suporte utilizado. Neste caso não é surpresa a modificação na conformação da enzima, tal como atividade, seletividade e estabilidade, podendo ser radicalmente melhorada na comparação não somente com outros métodos de imobilização de enzimas, mas também com a enzima nativa (CAO, 2005).

O glutaraldeído é um reagente geralmente usado na imobilização de enzimas nos processos industriais, efetuando uma ligação covalente entre um radical ativo do suporte com a molécula da enzima (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Como a ligação covalente é forte, a enzima imobilizada é estável e não ocorre perda da enzima para a solução, e assim pode influir na alta resistência a temperaturas, a desnaturantes e a solventes orgânicos em geral. A extensão disso depende das condições do sistema, da natureza da enzima e do tipo de suporte (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1978; ARICA, 2006 apud BAYRAMOGLU *et al.*, 2004).

Infelizmente, menos atenção tem sido dada para este método, embora descobertas de que a enzima pode ser dissolvida em alguns solventes orgânicos com alta retenção da

atividade poderia estimular novo interesse em explorar esse potencial da atividade e seletividade (CAO, 2005).

#### e) Ligação cruzada

A ligação cruzada é um método livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou à proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais, obtendo-se uma enzima quase pura (SHELDON, 2007). Entre os agentes de ligação cruzada mais usados está o glutaraldeído (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Como desvantagem do método está a necessidade de grande quantidade de enzima, resultando em baixas retenções da atividade e em baixa estabilidade mecânica, o que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade. Como alternativas ao método convencional, foram desenvolvidos os métodos por ligação cruzada utilizando-se de enzimas cristalinas (CLEC - cross-linked enzymes crystals) e o método de formação de agregados físicos, por precipitação, e subsequente intercruzamento (CLEAs - cross-linked enzyme aggregates) das enzimas do agregado (SHELDON, 2007). O uso dos CLEAs tem atraído a atenção, por sua simplicidade, extensa aplicação, alta estabilidade e preservação da atividade (JOSIC *et al.*, 2001; HAGE *et al.*, 2002; SHELDON, 2007).

### 2.5.2 Imobilização por retenção física

#### a) Imobilização de enzima por oclusão

Este método baseia-se em retenção das enzimas nos espaços intersticiais, podendo ser feito em géis, fibras e por microencapsulação, permitindo apenas difusão do substrato e produtos. Neste método, nenhuma reação ocorre, sendo um processo de retenção física da enzima. Este procedimento tem a vantagem de que o biocatalisador não é submetido a uma modificação estrutural, e é protegido por substâncias de alto peso molecular. É um processo muito simples e as enzimas não sofrem modificações químicas (CHIBATA, 1978; FABER, 1997).

- Oclusão em géis: a enzima está livre em solução, mas com seu movimento restrito por uma rede de gel ou polímero. A enzima é misturada aos componentes que

formarão o gel e, quando esse é formado, a enzima fica presa à matriz. A porosidade da matriz deve evitar a perda de enzima, e, ao mesmo tempo, permitir o livre movimento do substrato e do produto (CHAPLIN e BUCKE, 1990; GIRELLI *et al.*, 2005);

- Oclusão em fibras: é um método de imobilização de enzima por oclusão nas microcavidades de fibras sintéticas. Nesta técnica o monômero é dissolvido em um solvente orgânico e emulsionado numa solução aquosa de enzima. A emulsão é forçada através de um processo de extrusão com um líquido coagulante (tolueno ou éter de petróleo), precipitando o polímero numa forma filamentosa, com as microgotas de solução de enzima retidas. As vantagens desse método é que as fibras são resistentes a ácidos fracos, a alta força iônica e a alguns solventes orgânicos, além de ser muito estável (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; KENNEDY e CABRAL, 1987);
- Membranas: O método de imobilização por meio de contenção em membranas envolve a utilização de membranas pré-formadas (reatores do tipo hollow fiber) ou a formação *in situ* da membrana em torno das células a serem imobilizadas (KAREL *et al.*, 1985). Este método consiste em colocar a solução de enzima e o substrato de um mesmo lado da membrana, permitindo o contato íntimo entre a enzima e o substrato. Esse processo pode ser utilizado na conversão de substratos de alto peso molecular (KENNEDY e CABRAL, 1987). Devido à ausência de núcleo gelificado, as limitações à transferência de massa também são reduzidas (PARK e CHANG, 2000);
- Encapsulação: pode ser obtida pelo envolvimento das enzimas por membranas semipermeáveis, ou por micelas reversas formadas por surfactantes. As enzimas permanecem livres em solução, mas em um espaço restrito. A vantagem deste método é a grande área superficial de contato do substrato e enzima dentro de um volume relativamente pequeno e da possibilidade real de imobilização simultânea de várias enzimas em uma única etapa (KENNEDY e CABRAL, 1987).

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (MALCATA *et al.*, 1990).

### 2.5.3 Suportes para imobilização

Durante as últimas décadas tem surgido grande interesse na tecnologia de imobilização das enzimas, que permite uma maior utilização (reuso) em muitos processos biológicos caros comparados com a enzima em solução, dando a chance de operar em um sistema contínuo pelo fato de operar em colunas empacotadas. A viabilidade comercial dos processos que utilizam enzimas imobilizadas tem sido avaliada levando em consideração o custo e a eficiência. O baixo custo do material de suporte combinado com uma boa retenção da atividade enzimática e um longo período de trabalho são fatores relevantes na determinação da viabilidade do sistema (RUBIOLLO e CARRARA, 1997).

A imobilização enzimática em suportes sólidos permite, além da reutilização de sua atividade catalítica, um melhor controle das reações e o projeto de biorreatores podem ser facilmente incorporados numa linha de processo contínua (WHITAKER, 1990). A imobilização enzimática em suportes apropriados se constitui em área de interesse enquanto pode significar a melhoria de processos e barateamento de custos. Sendo que o suporte ideal deve adsorver a enzima, sem afetar sua atividade e sem interferir na reação enzimática (COMERLATO, 1995).

O material do suporte deve ser efetivamente inerte, conter um grande número de sítios para a imobilização da enzima e impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação. Os suportes mais utilizados para a imobilização das enzimas incluem vidro poroso, resinas de troca iônica, policrilamida e colágeno (BAKKEN *et al.*, 1990).

Para o uso industrial são mais adequados os suportes inorgânicos, devido às suas propriedades físicas. Além disso, apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como, por exemplo, elevada força mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de micro-organismos e fácil regeneração por processo de pirólise. No mais, materiais inorgânicos não apresentam modificação na estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. Contudo, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas é obtida com matrizes orgânicas, provavelmente devido à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Os suportes, quanto à sua classificação morfológica, podem ser porosos, não porosos e estrutura gel. Os suportes porosos, tanto orgânicos quanto os inorgânicos, apresentam como

vantagem a grande área superficial interna disponível para imobilização da enzima, que neste caso fica protegida de turbulência externa, elevado teor em biocatalisadores e proteção ao ambiente externo. Algumas das desvantagens desse tipo de suporte são: elevadas limitações difusionais, custo alto, alta pressão osmótica. Os não-porosos eliminam a resistência à transferência de massa interna, contudo, apresentam uma limitada área superficial disponível para imobilização de enzimas. Para aumentar a carga de enzima imobilizada, utilizam-se partículas finas ou fibras, porém, estas são dificilmente removidas da mistura reacional, limitando o uso em reações contínuas, desde que levadas a uma alta pressão em reatores de leito fixo. Além disso, influem no grau de escoamento se utilizadas em reatores de leito fluidizado (PEREIRA, 1996). A Tabela 2.2 ilustra os diferentes tipos de suporte e sua classificação.

Tabela 2.2 – Classificação dos suportes conforme a composição (GALVÃO, 2004).

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

Apesar do alto custo da imobilização, os processos com enzima imobilizadas podem tornar-se economicamente viável quando comparado aos processos que utilizam enzimas livres, uma vez que estes processos podem ser realizados continuamente e oferecer a possibilidade de reutilização da enzima e um melhor ambiente para a atividade catalítica da enzima (SZCZODRAK, 2000; LADERO *et al.*, 2005).

Pesquisadores têm utilizado alginato como um meio para a oclusão de  $\beta$ -galactosidase, mas este procedimento de imobilização de enzimas tem algumas limitações, tais como o problema do substrato e do produto na difusão dentro e fora das partículas de alginato (HAIDER e HUSAIN, 2007).



A quitosana é um suporte cada vez mais utilizado em muitas aplicações, incluindo sistemas de administração de medicamentos. A desvantagem da quitosana é limitada à sua solubilidade em água e ao baixo pH da solução de quitosana, sendo assim, tendendo a desnaturar a enzima (TAQIEDDIN *et al.*, 2002).

#### 2.5.4 Quitosana

A quitosana (Figura 2.5) foi descoberta em 1859, pelo professor C. Rouget, quando este pesquisador colocou em ebulição uma solução de hidróxido de potássio com quitina (Figura 2.6). O derivado mais importante da quitina é a quitosana.

A quitosana é um polímero natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (AZEVEDO *et al.*, 2007), tendo um alto potencial como uma fonte de polissacarídeos (SILVA *et al.*, 2006).

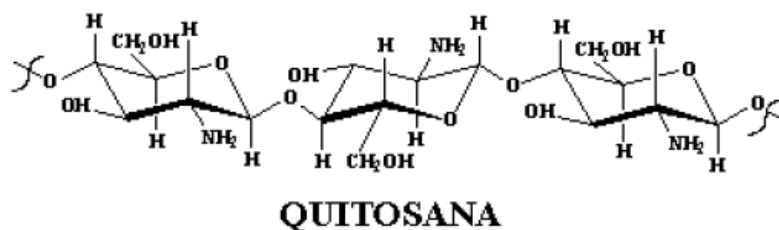


Figura 2.5: Estrutura química da quitosana.

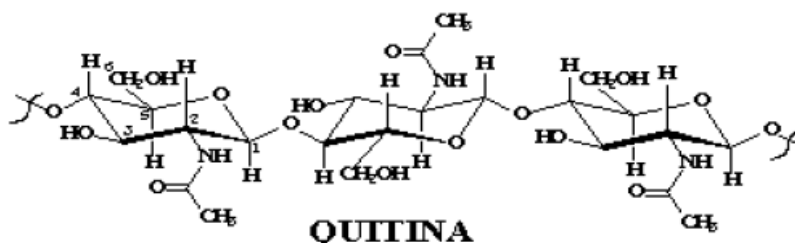


Figura 2.6: Estrutura química da quitina.

O emprego da quitosana como suporte em imobilizações torna-se uma opção atrativa, por apresentar uma maior afinidade por proteínas que sua precursora, além do fato de apresentar um maior número de grupos amins livres reativos em sua molécula (HIRANO, 1996).

Este polímero natural apresenta vantagens em relação aos sintéticos por terem menos limitações quanto à biodegradação e biocompatibilidade. Entretanto, pode exibir uma limitação em suas reatividades e processamentos.

A quitosana é obtida por reação de hidrólise alcalina da quitina, resultando no biopolímero constituído predominantemente das unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, apresentando em sua cadeia aproximadamente 70-90% de grau de desacetilação (FURLAN, 1997). A transformação da quitina em quitosana modifica suas propriedades, de modo que a quitosana insolúvel em água, torna-se solúvel na maioria dos ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico e ácidos inorgânicos, incluindo o ácido clorídrico. A produção comercial ocorre essencialmente através de fontes marinhas conforme demonstrado pela Figura 2.7 (SKAUGRUD *et al.*, 1998).

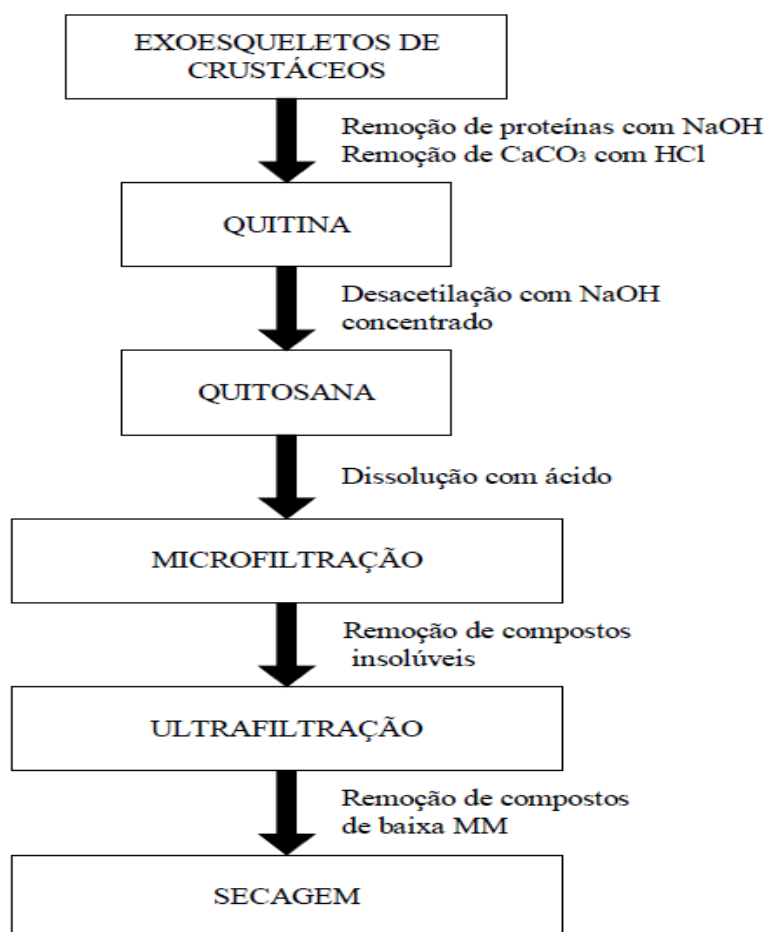


Figura 2.7: Esquema simplificado dos processos de fabricação industrial de quitosana

Devido à presença de grupos amino livres na quitosana e sua consequente solubilidade em soluções aquosas de certos ácidos, seu caráter de polieletrólito e suas propriedades físicas, químicas e biológicas, tornam este polímero mais versátil quimicamente quando comparado com seu análogo, a quitina. Dessa forma, a quitosana torna-se uma atraente alternativa para muitas aplicações (VILLELA, 2006).

A quitosana é solúvel em ácidos diluídos como ácido acético e fórmico, além disso, sofre reações típicas de aminas. Este polímero é interessante devido ao alto conteúdo de grupos amino primário, que permitem a quitosana ser homogeneamente modificada em meio aquoso enquanto a nucleofilicidade destes grupos permitem modificações químicas na molécula visando a um melhor desempenho funcional (KUMAR *et al.*, 1999).

A quitosana apresenta um grande interesse industrial devido a sua alta percentagem de nitrogênio (6,89%) comparado à celulose sintética substituída (1,25%). Isto faz da quitosana um potente agente gelificante (MUZZARELLI, 1973), propriedade que é responsável por muitas das aplicações da quitosana em diversos setores de síntese e produção industrial. Outro importante fator é que a quitina (precursor da quitosana) é o polímero mais abundante na natureza depois da celulose.

Na área ambiental, a quitosana vem sendo utilizada para promover a clarificação das águas, tendo a capacidade de remover óleos, graxas, metais pesados e partículas de matéria que causam turvação em águas (JUANG e SHAO, 2002). Esse material também tem sido estudado para promover a remoção de compostos tóxicos e coloridos de efluentes industriais.

A quitosana possui algumas propriedades biológicas tais como, atividade antimicrobiana e cicatrizante, que tem sido atribuída aos fragmentos (oligossacarídeos) resultantes da degradação enzimática da quitosana. Essas propriedades, associadas à capacidade de formar filmes, fizeram da quitosana o biopolímero escolhido como substrato para o desenvolvimento de lentes de contato, invólucro protetor para preservação de frutas e verduras, tratamento de lesões na pele, encapsulamento de fragrâncias, pigmentos, no preparo de loções, cremes e outros (SANDFORD e HUTCHINGS, 1997). Além disso, vem sendo utilizada como suporte para imobilização de micro-organismos e enzimas, devido as propriedades já citadas, e, principalmente, em função de sua matéria prima ser de baixo custo, pois se trata, principalmente, de resíduos da industria pesqueira (SAKURAGAWA *et al.*, 1998).

### 2.5.5 Glutaraldeido

Glutaraldeido, glutaral, aldeído glutárico, pentano-1,5-dial ou 1,5 pentanedial é um dialdeido saturado, com um odor pungente, usado em desinfetantes e esterilizantes ambulatoriais e hospitalares. Possui fórmula química  $C_5H_8O_2$ . Sua fórmula estrutural está representada pela Figura 2.8.

Embora seja usado em ambiente médico, é tóxico, causando severas irritações nos olhos, nariz, garganta e pulmões, juntamente com cefaléias, sonolências e vertigens.



Figura 2.8: Estrutura química do glutaraldeído.

A ativação enzimática dos suportes através de glutaraldeído é uma das técnicas mais populares para imobilizar enzimas (BURTEAU *et al.*, 1989; VAN AKEN *et al.*, 2000; DOS REIS-COSTA *et al.*, 2003; MAGNAN *et al.*, 2004). Além disso, o glutaraldeído, também tem sido muito usado para introduzir reticulação intermolecular em proteínas (VISURI *et al.*, 1999; GOVARDHAN, 1999, SCHOEVAART *et al.*; 2004) ou para modificar proteínas adsorvidas em suportes aminados. (HWANG *et al.*, 2004).

Suportes ativados com glutaraldeídos apresentaram elevados rendimentos de imobilização e atividade recuperada, isto ocorre devido ao glutaraldeído ser um reagente que apresenta dois grupos aldeídos com elevada reatividade, promovendo reações com vários grupos laterais das proteínas como: hidroxila, carbonila, amino e sulfidril (ADRIANO *et al.*, 2005).

A estrutura exata do glutaraldeído como suporte ainda está em discussão (MONSAN, 1978; MIGNEAULT *et al.*, 2004), mas, dada a elevada estabilidade da ligação multiponto entre o grupo amino e o glutaraldeído, a formação de algum tipo de ciclo parece ser uma possibilidade provável.

Tem sido demonstrado que é relativamente simples ativar suportes aminados com glutaraldeído, utilizando-se para isso até duas moléculas de glutaraldeído por grupos amino primário (MONSAN, 1978). Resultados apontaram que o uso de condições mais drásticas promoveu um notável aumento na quantidade de glutaraldeído introduzido no suporte, sugerindo uma polimerização descontrolada de glutaraldeído.

Estes resultados sugerem que, controlando as condições de ativação, pode ser possível ativar todos os grupos amino em um suporte com uma única molécula de glutaraldeído por grupo amino ou com até duas moléculas de glutaraldeído, em vez de usar ativações aleatórias que poderiam produzir uma mistura de monômeros e dímeros. Entretanto, isto poderia ter mais importância se as propriedades de ambos os glutaraldeído

(monômeros ou dímeros) em grupos de imobilização de proteína fossem diferentes, mas isso não foi discutido anteriormente (MIGNEAULT *et al.*, 2004).

Existem várias possibilidades de utilização de glutaraldeído para a imobilização de proteínas. Duas dessas possibilidades são: o uso de suportes previamente ativados (ZHOU e CHEN, 2001; MAGNAN *et al.*, 2004; SEYHAN e ALPTEKIN, 2004; BURTEAU *et al.*, 1989; VAN AKEN *et al.*, 2000; DOS REIS-COSTA *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2003; LAMAS *et al.*, 2001) ou o tratamento com glutaraldeído sobre proteínas previamente adsorvidas em suporte com grupos amino primários (D'SOUZA e KUBAL, 2002; HWANG *et al.*, 2004). No entanto, na primeira estratégia as modificações da enzima restringem-se aos grupos da proteínas que estão envolvidas com a imobilização, enquanto no segundo caso, toda a superfície da proteína pode ser modificada (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1995).

Quando a imobilização é feita com pré-ativação do suporte, os grupos amino primários da enzima reagem com os grupos aldeído que foram introduzidos, fato esse que acontece geralmente com duas moléculas de glutaraldeído (MONSAN, 1978; GUISÁN *et al.*, 1997). Devido a baixa estabilidade do suporte glutaraldeído em altos valores de pH (baixa eficiência da ligação covalente multiponto em valores elevados de pH), a imobilização desse suporte acontece em uma faixa de pH entre 7 e 8,5.

Por outro lado, quando a enzima é inicialmente adsorvida no suporte, e posteriormente tratada com glutaraldeído em condições brandas, todos os principais grupos amino da enzima e do suporte podem ser ativados com uma única molécula de glutaraldeído. Isso permite obter intensas ligações multipontos sob uma ampla faixa de condições (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1995). Dessa forma, a molécula ligada ao glutaraldeído através dos grupos amino da enzima poderiam reagir covalentemente estabelecendo assim uma forte ligação multiponto, acarretando em uma maior fixação da enzima no suporte.

## 2.6 Hidrólise enzimática dos galacto-oligossacarídeos

A  $\alpha$ -galactosidase catalisa clivagem de resíduos  $\alpha$ -1,6 terminais de uma grande faixa de substratos incluindo oligossacarídeos lineares e ramificados, polissacarídeos e substratos sintéticos como o *p*-nitrofinil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (*p*NP $\alpha$ Gal) (ADEMARK *et al.*, 2001).

A hidrólise dos galacto-oligossacarídeos pode ser conseguida pela catálise das enzimas  $\alpha$ -galactosidases que são específicas para ligações  $\alpha$ -1,6 que une os resíduos de

galactose à sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose, e também por invertases, enzimas específicas para a ligação  $\beta$ -1,2 que une frutose à glicose nos mesmos oligossacarídeos acima citados (FIALHO, 2007).

Um esquema da via de degradação dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, está representado na Figura 2.9.

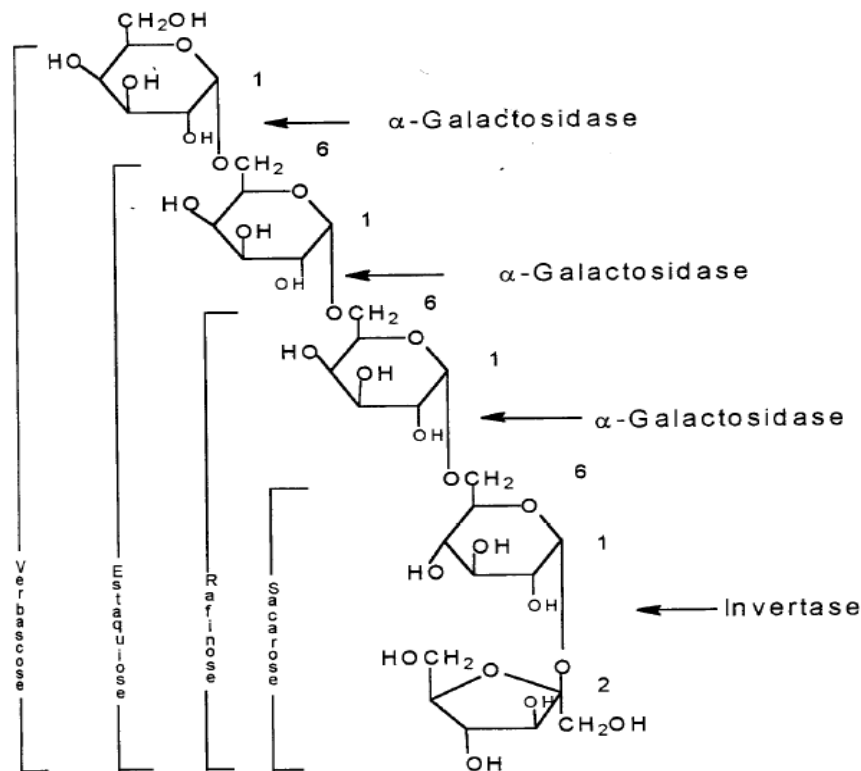


Figura 2.9: Galacto-oligossacarídeos e sítios de clivagem para as enzimas hidrolíticas invertase e  $\alpha$ -galactosidase (Retirado de REZENDE, 1998).

Existem vários relatos sobre a utilização de  $\alpha$ -galactosidases de origem vegetal e microbiana na degradação dos oligossacarídeos presentes em extrato hidrossolúvel de soja, também conhecido como leite de soja, e em outras farinhas obtidas de leguminosas (SOMIARI e BALOGH, 1993; MULIMANI *et al.*, 1997).

Várias pesquisas visando o estabelecimento de processos para a remoção dos galacto-oligossacarídeos (GO) no leite de soja com a utilização de enzimas já foram realizados como a produção de  $\alpha$ -galactosidases pelo fungo *Aspergillus oryzae* e sua aplicação na hidrólise dos GO no leite de soja (CRUZ e PARK, 1982). Com o mesmo objetivo, imobilizaram em gel de poliácridamida a  $\alpha$ -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* para redução dos GO no leite de soja (THIPPESWAMY e MULIMANI, 2002). Reduziu-se completamente

o conteúdo de rafinose e estaquiose no leite de soja após 4 horas usando a  $\alpha$ -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV1 (VIANA *et al.*, 2005).

Estudos utilizando fontes vegetais para a obtenção de  $\alpha$ -galactosidases para uso em processo de hidrólise dos GO em leite de soja, ainda são escassos se, comparados com as fontes microbianas (FIALHO, 2007). A atividade das enzimas  $\alpha$ -galactosidase e invertase foram avaliadas durante o processo germinativo de *Glycine max*, e, testou-se a redução dos GO no leite de soja pela adição de pequenas proporções de grãos de soja germinados na formulação do produto (CRUZ e SILVA, 1986). Segundo os autores, não houve um decréscimo substancial de rafinose e estaquiose. Já em outro estudo (GUIMARÃES *et al.*, 2001), obteve-se redução expressiva dos GO em leite de soja pelo tratamento com  $\alpha$ -galactosidase de sementes germinadas de soja var. Doko.

Em outros estudos, testaram-se três técnicas para redução dos GO: embebição, cocção dos grãos e tratamento enzimático com enzima obtida de *Cassia sericea*, concluindo que o último tratamento foi o mais eficiente conseguindo hidrólise total dos GO após 3 horas. Entretanto, nenhum processo enzimático seguro, eficiente e economicamente satisfatório, utilizando enzimas nativas ou recombinantes, está disponível até o momento (MULIMANI e DEVENDRA, 1998).

## 2.7 Influência do pH na atividade e estabilidade das enzimas

SÖRENSEN (1909) mostrou que a atividade enzimática depende do pH. Sabe-se, desde então, que a atividade máxima de uma enzima corresponde a determinado pH ótimo.

MICHAELIS e DAVIDSOHN (1911) formularam a hipótese de que a dependência da atividade da enzima ao pH é consequência das propriedades anfotéricas das proteínas enzimáticas. Assim, se observa a característica em forma de sino das curvas de pH, o que indica que a proteína no seu ponto isoelétrico apresenta o máximo de atividade catalítica.

É possível que a ionização de grupos localizados nos centros ativos ou próximo deles tenha grande efeito na atividade da enzima. Em sistema enzimático, o pH influi no estado de ionização dos componentes do sistema: enzima livre, complexo enzima-substrato ou o próprio substrato (VILLELA *et al.*, 1978).

O pH exerce grande influência sobre a velocidade das reações. Muitas enzimas possuem velocidades máximas num determinado pH, denominado pH ótimo, enquanto outras

atuam com igual eficácia dentro de uma faixa limitada de pH. Vários fatores influenciam o pH ótimo, incluindo os grupos ácidos no sítio ativo. Se uma enzima necessita de um grupo ácido protonado para sua ação catalítica, a enzima pode exibir uma atividade máxima em valores de pH abaixo do  $pK$  do grupo. Por outro lado, quando há necessidade da forma dissociada de um ácido, a atividade máxima pode ocorrer acima do  $pK$  do grupo. Com frequência, dois ou mais grupos ácidos dissociáveis participam do sítio ativo, e as curvas que relacionam o pH com a atividade irão refletir a dependência de cada grupo ao pH. Na verdade, o estudo dos efeitos do pH sobre a velocidade da reação pode ajudar a identificar grupos ácidos num sítio ativo, embora outras informações sejam necessárias.

Alguns substratos são ácidos fracos ou contém constituintes iônicos, e o pH ótimo pode refletir a necessidade de uma forma iônica ou não-iônica de substrato para a enzima, além disso, o rápido declínio na velocidade da reação, que é frequentemente observado em valores altos e baixos de pH, pode refletir na desnaturação da enzima ou a dissociação de um cofator essencial (SMITH *et al.*, 1985).



---

---

# CAPÍTULO 3

---

## **3 Materiais e Métodos**

A seguir são descritos os materiais, equipamentos e a metodologia experimental utilizada no desenvolvimento dessa dissertação.

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Unidade experimental**

A unidade experimental foi montada no Laboratório de Engenharia Bioquímica localizado na Universidade Federal de Uberlândia, onde foram realizados os experimentos para determinação da atividade para a enzima na forma imobilizada como estão representados na Figura 3.1 e na Figura 3.2. Esta unidade experimental consistia em um microrreator de mistura, de volume útil de 50 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostático para controle da temperatura, submetido à agitação magnética. As partículas imobilizadas eram colocadas dentro de uma cesta de aço inox de 100 mesh, e esta colocada dentro do reator, evitando assim o atrito entre o agitador e a enzima imobilizada.

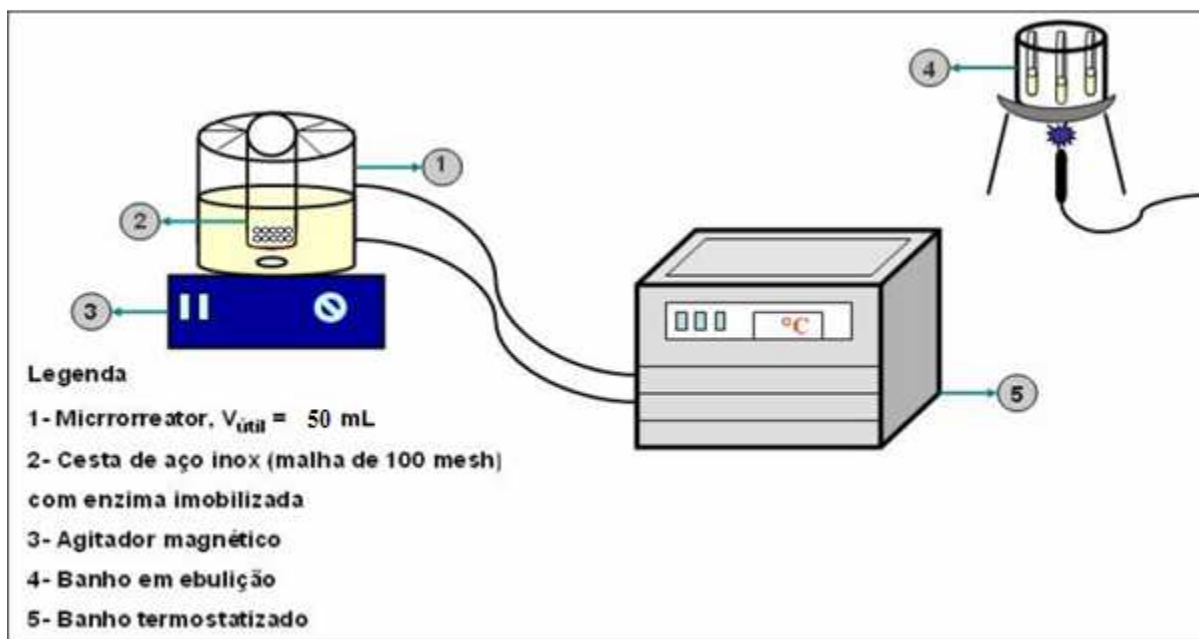


Figura 3.1: Unidade experimental



Figura 3.2: Reator utilizado para realizar os ensaios.

### 3.1.2 Enzima

A enzima utilizada nos ensaios de hidrólise do melão de soja foi StartMax<sup>®</sup> AGSL, cedida pela empresa Prozyn Biosolutions<sup>®</sup>. A StartMax<sup>®</sup> AGSL (SM) é constituída a base de  $\alpha$ -galactosidase, produzida por fermentação controlada de *Aspergillus niger*. A enzima foi estocada sob refrigeração em embalagem fechada.

### 3.1.3 Suporte

A quitosana em pó foi obtida da Polymar.

### 3.1.4 Rafinose

Utilizou-se rafinose-D(+) pentahidratada de grau analítico de 98% como substrato. Esta foi adquirida da empresa Vetec®.

### 3.1.5 Agente reticulante

Glutaraldeído foi utilizado como agente reticulante. Este foi adquirido da empresa Quimibrás S.A® em frasco contendo solução a 25%.

## 3.2 Metodologia

### 3.2.1 Estudo preliminar para preparação das partículas de quitosana

Foram testados 4 métodos com o intuito de preparar as partículas de quitosana:

- Método 1: pesou-se cerca de 1 grama de quitosana em pó e diluiu-se em 30 mL de ácido acético 5%. A solução obtida foi gotejada em NaOH 1 Molar.
- Método 2: pesou-se cerca de 1 grama de quitosana em pó e diluiu-se em 30 mL de ácido acético 5%. A solução obtida foi gotejada em NaOH 2 Molar.
- Método 3: pesou-se cerca de 1 grama de quitosana em pó e diluiu-se em 30 mL de ácido acético 5%. A solução obtida foi gotejada em solução de glutaraldeído 5% (v/v) cujo solvente foi uma solução de NaOH 2 Molar.
- Método 4: pesou-se cerca de 1 grama de quitosana em pó e diluiu-se em uma solução de 30 mL de ácido acético 5% (em peso) e concentração de  $5\text{g.L}^{-1}$  de  $\alpha$ -galactosidase. A solução obtida foi gotejada em uma solução de glutaraldeído 5% cujo solvente foi uma solução de NaOH 2 Molar.

Posteriormente, com a finalidade de se comparar os métodos, procedeu-se à imobilização das partículas em soluções de glutaraldeído a 5% (v/v) em solução tampão de pH equivalente a 8 e tempo de imobilização de 2 horas com concentração enzimática de  $5\text{g.L}^{-1}$ . Esse procedimento aconteceu para as metodologias 1, 2 e 3.

Com relação à metodologia 3, importante ressaltar que não foi necessário utilizar glutaraldeído posteriormente à fase de produção das partículas de quitosana haja vista o fato de que o referido agente reticulante fora usado no próprio processo de formação das partículas. Já as partículas produzidas conforme a metodologia 4 foram submetidas à hidrólise imediatamente após o processo de confecção.

### 3.2.2 Preparação das partículas de quitosana

Para a produção das partículas foi pesada cerca de 1 grama de quitosana em pó e diluiu-se em 30 mL de ácido acético 5%. As soluções foram gotejadas em uma solução de NaOH 2 molar (conforme explicitado pelo método 2 do item 3.2.1).

O gotejamento foi realizado com auxílio de uma bomba peristáltica com uma vazão de 0,50 mL/ min, com uso de mangueira. Logo após, as partículas permaneceram no banho de precipitação por 24 horas. Na sequência, as mesmas foram lavadas com água destilada e armazenadas em solução tampão fosfato (0,1M) de pH 8 como mostrado na Figura 3.3.



Figura 3.3: Partículas de quitosana lavadas com água destilada.

### 3.2.3 Imobilização das enzimas em partículas de quitosana

O processo de imobilização das enzimas nas partículas foi realizado adicionando-se 10 esferas de quitosana em um erlenmeyer de 125 mL juntamente com 10 mL de solução de glutaraldeído diluída em solução tampão em faixa de pH previamente estabelecida em um shaker a 150 rpm e temperatura definida. Tanto o período de contato entre as partículas e as soluções de glutaraldeído como a própria concentração de glutaraldeído e da enzima  $\alpha$ -galactosidase no processo de imobilização variaram conforme o planejamento experimental.

A atividade enzimática foi avaliada como resposta para o referido planejamento.

### 3.2.4 Determinação da atividade de $\alpha$ -galactosidase imobilizada pelo método das velocidades iniciais

Em todos os experimentos realizados com  $\alpha$ -galactosidase imobilizada para hidrólise de rafinose, usou-se o método das velocidades iniciais da reação para determinar a atividade catalítica.

A reação de hidrólise da rafinose era realizada em um microrreator conforme item 3.1.1, com um volume útil de 35 mL de solução de rafinose, nas condições de pH, concentração e temperatura (6; 5 g.L<sup>-1</sup> e 45°C respectivamente) desejadas, além de agitação definida. Para cada experimento era adicionada ao reator uma cesta de aço inox com a enzima imobilizada, usando 10 partículas de quitosana com a enzima imobilizada nas respectivas concentrações de glutaraldeído definidas previamente no processo de imobilização.

A unidade de atividade ( $U_i$ ) foi definida como grama de rafinose hidrolisada por grama de partícula de quitosana ( $g_{RH}/g_{SQ}.L.minuto$ ).

Para cada experimento foram tomadas cinco amostras no intervalo de cinco em cinco minutos. Cada amostra era 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  $\alpha$ -galactosidase. A galactose formada nas amostras era dosada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER,1959). Os valores obtidos foram calculados com o auxílio de uma curva padrão cuja concentração de galactose é correlacionada com a absorvância (Apêndice A). As análises foram feitas em triplicata.

A unidade para a atividade ( $U_i$ ) obtida foi definida conforme estabelece a Equação 3.1, em que o parâmetro [ $U_i$ ] representa a unidade da atividade,  $g_{RH}$  representa a quantidade de rafinose hidrolisada em gramas; L representa o volume reacional em litros, min representa o tempo em minutos e  $g_{SQ}$  representa a massa do suporte de quitosana e do biocatalisador em gramas no processo de imobilização:

$$[U_i] = \frac{g_{RH}}{L.min.g_{SQ}} = g_{RH}.L^{-1}.min^{-1}.g_{SQ}^{-1} \quad (3.1)$$

A atividade calculada a partir do método das velocidades iniciais, para cada reação da hidrólise da rafinose, era obtida por meio das inclinações das retas de concentração dos açúcares totais produzidos em função do tempo de reação. Todos os experimentos realizados

até o final do trabalho foram feitos em duplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. A atividade foi calculada com a curva de calibração, conforme Apêndice A.

### 3.2.5 Teste da influência do tempo e da concentração de glutaraldeído no processo de imobilização

Após os testes preliminares que indicaram o melhor método para se produzir partículas de quitosana, conforme o item 3.2.1, foi proposto um Planejamento Fatorial Central (PFC) para o estudo das variáveis tempo e concentração de glutaraldeído no processo de imobilização.

Experimentos que envolvem níveis de dois ou mais fatores são delineados com esquemas fatoriais. Denominam-se fatores as variáveis independentes que tiverem seus níveis fixados segundo o interesse do pesquisador. Na literatura o planejamento fatorial não é considerado delineamentos experimentais, mas sim delineamentos de tratamentos. Se todas as combinações possíveis entre todos os níveis de cada fator estão presentes, o esquema fatorial é dito completo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Essa técnica permite avaliar não somente os efeitos principais dos fatores como também os efeitos de interação entre os mesmos. O número de experimentos é igual ao número de níveis experimentais elevado ao número de fatores. Arranjos fatoriais completos podem ser gerados para qualquer quantidade de fatores e os níveis de cada fator se alternam nas colunas, segundo uma mesma ordem (PAIVA, 2006).

Nesses experimentos, fixou-se os valores das variáveis temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$ ), concentração de enzima ( $5\text{ g.L}^{-1}$ ) e pH (7), variando apenas as variáveis de interesse conforme o PFC proposto. O planejamento foi elaborado para duas variáveis totalizando 11 experimentos utilizando-se o *software Statistica 7.0*.

Neste planejamento, o tempo de imobilização situou-se na faixa de 2 (-1), 13 (0) e 24 horas (+1); já a concentração de glutaraldeído correspondeu aos valores de 0% (-1), 5% (0) e 10% (+1). Ambas as faixas foram fixadas mediante testes preliminares. Foram utilizados os tampões fosfato (0,1 M) para faixa de pH 8. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento ( $X_1$  = tempo de imobilização e  $X_2$  = concentração de glutaraldeído) estão apresentados na Tabela 3.1.

O cálculo dos valores codificados para as variáveis apresentadas são demonstrados pela Equação 3.2.

$$X_n = \frac{X - X_0}{\left[ \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (3.2)$$

$X_n$  = Valor codificado da variável (n=1,2...);

$X$  = Valor variável ser calculada;

$X_0$  = Valor da variável no ponto central;

$X_{+1}$  = Valor da variável no nível superior;

$X_{-1}$  = Valor da variável no nível inferior.

Tabela 3.1: Matriz Planejamento Fatorial Completo do efeito do tempo de imobilização e concentração de glutaraldeído na imobilização da  $\alpha$ -galactosidase em suporte de quitosana.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)	
	Tempo de imobilização (horas)	Concentração de glutaraldeído (%)
1	2 (-1)	0 (-1)
2	2 (-1)	5 (0)
3	2 (-1)	10 (+1)
4	13 (0)	0 (-1)
5	13 (0)	5 (0)
6	13 (0)	5 (0)
7	13 (0)	5 (0)
8	13 (0)	10 (+1)
9	24 (+1)	0 (-1)
10	24 (+1)	5 (0)
11	24 (+1)	10 (+1)

A imobilização foi realizada incubando-se 10 partículas de quitosana em 10 mL de uma solução de  $\alpha$ -galactosidase em solução tampão de pH 8 nas condições definidas conforme a Tabela 3.1, com agitação de 150 rpm em shaker e temperatura de 25°C. Ao final da imobilização, a determinação da atividade do biocatalisador foi realizada conforme item 3.2.4, usando uma concentração de rafinose de 5 g/L no meio reacional.

As Equações codificadas do tempo de imobilização e concentração de glutaraldeído são apresentadas nas Equações 3.3 e 3.4, respectivamente.

$$X_1 = \frac{t_{\text{imob}} - 13}{11} \quad (3.3)$$

$$X_2 = \frac{[G]_{\text{imob}} - 5}{5} \quad (3.4)$$

Um teste *t-Studente* foi aplicado à Equação 3.5 gerada pelo modelo para determinação do nível de significância de cada parâmetro, sendo aceitos como estatisticamente significativos somente aqueles que apresentaram valor-p inferior à 5% ( $p < 0,05$ ). Pela análise estatística também foi possível obter o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para constatação da significância do modelo ou não.

Superfícies de respostas foram geradas pelo software *Statistica 7.0*, utilizando a Equação 3.5 contendo somente os parâmetros significativos. A partir dessas superfícies foi possível verificar uma região ótima para a atividade enzimática, a qual corresponde à combinação de uma faixa de valores das variáveis estudadas.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^n b_j X_j + \sum_{j=1}^n \sum_{m=1}^n b_{jm} X_j X_m + \sum_{j=1}^n b_{jj} X_j^2 \quad (3.5)$$

Em que:

Y = Valor da variável de resposta (Atividade enzimática);

$\beta_0$  = Valor médio da variável de resposta;

n = Número de variáveis independentes ;

X = Variáveis independentes;

$b_j$ ;  $b_{jm}$ ;  $b_{jj}$  = Parâmetros do modelo.

### 3.2.6 Teste da influência da temperatura, pH e concentração de enzima no processo de imobilização

Após a análise do resultado do planejamento fatorial completo, conforme item 3.2.5, fixou-se os valores para as variáveis concentração de glutaraldeído e tempo no processo de imobilização que abrangeram a região com atividades máximas. Baseado nisso, utilizou-se um planejamento composto central para avaliar o processo de imobilização enzimático com relação as variáveis temperatura, concentração enzimática e pH.



Este método científico de planejamento permite obter experimentos significativos e confiáveis com as vantagens de reduzir o tempo de experimentação assim como custo relativo à execução dos ensaios, uma vez que permite a otimização do número de experimentos. Além disto, o planejamento composto central permite uma otimização multivariada, minimiza o erro experimental e não requer conhecimentos elevados em estatística (OLIVEIRA, 2004).

O planejamento composto central estuda os efeitos da interação dos parâmetros em questão. Cada variável é estudada com 5 diferentes níveis  $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$  e cada nível possui seu respectivo valor nominal. O parâmetro  $\alpha$  utilizado foi o de rotabilidade de modo a se obter um planejamento cuja região de interesse seja uma superfície de resposta de segunda ordem (BOX et al., 1978).

Dessa maneira, Planejamento Composto Central utilizado para otimizar o processo de imobilização de  $\alpha$ -galactosidase atrelou as condições ótimas de concentração de glutaraldeído e tempo de imobilização adquiridas no item 3.2.5. As variáveis consideradas durante o processo de imobilização foram temperatura, pH e concentração de enzima do meio, com três réplicas centrais totalizando 17 experimentos utilizando-se o *software Statistica 7.0*. Neste planejamento, a temperatura situou-se na faixa de 18,2  $(-\alpha)$  a 51,8<sup>0</sup>C  $(+\alpha)$ , a concentração de enzima variou entre 1,59  $(-\alpha)$  e 18,41 g.L<sup>-1</sup>  $(+\alpha)$  e o pH variou entre 4,98  $(-\alpha)$  a 10,02  $(+\alpha)$  sendo que essas faixas foram estabelecidas através de testes preliminares. Foi utilizado o tampão fosfato para as faixas de pH analisadas. O valor do  $\alpha$  de rotabilidade foi automaticamente determinado pelo *software Statistica 7.0* sendo equivalente à 1,6818. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento ( $X_1$ = temperatura,  $X_2$ = concentração de enzimas e  $X_3$ = pH) estão apresentados na Tabela 3.2.

O cálculo dos valores codificados para as variáveis apresentadas são demonstrados pela Equação 3.2.

$$X_n = \frac{X - X_0}{\left[ \frac{X_{+1} - X}{2} \right]} \quad (3.6)$$

$X_n$  = Valor codificado da variável (n=1,2...);

$X$  = Valor variável ser calculada;

$X_0$  = Valor da variável no ponto central;

$X_{+1}$  = Valor da variável no nível superior;

$X_{-1}$  = Valor da variável no nível inferior.

Tabela 3.2: Matriz Planejamento Composto Central da influência das variáveis temperatura, concentração de enzima e pH no processo de imobilização da  $\alpha$ -galactosidase.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Concentração de enzima (g/L)	pH
1	35 (0)	10 (0)	7,5 (0)
2	35 (0)	10 (0)	7,5 (0)
3	35 (0)	10 (0)	7,5 (0)
4	35 (0)	10 (0)	10,02 (+ $\alpha$ )
5	35 (0)	10 (0)	4,98 (- $\alpha$ )
6	35 (0)	18,41 (+ $\alpha$ )	7,5 (0)
7	35 (0)	1,59 (- $\alpha$ )	7,5 (0)
8	45 (+1)	5 (-1)	6 (-1)
9	45 (+1)	5 (-1)	9 (+1)
10	45 (+1)	15 (+1)	6 (-1)
11	45 (+1)	15 (+1)	9 (+1)
12	25 (-1)	5 (-1)	6 (-1)
13	25 (-1)	5 (-1)	9 (+1)
14	25 (-1)	15 (+1)	6 (-1)
15	25 (-1)	15 (+1)	9 (+1)
16	18,2 (- $\alpha$ )	10 (0)	7,5 (0)
17	51,8 (+ $\alpha$ )	10 (0)	7,5 (0)

A imobilização foi realizada incubando-se 10 partículas de quitosana em 10 mL de uma solução de  $\alpha$ -galactosidase nas condições definidas conforme a Tabela 3.2, com agitação de 150 rpm em shaker e temperatura de 25 $^{\circ}$ C. Ao final da imobilização a determinação da atividade do biocatalisador foi realizada conforme item 3.2.4, usando uma concentração de rafinose de 5 g/L no meio reacional.

As Equações de codificação da temperatura, concentração de enzima e pH são apresentadas nas Equações 3.7, 3.8 e 3.9, respectivamente.

$$X_1 = \frac{T_{\text{imob}} - 35}{10} \quad (3.7)$$

$$X_2 = \frac{[E]_{\text{imob}} - 10}{5} \quad (3.8)$$

$$X_3 = \frac{\text{pH}_{\text{imob}} - 7,5}{1,5} \quad (3.9)$$

Um teste *t-Student* foi aplicado à Equação 3.4 gerada pelo modelo para determinação do nível de significância de cada parâmetro, sendo aceitos como estatisticamente significativos somente aqueles que apresentaram valor-p superior que 5% ( $p < 0,05$ ). Pela análise estatística também foi possível obter o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para constatação da significância do modelo ou não.

Superfícies de respostas foram geradas pelo software *Statistica 7.0*, utilizando a Equação 3.10 contendo somente os parâmetros significativos. A partir dessas superfícies foi possível verificar uma região ótima para a atividade enzimática, a qual corresponde à combinação de uma faixa de valores das variáveis estudadas.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^n b_j X_j + \sum_{j=1}^n \sum_{m=1}^n b_{jm} X_j X_m + \sum_{j=1}^n b_{jj} X_j^2 \quad (3.10)$$

Em que:

Y = Valor da variável de resposta (Atividade enzimática);

$\beta_0$  = Valor médio da variável de resposta;

n = Número de variáveis independentes ;

X = Variáveis independentes;

$b_j$ ;  $b_{jm}$ ;  $b_{jj}$  = Parâmetros do modelo.

### 3.2.7 Teste de estabilidade em relação ao pH da enzima imobilizada

Imobilizou-se a enzima nas condições ótimas (pH equivalente a 7,5; concentração enzimática de 15 g.L<sup>-1</sup>; temperatura de 25<sup>0</sup>C e tempo de imobilização equivalente a 24 horas) determinadas pelos itens 3.2.5 e 3.2.6 tanto para uma concentração de 5% como de 0% de glutaraldeído a fim de comparar o efeito da ligação cruzada. Posteriormente ao processo de imobilização, a enzima imobilizada foi lavada e incubada em 20 mL de solução tampão durante o período de 24 horas a temperatura ambiente. Para a faixa de pH entre 3 e 5, utilizou-se o tampão citrato; já para a faixa de pH entre 6 e 9, o tampão utilizado foi o fosfato. Após

esse período, as partículas de quitosana foram lavadas, colocadas na cesta inox para se proceder á hidrólise e consequente determinação da atividade residual conforme item 3.2.4. A atividade relativa para cada valor de pH foi determinada pela relação entre a atividade residual e a atividade máxima obtida no item 3.2.6.

Para ambos os processos de imobilização (com glutaraldeído e sem glutaraldeído) realizou-se o teste de proteína segundo o Método de LOWRY (1951) (Apêndice B).

Para determinação da quantidade de enzima imobilizada no suporte, mediu-se a concentração de proteína presente no sobrenadante utilizado na imobilização antes e após o processo de imobilização ter sido concluído conforme Equação 3.11.

$$[\alpha\text{-galactosidase}_{\text{suporte}}] = [\alpha\text{-galactosidase}_{\text{Antes}}] - [\alpha\text{-galactosidase}_{\text{Após}}] \quad (3.11)$$

Em que:

$[\alpha\text{-galactosidase}_{\text{suporte}}]$  = Concentração de  $\alpha$ -galactosidase retida no suporte ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$[\alpha\text{-galactosidase}_{\text{Antes}}]$  = Concentração de  $\alpha$ -galactosidase no sobrenadante antes do processo de imobilização ( $\text{g.L}^{-1}$ );

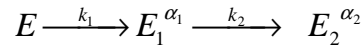
$[\alpha\text{-galactosidase}_{\text{Após}}]$  = Concentração de  $\alpha$ -galactosidase no sobrenadante após o processo de imobilização ( $\text{g.L}^{-1}$ );

### 3.2.8 Teste de estabilidade térmica da enzima imobilizada

Enzimas de  $\alpha$ -galactosidase imobilizadas em partículas de quitosana nas condições estabelecidas pelos itens 3.2.5 e 3.2.6 são, posteriormente, incubadas em tampão fosfato de pH 6, conforme item 3.2.7, e introduzidas em um banho termostatizado em temperatura na faixa entre 50 e 60<sup>0</sup>C. Esta faixa de temperatura foi escolhida por ser uma faixa de temperatura utilizada em processos de pasteurização. Após isso, as amostras foram retiradas em intervalos adequados de tempo, resfriadas rapidamente em banho de gelo e, em seguida, transferidas para a cesta de aço inox com o intuito de se determinar a atividade residual conforme item 3.2.4.

Os resultados de atividade enzimática em função do tempo de incubação obtidos foram analisados pelo modelo de desativação de primeira ordem e pela modelagem de desativação enzimática em série com dois estágios, realizando regressões não-lineares

aplicadas às Equações 3.12, 3.13 e 3.14, para determinar os melhores ajustes e os parâmetros cinéticos.



$$\frac{A}{A_0} = e^{(-k_1 t)} \quad (3.12)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \cdot e^{(-k_1 t)} + \alpha_1 \quad (3.13)$$

$$\frac{A}{A_0} = \alpha_2 + \left( 1 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \right) e^{(-k_1 t)} - \left( \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \right) e^{(-k_2 t)} \quad (3.14)$$

Sendo:  $\frac{A}{A_0}$  = Atividade relativa

$$\alpha_1 = \frac{E_1}{E}$$

$$\alpha_2 = \frac{E_2}{E}$$

$k_1$  e  $k_2$  = constantes cinéticas

Os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura, considerando o melhor ajuste dos dados experimentais às Equações de desativação em série. As Equações 3.15 e 3.16 representam, respectivamente, os tempos de meia vida provenientes das Equações 3.12 e 3.13. A energia de ativação do processo de desativação térmica foi calculada pela regressão linear da equação de Arrhenius (Equação 3.17).

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (3.15)$$

$$t_{1/2} = -\frac{\ln\left[\frac{0,5 - \alpha_1}{1 - \alpha_1}\right]}{k_d} \quad (3.16)$$

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.17)$$

Sendo:

$k_d$  = Constante cinética de desativação térmica (corresponde ao valor de  $k_1$  na Equação 3.7)

A = Fator de frequência para a reação

$E_a$  = Energia de ativação do processo de desativação térmica

T = Temperatura absoluta

R = Contante universal dos gases

### 3.2.9 Teste de resistência ao armazenamento

Neste estudo, realizaram-se testes com enzimas de  $\alpha$ -galactosidase imobilizadas em partículas de quitosana estocadas a temperatura ambiente em tampão de 7,5 (conforme obtido região de máxima atividade no item 3.2.6). A atividade residual foi determinada em intervalos de tempo (aperiódicos) durante 50 dias, pelo método das velocidades iniciais, conforme item 3.2.4, após sofrer hidrólise a 45<sup>0</sup>C, pH 6 e concentração de rafinose equivalente a 5 g.L<sup>-1</sup>. As condições de imobilização foram as seguintes: temperatura equivalente a 25<sup>0</sup>C, concentração enzimática de 15 g.L<sup>-1</sup>, tempo de imobilização de 24 horas, concentração de glutaraldeido de 0% e 5%, pH do meio correspondente a 7,5.

### 3.2.10 Teste de resistência ao número de repetições

Neste estudo, realizaram-se testes com enzimas de  $\alpha$ -galactosidase imobilizadas em partículas de quitosana estocadas a temperatura ambiente em tampão de 7,5 (conforme obtido região de máxima atividade no item 3.2.8). As condições de imobilização foram as seguintes: temperatura equivalente a 25<sup>0</sup>C, concentração enzimática de 15 g.L<sup>-1</sup>, tempo de imobilização de 24 horas, concentração de glutaraldeido de 5%, pH do meio correspondente a 7,5. A atividade residual foi determinada pelo método das velocidades iniciais, conforme item 3.2.4. A imobilização foi feita uma única vez para cada conjunto de 10 partículas e 20 hidrólises consecutivas foram realizadas a fim de se obter a atividade residual. Cada hidrólise ocorreu nas seguintes condições: temperatura correspondente a 45<sup>0</sup>C, pH equivalente a 6 e concentração de rafinose de 5 g.L<sup>-1</sup>.

---

---

# CAPÍTULO 4

---

## 4 Resultados e discussões

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos, seguindo a metodologia proposta neste trabalho.

### 4.1 Estudo preliminar para a preparação das partículas de quitosana

Conforme proposto no item 3.2.1, foram realizados quatro metodologias distintas com intuito de obter a melhor maneira de preparar as partículas de quitosana que seriam, posteriormente, utilizadas no processo de imobilização da  $\alpha$ -galactosidase. Os resultados obtidos estão explicitados na Tabela 4.1 abaixo:

Tabela 4.1: Atividades ( $U_i$ ) obtidas nos métodos de produção de partículas de quitosana.

Método	Adiciona-se ao ácido acético 5%	Solução receptora	Atividade ( $U_i$ )
1	1 grama de quitosana	NaOH 1 molar	0,0024
2	1 grama de quitosana	NaOH 2 molar	0,0027
3	1 grama de quitosana	Glutaraldeido 5% (v/v) em NaOH 2 molar	0
4	1 grama de quitosana + 0,15 gramas de $\alpha$ -galactosidase	Glutaraldeido 5% (v/v) em NaOH 2 molar	0,0008

Dessa maneira, concluiu-se que a melhor metodologia a ser empregada para produção das partículas de quitosana seria a metodologia 2.

Percebe-se um acréscimo de atividade quando as partículas são formadas em solução de NaOH 2 molar ao invés de 1 molar. Esse resultado confere com estudos desenvolvidos por OHTAKARA e MITSUTOMI (1987) que também imobilizaram  $\alpha$ -galactosidase (proveniente de *Pycnoporus cinnabarinus*) em quitosana com ligações cruzadas cujo agente reticulante foi o glutaraldeido.

#### 4.2 Teste de influência do tempo de imobilização e da concentração de glutaraldeído no processo de imobilização

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial completo proposto no item 3.2.5, estão representados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Matriz planejamento fatorial completo do efeito do tempo de imobilização e concentração de glutaraldeído na imobilização da  $\alpha$ -galactosidase em suporte de quitosana.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	Tempo de imobilização (horas)	Concentração de glutaraldeído (%)	Atividade ( $\text{g}_{\text{RH}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{SQ}}^{-1}$ )
1	2 (-1)	0 (-1)	0,0032 $\pm$ 0,0001
2	2 (-1)	5 (0)	0,0134 $\pm$ 0,0004
3	2 (-1)	10 (+1)	0,0120 $\pm$ 0,0002
4	13 (0)	0 (-1)	0,0051 $\pm$ 0,0001
5	13 (0)	5 (0)	0,0226 $\pm$ 0,0009
6	13 (0)	5 (0)	0,0219 $\pm$ 0,0006
7	13 (0)	5 (0)	0,0210 $\pm$ 0,0011
8	13 (0)	10 (+1)	0,0150 $\pm$ 0,0007
9	24 (+1)	0 (-1)	0,0065 $\pm$ 0,0002
10	24 (+1)	5 (0)	0,0267 $\pm$ 0,0012
11	24 (+1)	10 (+1)	0,0240 $\pm$ 0,0014

A atividade alcançada durante os experimentos variou entre 0,0032  $U_i$  obtida através do experimento 1 (valores menos elevados tanto na variável tempo de imobilização como para a variável concentração de glutaraldeído na imobilização) até 0,0267  $U_i$  obtida através do experimento 10 (maior tempo de imobilização e valor intermediário da concentração de glutaraldeído).

Observa-se que houve reprodutibilidade para os valores obtidos para  $U_i$  através dos ensaios realizados no ponto médio do PFC (experimentos 5, 6 e 7).

Analisando-se períodos fixos de tempo de imobilização, percebe-se que a atividade  $U_i$ , invariavelmente, apresenta seus maiores resultados nos experimentos cujos valores de concentração de glutaraldeído são de 5%. Dessa maneira, conclui-se que valores máximos



estão necessariamente entre a concentração de 0% e 10% de glutaraldeído no processo de imobilização.

Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função do tempo de imobilização e concentração de glutaraldeído, realizou-se uma regressão múltipla e analisou os valores de  $p$  encontrados pelo teste  $t$ - *Student*, onde  $X_1$  representa o tempo de imobilização e  $X_2$  representa a concentração de glutaraldeído durante o processo de imobilização. Estão representados na Tabela 4.3 os parâmetros lineares, as interações e os termos quadráticos das duas variáveis estudadas.

Tabela 4.3: Resultados da regressão múltipla aplicada ao PFC.

<b>Fatores</b>	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>Nível de significância p-valor</b>
<b>Média</b>	0,021179	0,001063	0,000006
<b>X<sub>1</sub></b>	0,004769	0,000846	0,002436
<b>X<sub>1</sub>X<sub>1</sub></b>	-0,000130	0,001302	0,924259
<b>X<sub>2</sub></b>	0,006035	0,000846	0,000840
<b>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub></b>	-0,010111	0,001302	0,000567
<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	0,002164	0,001036	0,091103

Por meio dos resultados obtidos através do programa *Statistica 7.0*, utilizou-se a regressão múltipla, gerando-se a Equação 4.1 completa cujo coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi de 0,97:

$$U_i \cdot 10^2 = 2,1179 + 0,4769 \cdot X_1 - 0,0130 \cdot X_1^2 + 0,6035 \cdot X_2 - 1,0111 \cdot X_2^2 + 0,2164 \cdot X_1 X_2 \quad (4.1)$$

Os parâmetros avaliados pelo teste de hipótese ao se utilizar o estudo estatístico  $t$  de *Student* que apresentaram nível de significância superior a 5% foram negligenciados. Tais parâmetros foram o tempo de imobilização em seu termo quadrático ( $X_1^2$ ) e a interação entre os termos tempo de imobilização e concentração de glutaraldeído ( $X_1 X_2$ ) conforme visualizado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Resultado da regressão múltipla com variáveis significativas aplicada ao PFC.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
Média	0,021127	0,001072	0,000006
$X_1$	0,004769	0,000979	0,002436
$X_2$	0,006035	0,000979	0,000840
$X_2X_2$	-0,010145	0,001452	0,000567

O modelo com as variáveis significativas está representado na Equação 4.2:

$$U_i = 2,113 \cdot 10^{-2} + 4,769 \cdot 10^{-3} \cdot X_1 + 6,035 \cdot 10^{-3} \cdot X_2 - 1,014 \cdot 10^{-2} \cdot X_2^2 \quad (4.2)$$

Dessa maneira, como exposto acima, somente parâmetros com nível de significância menor que 5% foram considerados significativos. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) indicou que 94,05% da variabilidade dos dados são justificadas pela superfície proposta, o que demonstra um excelente ajuste.

A Figura 4.1 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero e a Figura 4.2 mostra a representação dos valores preditos pelo modelo ajustado em função dos valores observados experimentalmente.

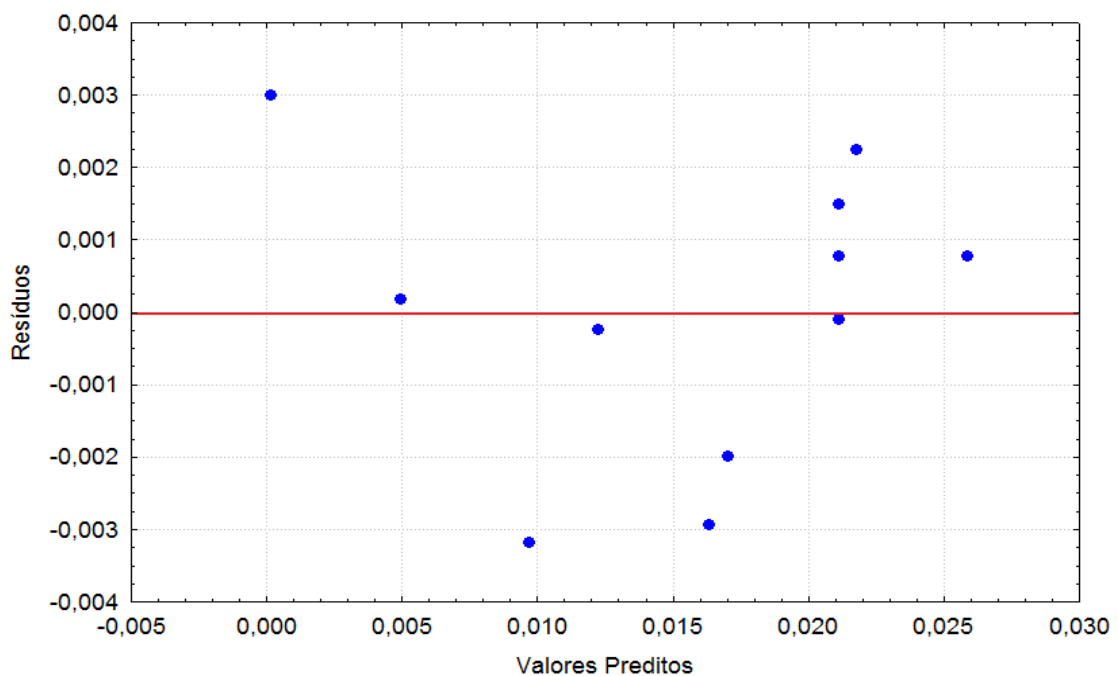


Figura 4.1: Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.

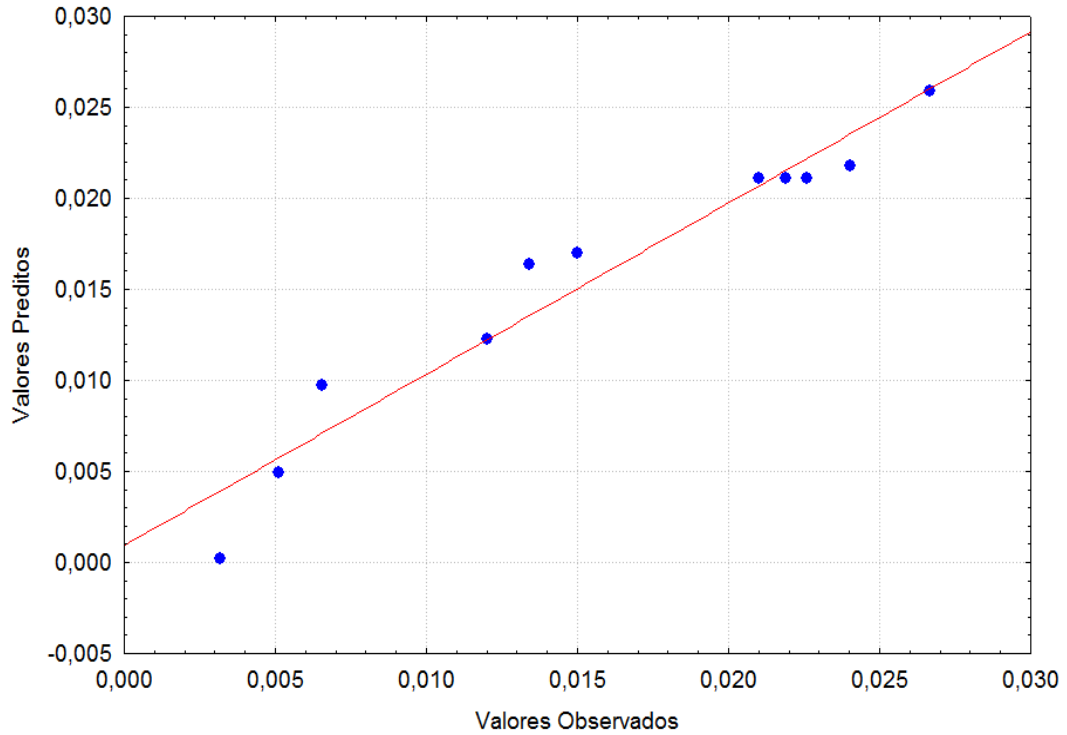


Figura 4.2: Valores preditos pelo modelo versus valores observados experimentalmente.

O modelo foi significativo ( $R^2$  equivalente a 0,94), ou seja, dessa forma torna-se possível construir (através do programa *Statistica 7.0*) uma superfície de resposta cujo intuito principal seja o de analisar a região de interesse. A referida superfície está representada pela Figura 4.3:

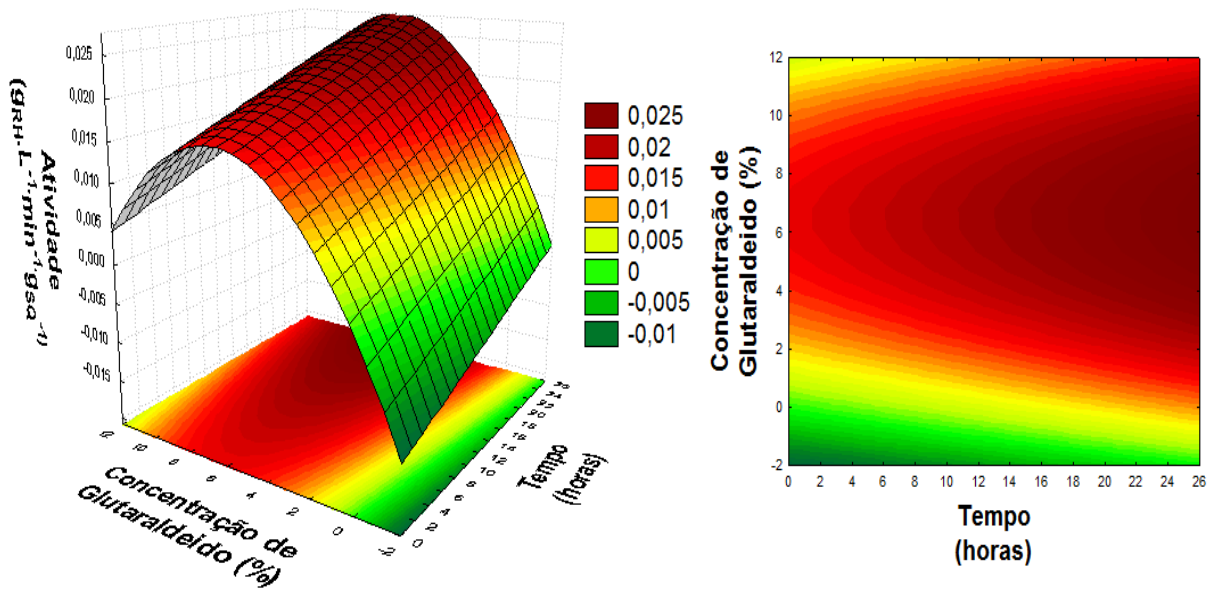


Figura 4.3: Superfície de resposta da influência da concentração de glutaraldeído e do tempo de imobilização na atividade de  $\alpha$ -galactosidase obtida pelo planejamento fatorial completo.

Para realizar os testes de validação no processo de otimização, fixou-se os valores de concentração de glutaraldeído e tempo no processo de imobilização (5% e 24 horas respectivamente) que estivessem dentro da região de máxima atividade conforme a Figura 4.3. Os testes foram feitos em triplicata e a média da atividade obtida experimentalmente foi de 0,0267 U<sub>i</sub>. Esse resultado experimental foi satisfatório, haja vista o fato de que a atividade, para essa faixa de concentração de glutaraldeído e tempo no processo de imobilização, encontrada utilizando-se a Equação 4.2 apresentou um desvio, com relação ao resultado experimental, de apenas 0,37%.

Suportes ativados com glutaraldeídos apresentaram elevados rendimentos de imobilização e atividade recuperada, isto ocorre devido ao glutaraldeído ser um reagente que apresenta dois grupos aldeídos com elevada reatividade, promovendo reações com vários grupos laterais das proteínas como: hidroxila, carbonila, amino e sulfídrica (ADRIANO et al, 2005).

A região de máxima atividade com relação à concentração de glutaraldeído ocorre nos pontos de concentração intermediária (entre 4,5 e 8) como visualizado através da Figura 4.3. As partículas imobilizadas sem glutaraldeído (0%) apresentaram-se mais frágeis e gelatinosas Já as imobilizadas com 10% de glutaraldeído apresentaram-se menos resistentes e mais quebradiças. Essas constatações estão em conformidade com os estudos de VILLELA (2006) e SISO et al. (1997).

Segundo ADRIANO et al. (2005), concentrações de glutaraldeído superiores a 5% em processos de imobilização que utilizam quitosana como suporte acarretam uma significativa perda de atividade como consequência da interação multiponto entre suporte e agente reticulante. Essa interação, nessas condições, ameaça a preservação da conformação da enzima, além de ser responsável por diminuição do diâmetro dos poros da matriz polimérica devido a aproximação das cadeias entre suporte e agente reticulante.

GIRIGOWDA e MULIMANI (2006) imobilizaram  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em  $\kappa$ -carragena segundo o método de SATO et al (1979). A enzima imobilizada foi capaz de hidrolisar 75% dos oligossacarídeos presentes no leite de soja após duas horas de incubação. Quando utilizada em reator de leito fluidizado, a  $\alpha$ -galactosidase imobilizada reduziu em 92% a quantidade de oligossacarídeos a uma vazão de 25 mL.min<sup>-1</sup>.

### 4.3 Teste da influência da temperatura, concentração da enzima e pH do meio no processo de imobilização

Os resultados obtidos a partir do planejamento composto central proposto no item 3.2.6, estão explícitos na Tabela 4.5. Importante enfatizar o fato de que os valores para concentração de glutaraldeído e tempo no processo de imobilização foram fixados respectivamente em 5% (v/v) e 24 horas de acordo com o item 4.2.

Tabela 4.5: Matriz Planejamento Composto Central da influência das variáveis temperatura, concentração de enzima e pH no processo de imobilização da  $\alpha$ -galactosidase.

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)			
	Temperatura ( $X_3 - ^\circ\text{C}$ )	Concentração de enzima ( $X_4 - \text{g/L}$ )	pH ( $X_5$ )	Atividade ( $U_i^*$ )
1	35 (0)	10 (0)	7,5 (0)	0,0295 $\pm$ 0,0014
2	35 (0)	10 (0)	7,5 (0)	0,0343 $\pm$ 0,0019
3	35 (0)	10 (0)	7,5 (0)	0,0330 $\pm$ 0,0021
4	35 (0)	10 (0)	10,02 (+ $\alpha$ )	0,0032 $\pm$ 0,0001
5	35 (0)	10 (0)	4,98 (- $\alpha$ )	0,0170 $\pm$ 0,0004
6	35 (0)	18,41 (+ $\alpha$ )	7,5 (0)	0,0427 $\pm$ 0,0026
7	35 (0)	1,59 (- $\alpha$ )	7,5 (0)	0,0039 $\pm$ 0,0003
8	45 (+1)	5 (-1)	6 (-1)	0,0034 $\pm$ 0,0002
9	45 (+1)	5 (-1)	9 (+1)	0,0025 $\pm$ 0,0002
10	45 (+1)	15 (+1)	6 (-1)	0,0193 $\pm$ 0,0008
11	45 (+1)	15 (+1)	9 (+1)	0,0101 $\pm$ 0,0007
12	25 (-1)	5 (-1)	6 (-1)	0,0111 $\pm$ 0,0007
13	25 (-1)	5 (-1)	9 (+1)	0,0065 $\pm$ 0,0001
14	25 (-1)	15 (+1)	6 (-1)	0,0392 $\pm$ 0,0015
15	25 (-1)	15 (+1)	9 (+1)	0,0231 $\pm$ 0,0010
16	18,2 (- $\alpha$ )	10 (0)	7,5 (0)	0,0360 $\pm$ 0,0019
17	51,8 (+ $\alpha$ )	10 (0)	7,5 (0)	0,0035 $\pm$ 0,0001

\* $U_i = (\text{g}_{\text{RH}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{SQ}}^{-1})$

A atividade alcançada durante os experimentos variou entre 0,0025  $U_i$  obtida no experimento 9 (valores menos elevados de temperatura e pH e baixo valor de concentração

enzimática) até 0,0427 U<sub>i</sub> obtida através do experimento 6 (alto valor de concentração enzimática e valores intermediários de temperatura e pH).

Observa-se que houve reprodutividade para os valores obtidos para U<sub>i</sub> através dos ensaios realizados no ponto médio do PCC (experimentos 1, 2 e 3).

Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função da temperatura, concentração enzimática e pH no processo de imobilização, realizou-se uma regressão múltipla e analisou os valores de *p* encontrados pelo teste *t-Student*, onde X<sub>3</sub> representa a temperatura de imobilização, X<sub>4</sub> a concentração da enzima α-galactosidase no processo de imobilização e X<sub>5</sub> representa o pH do meio durante o processo de imobilização. Estão representados na Tabela 4.6 os parâmetros lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das três variáveis estudadas.

Tabela 4.6: Resultados da regressão múltipla aplicada ao PCC.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Nível de significância p-valor
<b>Média</b>	0,032427	0,002360	0,000003
<b>X<sub>3</sub></b>	-0,007290	0,001109	0,000312
<b>X<sub>3</sub>X<sub>3</sub></b>	-0,004962	0,001222	0,004802
<b>X<sub>4</sub></b>	0,009778	0,001108	0,000049
<b>X<sub>4</sub>X<sub>4</sub></b>	-0,003701	0,001219	0,018986
<b>X<sub>5</sub></b>	-0,003949	0,001109	0,009206
<b>X<sub>5</sub>X<sub>5</sub></b>	-0,008405	0,001222	0,000236
<b>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub></b>	-0,002650	0,001448	0,110014
<b>X<sub>3</sub>X<sub>5</sub></b>	0,001325	0,001448	0,390727
<b>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub></b>	-0,002473	0,001448	0,131468

Por meio dos resultados obtidos através do programa *Statistica 7.0*, utilizou-se a regressão múltipla, gerando-se a Equação 4.3 completa:

$$U_i = 3,324 \cdot 10^{-2} - 7,290 \cdot 10^{-3} \cdot X_3 - 4,962 \cdot 10^{-3} \cdot X_3^2 + 9,778 \cdot 10^{-3} \cdot X_4 - 3,701 \cdot 10^{-3} \cdot X_4^2 - 3,949 \cdot 10^{-3} \cdot X_5 - 8,405 \cdot 10^{-3} \cdot X_5^2 - 2,650 \cdot 10^{-3} \cdot X_3 X_4 + 1,325 \cdot 10^{-3} \cdot X_3 X_5 - 2,473 \cdot 10^{-3} \cdot X_4 X_5 \quad (4.3)$$

Os parâmetros avaliados pelo teste de hipótese ao se utilizar o estudo estatístico *t de Student* que apresentaram nível de significância superior a 5% foram negligenciados. Tais

parâmetros negligenciados foram os termos de interação ( $X_3X_4$ ,  $X_3X_5$ ,  $X_4X_5$ ) sendo que a Tabela 4.7 representa apenas as variáveis significativas.

Tabela 4.7: Resultados da regressão múltipla com variáveis significativas aplicada ao PCC.

<b>Fatores</b>	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>Nível de significância p-valor</b>
<b>Média</b>	0,032427	0,002803	0,000000
<b>X<sub>3</sub></b>	-0,007290	0,001317	0,000249
<b>X<sub>3</sub>X<sub>3</sub></b>	-0,004962	0,001451	0,006545
<b>X<sub>4</sub></b>	0,009778	0,001316	0,000022
<b>X<sub>4</sub>X<sub>4</sub></b>	-0,003701	0,001448	0,028582
<b>X<sub>5</sub></b>	-0,003949	0,001317	0,013367
<b>X<sub>5</sub>X<sub>5</sub></b>	-0,008405	0,001451	0,000175

O modelo com as variáveis significativas está representado na Equação 4.4:

$$U_1 = 3,324 \cdot 10^{-2} - 7,290 \cdot 10^{-3} \cdot X_3 - 4,962 \cdot 10^{-3} \cdot X_3^2 + 9,778 \cdot 10^{-3} \cdot X_4 - 3,701 \cdot 10^{-3} \cdot X_4^2 - 3,949 \cdot 10^{-3} \cdot X_5 - 8,405 \cdot 10^{-3} \cdot X_5^2 \quad (4.4)$$

Dessa maneira, como exposto acima, somente parâmetros com nível de significância inferior à 5% ( $p < 0,05$ ) foram considerados significativos. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) indicou que 92,95% da variabilidade dos dados são justificadas pela superfície proposta, o que demonstra um excelente ajuste.

A Figura 4.4 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero e a Figura 4.5 mostra a representação dos valores preditos pelo modelo ajustado em função dos valores observados experimentalmente.

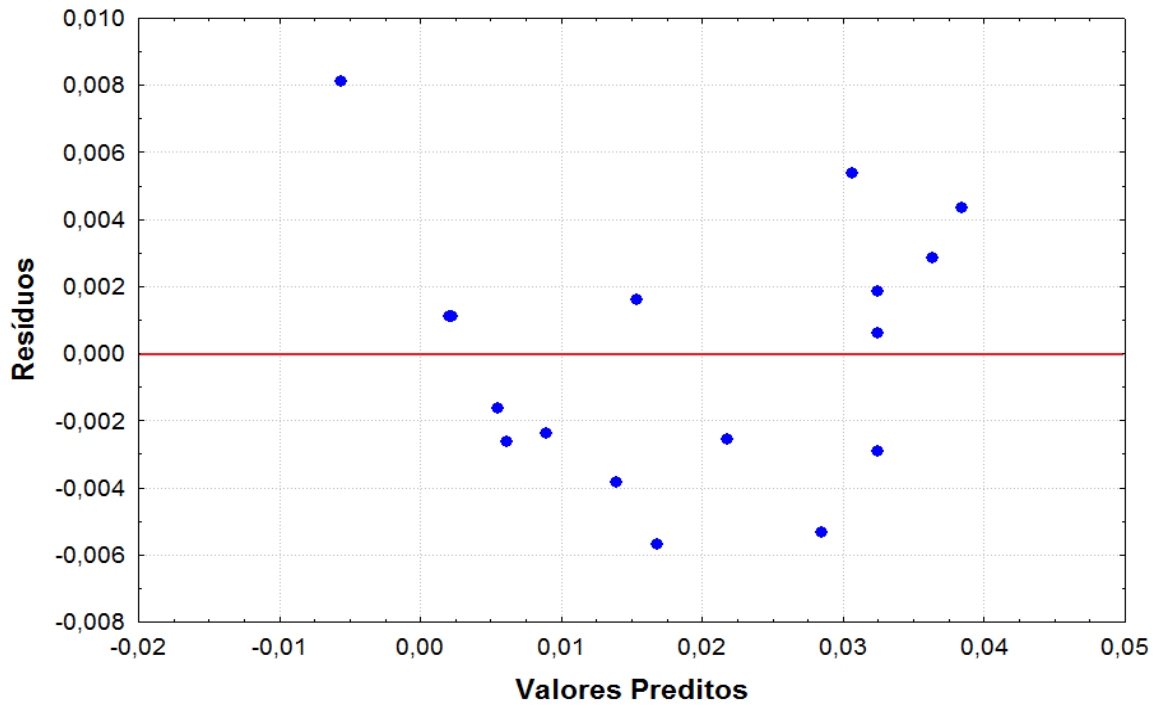


Figura 4.4: Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.

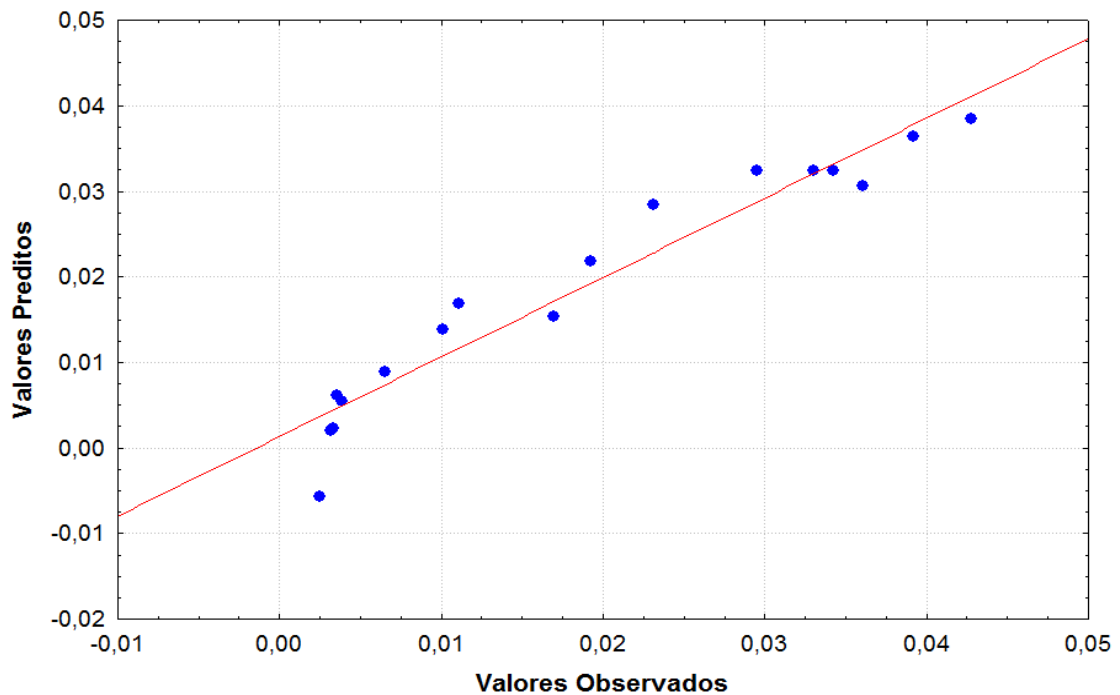


Figura 4.5: Valores preditos pelo modelo versus valores observados experimentalmente.

O modelo foi altamente significativo ( $R^2$  equivalente a 0,9295), ou seja, dessa forma torna-se possível construir (através do programa *Statistica 7.0*) uma superfície de resposta cujo intuito principal seja o de analisar a região de interesse. As referidas superfícies estão representadas pelas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8:



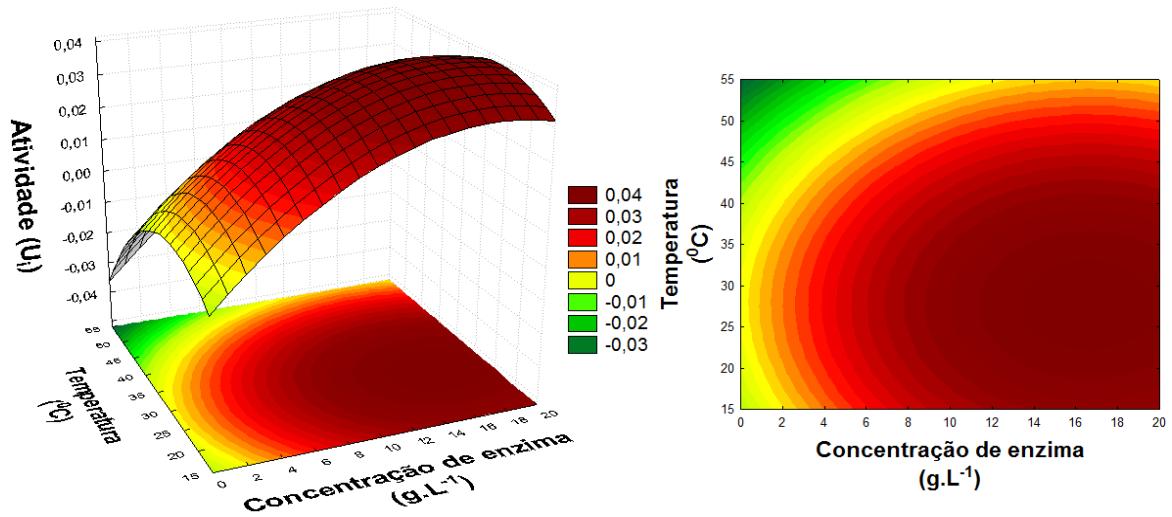


Figura 4.6 - Superfície de resposta da influência da concentração de enzima e da temperatura de imobilização na atividade de  $\alpha$ -galactosidase obtida pelo planejamento composto central.

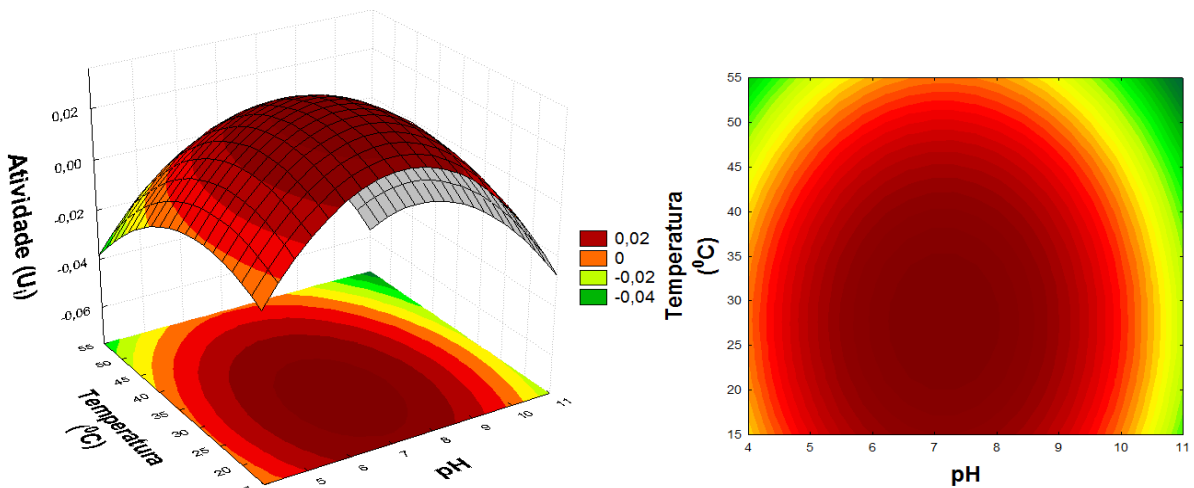


Figura 4.7 - Superfície de resposta da influência do pH e da temperatura de imobilização na atividade de  $\alpha$ -galactosidase obtida pelo planejamento composto central.

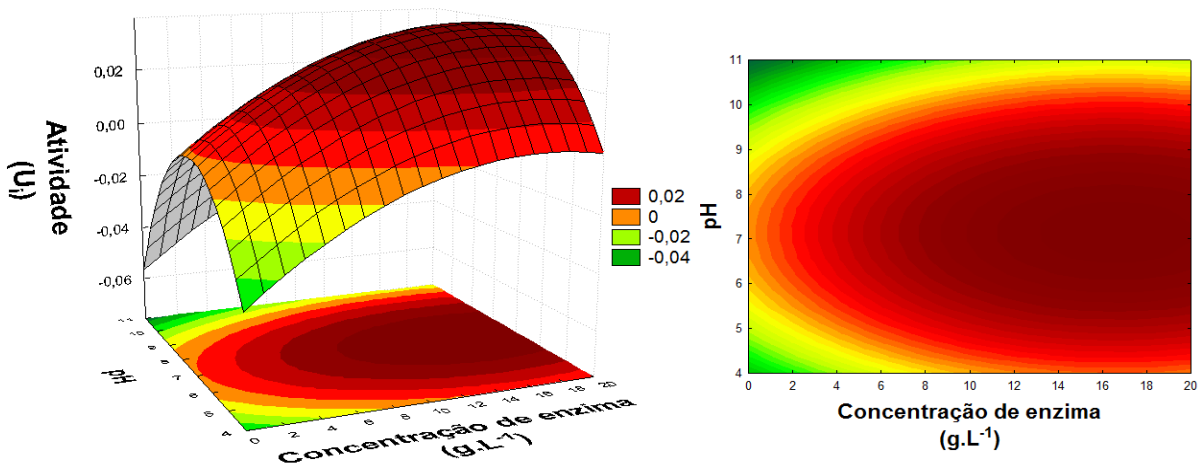


Figura 4.8 - Superfície de resposta da influência do pH e da concentração de enzima no processo de imobilização na atividade de  $\alpha$ -galactosidase obtida pelo planejamento composto central.

Analisando-se cada uma das variáveis isoladamente ao se fixar as outras duas, percebe-se que a atividade enzimática apresenta valores mais elevados aproximadamente nas seguintes faixas experimentais: temperatura intermediária (entre 19<sup>o</sup>C e 33<sup>o</sup>C), em concentrações elevadas da enzima (entre 13 g.L<sup>-1</sup> e 19 g.L<sup>-1</sup>) e faixa intermediária de pH (entre 6,5 e 8). Essas constatações são visualizadas com o auxílio das superfícies representadas pelas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8 expostas anteriormente.

Dessa maneira, com relação aos testes de validação no processo de otimização, escolheu-se uma faixa de temperatura, concentração enzimática e pH no processo de imobilização (25<sup>o</sup>C, 15 g.L<sup>-1</sup> e 7,5 respectivamente) que estivessem dentro da região máxima atividade, conforme as Figuras 4.6, 4.7 e 4.8. Os testes foram feitos em triplicata e a média da atividade obtida experimentalmente foi de 0,0435 U<sub>i</sub>. Esse valor experimental mostrou-se satisfatório, haja vista o fato de que a atividade, para essa faixa de temperatura, concentração de enzima e pH no processo de imobilização, encontrada utilizando-se a Equação 4.4 apresentou um desvio, com relação ao resultado experimental, de apenas 6,21%.

OKUTUKU *et al* (2010) extraíram  $\alpha$ -galactosidase de tomates e imobilizaram em resina polimérica contendo galactose. A imobilização ocorreu em tampão citrato pH 6,0 com solução de enzima contendo atividade de 0,672U/mL durante 2 horas sob agitação. Neste estudo a atividade residual da  $\alpha$ -galactosidase imobilizada foi 46%. As condições ótimas de atividade foram pH 4,0 e 37<sup>o</sup>C tanto para a forma solúvel quanto imobilizada.

FIALHO *et al* (2008) imobilizaram a  $\alpha$ -galactosidase em ágar posteriormente tratado com glutaraldeído e obtiveram temperatura ótima a 70<sup>o</sup>C, a qual foi 5<sup>o</sup>C acima da temperatura ótima da enzima livre. A 80<sup>o</sup>C a atividade residual da  $\alpha$ -galactosidase imobilizada foi quase o dobro da livre (72% e 40%, respectivamente). Neste estudo, a imobilização não alterou a faixa de pH ótimo da enzima, que esteve compreendido entre 4 e 5.

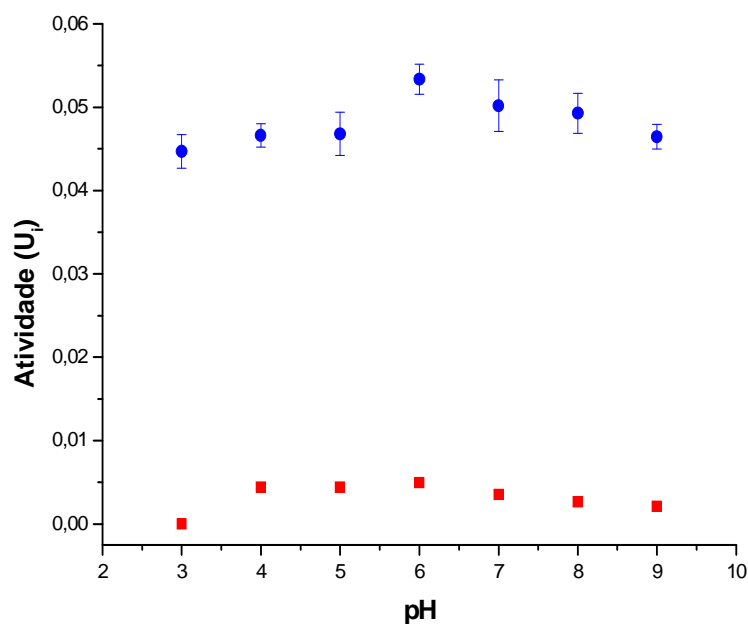
#### **4.4 Teste de estabilidade em relação ao pH da enzima imobilizada**

Conforme descrito através do itens 3.2.7, desenvolveu-se o teste correspondente à estabilidade em relação ao pH da enzima imobilizada bem como o teor de proteína retido pelo suporte durante o processo de imobilização com glutaraldeído (5%) e sem glutaraldeído (0%).

Com relação à retenção de proteína pelo suporte para o processo de imobilização sem glutaraldeído (0%), ocorreu uma eficiência de 11,28%. Já para o processo de imobilização com glutaraldeído (5%), a retenção do suporte alcançou 12,28% de eficiência.

O pH do meio reacional exerce grande influência na estabilidade catalítica da maioria das enzimas. A influência do pH na estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase está representada conforme demonstra a Figura 4.9, em que, tanto no processo de imobilização com 5% quanto no processo de imobilização a 0% de enzima, são explicitados os valores absolutos da atividade residual obtida experimentalmente.

Percebe-se claramente, através da Figura 4.9, o elevado valor de atividade que se perde ao se comparar os processos de imobilização com glutaraldeído (5%) e sem glutaraldeído (0%).



.Figura 4.9: Valores absolutos para as atividades residuais obtidas experimentalmente para  $\alpha$ -galactosidase imobilizada com glutaraldeído (●) e sem glutaraldeído (■).

Interessante citar que, conforme observado pela Figura 4.9, após o período de incubação descrito pelo item 2.7 para o pH equivalente a 6 (faixa que proporciona a maior atividade após o referido período de incubação), ocorre um incremento na atividade, isto é, conforme indicado pelos resultados experimentais expostos no item 4.4, observou-se que a atividade após o processo de imobilização para as faixas adotadas dentro das regiões de máxima atividade fixadas de acordo com as Figuras 4.6, 4.7 e 4.8 foi de 0,0435 U<sub>i</sub>, entretanto, percebeu-se que ao se incubar as partículas previamente imobilizadas (nas condições otimizadas) durante o período de 24 horas em pH equivalente a 6 e posteriormente a incubação foi desenvolvido o processo de hidrólise da rafinose, observando-se uma elevação da atividade enzimática para o valor de 0,0531 U<sub>i</sub>.

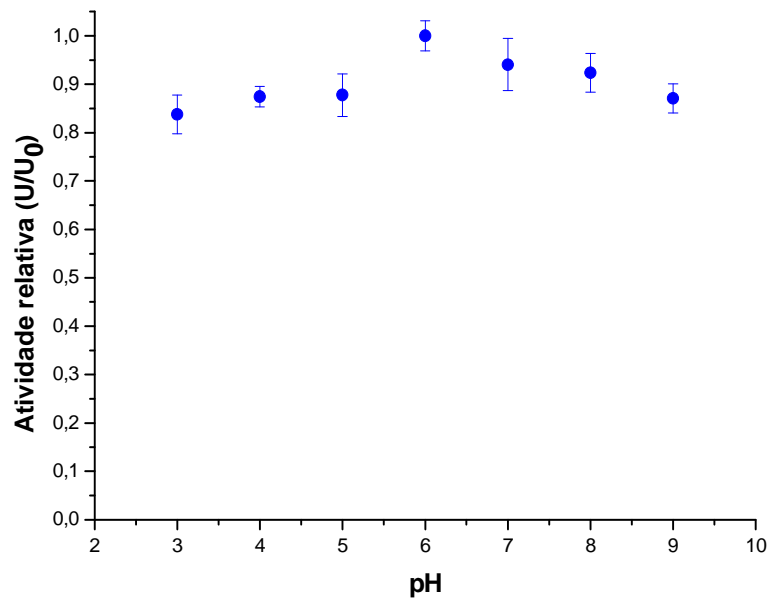


Figura 4.10: Atividade relativa da enzima immobilizada com glutaraldeído (5%).

Observa-se que a enzima immobilizada com 5% de glutaraldeído apresenta-se estável dentro de toda a faixa de pH estudada (entre 3 e 9) como visualizado através da Figura 4.10. A atividade máxima encontrou-se ao incubar a enzima previamente imobilizado em tampão de pH equivalente a 6. Através do ajuste polinomial obtido por meio do software *Origin 8*, a atividade máxima ocorre no pH equivalente a 6,4. A maior perda percentual, quando comparada á atividade máxima obtida para a incubação em pH equivalente a 6, ocorreu para o valor de incubação no pH equivalente a 3 cuja perda percentual ocorreu em 16,22%.

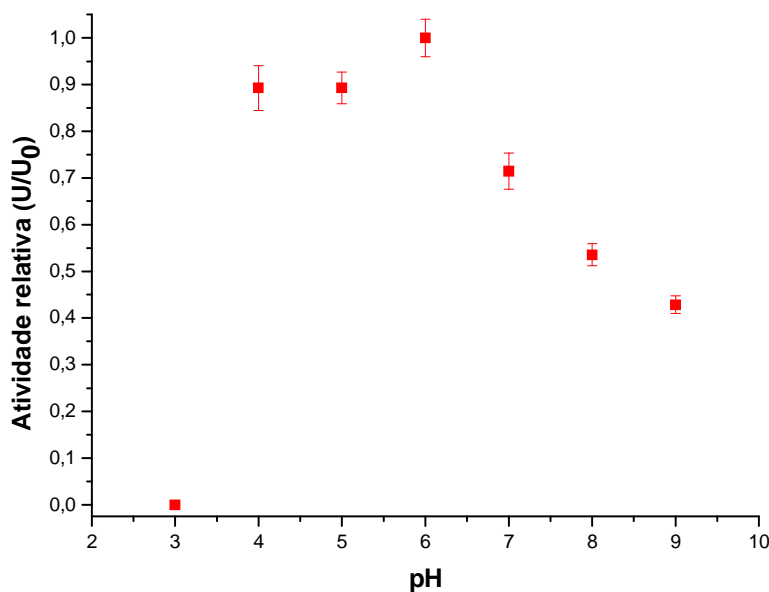


Figura 4.11: Atividade relativa da enzima immobilizada sem glutaraldeído (0%).

Já com relação à enzima imobilizada sem glutaraldeído (0%), o processo foi estável na faixa entre 4 e 6, apresentando um decréscimo máximo na atividade no valor de 57,14% para a faixa de pH equivalente à 9, como explicitado através da Figura 4.11. A atividade máxima foi obtida, assim como no processo feito com ligação cruzada, para o pH equivalente à 6. Através do ajuste polinomial obtido por meio do software *Origin 8*, a atividade máxima ocorre no pH equivalente a 6,09.

Outro detalhe importante nesses experimentos em que não foi utilizado o processo de ligação cruzada com glutaraldeído relaciona-se à completa dissolução das partículas de quitosana imobilizadas quando incubadas em pH equivalente à 3.

Esses resultados de atividade máxima quando incubada em pH equivalente a 6, em ambos os casos (com ligação cruzada e sem ligação cruzada), são próximos aos determinados segundo SHANKAR *et al.* (2011) em que a atividade máxima ocorreu em pH equivalente a 5 sendo a enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em três processos distintos: enzima solúvel em alginato de cálcio; enzima complexada em alginato de cálcio e enzima complexada em alginato de cálcio com ligações cruzadas de glutaraldeído. Além disso, as três maneiras de se imobilizar a enzima apresentaram estabilidade (atividade residual acima de 85%) para a faixa de pH entre 4 e 6.

Nos estudos desenvolvidos por COSTA (2012), verificou-se que as atividade relativas tanto da enzima livre quanto imobilizada em resina de troca iônica Duolite A-568 são próximas para o intervalo de pH de 4,0 a 6,0. Em solução, a atividade relativa da enzima esteve acima de 91% para esta faixa enquanto que quando retida no suporte esta percentagem foi de 89%. Em pH 3,5 o biocatalisador livre perdeu 63% da atividade máxima observada, enquanto que para um pH ainda mais ácido (pH 3,0) a enzima imobilizada perdeu apenas 13%. Para pHs mais alcalinos a  $\alpha$ -galactosidase imobilizada também apresentou atividades relativas melhores do que a quando em sua forma livre. Em pH 7,0 as atividades relativas foram 54% e 17% para as formas imobilizada e livre, respectivamente. Em pH 7,5 já não foi observada nenhuma atividade de  $\alpha$ -galactosidase livre, enquanto que a imobilizada ainda apresentou atividade relativa de 16% para pH 8,0. Os resultados indicam que a imobilização da enzima melhorou a sua atividade para pHs mais alcalinos (acima de 6,0).

Os experimentos realizados por NAGANAGOUDA *et al.* (2007) apresentaram elevada estabilidade para  $\alpha$ -galactosidase proveniente do fungo *Aspergillus oryzae* imobilizada em gelatina para uma faixa de pH entre 4,4 e 6 com atividade máxima em pH equivalente a 5,4. Já com relação à enzima livre, a estabilidade ocorreu para uma faixa de pH entre 4 e 5,6, sendo que a atividade máxima foi encontrada para o pH equivalente à 4,8.

FERREIRA (2007) purificou e caracterizou  $\alpha$ -galactosidase extraída do fungo *Aspergillus terreus*. Em seu estudo do efeito do pH na atividade enzimática, foi utilizado o substrato p-NPG e hidrólises foram feitas a 40°C para faixa de pH entre 3,0 e 7,6. A atividade relativa foi superior a 75% para o intervalo de pH entre 3,6 a 5,6 e a maior atividade foi encontrada em pH 5,0. Acima de pH 6,6 a atividade reduziu muito, sendo observados valores de atividade relativa inferiores a 22%.

REZESSY-SZABÓ *et al.* (2007) obtiveram atividade máxima em pH igual à 5 e elevada estabilidade para valores de pH entre 4 e 6,5 em seus estudos realizados sobre purificação e caracterização de  $\alpha$ -galactosidase proveniente do fungo *Thermomyces lanuginosus*.

THIPPESWAMY e MULIMANI (2002) obtiveram ampla estabilidade para  $\alpha$ -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* imobilizada para a faixa de pH entre 3,75 e 6,5 com atividade máxima na faixa de pH entre 5 e 5,5. Já com relação aos estudos desenvolvidos para a enzima livre, ocorreu estabilidade para a faixa de pH entre 3,5 e 6,5; com atividade máxima para o pH equivalente à 5,75.

SOMIARI e BALOGH (1995) observaram máxima atividade de  $\alpha$ -galactosidase impura e purificada de *Aspergillus niger* em pH 5,0 utilizando farelo de trigo e arroz como substratos.

A  $\alpha$ -galactosidase proveniente de *Cassia sericea*, *Humicola sp.* e *Cyamopsis tetragonalobus* apresentaram ótima atividade em pH 5,0 (SHIVANNA e RAMAKRISHNA, 1985; ALANI *et al.*, 1989).

#### 4.5 Teste de estabilidade em relação à temperatura

A influência da temperatura na estabilidade da enzima  $\alpha$ -galactosidase foi estudada conforme item 3.2.8. As atividades relativas para enzima imobilizada nas faixas de condições ótimas (conforme estabelecido pelos itens 4.2 e 4.3) em função do tempo de incubação, a várias temperaturas, estão apresentadas a Figura 4.12.

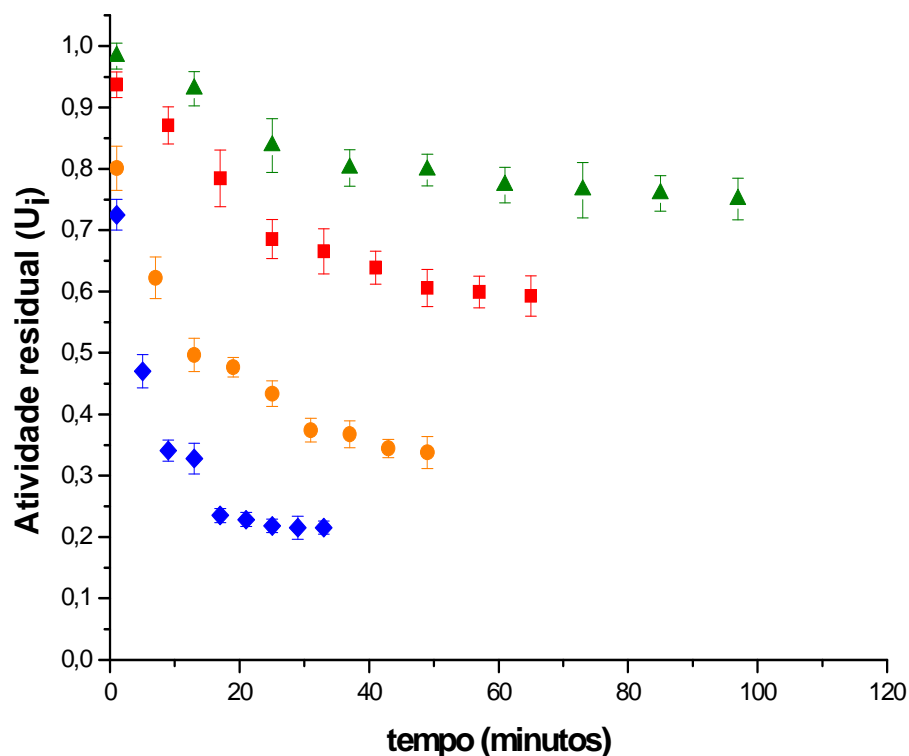
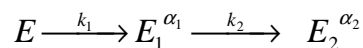


Figura 4.12: Atividade residual ( $U/U_0$ ) de  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana com glutaraldeído (5%) após diferentes tempos de incubação a 60°C (◆), 58°C (●), 55°C (■) e 50°C (▲).

Uma análise da Figura 4.12 evidencia a forte dependência da estabilidade térmica da enzima imobilizada (com glutaraldeído a 5%) com a temperatura. A atividade relativa decai mais intensamente com o passar do tempo quando a enzima imobilizada está sob influência de temperaturas mais elevadas.

Observa-se que para a temperatura de 60°C ocorreu rápida desnaturação da enzima imobilizada, sendo que em apenas 10 minutos houve perda de aproximadamente 70% de atividade. Já para a temperatura de 50°C, percebe-se a maior resistência da enzima imobilizada, haja vista o fato de que mesmo após 100 minutos ocorreu a perda de apenas 20% da atividade.

Os resultados de atividade relativa em função do tempo de incubação a várias temperaturas estudadas foram analisados segundo um modelo de desativação em série com dois estágios (HENLEY e SADANA, 1985), conforme modelo apresentado a seguir:



As Equações 3.12, 3.13 e 3.14 são representativas do mecanismo de desativação dado pelo modelo acima e os seus parâmetros cinéticos foram ajustados por regressão não linear por meio do método Levenberg-Marquardt (MORE, 1977) e pelo método Quase-Newton (BISHOP, 1975) utilizando o software *Statistica 7.0*.

Uma vez que a atividade relativa diminui com o tempo de incubação térmica, é necessário que o valor dos parâmetros  $k_1$  e  $k_2$  presentes nos termos exponenciais das Equações 3.12, 3.13 e 3.14 sejam positivos. Além disto, os valores de  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , que representam a razão entre a atividade específica do estado final da enzima e a atividade do estado inicial (Equações 3.13 e 3.14), também devem obrigatoriamente serem números positivos. Portanto, para que os valores dos parâmetros  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  apresentem significado físico é necessário que todos estes sejam números positivos.

Para a escolha do melhor ajuste, os critérios de maior coeficiente de determinação, menor soma dos quadrados dos desvios e parâmetros estatisticamente ( $p < 0,05$ ) e fisicamente (valores positivos) significativos foram levados em consideração.

Conforme visualizado na Tabela 4.8, o parâmetro  $\alpha_2$  da Equação 3.14 não apresentou significado físico. Todos os parâmetros das Equações 3.12 e 3.13 apresentaram valores significativos, além disso, a soma dos quadrados dos desvios foi satisfatória.

Tabela 4.8 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 60°C

	Método	$k_1$ valor- p	$k_2$ valor- p	$\alpha_1$ valor- p	$\alpha_2$ valor- p	$R^2$	$\sum(V - V_{\text{Modelo}})^2$
<b>Eq3.12</b>	Levenberg- Marquardt	0,0876 0,0001	-----	----	-----	88,76%	$1,405 \cdot 10^{-1}$
<b>Eq3.13</b>	Levenberg- Marquardt	0,2538 $1,5 \cdot 10^{-4}$	-----	0,2351 $3 \cdot 10^{-6}$	-----	98,62%	$1,738 \cdot 10^{-2}$
<b>Eq3.14</b>	Quasi- Newton	0,5767 -----	0,0278 ----	0,4377 -----	-0,0048 -----	99,44%	$3,125 \cdot 10^{-3}$



Dessa maneira, optou-se pela Equação 3.13 para representar o modelo de desativação a 60°C devido ao seu maior coeficiente de correlação (0,9944) quando comparado ao coeficiente de correlação da Equação 3.12 (0,8876).

Portanto, a equação que representa o modelo de desativação térmica a 60°C para a enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana com glutaraldeído (5%) é representada pela Equação 4.5.

$$\frac{U}{U_0} = 0,7649 \cdot e^{(-0,2538 \cdot t)} + 0,2351 \quad (4.5)$$

Percebe-se através da Equação 4.5 que o valor para a constante k equivale a 0,2538.

Por meio da Figura 4.13 torna-se possível visualizar os pontos experimentais para o processo de desativação térmica a 60°C bem como as curvas geradas pelas Equações 3.12, 3.13 e 3.14 com seus respectivos parâmetros obtidos conforme demonstra a Tabela 4.8.

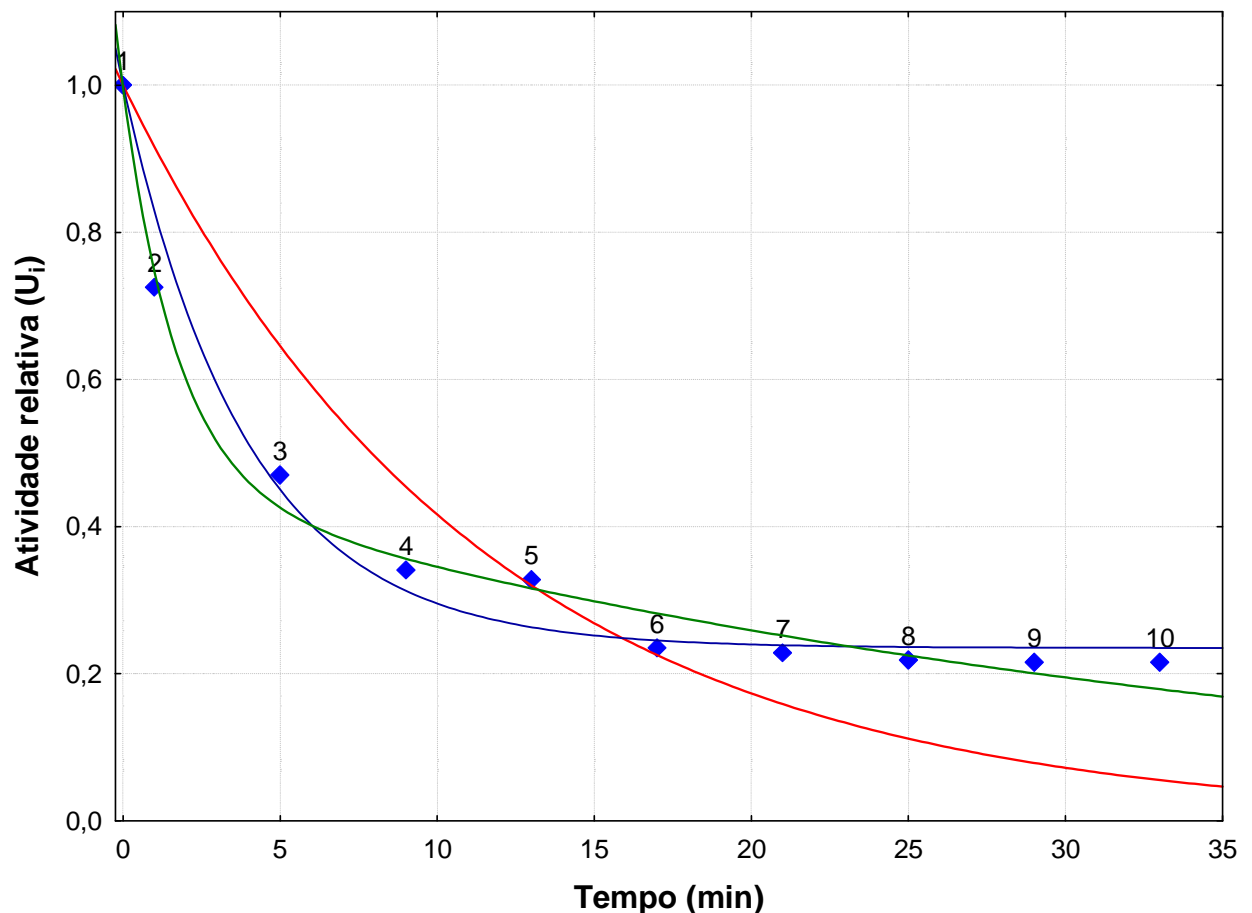


Figura 4.13: Perfil da desativação térmica para a temperatura de 60°C. Pontos experimentais (♦), Eq. 3.12 (—), Eq. 3.13 (—), Eq. 3.14 (—).

Nota-se, pela Figura 4.13, que a curva representada pela Equação 3.13 realmente se ajusta bem aos pontos obtidos experimentalmente.

Conforme visualizado na Tabela 4.9, os parâmetros  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  da Equação 3.14 não apresentaram significados físicos (valores inferiores a zero). Entretanto, todos os parâmetros das Equações 3.12 e 3.13 apresentaram valores significativos, além disso, a soma dos quadrados dos desvios foi satisfatória.

Tabela 4.9 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 58°C

	Método	$k_1$ valor- p	$k_2$ valor- p	$\alpha_1$ valor- p	$\alpha_2$ valor- p	$R^2$	$\sum(V-V_{\text{Modelo}})^2$
<b>Eq3.12</b>	Levenberg- Marquardt	0,0325	-----	----	-----	85,30%	$2,903.10^{-1}$
		0,00023					
<b>Eq3.13</b>	Levenberg- Marquardt	0,1256	-----	0,3675 $1.10^{-6}$	-----	97,54%	$1,986.10^{-2}$
		0,00080					
<b>Eq3.14</b>	Quasi- Newton	0,0128	0,2574	-7,5112	-0,0406	98,97%	$1,509.10^{-2}$
		-----	----	-----	-----		

Dessa maneira, optou-se pela Equação 3.13 para representar o modelo de desativação a 58°C devido ao seu maior coeficiente de correlação (0,9754) quando comparado ao coeficiente de correlação da Equação 3.12 (0,8530).

Portanto, a equação que representa o modelo de desativação térmica a 58°C para a enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana com glutaraldeído (5%) é representada pela Equação 4.6.

$$\frac{U}{U_0} = 0,6325.e^{(-0,1256.t)} + 0,3675 \quad (4.6)$$

Percebe-se através da Equação 4.6 que o valor para a constante k equivale a 0,1256.

Por meio da Figura 4.14 torna-se possível visualizar os pontos experimentais para o processo de desativação térmica a 58°C bem como as curvas geradas pelas Equações 3.12, 3.13 e 3.14 com seus respectivos parâmetros obtidos conforme demonstra a Tabela 4.9.

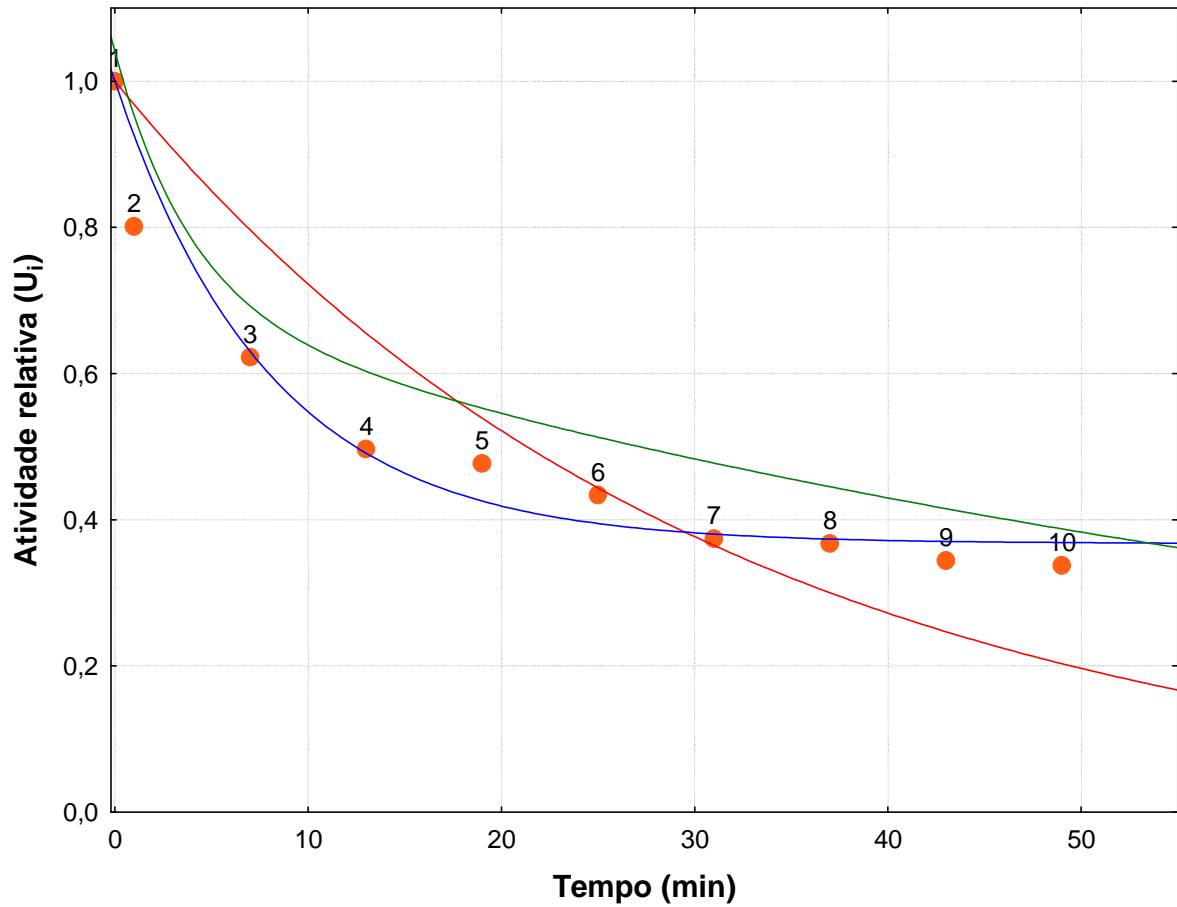


Figura 4.14: Perfil da desativação térmica para a temperatura de 58<sup>o</sup>C. Pontos experimentais (●), Eq. 3.12 (—), Eq. 3.13 (—), Eq. 3.14 (—).

Nota-se, pela Figura 4.14, que a curva representada pela Equação 3.13 realmente se ajusta bem aos pontos obtidos experimentalmente.

Conforme visualizado na Tabela 4.10, os parâmetros  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  da Equação 3.14 não apresentaram significados físicos (valores inferiores a zero). Entretanto, todos os parâmetros das Equações 3.12 e 3.13 apresentaram valores significativos, além disso, a soma dos quadrados dos desvios foi satisfatória.

Tabela 4.10 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 55°C

		$k_1$	$k_2$	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$R^2$	$\sum(V-V_{Modelo})^2$
	Método	valor-p	valor-p	valor-p	valor-p		
Eq3.12	Levenberg-Marquardt	0,0103	-----	----	-----	93,43%	8,709.10 <sup>-2</sup>
		0,0000					
Eq3.13	Levenberg-Marquardt	0,0440	-----	0,5624	-----	99,26%	3,677.10 <sup>-3</sup>
		5.10 <sup>-5</sup>		0,0000			
Eq3.14	Quasi-Newton	0,0009	0,0445	-18,8861	-0,0163	99,75%	2,437.10 <sup>-3</sup>
		-----	----	-----	-----		

Dessa maneira, optou-se pela Equação 3.13 para representar o modelo de desativação a 55<sup>0</sup>C devido ao seu maior coeficiente de correlação (0,9926) quando comparado ao coeficiente de correlação da Equação 3.12 (0,9343).

Portanto, a equação que representa o modelo de desativação térmica a 55<sup>0</sup>C para a enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana com glutaraldeído (5%) é representada pela Equação 4.7.

$$\frac{U}{U_0} = 0,4376.e^{(-0,0440.t)} + 0,5624 \tag{4.7}$$

Percebe-se através da Equação 4.7 que o valor para a constante k equivale a 0,0440.

Por meio da Figura 4.15 torna-se possível visualizar os pontos experimentais para o processo de desativação térmica a 55<sup>0</sup>C bem como as curvas geradas pelas Equações 3.12, 3.13 e 3.14 com seus respectivos parâmetros obtidos conforme demonstra a Tabela 4.10.

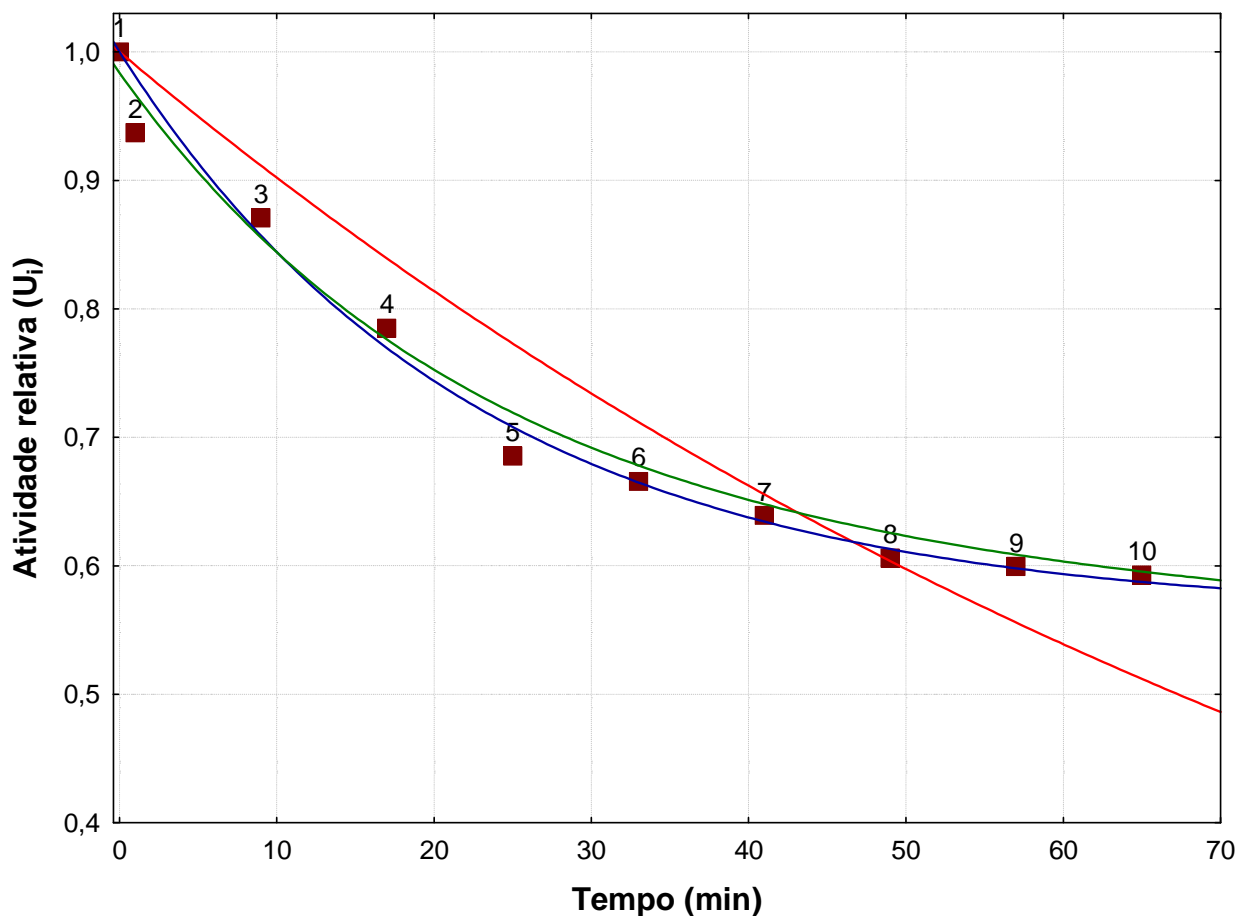


Figura 4.15: Perfil de desativação térmica para a temperatura de 55<sup>0</sup>C. Pontos experimentais (■), Eq. 3.12 (—), Eq. 3.13 (—), Eq. 3.14 (—).

Nota-se, pela Figura 4.15, que a curva representada pela Equação 3.13 realmente se ajusta bem aos pontos obtidos experimentalmente.

Conforme visualizado na Tabela 4.11, o parâmetro  $\alpha_1$  da Equação 3.14 não apresentou significado físico (valores inferiores a zero). Entretanto, todos os parâmetros das Equações 3.12 e 3.13 apresentaram valores significativos, além disso, a soma dos quadrados dos desvios foi satisfatória.

Tabela 4.11 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 50°C.

	Método	$k_1$ valor- p	$k_2$ valor- p	$\alpha_1$ valor- p	$\alpha_2$ valor- p	$R^2$	$\sum(V-V_{\text{Modelo}})^2$
<b>Eq3.12</b>	Levenberg- Marquardt	0,0038 0,0000	-----	----	-----	89,35%	$1,389.10^{-1}$
<b>Eq3.13</b>	Levenberg- Marquardt	0,0348 $3.10^{-5}$	-----	0,7434 0,0000	-----	99,36%	$3,289.10^{-3}$
<b>Eq3.14</b>	Quasi- Newton	0,0023 -----	0,4151 ----	-16,7355 -----	0,0079 -----	93,67%	$8,233.10^{-2}$

Dessa maneira, optou-se pela Equação 3.13 para representar o modelo de desativação a 50°C devido ao seu maior coeficiente de correlação (0,9936) quando comparado ao coeficiente de correlação da Equação 3.12 (0,8935).

Portanto, a equação que representa o modelo de desativação térmica a 50°C para a enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana com glutaraldeído (5%) é representada pela Equação 4.8.

$$\frac{U}{U_0} = 0,2566.e^{(-0,0348.t)} + 0,7434 \quad (4.8)$$

Percebe-se através da Equação 4.8 que o valor para a constante k equivale a 0,0348.

Por meio da Figura 4.16 torna-se possível visualizar os pontos experimentais para o processo de desativação térmica a 50°C bem como as curvas geradas pelas Equações 3.12, 3.13 e 3.14 com seus respectivos parâmetros obtidos conforme demonstra a Tabela 4.11.

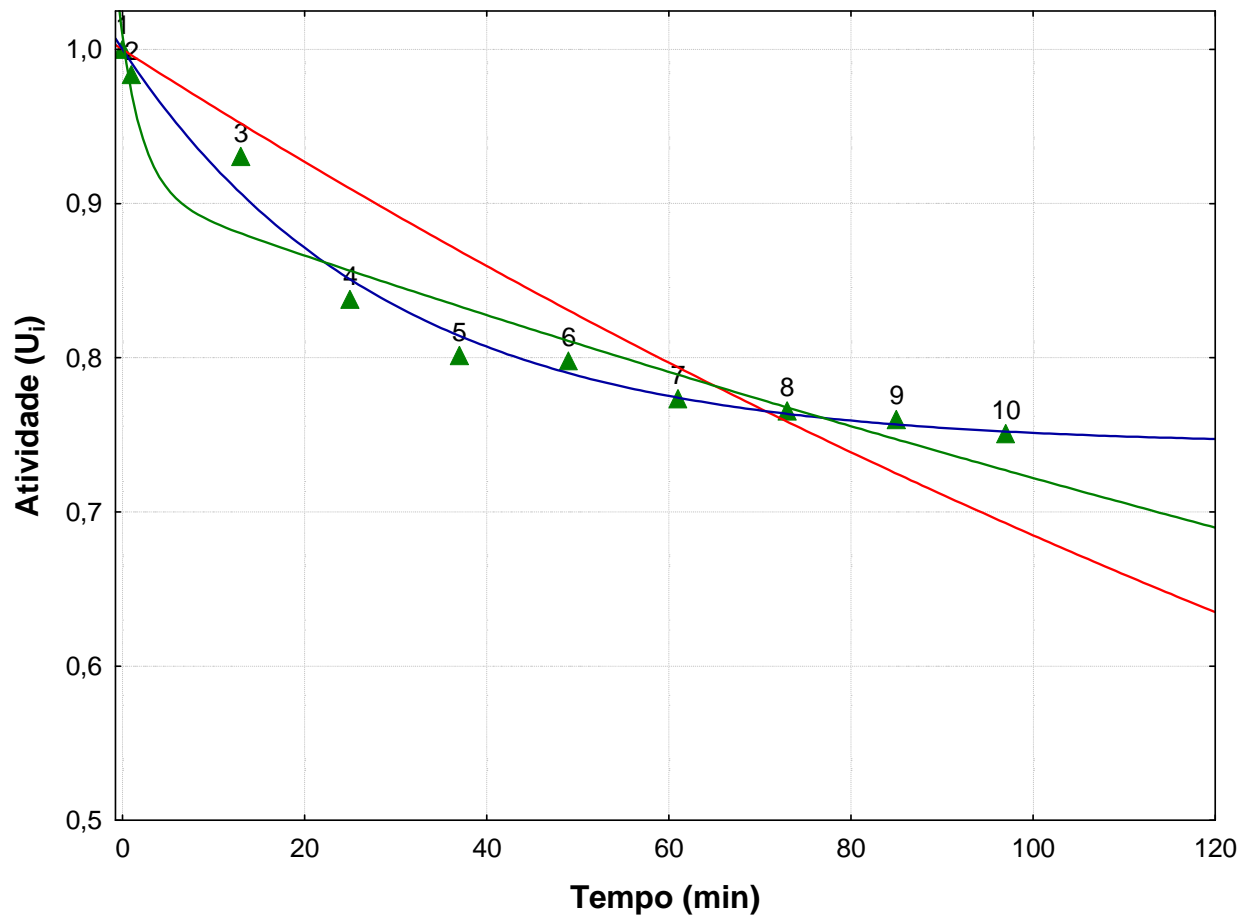


Figura 4.16: Perfil de desativação térmica para a temperatura de 50°C.  
Pontos experimentais (▲), Eq. 3.12 (—), Eq. 3.13 (—), Eq. 3.14 (—).

Nota-se, pela Figura 4.16, que a curva representada pela Equação 3.13 realmente se ajusta bem aos pontos obtidos experimentalmente.

Com relação aos estudos desenvolvidos por COSTA (2012), a enzima  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* imobilizada em resina de troca iônica Duolite a-568, observou-se uma elevada diminuição da atividade relativa para a faixa de temperatura compreendida entre 60°C e 70°C. Após 120 minutos de incubação a 60°C foi observada uma diminuição de mais da metade da atividade inicial e após 180 minutos, a atividade relativa obtida foi 28,6%. Quando exposta a temperatura de 65°C por 30 minutos, houve perda de 76,2% da atividade inicial. Para 70°C a atividade relativa foi de apenas 6,3% após 20 minutos de incubação.

No trabalho desenvolvido por Ademark et al. (2001), os quatro tipos de  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* ATCC 46890 apresentaram cerca de 95% da atividade inicial quando incubadas por 21 horas a 40°C e pelo menos 80% para o mesmo tempo a 50°C. A enzima foi completamente desnaturada a 60°C também após 21 horas de incubação. Para a

enzima proveniente do mesmo fungo, Scigelova e Crout (2000) observaram que a atividade relativa se manteve acima de 80% após 300 minutos a 50°C. Aumentando 10°C, a atividade relativa foi de cerca de 25% após 165 minutos de incubação. Após 60 minutos a 65°C, a  $\alpha$ -galactosidase perdeu completamente sua atividade.

A  $\alpha$ -galactosidase de *A. terreus*, manteve 92% da atividade inicial quando incubada a 60°C por 30 minutos. Após 270 minutos nesta temperatura, a enzima perdeu 69% da atividade (FERREIRA, 2007). Utilizando  $\alpha$ -galactosidase de *A. fumigatus*, Rezende et al. (2005) diminuíram 20% da atividade após tratamento térmico a 50°C por 90 minutos. A menor estabilidade térmica encontrada na literatura para fungos do gênero *Aspergillus* foi para a espécie *A. nidulans*, cuja  $\alpha$ -galactosidase foi instável para temperaturas acima de 30°C (RÍOS et al., 1993).

Utilizando sementes germinadas de soja, VIANA et al. (2005) purificaram  $\alpha$ -galactosidase e observaram que houve redução de mais de 80% de atividade a 45°C por 30 minutos.

A  $\alpha$ -galactosidase de *Monascus pilosus* manteve atividade quando incubada por 20 minutos a 50°C e 55°C, porém a atividade diminuiu para 30% da atividade inicial após este mesmo tempo a 60°C (WONG et al., 1986).

Observa-se nas Tabelas 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11 que, embora os altos valores para os coeficientes de correlação obtidos ( $R^2$ ), em nenhuma das temperaturas estudadas foi possível ajustar a cinética de desativação segundo a Equação 3,9 devido a incoerências físicas dos valores encontrados para as variáveis estudadas, isto é, valores inferiores à zero. Os parâmetros  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são as razões específicas de atividade  $\frac{E_1}{E}$  e  $\frac{E_2}{E}$ , respectivamente, não sendo possível admitir valor negativo.

Quanto maior a temperatura maior o parâmetro da constante da taxa de desativação térmica ( $k_d$ ), o que realmente deveria acontecer, pois de acordo com Arrhenius  $k_d$  é diretamente proporcional à temperatura.

Com as constantes de ativação do processo de desativação térmica dos modelos que apresentaram melhor ajuste para cada temperatura foram calculados os tempos de meia-vida, citados na Tabela 4.12, conforme as Equações 3.15 e 3.16.

Tabela 4.12: Tempos de meia vida e constantes de desativação térmica a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	$K_d$ (Eq. 3.12)	$t_{1/2}$ (min) (Eq. 3.15)	$K_d$ (Eq. 3.13)	$t_{1/2}$ (min) (Eq. 3.16)	$t_{1/2}$ Experimental (min)
60	0,0876	7,913	0,2538	3,454	4,077
58	0,0325	21,328	0,1256	12,445	12,842
55	0,0103	67,296	0,0440	*	**
50	0,0038	182,407	0,0348	*	**

\* Não foi possível ajustar o tempo de meia vida pela Equação 3.16 para as temperaturas de 55 e 50°C.

\*\* Não foram encontrados os valores experimentais para os tempo de meia vida referentes às temperaturas de 55 e 60°C.

Analisando-se a Tabela 4.12, percebe-se que os resultados para os tempos de meia vida provenientes da Equação 3.13 estão mais próximos dos resultados experimentais quando comparados com os resultados de tempo de meia vida obtidos através da Equação 3.12. Essa similaridade ocorre até nos experimentos cujas temperaturas são inferiores (50°C e 55°C) e, por isso, os tempos de meia vida experimentais não foram obtidos.

Para encontrar a energia de ativação do processo de ativação térmica realizou-se uma regressão linear na equação de Arrhenius (Equação 3.17), utilizando-se as constantes de desativação térmica ( $K_d$ ) oriunda dos melhores ajustes (Equação 3.16) citados na Tabela 4.12.

A Figura 4.17 representa o ajuste linear e foi originada utilizando-se o software *Statistica 7.0*.



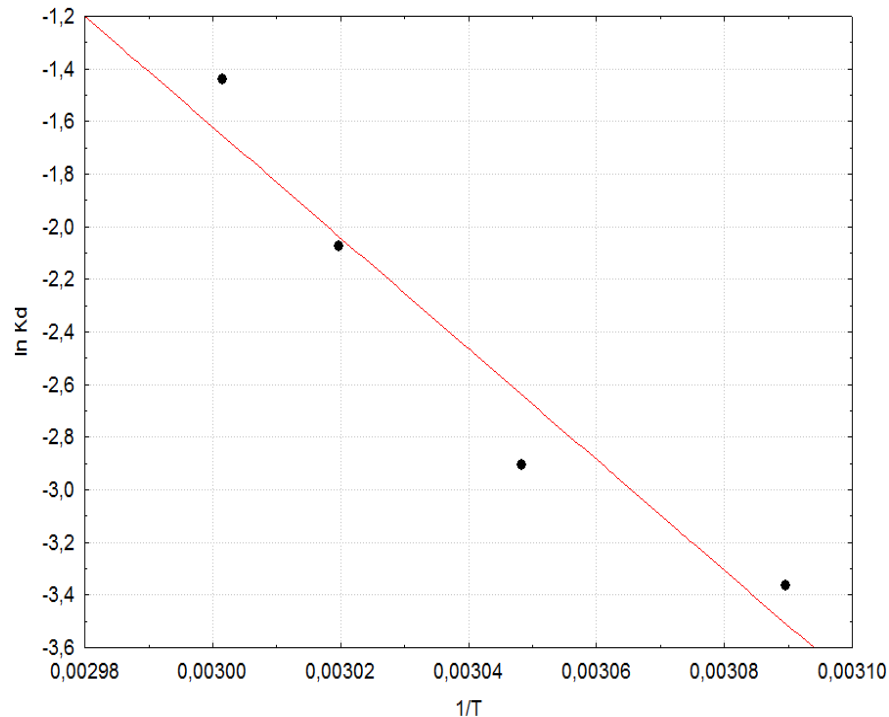


Figura 4.17: Regressão linear da equação de Arrhenius.

O ajuste linear obtido está representado pela Equação 4.9, atingindo um coeficiente de determinação linear ( $R^2$ ) da ordem de 0,92.

$$\ln(k_d) = -21070.(1/T) + 61,6 \quad (4.9)$$

O valor da energia de ativação encontrada foi da ordem de  $175,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ou  $41,85 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Esse valor é relativamente elevado sendo que tal fato implica maior sensibilidade da atividade residual da enzima imobilizada nas partículas de quitosana em função da temperatura, ou seja, a elevação da temperatura diminui a estabilidade térmica da enzima imobilizada acarretando maior degradação da atividade residual ( $U/U_0$ ) da mesma. Isso ficou evidenciado nesses estudos como visualizado na Figura 4.12 em que ao aumentar a temperatura em  $10^0 \text{ C}$  (elevando de  $50^0 \text{ C}$  para  $60^0 \text{ C}$ ) percebeu-se uma queda da atividade, com relação à atividade inicial, na ordem de 50%, isto é, enquanto para a temperatura inferior após 100 minutos ocorreu queda de aproximadamente apenas 20% da atividade inicial, para a temperatura de  $60^0 \text{ C}$  a queda de atividade foi de aproximadamente 70% decorridos apenas 10 minutos.

#### 4.6 Teste de resistência ao armazenamento

As enzimas  $\alpha$ -galactosidase, imobilizadas com 0% e 5% de glutaraldeído conforme item 3.2.11, foram analisadas quanto à estabilidade em relação ao armazenamento e os resultados de atividade enzimática residual, determinados de acordo com o item 3.2.3, estão representados nas Figuras 4.13 e 4.14.

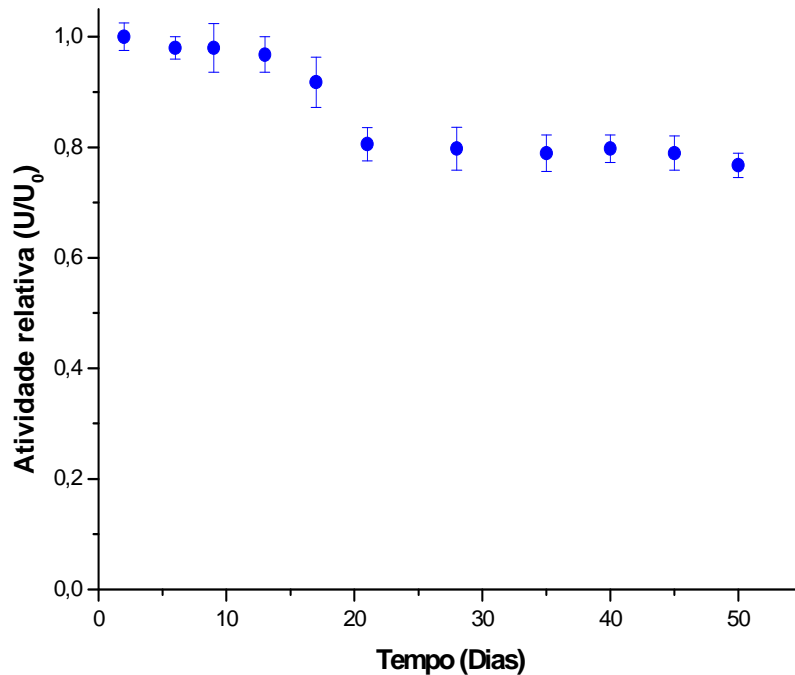


Figura 4.18: Atividade relativa ( $U/U_0$ ) para enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana com 5% de glutaraldeído como ligação cruzada em função do tempo de armazenamento.

Observa-se, através da Figura 4.18, que para o processo de imobilização em suporte de quitosana que utiliza glutaraldeído a retenção de atividade após 50 dias de armazenamento foi de 76,73% relacionada à atividade inicial.

Os resultados obtidos mostraram que a enzima  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* imobilizada em partículas de quitosana com glutaraldeído como agente reticulante apresentou maior estabilidade de estocagem do que os resultados obtidos por NAGANAGOUDA e MULIMANI (2006) para  $\alpha$ -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em alginato de cálcio e gelatina. Esses autores verificaram perda de pelo menos 50% da atividade inicial após 40 dias de estocagem.

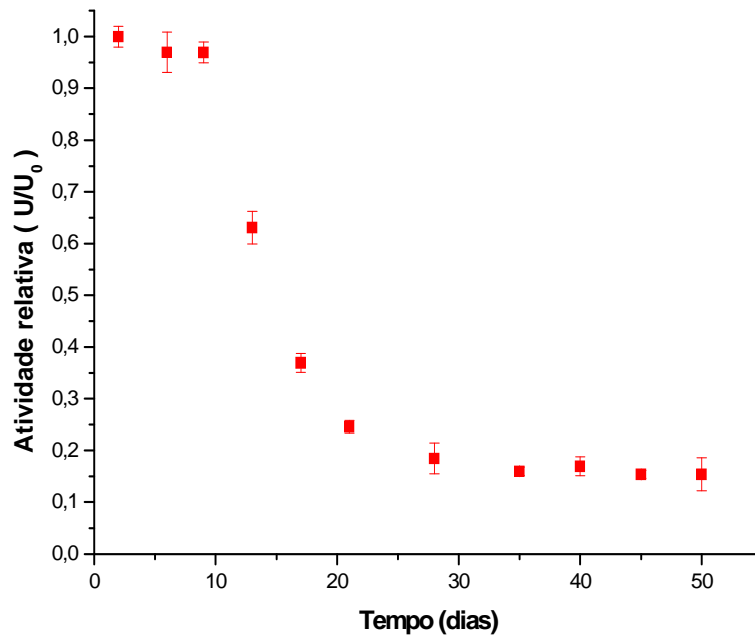


Figura 4.19: Atividade relativa ( $U/U_0$ ) para enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana com 0% de glutaraldeído como ligação cruzada em função do tempo de armazenamento.

Já para o processo de imobilização sem glutaraldeído como ligação cruzada, conforme visualizado através da Figura 4.19, a retenção de atividade após 50 dias de armazenamento foi de 14,38% relacionado ao valor de atividade inicial. Interessante citar o patamar de relativa estabilidade na utilização da enzima imobilizada até aproximadamente o décimo primeiro dia de armazenamento.

Dessa maneira, percebe-se que, para o processo de imobilização de  $\alpha$ -galactosidase em suporte de quitosana o procedimento envolvendo a ligação cruzada cujo agente reticulante seja o glutaraldeído demonstra-se capaz de manter a atividade residual em condições mais elevadas quando comparadas aos valores obtidos no mesmo período no processo de imobilização sem as ligações cruzadas de glutaraldeído.

#### 4.7 Teste de resistência ao número de usos

As enzimas  $\alpha$ -galactosidase, imobilizadas conforme item 3.2.12, foram analisadas quanto à estabilidade em relação ao número de usos e os resultados de atividade enzimática residual, determinados de acordo com o item 3.2.3, está representado na Figura 4.20.

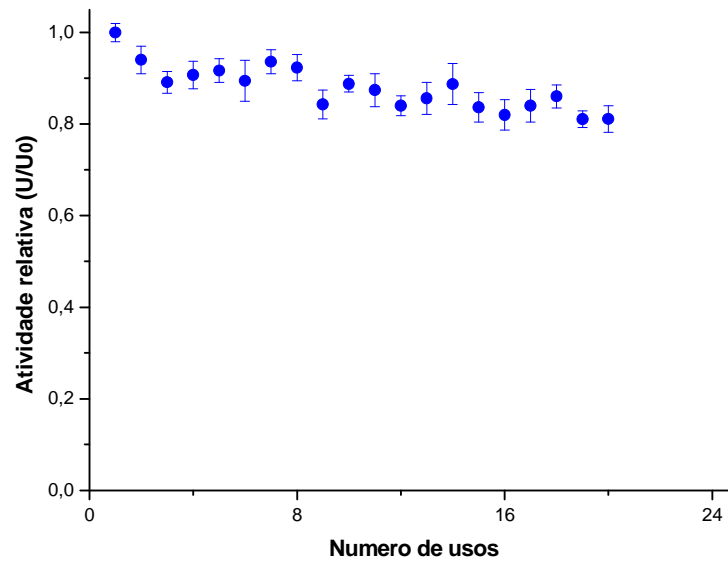


Figura 4.20: Atividade relativa ( $U/U_0$ ) para enzima  $\alpha$ -galactosidase immobilizada em suporte de quitosana com 5% de glutaraldeído como ligação cruzada em função do número de repetições.

A atividade da enzima immobilizada com o tratamento de glutaraldeído após 20 usos foi de 82,65% em relação à inicial como pode ser observado através da Figura 4.20.

COSTA (2012) realizou experimentos cujo intuito foi estudar o efeito de glutaraldeído na estabilidade operacional da enzima  $\alpha$ -galactosidase proveniente de *Aspergillus niger* immobilizada em resina de troca iônica Duolite A-568. Após 28 horas no reator sob agitação, observou-se uma estabilização da atividade relativa para ambos os tratamentos, sendo observados valores de atividades residuais entre 82 e 86% para o suporte ativado com glutaraldeído (1% v/v) e 70 e 74% para o suporte sem tratamento de reticulação (0% de glutaraldeído). O autor concluiu que o processo de reticulação anterior à immobilização da enzima ao suporte aumentou em cerca de 12% a atividade relativa da  $\alpha$ -galactosidase após vários ciclos de reação o que torna o glutaraldeído útil na immobilização da  $\alpha$ -galactosidase em Duolite A-568.

GUIDINI (2009) estudou o processo de ligação cruzada com glutaraldeído utilizando Duolite A-568 como suporte para immobilização de  $\beta$ -galactosidase e obteve uma retenção de 90% da atividade inicial após 30 reutilizações quando o processo de ligação cruzada foi estabelecido. Para o tratamento sem o uso do agente reticulante a atividade residual da enzima immobilizada foi de 51% para o mesmo número de reutilizações. O autor ainda concluiu que o uso de glutaraldeído não diminuiu a atividade inicial da enzima immobilizada.

---

---

# CAPÍTULO 5

---

## 5 Conclusões e sugestões

### 5.1 Conclusões

Pelos resultados obtidos é possível concluir que:

- Ao estudar o processo de ligação cruzada, observou-se que o tempo e a concentração de glutaraldeído, para o processo de imobilização, que maximizaram a atividade foram, respectivamente, 24 horas e 5% (v/v). Posteriormente, quando estudou-se a influência conjunta de temperatura, concentração da enzima  $\alpha$ -galactosidase e pH, no processo de imobilização, observou-se que os valores responsáveis por maximizar a atividade foram, respectivamente, 25°C; 15 g/L e 7,5. Dessa maneira, percebe-se que a combinação do processo de imobilização em suporte de quitosana com o processo de ligação cruzada empregando o agente glutaraldeído levou ao aumento da atividade e estabilidade da enzima  $\alpha$ -galactosidase. Os erros relacionados às validações dos pontos ótimos para o PFC e PCC foram satisfatórios (0,37% e 6,21% respectivamente);

- O intervalo de estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em quitosana em relação ao pH ocorreu para toda faixa estudada entre 3 e 9 (em tampão citrato e fostato  $10^{-1}$ M) para a enzima imobilizada com o processo de ligação cruzada com glutaraldeído sendo o pH de incubação equivalente a 6 responsável por um ganho de 22,53% de atividade. Para o processo sem glutaraldeído, a faixa de estabilidade ocorreu apenas para os valores de pH entre 4 e 6 ocorrendo total dissolução das partículas em pH equivalente a 3. Em ambos os casos, o pH de incubação que apresentou melhores resultados para atividades foi o tampão fosfato 6;

- O modelo de desativação térmica em série em uma única etapa descreveu de forma significativa a cinética de desativação térmica da enzima imobilizada em todas as temperaturas estudadas. Para a enzima imobilizada em quitosana com glutaraldeído, observou-se a dependência da estabilidade do biocatalisador imobilizado em relação à temperatura. A 60°C, em 10 minutos houve uma queda de 70% da atividade em relação à inicial. Para temperatura de 50°C, após 100 minutos, ocorreu queda de apenas 20% na atividade. Já para a enzima imobilizado em quitosana sem glutaraldeído, observou-se a degradação das partículas já para a temperatura de 50°C;

- Ao estudar a estabilidade com relação ao armazenamento, observou-se que para o processo de imobilização com glutaraldeído, após 50 dias, a retenção de atividade foi de 76,73% relacionada à inicial. Com relação ao processo sem glutaraldeído, após 50 dias, a retenção de atividade atingiu o valor de 14,38% do valor inicial;

- Analisou-se a estabilidade com relação ao número de usos e observou-se que para o processo de imobilização com glutaraldeído, após 20 repetições, a retenção de atividade enzimática foi de 82,65% relacionada ao valor inicial.

## **5.2 Sugestões para trabalhos futuros**

- Testar suportes diferentes para imobilizar a enzima  $\alpha$ -galactosidase;
- Avaliar a estabilidade operacional da enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada em quitosana utilizando reatores distintos do batelada.

---

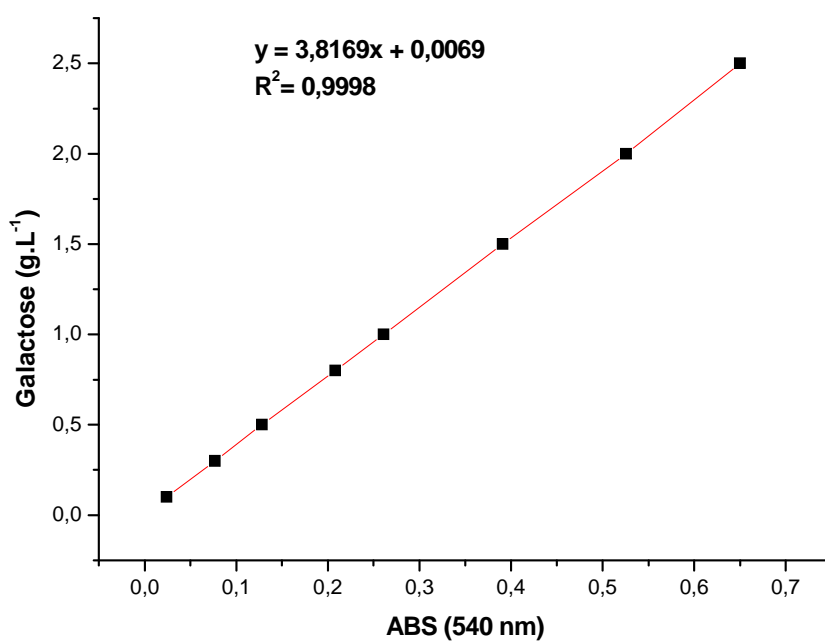
---

# APÊNDICE A

---

Curva de calibração do DNS.

[Galactose] (g.L <sup>-1</sup> )	ABS 1	ABS 2	Média
0,1	0,0249	0,0231	0,0240
0,3	0,0752	0,0780	0,0766
0,5	0,1295	0,1269	0,1282
0,8	0,2100	0,2064	0,2082
1	0,2629	0,2587	0,2608
1,5	0,3899	0,3922	0,3911
2	0,5266	0,5249	0,5257
2,5	0,6487	0,6517	0,6502



---

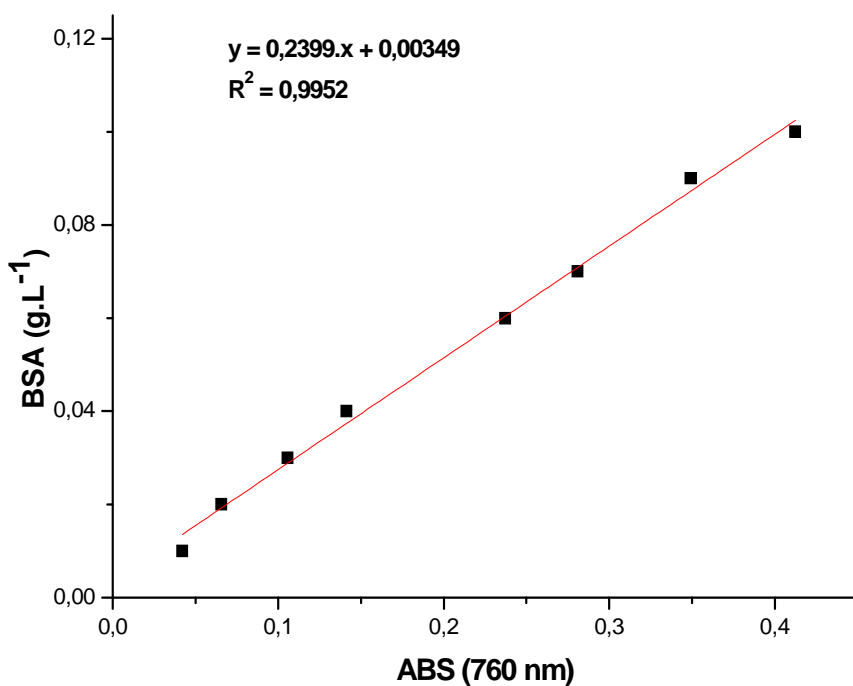
---

# APÊNDICE B

---

Curva de calibração para análise de proteína pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

[BSA] (g.L <sup>-1</sup> )	ABS 1	ABS 2	Média
0,01	0,0411	0,0431	0,0421
0,02	0,0671	0,0643	0,0657
0,03	0,1049	0,1063	0,1056
0,04	0,1399	0,1425	0,1412
0,06	0,2792	0,2350	0,2371
0,07	0,2795	0,2825	0,2810
0,09	0,3507	0,3477	0,3492
0,1	0,4144	0,4101	0,4123





---

---

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple  $\alpha$ -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme and Microbial Technology*, v.29, p.441-448, 2001.

ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GIORDANO, R.L.C; GONCALVES, L. R. B. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.22, p.529-538, 2005.

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.

ALANI, S. R.; SMITH, D. M.; MARKAKIS, P.  $\alpha$ -galactosidases of *Vigna unguiculata*. *Phytochemistry*, New York, v.28, n.8, p.2047-2051, 1989.

ALBAYRAK, N. YANG, S. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase on Tosylated Cotton Cloth. *Enzyme and Microbial Technology*, v 31, p. 371–383, 2002

ALEKSANYAN, E. R., MARKOSYAN, L. S. Microbial  $\beta$ -fructofuranosidase (survey). *Appl Biochem Microbiol*, v.22, p.133–45, 1986.

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.

ANNUNZIATO, M. E.; MAHONEY, R. R.; MUDGETT, R. E. Production of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* grown in solid state culture. *Journal of Food Science*, Chicago, v.51, n.5, p.1370-1371, 1986.

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.

AYMARD,C., BELARBI, A. Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. *Enzyme and Microbial Technology* v. 27. pp. 612-618, 2000.

AZEVEDO, V. V.; CHAVE, S.A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. v.2, p.27-34, 2007.

- BAGAL, D.; KARVE, M. S. Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose-guar gum biopolymer membrane. *Analytica Chimica Acta*, v. 555, p.316-321, 2006.
- BAILEY, J.E. & OLLIS D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. New York, McGraw-Hill, 1986.
- BAKKEN, A. P., HILL Jr., C. G., AMUDSON, C. H. Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized  $\beta$ -Galactosidase Reactor to Hydrolyze the Lactose Constituent of Skim Milk. *Biotechnology and Bioengineering*, v.36, n.3, p. 293-309, 1990.
- BARROS, R. M; EXTREMINA, C. I; GONÇALVES, I. C; BRAGA B. O; BALCÃO V. M, MALCATA FX. Hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzyme Microb Tech*; 7:908–16, 2003.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., RUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos*. 2º edição, Unicamp, 2002, p.412.
- BAYRAMOGLU, G., YILMAZ, M., ARICA, M.Y. *Food Chem.*, v.84, p. 591, 2004.
- BAYRAMOGLU, 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, pp. 117-126, 2003.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, M.J.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed bya complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52, 2004.
- BICKERSTAFF, G. F. *Em Immobilization of Enzymes and Cells*. ed.: Human Press. New Jersey, 1997, cap.1, p. 1-11.
- BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. *Principles of Catalysis In: Biochemical Engineering*. New York. Editora Marcel Dekker, 1997.
- BOBBIO, F.O. e BOBBIO, P.A.. *Introdução à Química de Alimentos*. 2a ed, São Paulo. 1995.
- BODALO, A., GOMEZ, J. L., GOMEZ, E., MAXIMO, M. F., HIDALGO, A. M. Simulation of Transient State in Enzymatic Membrane Reactors for Resolution of dl-valine and Experimental. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, v. 9, p. 978–984, 2001.
- 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. R.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J.S. *Statistic for experiments. An introduction to design, data analysis and model building*. New York; Wilwy, 1978.
- BULCHHOLZ K.; KASCHE V.; BORNSCHEUER U. T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. 2005.
- BULPIN, P.V.; GIDLEY, M.J.; JEFFCOAT,R.; UNDERWOOD, D.J. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant  $\alpha$ -galactosidase. *Carbohydrate Polymers*. v.12, p.155-168, 1990.

BURROWS, S. Baker's yeast. In: ROSE, A.H. Economic Microbiology. London: Academic Press, p.34-64, 1979.

BURTEAU, N., BURTON, S., CRICHTON, R.R., Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase. FEBS Lett. 258, 185–189, 1989.

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

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.

CARPIO, C., GONZALEZ, P., RUALES, J., BATISTA-VIERA, F. Bone-bound Enzymes for Food Industry Application. Food Chem, v.9, p.68-403, 2000.

CASABLANCA, F.G., SANTÍN, J.L. Ingeniería Bioquímica. 1ª edition. Editora Sintsis, 1998.

CHAPLIN, M. F., BUCKE, C. Enzyme Technology, Cambridge University, 1990.

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. New York: John Wiley & Sons, 1978.

CHIEN, S.F.; LIN-CHU, M. The conversion of group B red blood cells into group B by an  $\alpha$ -galactosidase from taro (*Colocasia esculenta*). Carbohydrate Research, v.217, p.191-200, 1991.

CLARKE, J.H.; DAVIDSON, K.; RIXON, J.E.; HALSTEAD, J.R.; FRANSEN, M.P.; GILBERT, H.J.; HAZLEWOOD, G.P. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase, and  $\alpha$ -galactosidase. Applied Microbiology Biotechnology, v.53, p.661-667, 2000.

COMERLATO, M.H. Imobilização de enzimas no suporte crisotila. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

COSTA, H.C.B. Imobilização de  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* em resina de troca iônica Duolite A-568 . Dissertação de Mestrado, UFU, 2012.

COSTA, S.I.; MIYA, E. Composição química e qualidade organoléptica das principais variedades de soja cultivadas no Brasil. Divulgando a pesquisa, v.1, p1-3, 1972.

COUTINHO FILHO U. Contribuição ao Estudo de Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 1996.

CRUZ, R.; PARK, Y. K. Production of fungal  $\alpha$ -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. Journal of Food Science, Chicago, v.43, p.1973-1975, 1982.

CRUZ, R., SILVA, A.I. Soybean (*Glycine max*), endogenous  $\alpha$ -galactosidase and invertase during the germinative process. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.29, p.435-443, 1986.

DAVID A. E. Immobilizaion of enzymes on nanoporous sílica composites. Tese de doutorado. University of Maryland, College Park, 2004.

DEY, P.M. D-galactoside containing oligosaccharides. In: DEY, P.M; DIXON, R.A. *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*, New York: Academic Press, p.53-129, 1985.

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

DOPICO, B.; NICOLÁS, G.; LABRADOR, E. Partial purification of cell wall  $\alpha$ -galactosidases and arabinosidases from *Cicer arietinum* epicotyls. Relationship with cell wall autolytic processes. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.75, p.465-468, 1989.

DOS REIS-COSTA, L.S., ANDREIMAR, M., FRANÇA, S.C., TREVISAN, H.C., ROBERTS, T.J.C., Immobilization of lipases and assay in continuous fixed bed reactor. *Protein Peptide Lett.* v.10, p.619–628, 2003.

D'SOUZA, S.F., KUBAL, B.S., A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase. *J.Biochem.Biophys.Meth.* v.51, p.151–159, 2002.

EGOUNLETY, M.; AWORH, O.C. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max Merr.*), cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa Harms*). *Journal of Food Engineering*, v.56, p.249-254, 2003.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, 2004.

FABER, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer- Verlag, New York Inc., 1997.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., ROSELL, C.M., RODRIGUEZ, V., GUIBAN, J.M., Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzyme Microb. Technol*, v.17, p.517–523, 1995.

FERREIRA, J. G. Purificação parcial e caracterização bioquímico-cinética de  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus terreus*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

FIALHO, L. S.; GUIMARÃES, V. M.; CALLEGARI, C. M.; REIS, A. P.; BARBOSA, D. S.; BORGES, E. C. L.; MOREIRA, M. A. Characterization and biotechnological application of an acid  $\alpha$ -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. *Phytochemistry*, v. 69, p. 2579-2585, 2008.

FIALHO, L.S. Purificação e caracterização de uma  $\alpha$ -galactosidase em sementes de *Tachigali multijuga* e clonagem parcial do gene da estaquiose sintase de soja. Tese de Doutorado. Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

FLYNN A. & JOHNSON D. B. Some Factors Affecting the Stability of Glucoamylase Immobilized on Hornblende and on Orther Inorganic Supports. *Biotechnology Bioengineering*, v. 20, p. 1445-1454, 1978.

FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; MOMMA, M.; DOBAYASHI, H.; MIZUNO, H. Crystal Structure of Rice  $\alpha$ -galactosidase Complexed with D-galactose. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.20313-20318, 2003.

FURLAN, L. Adsorção de corantes reativos e fotossensíveis por aminopolissacarídeos naturais. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis. 1997.

FURLONG, E.B. *Bioquímica: um Enfoque para "Alimentos"*. Edgraf. Rio Grande, 2000.

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

GÉKAS, V. & LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of Lactose: A Literature Review. *Process Biochemistry*, v. 20, pp. 2-12, 1985.

GIRELLI, A. M., MATTEI, E., J. *CHROMATOGR. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*v.3, p.819, 2005.

GIRIGOWDA, K., MULIMANI V.H.; Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by k-carrageenan-entrapped  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 437-442, 2006.

GÓES, S. P. de; RIBEIRO, M. L. L.;  $\alpha$ -galactosidase: general aspects and its application on soybean oligosaccharides. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 23, n. 1, p. 111-119, jan./jun. 2002.

GOLUBEV, A.M.; NAGEM, R.A.P.; NETO, J.R.B.; NEUSTROV, K.N.; ENEYSKAYA, E.V.; KULMINSKAYA, A.A.; SHABALIN, K.A.; SAVEL'EV, A.N.; POLICARPOV, I. Crystal Structure of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei* and Its Complex with galactose: Implications for Catalytic Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, v.339, p.413-422, 2004.

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, pp. 22-27, 2005.

GOVARDHAN CP. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr Opin Biotech*; v.10, p.331-5, 1999.

GOTE, M. M.; KHAN, M. I.; GOKHALE, D.V.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J.M. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). *Process Biochemistry*, v. 41, p.1311-1317, 2006.

GUIDINI, C.Z. Imobilização de  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia (FEQ/UFU), 2009.

GUIMARÃES, V.M.; DE REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIX, C.R. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry*, v.58, p.67-73, 2001.

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: reduction of steric problems. In: Bickerstaff, G. (Ed.), Immobilization of Enzymes and Cells, Series Methods Biotechnol, v.1. The Humana Press Inc., p. 261–275, 1997.

HAGE, D. S., CHROMATOGR, J., ANA, L B. Technol. Biomed. Life Sci, v.3, p. 768, 2002.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey Lactose by  $\alpha$ -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.

HAIDER, T., HUSSAIN, Q. Calcium Alginate Entrapped Preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ - galactosidase: Its stability and Applications in the Hydrolysis of Lactose International Journal of Biological Macromolecules . p.72-80, 2007.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. Enzyme Microb. Technol, Butterworth & Co.v.7. pp. 50-59, 1985.

HINCHA, D.K.; ZUTHER, E.; HEYER, A.G. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. Biochimica et Biophysica Acta, v.1612, p.172-177, 2003.

HIRANO, S. Chitin biotechnology application. Biotechnology Annual Review, v.2, p.237-258, 1996.

HWANG, S., LEE, K., PARK, J., MIN, B., HAAM, S., AHN, I., JUNG, J., Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. Biochem. Eng. J.17, 85–90, 2004.

JOSIC. D. BUCHCHER, A. JUNGBAUER, A. J. CHROMATOG. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., p.191, 2001.

JUANG, R., SHAO, H. Effect of pH on competitive adsorption of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) from water onto chitosan beads. Adsorption, New York, v.8, p.71-78, 2002.

KANDLER, O.; HOLF, H. Metabolism and function of oligosaccharides. In: Biochemistry of plants. Carbohydrates, Academic Press, New York, Kagawa University, v.15, p.117-131, 1980.

KAREL, S. F., LIBICKI, S. B., ROBERTSON, C. R. The Immobilization of whole cells: Engineering principles. Chemical Engineering Science. v.40, p.1321-54, 1985.

KENNEDY, J.F. & CABRAL, J.M.S. Enzyme Immobilization. Enzyme Technology, p. 761, 1987.

KHARE SK, KRISHNA J, MUNISHWAR NG. Entrapment of wheat phytase in polyacrylamide gel and its application in soymilk phytate hydrolysis. Biotechnol Appl Biochem; 19:193\_8; 1994.

KOBAYASHI, H.; SUZUKI H. Studies on the decomposition of raffinose by  $\alpha$ -galactosidase of mold. II. Formation of mold pellet na its enzyme activity. Journal of Fermentation Technology, v.50, p.625-632, 1972.

- KRAJEWSKA, B. Ureasas. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, p. 22-40, 2009.
- KUMAR, M. N. V.; SINGH, P.; DUTTA, P. K. Effect of swelling on chitosan-amine oxide gel in extended drug delivery. *Indian Drugs*, v.36, p.393. 1999.
- LADERO, M., FERRERO, R., VIAN, A., SANTOS, A., GARCIA-OCHOA, F. *Enzyme Microb. Technol*, v.37, p.505, 2005.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis with an Immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 27, pp. 583 – 592, 2000.
- LAMAS E. M.; BARROS R. M., BALCÃO, V.M., MALCATA, F.X., Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. 2001.
- LEBLANC JG, SILVESTRONI A, CONNES C, JUILLARD V, GIERI GS, PIARD J, SESMA F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce  $\alpha$ -galactosidase. *Genet Mol Res* 3:432–440, 2004.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAGNAN E, CATARINO I, PAOLUCCI-JEANJEAN D, PREZIOSI-BELLOU L, BELLEVILLE MP. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *J Membr Sci*. p.161–166, 2004.
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry, Oxford*, v.63, n.2, p.147-154, 1998.
- MALCATA, F. X., REYES, H. R., GARCIA, H. S., HILL Jr, C. G., AMUNDSON, C. H. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils. A review. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.
- MANZANARES, P.; GRAAFF, L.H.; VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger* : purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. *Enzyme and Microbial Technology, New York*, v.22, p.383-390, 1998.
- MARKOGLU, N., WAINER, I. W. Em *Bioanalytical Separations, New York*, ed.; Elsevier Science, cap. 7; 2003.
- MARQUEZ, L.D.S. Produção De Açúcar Invertido Pelo Uso De Invertase Imobilizada Em Resinas. Dissertação de Mestrado, UFU, 2007.
- MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORETE, G., GUIZA, J. M., FERNANDEZ-LORETE, R.; *Enzyme Microb. Tecnol*, v.40, p.1451, 2007.
- MEHRA, R.; KELLY, P. Milk oligosaccharides: structural and technological aspects. *International Dairy Journal, Oxford*, v. 16, n. 11, p. 1334-1340, 2006.
- MESSING, R. A. Carriers for immobilized biologically active systems in advances in biochemical engineering, v. 10, 1978.

- MICHAELIS, L.; DAVIDSOHN, H. . Biochem. Z. 35, 366, 1911.
- MIGNEAULT I, DARTIGUENAVE C, BERTRAND MJ, WALDRON KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. Biotechniques; v. 37, p.798–802, 2004.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyses Chemistry, v.31, p. 426-428, 1959.
- MOFFAT, G., WILLIAMS, R. A., WEBB, C., STIRLING, R. Selective Separations in Environmental and Industrial Processes Using Magnetic Carrier Technology. Minerals Engineering, p.1039–1056, 1994.
- MONSAN, P., Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilisation. J. Mol. Catal. v.3, p.371–384, 1978.
- MOREIRA, R.F.; MARIA, C.A.B.; “Glicídios no mel”; Química Nova; v. 24, p.516-525; 2001.
- MULIMANI, V. H. ; DEVENDRA, S. Effect of soking, cooking and crude  $\alpha$ -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of red gram flour. Food Chemistry, v.61, p.475-479, 1998.
- MULIMANI, V. H., Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase in gelatin and its application in removal of flatulence-inducing sugars in soymilk. World J Microbial Biotechnol, India, p. 1, 2007.
- MULIMANI, V. H. ; RAMALINGAN. Enzymatic degradation of raffinose family sugars in chickpea flour. World Journal of Microbiology & Biotechnology, Oxford, v.13, p.583-585, 1997.
- MULIMANI, V. H. ; RAMALINGAN. Enzymic hydrolysis of raffinose and stachyose in soymilk by alphagalactosidase from *Gibberella fujikuroi*. Biochemistry and Molecular Biology International, Marrickville, v.36, n. 4, p.897-905, 1995.
- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. Carbohydrate Polymers, Oxford, v 68, n. 3, p. 587-597, 2007.
- MUZZARELLI, R. A. A. Natural chelating polymers. New York: Pergamon Press. 1973.
- NAGANAGOUDA, K.; PRASHANTH, S. J.; SHANKAR, S. K.; DHANANJAY, S. K.; MULIMANI, V.H.; Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase in gelatin and its application in removal of flatulence-inducing sugars in soymilk. World J Microbiol Biotechnol, 23:1131–1137. 2007.
- NELSON J. M.; GRIFFIN E. G. Adsorption of Invertase. Journal Americal Chemical, v. 38, pp. 1109-1114, 1916.
- OLIVEIRA, M. S. Flotação em colunado rejeito remoído do processo de concentração da apatita. Dissertação de Mestrado FEQUI/UFU, Uberlândia, 131p., 2004.
- OSMAN, B.; KARA, A.; UZUN, L.; BESIRLI, N.; DENIZLI, A. Vinyl imidazole carrying metal-chelated beads for reversible use in yeast invertase adsorption. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 37, pp. 88-94, 2005.



- OHTAKARA A., MITSUTOMI M., Immobilization of Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on Chitosan Beads and Its Application to the Hydrolysis of Raffinose in Beet Sugar Molasses. *Journal of fermentation Technology*. v.65, No.4, 493-498, 1987.
- PAIVA, A. P. Metodologia de Superfície de Resposta Multivariada – Uma Proposta de otimização para processos de Manufatura com Múltiplas Respostas Correlacionadas. Tese de Doutorado – UNIFEI – Universidade Federal de Itajubá. . 2006. 279p.
- PARK, J. K., CHANG, H. N. Microencapsulation of Microbial Cells. *Biotechnology Advances*. v.18, p.303-319, 2000.
- PASSOS, L. M.; PARK, Y. K. Fruto-oligossacarídeos: implicações na saúde humana e uso em alimentos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.2, p. 85-390, 2003.
- PEREIRA, G. H. A. Estudo da Imobilização Multipontual da Penicilina G Acilase em Sílica Ativada com Grupos Glioxil. São Carlos, UFSCar, 1996.
- PORTER, J. E. et al. Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean  $\alpha$ -galactosidase. *Enzyme Microbial Technology*, New York, v.14, p.609-613, 1992.
- PUCHART, V.; VRSANSKÁ, M.; BHAT, M.K.; BIELY, P. Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1524, p.27-37, 2000.
- REZENDE, S.T. Teores de Oligossacarídeos de Rafinose em Soja, Purificação e Caracterização de Invertases e  $\alpha$ -galactosidases de Micro-organismos, Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília (UnB), 1998.
- REZENDE, S.T.; GUIMARÃES, V.M.; RODRIGUES, M.C.; FELIX, C.R. Purification and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Brazilian archives of biology and technology*, Curitiba, v.48, 2005.
- REZESSY-SZABÓ, J.M.; NGUYEN, Q.D.; HOSCHKE, A.; CHRISTOPHE, B. HAJÓS, G.; CLAWYSSENS, M.; A novel thermostable  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 55–62, 2007.
- 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.
- RIOS, S.; PEDREGOSA, A. M.; MONISTROL, I. F.; LABORDA, F. Purification and molecular properties of the  $\alpha$ -galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 112, p. 35-42, 1993.
- 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.I., IEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Casa do Pão Editora. FEA – Campinas. 2005.

- RUBIOLO, A.C., CARRARA, C.R. A method for evaluating lactose hydrolysis in a fixed bed reactor with  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan. *Chemical Engineering Journal*, v.65, pp. 93-98, 1997.
- RUIZ, A.; ACOSTA, M.; CISNEROS, F. Utilizacion de enzimas en los procesos de obtencion de leche y derivados de la soya. *Alimentaria*, Madrid, v.33, p.127-132, 1995.
- RUPÉREZ, P. Bifidogenic oligosaccharides. *Food Science and Technology International*, Thousand Oaks, v.4, n.4, p.237-243, 1998.
- SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas. In: \_\_\_\_\_ Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 1-7, 2004.
- SAKURAGAWA A.; TANIAI T.; OKUTANI. Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase to chitosan beads. *Analytica Chimica Acta*, p.289-296, 1999.
- SANDFORD, P.A.; HUTCHINGS, G.P. Chitosana natural cationic biopolymer: commercial applications. *Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Prope Relations and Applications*. Amsterdam: Elsevier Science, 1987.
- SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chemistry*, v.94, p. 573-579, 2005.
- SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Invertase immobilized on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. *Catalysis Communications*, v. 6. p81-86, 2005.
- SANNI, A.I.; ONILUDE, A.A.; OGUNDOYE, O.R. Effect of bacterial galactosidase treatment on the nutritional status of soybean seeds and its milk derivative. *Nahrung*, v.41, p.18-21, 1997.
- SARAVITZ, D.M.; PHARR, D.M.; CARTER, T.E. Jr. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiology*, v.83, p.185-189, 1987.
- SATO, T.; NISHIDA, Y.; TOSA, T.; CHIBATA, I. Immobilization of Escherichia coli cells containing aspartase activity with  $\kappa$ -carrageenan. Enzymic properties and application for l-aspartic acid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, v.570; p.179-186, 1979.
- SCHOEVAART R, WOLBERS MW, GOLUBOVIC M, OTTENS M, KIEBOOM APG, VAN RANTWIJK F, et al. Preparation, optimization, and structures of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng*; v.87; p.754-62, 2004.
- SCIGELOVA, M.; CROUT, D. H. G. Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 8, p. 175-181, 2000.
- SCOUTEN, W. H. *Methods in Enzymology*. Mosbach, K. ed., vol. 135, p.30-65; 1987.
- SECUNDO, F., CARREA, G. *MOL. J. Catal. A: Enzyme*, v.93, p.19-20, 2002.
- SEGEL I. H. *Bioquímica, Teoria e Problemas*. Traduzido Grassiano D.M., Rio de Janeiro, Livros técnicos e Científicos Editora, 1979.

SEYHAN, T.S., ALPTEKIN, O., Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochem.* 39, 2149–2155, 2004.

SHANKAR S. K.; PRAVEEN KUMAR S. K.; MULIMANI V.H. Calcium alginate entrapped preparation of  $\alpha$ -galactosidase: its stability and application in hydrolysis of soymilk galactooligosaccharides. *J Ind Microiol Biotechnol.* 38:1399–1405, 2011.

SHELDON, R. A. *Adv. Synth. Catal.* v. 349, p.1289, 2007.

SHIVANNA, B. D.; RAMAKRISHNA, M.; RAMADOSS, C. S. Enzymic hydrolysis of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*). *Process Biochemistry*, London, v.24, p.197-201, 1989.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. *Química Nova*, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SISO, M.I.G. et al. Enzyme encapsulation on chitosan microbeads. *Process Biochemistry*, New York, v.32, p.211-216, 1997.

SKAUGRUD, O. et al. Biomedical and Pharmaceutical Applications of alginate and chitosan. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, New York, v.16, p.23-41, 1998.

SMITH A. K, CIRCLE J. J. *Soybeans: Chemistry and Technology*. Westport, CN: Avi Publishing Co, 1972.

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.

SOMIARI, R. I. ; BALOGH, E. Effect of soaking, cooking and crude  $\alpha$ -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of cowpea flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.61, p.339-343, 1993.

SOMIARI, R. I. ; BALOGH, E. Hydrolysis of raffinose and stachyose in cowpea (*Vigna unguiculata*) flour, using  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v.8, p.564-566, 1992.

SÖRENSEN, S. P. L., *Comptes-Rendus des Travaux du Laboratoire de Carlsberg*, 8: 1 (apud, referência 11) , 1909.

SPRENGER, N.; KELLER, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. *The plant Journal*, v.21, p.249-258, 2000.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of Lactose in whey Permeate by Immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Mol. Catal. B: Enzym*, v. 10, p. 631–637, 2000.

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.

TAQIEDDIN, E., LEE, C., AMIJI, M. Perm-selective Chitosan-alginate Hybrid Microcapsules for Enzyme Immobilization Technology. *Pharm. Eng*, v.22, p.1–3, 2002.

- THANANUNKUL, D.; TANANKA, M.; CHICHESTER, C.O.; LEE, T.C. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase within polyacrylamide gel. *Journal of Food Science*, v.41, p.173-175, 1976.
- THIPPESWAMY, S.; MULIMANI, V. H. Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochemistry*, p.635-640, 2002.
- TISCHER, W., KASCHE, V. *Trends Biotechnol.* V,17, p.326, 1999.
- TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. *Process Biochemistry*, v. 41, pp. 1325-1331, 2006.
- TOPALOGLU, A.K.; ASHLEY, G.A.; TONG, B.; SHABBEER, J.; ASTRIN, K.H.; ENG, C.M.; DESNIK, R.J. Twenty novel mutations in the  $\alpha$ -galactosidase A gene causing Fabry disease. *Molecular Medicine*, v.5, p.806-811, 1999.
- TRUGO, L. C.; FARAH, A.; CABRAL, L. Oligosaccharide distribution in Brazilian soya bean cultivars. *Food Chemistry*, v.52, p.385-387, 1995.
- TUNGLAND, B. C.; MEYER, D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Chicago, v. 1, n. 3, p. 90-109, 2002.
- UHLIG, H. *Enzyme Arbeiten für uns, Technische Enzyme und ihre Anwendung*, München, Carl Hanser Ed, p.198-211; 1991.
- VAN AKEN, B.P., HENRY, L., SPIROS, N., AGATHOS, N., Coimmobilization of manganese peroxidase from *Phlebia radiata* on porous silica beads. *Biotechnol. Lett.* v.8, p.641-646, 2000.
- VARBANETS, L.D.; MALANCHUK, V.M.; BULOVA, T.T.; KUHLMANN, R.A. *Penicillium sp.23*  $\alpha$ -galactosidase: purification and substrate specificity. *Carbohydrate Polymers*, v.44, p.357-363, 2001.
- VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; FALKOSKI D. L.; LEITE, T. A.; JOSÉ, I. C.; MOREIRA, M. A.; GUIMARÃES, V. M. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidases. *Food Chemistry* 103 p. 331-337, 2007.
- VIANA, S. F.; GUIMARÃES, V. M.; JOSÉ, I. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; COSTA, N. M. B.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; REZENDE, S. T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean  $\alpha$ -galactosidase. *Food Chemistry*, v. 93, p.665-670, 2005.
- 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.
- VILLELA, G. G., BACILA, M., TASTALDI, H. *Bioquímica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A., 1978.
- VILLELA, S. M. *Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal de Santa Catarina. 2006

VISURI K, PASTINEN O, WU X, MAKINEN K, LEISOLA M. Stability of native and cross-linked crystalline glucose isomerase. *Biotechnol Bioeng*; v.64, p.377–80, 1999.

WEETALL H. H. Immobilized Enzymes and their Application in the Food and Beverage Industry. *Process Biochemistry*, p. 3-30, 1975.

WHITAKER, J. R. “*Microbial pectolytic enzymes*”. In: FOGARTY, W. “*Microbial Enzymes and Biotechnology*”. Dublin: Applied Science Publisher, p.133-137, 1990.

WONG, H. C.; HU, C. A.; YEH, H. L.; SU, W.; LU, H. C.; LIN, C. F. Production, purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Monascus pilosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, p. 1147-1152, 1986.

WOODWARD, J. Immobilised Cells and Enzymes- A practical approach. Ed. by IRL Press Oxford. Washington DC, USA, 1984, p.3-17.

YONG LIU, YAN SUN, YANLI LI, SHAOCHUN XU, JIANGWU TANG, JUNTAO DING, YAOXING XU. Preparation and characterization of  $\alpha$ -galactosidase-loaded chitosan nanoparticles for use in foods. *Carbohydrate Polymers* 83 (2011) 1162–1168.

ZHOU, Q.Z.K., CHEN, X.D. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *J. Food Eng.* 48, 69–74, 2001.

ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. *Gene*, v.140, p.227-231, 1994.