



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



PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO PELO
USO DE INVERTASE IMOBILIZADA EM
RESINAS

Autora: Líbia Diniz Santos Marquez

Orientadores: Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Uberlândia

2007



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



PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO PELO **USO DE INVERTASE IMOBILIZADA EM** **RESINAS**

Líbia Diniz Santos Marquez

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

Uberlândia

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M357p Marquez, Líbia Diniz Santos, 1978-
Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em
resinas / Líbia Diniz Santos Marquez. - 2007.
137 f. : il.

Orientadores: Eloízio Júlio Ribeiro, Vicelma Luiz Cardoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Processos químicos - Teses. 2. Enzimas - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.09

Agradecimentos

A conquista do título de Mestre em Engenharia Química vem acompanhada de reconhecimentos sinceros àqueles que contribuíram solidariamente na execução e elaboração deste trabalho, direta ou indiretamente. Seria impossível expressar a minha gratidão a todos, e o que posso oferecer é uma pequena, mas valorosa lembrança do quanto vocês representam para mim.

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e oportunidade de desenvolvimento intelectual e pessoal. A meu marido, pela compreensão, apoio e pelos valiosos incentivos. A meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional, pelos preciosos conselhos e afeto dedicados sempre.

Agradeço a você Eloízio Júlio Ribeiro, que me acompanha desde o primeiro ano de graduação, direcionando meus trabalhos, me incentivando e contribuindo para minha formação pessoal e profissional. É uma pessoa que merece todo meu respeito e carinho pela sua simplicidade, competência e afeto dispensado durante toda convivência. A você, meus sinceros agradecimentos pela sua orientação.

A professora Vicelma Luiz Cardoso, pela co-orientação incomum, típica do seu profissionalismo e pelo comprometimento com cada etapa desenvolvida na dissertação.

Aos professores Miriam Maria de Resende e Ubirajara Coutinho Filho, pelas diretrizes necessárias e fundamentais à condução experimental e análises dos resultados.

A professora Carla Eponina Hori, que não poupou esforços para auxiliar em equipamentos necessários durante a execução dos ensaios experimentais.

Pelos professores Carlos, Cláudio Mezenga, Daniel, Marcos Barroso, Lima Verde e Luiz Gustavo, pela ajuda indispensável em diferentes momentos da realização desta pesquisa.

A todos os professores da FEQUI que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários da FEQUI: Anísio, Cleide, José Henrique, Roberta, Silvino Tiago e Zuleide, sempre dispostos a ajudar de forma cordial.

Ao engenheiro Édio José Alves pelas informações preciosas e indispensáveis.

Ao amigo Marco Antônio Martins de Oliveira pela confecção do reator.

Ao professor Antônio Meireles da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela gentileza da doação da resina Duolite A-568 utilizada nesta pesquisa.

Aos amigos que colaboraram de várias maneiras na realização deste estudo:
Bruna Vieira, Bruno Daniel, Cristian, Fernanda Freitas, Fabiano, Gislaine, Gustavo,
Janaína, José Luiz, Karen, Patrícia Angélica, Raquel, Ricardo, Sandra Faria, Sandra.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À CAPES, pelo apoio financeiro através do Projeto Procad.

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

Índice

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Nomenclatura	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Capítulo 1 – Introdução	1
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	4
2.1 - Enzimas	4
2.1.1 – Enzimas como Catalisadores	4
2.1.2 - Invertase	6
2.2 – Açúcar Invertido	8
2.2.1 – Processo de Fabricação de Açúcar Invertido	10
2.2.2.1 – Inversão Ácida	10
2.2.2.2 – Inversão com Resinas Catiônicas	10
2.2.2.3 – Inversão Enzimática	11
2.3 – Enzimas Imobilizadas	12
2.3.1 – Métodos de Imobilização de Enzimas	14
2.3.1.1 – Ligação a Suportes Insolúveis	15
2.3.1.2 – Imobilização por Retenção Física	21
2.3.2 – Comparação Entre os Métodos de Imobilização	23
2.3.3 – Suportes para Imobilização	23
2.3.3.1 – Imobilização em Resinas	26
2.4 – Cinética Enzimática	27
2.4.1 – Presença de Inibidores no meio Reacional	29
2.4.2 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos	32
2.4.3 – Influência da Temperatura e do pH na Atividade e na Estabilidade	33
2.4.4 – Efeito da Imobilização nas Propriedades da Enzima	37
2.5 – Reatores com Enzimas Imobilizadas	38
2.5.1 – Reatores Descontínuos	39
2.5.2 – Reatores Contínuos	41
2.5.3 – Fatores que Influenciam a Seleção do Reator	43
2.5.4 – Problemas Operacionais de Reatores Enzimáticos	45
Capítulo 3 – Materiais e métodos	46
3.1 – Materiais	46
3.1.1 – Enzima e Reagentes	46
3.1.2 – Suportes para Imobilização	46
3.1.3 - Reator	47
3.2 - Metodologia	47
3.2.1 – Determinação de Açúcares Redutores	47
3.2.2 - Dosagem de Proteína	49
3.2.3 – Determinação da Atividade pelo Método das Taxas Iniciais	50
3.2.4 – Planejamento Composto Central	51
3.2.5 – Influência da Temperatura e do pH na Atividade de Invertase Livre.	55
3.2.6 – Estabilidade da Enzima Livre em Relação ao pH	56
3.2.7 – Estabilidade Térmica da Enzima Livre	56
3.2.8 – Influência da Concentração Inicial de Sacarose na Atividade de Invertase Livre	58

3.2.9 – Imobilização da Invertase	58
3.2.9.1 – Escolha das Resinas para a Imobilização de Invertase	58
3.2.9.2 – Influência do Tempo no Processo de Imobilização	59
3.2.9.3 – Influência da Temperatura, do pH e da Concentração de Enzima no Meio de Imobilização	60
3.2.9.4 – Influência do pH e Temperatura na Atividade da Enzima Imobilizada em Duolite A-568	61
3.2.9.5 – Eficiência da Enzima Imobilizada em Relação ao Número de Usos	62
3.2.9.6 – Estabilidade da Enzima Imobilizada em Relação ao pH	63
3.2.9.7 – Estabilidade Térmica da Enzima Imobilizada	63
3.2.9.8 – Influência da Concentração Inicial da Sacarose na Atividade de Invertase Imobilizada	64
3.2.9.9 - Influência da Concentração Inicial de Glicose e Frutose na Atividade de Invertase Imobilizada	64
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	67
4.1 - Atividade da Invertase usada no Trabalho	67
4.2 - Influência da Temperatura e do pH na Atividade de Invertase Livre	67
4.3 – Estabilidade de Invertase Livre em Relação ao pH	71
4.4 - Estabilidade Térmica de Invertase Livre	72
4.5 - Influência da Concentração de Substrato na Cinética da Reação da Enzima Livre	79
4.6 - Imobilização de invertase	81
4.6.1 - Escolha do Suporte	81
4.6.2 – Influência do Tempo no Processo de Imobilização	82
4.6.3 – Otimização do Processo de Imobilização	83
4.6.4 - Otimização da Imobilização em Relação à Temperatura e pH	90
4.6.5 - Estabilidade da Enzima Imobilizada em Relação ao Número de Usos	95
4.6.6 - Estabilidade de Invertase Imobilizada em Relação ao pH	95
4.6.7 - Estabilidade Térmica da Invertase Imobilizada	97
4.6.8 – Influência da Concentração de Substrato na Cinética da Reação da Enzima Imobilizada	105
4.6.9 – Influência da Concentração dos Produtos na Cinética da Reação da Enzima Imobilizada	107
Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões	115
Referências Bibliográficas	117
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mecanismo sugerido para a formação do complexo ativo invertase-sacarose.	8
Figura 2.2 - Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzimas; S: suportes; A: albumina.	15
Figura 2.3 - Representação esquemática do mecanismo de inibição competitiva.	31
Figura 2.4 - Representação esquemática do mecanismo de inibição não competitiva.	31
Figura 2.5 - Representação esquemática do mecanismo de inibição incompetitiva.	32
Figura 2.6 - Exemplos de reatores para enzimas imobilizadas.	41
Figura 3.1 - Foto do reator utilizado para realizar os ensaios.	47
Figura 3.2 - Esquema de reações envolvidas no método DNS.	48
Figura 3.3 - Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.	54
Figura 4.1 - Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.	69
Figura 4.2 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática	70
Figura 4.3 - Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de invertase livre.	70
Figura 4.4 - Influência do pH na estabilidade de invertase solúvel.	72
Figura 4.5 - Atividade relativa (A/A_0), em função do tempo, para as temperaturas estudadas.	73
Figura 4.6 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 66°C.	75
Figura 4.7 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C.	76
Figura 4.8 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 60°C.	77
Figura 4.9 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C.	77
Figura 4.10 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 54°C.	78
Figura 4.11 - Regressão linear da equação de Arrhenius.	79
Figura 4.12 - Perfil da influência da concentração de sacarose na atividade da enzima livre.	81
Figura 4.13 - Influência do tempo de imobilização na atividade enzimática relativa da invertase imobilizada.	83
Figura 4.14 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.	87
Figura 4.15 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.	87
Figura 4.16 - Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade de invertase imobilizada no processo de imobilização de invertase em Duolite A-568.	88
Figura 4.17 - Superfície de resposta da influência da temperatura e da concentração de enzima na atividade de invertase imobilizada no processo de imobilização de invertase em Duolite A-568.	88
Figura 4.18 - Superfície de resposta da influência do pH e da concentração de enzima na atividade de invertase imobilizada no processo de imobilização de invertase em Duolite A-568.	89
Figura 4.19 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.	92
Figura 4.20 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.	93

Figura 4.21 - Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de invertase imobilizada.	93
Figura 4.22 - Perfil de atividade enzimática em relação ao número de usos.	95
Figura 4.23 - Influência do pH na estabilidade de invertase imobilizada em Duolite A-568.	96
Figura 4.24 - Atividades relativas (A/Ao), em função do tempo, para diferentes temperaturas.	97
Figura 4.25 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C.	100
Figura 4.26 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 60°C.	101
Figura 4.27 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 55,5°C.	101
Figura 4.28 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C.	102
Figura 4.29 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 51°C.	103
Figura 4.30 - Regressão linear da equação de Arrhenius	105
Figura 4.31 - Perfil da influência da concentração de sacarose na atividade da enzima imobilizada.	106
Figura 4.32 - Perfil da influência da concentração de glicose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição competitiva.	110
Figura 4.33 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta de atividade enzimática.	110
Figura 4.34 - Perfil da influência da concentração de glicose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição não competitiva.	111
Figura 4.35 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição não competitiva para a resposta de atividade enzimática.	111
Figura 4.36 - Perfil da influência da concentração de frutose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição competitiva.	113
Figura 4.37 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta de atividade enzimática	113
Figura 4.38 - Perfil da influência da concentração de frutose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição não competitiva.	114
Figura 4.39 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição não competitiva para a resposta de atividade enzimática	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Exemplos de uso de enzimas nas indústrias.	6
Tabela 2.2 - Algumas propriedades da invertase.	7
Tabela 2.3 - Alguns exemplos de capacidade de trocadores iônicos.	18
Tabela 2.4 - Comparação entre os métodos de imobilização.	23
Tabela 2.5 - Classificação dos suportes de acordo com a composição.	25
Tabela 2.6 - Classificação de reatores enzimáticos.	39
Tabela 3.1 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da invertase livre.	55
Tabela 3.2 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito da temperatura, do pH e da concentração da enzima na imobilização de invertase na resina Duolite A-568.	61
Tabela 3.3 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade de invertase imobilizada na resina Duolite A-568.	62
Tabela 3.4 - Condições experimentais para o estudo da influência dos produtos da reação na taxa de hidrólise.	66
Tabela 4.1 - Matriz com resultados obtidos para avaliar a influência da temperatura e pH.	67
Tabela 4.2 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC.	68
Tabela 4.3 - ANOVA para a resposta de atividade enzimática.	69
Tabela 4.4 - Ajustes dos parâmetros na desativação térmica..	74
Tabela 4.5 - Tempo de meia vida para cada temperatura.	78
Tabela 4.6 – Taxas iniciais de reação (v), em função da concentração inicial de substrato (S), para invertase livre.	80
Tabela 4.7 - Resultados preliminares de imobilização de invertase nas resinas.	82
Tabela 4.8 - Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência da temperatura, do pH e da concentração de invertase no processo de imobilização.	84
Tabela 4.9 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC.	85
Tabela 4.10 - ANOVA para a resposta de atividade enzimática.	86
Tabela 4.11 - Matriz com os resultados obtidos de atividade enzimática de invertase imobilizada para avaliar a influência da temperatura e do pH.	90
Tabela 4.12 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC.	91
Tabela 4.13 - ANOVA para a resposta de atividade enzimática.	92
Tabela 4.14 - Análise da desativação térmica.	99
Tabela 4.15 - Cálculo do tempo de meia vida para cada temperatura em estudo.	104
Tabela 4.16 - Taxas iniciais de reação (v), em função da concentração inicial de substrato (S), para invertase imobilizada.	106
Tabela 4.17 - Resultados experimentais de taxa de reação em função das concentrações iniciais de sacarose, glicose e frutose no meio reacional.	108
Tabela 4.18 - Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de glicose como inibidor.	109
Tabela 4.19 - Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de frutose como inibidor.	112

Nomenclatura

U_S : Atividade de invertase solúvel - grama de açúcar redutor produzido por litro, por minuto, por grama de invertase em pó comercial
 U_i : Atividade de invertase imobilizada - grama de açúcar redutor por litro, minuto, grama de suporte
 F_{calc} : valor calculado do teste F para um conjunto de pontos experimentais
 F_T : valor tabelado do teste F de estatística para hipóteses
 α_1 : Relação entre a atividade da enzima no estado E_1 e a atividade da enzima nativa E_0
 α_2 : Relação entre a atividade da enzima no estado E_2 e a atividade da enzima nativa E_0
 E_1 : Atividade da enzima no estado E_1
 E_2 : Atividade da enzima no estado E_2
 k_1 : Coeficiente de velocidade de desativação de primeira ordem do estado E_0 para E_1
 k_2 : Coeficiente de velocidade de desativação de primeira ordem do estado E_0 para E_2
 $t_{1/2}$: tempo de meia-vida (min)
 k_d : Constante cinética desativação térmica
 A : fator de frequência para a reação
 E_a : energia de ativação do processo de desativação térmica (kJ/mol)
 T : temperatura absoluta (K)
 S : concentração de sacarose (g/L)
 F : concentração de frutose (g/L)
 G : concentração de glicose (g/L)
 v : taxas iniciais de reação ou velocidade da reação
 V_m : velocidade máxima da reação (U_S)
 S : concentração de substrato (g/L)
 K_m : constante de Michaelis Menten (M_{sac})
 K_i : constante de inibição (M_{sac})
 IA : índice de adsorção;
 TPA : total de proteína antes da imobilização (g/L)
 STP : total de proteína no sobrenadante depois da imobilização (g/L)
 A_i : atividade da invertase imobilizada (U_i)
 A/A_0 : atividade relativa
 $\Sigma(V-V_{modelo})^2$: somatória dos quadrados dos desvios

Resumo

O desenvolvimento do plano de trabalho proposto para esta dissertação refere-se à produção de açúcar invertido por invertase imobilizada em resinas trocadoras de íons. Os ensaios foram conduzidos em um microrreator de mistura com controle de temperatura e provido de agitação magnética. As concentrações de reagentes, de produtos, de invertase livre ou imobilizada e condições de pH e de temperatura seguiram planejamentos experimentais pré-estabelecidos, uma vez definida as variáveis do processo e seus níveis. Primeiramente realizou-se testes cinéticos com invertase livre a fim de determinar os parâmetros cinéticos, as melhores condições de atividade enzimática e estabilidade. A influência do pH e da temperatura foi analisada por meio de um Planejamento Composto Central (PCC) resultando em uma temperatura ótima igual a 47°C e pH 4,7. O intervalo de pH onde a enzima livre manteve-se estável está compreendido entre 5,5 a 7,5. A energia de ativação do processo de desativação térmica foi de 360 kJ/mol. A cinética de hidrólise de sacarose por invertase livre se ajustou ao modelo de inibição pelo substrato com a velocidade máxima de 0,0803 M/min, a constante cinética (K_m) de 45,2 mM e a constante de inibição (K_i) de 1,06 M. Na sequência foram testadas resinas para imobilização de invertase por adsorção visando obter o melhor suporte para o biocatalisador. A partir da definição da Duolite A-568 como sendo o melhor suporte realizaram-se testes cinéticos com a invertase imobilizada. O estudo da influência conjunta da temperatura, pH e concentração de invertase no meio de imobilização foi realizado por um PCC fixando um tempo de imobilização em 24 horas, obtendo como condições ótimas temperatura de 29°C, pH 5,0 e concentração de invertase 12,5 g/L. Nessas condições foram estudadas as influências da temperatura e do pH na atividade enzimática de invertase imobilizada por um PCC. A temperatura ótima foi 40°C e dentro da faixa de pH estudada, este apresentou pouca influência no resultado. A estabilidade em relação ao pH de invertase imobilizada ficou restrita ao intervalo 5,5 a 6,0, uma faixa menor se comparada à enzima livre. A energia de ativação do processo de desativação térmica do biocatalisador imobilizado foi 415 kJ/mol, maior do que o obtido pela enzima livre o que implica ser este mais sensível à variação de temperatura. Os parâmetros encontrados para o modelo de inibição pelo substrato foram V_m de 0,047 $M_{\text{sac}}/\text{min.g}_{\text{cat}}$, K_m de 176 mM e K_i de 1,08 M.

Palavras-chave: invertase, resina de troca iônica, imobilização, açúcar invertido, sacarose.

Abstract

This work aims to offer a contribution for the development of the production of invert sugar by invertase immobilized on ion exchanging resins. The experiments were conducted in a batch stirred microreactor with temperature control and magnetic agitation. Firstly, kinetic assays on free invertase were conducted aiming to determine the hydrolysis kinetic and the best conditions of enzymatic activity and stability. The influences of pH and temperature were analyzed by a Central Composite Design (CCD) resulting in optimal values of 47°C for temperature and 4.7 for pH. The soluble enzyme was stable from pH 5.5 to 7.5. The activation energy from the thermal deactivation process was 360 kJ/mol. The sucrose hydrolysis kinetic by free invertase fitted according substrate inhibition model with a kinetic constant (K_m) of 45.2 mM and an inhibition constant (K_i) of 1.06 M. Invertase immobilization by adsorption on ion exchange resins were then tested. After choosing Duolite A-568 as support, kinetic tests with the immobilized invertase were done. The study of the combined influence of temperature, pH and invertase concentration on immobilization medium was accomplished by a CCD, with an immobilization time of 24 hours, thus being obtained a temperature of 29°C, a value of 5.0 for pH and an invertase concentration of 12.5 g/L as optimal conditions for immobilization process. The influences of temperature and pH in the enzymatic activity of immobilized invertase were studied by a CCD. The optimal temperature found was 40°C and the pH presented little influence on the enzymatic activity. For the immobilized invertase, the stability in relation to the pH was restricted to an interval ranging from 5.5 to 6.0, a smaller range when compared to the enzyme free form. The activation energy from the biocatalyst thermal deactivation process was 415 kJ/mol, a higher value when compared with the free enzyme, showing that the immobilized enzyme is more sensible to temperature variations. The parameters found for the substrate inhibition model were a V_m of 0,047 $M_{sac}/min.g_{cat}$, a K_m of 176 mM and a K_i of 1,08 M.

Key-words: Invertase, ion exchanging resin, immobilization, invert sugar, sucrose.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Introdução

O açúcar invertido é uma mistura de açúcares em solução, constituída principalmente de glicose, frutose e sacarose residual, obtida pela reação de hidrólise ou inversão da sacarose. Esta reação pode ser catalisada por enzimas, por ácidos ou por resinas trocadoras de cátions.

Invertase ou β -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) é a principal enzima utilizada na indústria alimentícia para a hidrólise da sacarose, a qual atua no terminal não redutor do resíduo β -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos. A invertase catalisa também reações de transferência com outros aceptores, além da água. Isso resulta na formação de oligossacarídeos constituídos por unidades de glicose e frutose (VICENTE, 2000; DAVID et al., 2006).

A enzima invertase pode ser encontrada em leveduras, fungos, bactérias, insetos, mamíferos e vegetais, mas as principais fontes para produção industrial são as leveduras. A invertase de levedura apresenta-se em duas formas, pode estar localizada entre a membrana plasmática e a parede celular ou desprovidas de carboidratos e localizadas no citoplasma (CABRAL, 1982; ISIK et. al., 2003).

Os processos enzimáticos empregam as enzimas nas formas livres ou imobilizadas. Há vários benefícios ao utilizar as enzimas imobilizadas em relação às solúveis, tais como a reutilização do biocatalisador heterogêneo, redução de custos e melhoria no controle do processo (CAO, 2005). A hidrólise de sacarose catalisada por invertase na forma imobilizada ou livre produz um xarope de alta qualidade, com baixas concentrações de hidroximetil furfural (HMF) e sem desenvolvimento de cor (CHEN et. al., 2000; ALMEIDA et. al., 2005).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos e biológicos, durante armazenamento ou uso (DALLA-VECCHIA et al., 2004). O uso adequado das enzimas requer condições específicas, pois elas são ativas em estreitas faixas de pH e temperatura (ERGINER et al., 2000). A aplicação de enzimas em processos industriais tem sido restringida devido ao seu alto custo, à dificuldade de recuperação das mesmas no final do processo e ainda à sua instabilidade. Assim, a

utilização de enzimas na forma solúvel pode requerer etapas adicionais de separação ou inativação das mesmas ao final do processo e isto aumenta o custo. A aplicação da enzima na forma imobilizada pode apresentar várias vantagens em relação à forma livre, tais como redução de custo, possibilidade de melhor controle de processo, operação contínua, aumento de estabilidade, porém algumas alterações nas propriedades cinéticas da enzima também podem ser verificadas (KENNEDY e CABRAL, 1987; ÖZDURAL et al., 2003; DAVID, 2004).

A escolha de um processo de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais do processo, tais como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para fixação da enzima. Assim o método escolhido deve atender a duas necessidades, a catalítica, expresso em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a controle e *down-streaming process* (DALLA-VECCHIA et. al., 2004; CAO, 2005).

A imobilização em resinas de troca iônica é realizada de modo simples, comparado aos outros métodos de imobilização. Basicamente envolve interações iônicas e eletrostáticas entre os íons da proteína e os íons de carga oposta da resina. Apesar das forças de ligação entre enzima e suporte serem mais fortes que na adsorção, as condições de imobilização são brandas, as alterações conformacionais são pequenas, resultando em uma atividade enzimática elevada. Como desvantagem do método há a possibilidade de desprendimento da enzima quando há variação do pH e da força iônica do meio. Apesar disso, as vantagens são muitas, tais como recuperação do suporte, baixo custo e disponibilidade no mercado. A natureza das resinas trocadoras de íons é complexa, sendo que a maioria são polímeros. Os íons ativos são cátions em um trocador catiônico e ânions em um trocador aniônico (JEFFERY et al., 1992; COLLINS et al., 1993; OOSTEROM et al., 1998 TOMOTANI & VITOLO, 2006).

Logo, baseando-se nas considerações expostas, o objetivo geral desse trabalho foi estudar a imobilização de invertase em resinas de troca iônica, como as Marathon A e C e Duolite A-568 e S-761 e determinar a cinética de hidrólise de sacarose pela enzima livre e imobilizada.

Como objetivos específicos podem ser citados:

- Avaliar as concentrações de invertase e as condições de pH e temperatura no processo de imobilização.

- Verificar a influência de pH e temperatura na atividade da enzima livre e imobilizada.
- Analisar a estabilidade da enzima livre e imobilizada em relação ao pH e à temperatura.
- Estudar a cinética de reação de inversão da sacarose pela enzima livre e imobilizada em termos de substrato e de produtos.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Enzimas

2.1.1 – Enzimas como Catalisadores

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA, todas as enzimas são proteínas (GALVÃO, 2004). Pode-se definir a grande maioria das enzimas como sendo proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. São catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (ERGINER et al., 2000; GÜRSEL et al., 2003; ISIK et al., 2003).

A utilização das enzimas é antiga, antes de sua função e dos próprios microrganismos 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).

Com a compreensão da natureza das enzimas e de sua capacidade catalítica, várias foram descobertas, purificadas e cristalizadas nas décadas de 40 e 50 (SEGEL, 1979). Atualmente, as enzimas são os catalisadores mais eficientes e mais procurados em áreas extremamente variadas: biocatálise industrial (síntese de aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, antibióticos), tecnologia de alimentos, aplicações farmacêuticas e clínicas, bioconversão, potencialidades energéticas e outras (CABRAL, 1982).

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 & SUGNAN, 2005).

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

Estabilidade: a capacidade de uma enzima depende de sua estrutura nativa, a qual é mantida por meio de forças de interação (pontes de hidrogênio e ligações de

sulfeto, forças de Van der Waals, interações apolares e iônicas). Alterações no ambiente reacional podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e ocasionando perda parcial ou total da sua funcionabilidade biológica. Assim a estabilidade pode ser afetada por variação de temperatura, pH e presença de solventes polares.

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

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

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos e biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso (DALLA-VECCHIA et al., 2004). O perfeito funcionamento das enzimas requer condições específicas, pois elas são ativas em estreitas faixas de pH e temperaturas (ERGINER et al., 2000). As exceções são as extremozimas que são produzidas por bactérias extremófilas e assim são ativas em condições anormais (GALVÃO, 2004).

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 verifica-se alguns exemplos de aplicações de enzimas na indústria.

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

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

2.1.2 – Invertase

Invertase ou β -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise do terminal não redutor do resíduo β -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos. Além disso, a invertase catalisa reações de transferência com outros aceptores, além da água. Isso resulta na formação de oligossacarídeos constituídos por unidades de glicose e frutose (VICENTE, 2000).

A principal fonte de invertase industrial são as leveduras, 80% das enzimas são externas e os 20% restantes são intracelulares. A forma externa é uma glicoproteína com cerca de 50% de carboidratos, ao passo que a interna é destituída dos mesmos. Apresentam atividade catalítica similares, mas sua composição de aminoácidos é diferente, a invertase externa contém cisteína enquanto a interna não (CABRAL, 1982; ISIK et al., 2003; VICENTE, 2000). Algumas propriedades da invertase externa e interna estão apresentadas na Tabela 2.2 (GÁSCON et al., 1981).

Tabela 2.2 – Algumas propriedades da invertase (GÁSCON et al., 1981).

Propriedades	Invertase externa	Invertase interna
Massa molecular (kg)	270000	135000
% carboidrato	50	3
Atividade específica U/mg de proteína	2700	2900
K _m [mM] (sacarose)	26	25
pH - estabilidade	3,0 – 7,5	6,0 – 9,0
pH ótimo - atividade	3,5 – 5,5	3,5 – 5,5

U = micromol sacarose hidrolisado por minuto.

A temperatura ótima depende do grau de purificação da enzima e da concentração do substrato, tendo sido encontrado valores entre 23 e 55°C (DRAETTA, 1971). A estabilidade térmica da invertase pode ser devido à estrutura terciária da proteína, a qual contém interações carboidrato-proteína, com ligações cruzadas na cadeia polipeptídica (WISEMAN & WOODWARD, 1975).

O mecanismo de ação da invertase não é totalmente conhecido, mas estudos com a enzima têm sugerido o envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica (WISEMAN & WOODWARD, 1975). Um mecanismo para a formação do complexo ativo invertase-sacarose foi proposto por LAIDLER (1958) e citado por BOWSKI et al. (1971), o qual está representado na Figura 2.1. Pode-se observar a influência do pH no mecanismo de ligação do sítio ativo da invertase com grupos ácidos e básicos.

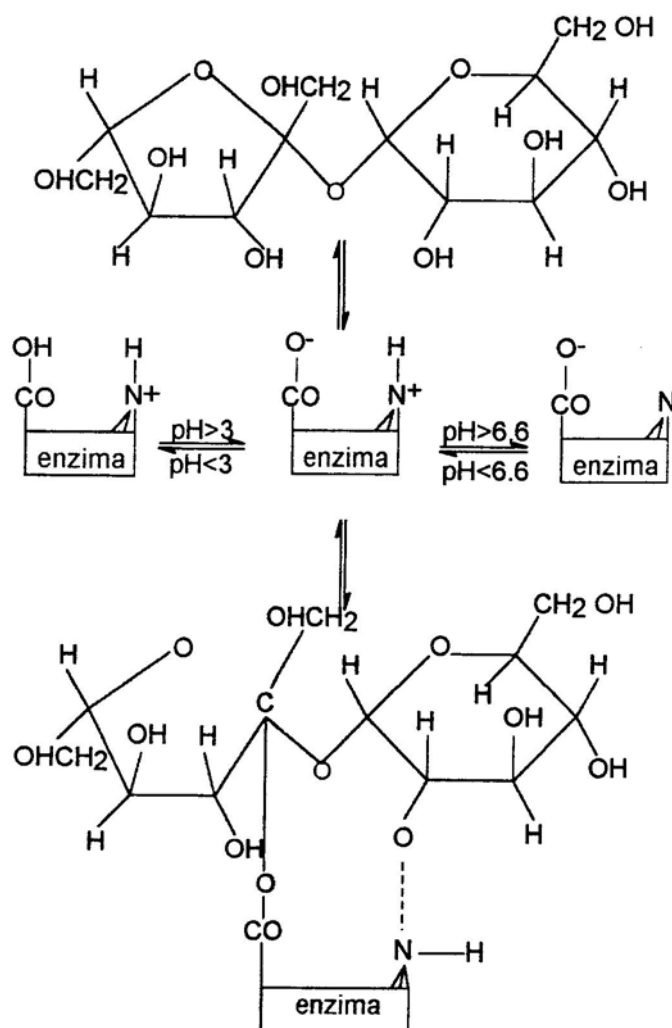


Figura 2.1 – Mecanismo sugerido para a formação do complexo ativo invertase-sacarose (BOWSKI et al., 1971).

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

2.2 – Açúcar Invertido

O açúcar invertido é um xarope composto de glicose, frutose e sacarose residual resultante de uma reação de hidrólise da sacarose (AKGOL et al., 2001; RODRIGUES et al., 2000). A hidrólise é conhecida como reação de inversão, pois o xarope dos monossacarídeos (glicose e frutose) desvia um feixe de luz polarizada para a

esquerda, enquanto as soluções de sacarose desviam esse feixe para a direita (CABRAL, 1989).

Se comparado o açúcar invertido com o açúcar cristal, o invertido apresenta diversos benefícios, tais como:

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

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

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

2.2.1 – Processos de Fabricação de Açúcar Invertido

O açúcar invertido pode ser obtido por catálise enzimática, catálise ácida ou por troca iônica com as resinas. O processo enzimático pode ocorrer pela adição direta da enzima ou pela imobilização da mesma em suportes inertes (AKGOL et al., 2001; RODRIGUES, 2000).

2.2.2.1 – Inversão Ácida

A inversão química é o processo de hidrólise mais antigo utilizado industrialmente, é relativamente fácil por não necessitar de pessoal qualificado para realização do processo, porém resulta em um produto de qualidade inferior, além do inconveniente de utilizar altas temperaturas e agentes corrosivos que comprometem a segurança dos operários e a manutenção dos equipamentos (AKGOL et al., 2001). Existe ainda o problema da necessidade da neutralização final do produto e da geração de subprodutos, como furfurais e outros aromáticos indesejáveis, além de oligossacarídeos por reação de polimerização (CASTELLANI, 1973 *apud* VICENTE, 2000). Geralmente o problema de neutralização é resolvido adicionando cal ao xarope, o que provoca incrustações nos equipamentos, além de ocasionar perda de açúcares no armazenamento devido à presença de sais insolúveis de cálcio.

Por catálise ácida o processo homogêneo é o mais empregado industrialmente, onde a escolha do ácido depende de sua compatibilidade com o produto final, porém os xaropes obtidos são altamente coloridos devido às condições drásticas de reação, pH e temperatura (RODRIGUES, 2000). Este processo consiste na adição de soluções ácidas em caldas refinadas a elevadas temperaturas e em reator descontínuo. Xaropes de sacarose com concentração entre 60 a 70 °Brix são aquecidos até 70°C e acidificados até o pH 2,0. O tempo de reação depende muito do tipo de ácido utilizado e do grau de inversão que se deseja (CASTELLANI, 1973 *apud* VICENTE, 2000; MARTINS, 2000).

2.2.2.2 – Inversão com Resinas Catiônicas

Segundo VICENTE (2000), o método da inversão com resinas trocadoras de íons foi desenvolvido e patenteado por HUGHES em 1952 para a produção contínua de

xaropes de açúcar invertido. Esse método consiste em clarificar e reduzir a cor com carvão ativo, por meio de uma resina de troca iônica com grupos sulfônicos em sua superfície na passagem da solução concentrada de sacarose em pH ácido. A solução de sacarose ácida é mantida a 50°C até a hidrólise ter sido processada na extensão desejada (KIRK OTHMER, 1994). Neste processo heterogêneo, ocorre uma perda de açúcar devido à degradação do mesmo, levando à formação de HMF (Hidroximetil furfural) e produção de um xarope colorido pelas reações de Maillard e de caramelização (AKGOL et al., 2001).

RODRIGUES et al. (2000) desenvolveram um processo utilizando resinas de troca iônica para a inversão da sacarose, utilizando a resina catiônica do tipo gel, Amberlite IR-120 fornecida pela Rohm and Haas. O processo heterogêneo consistia em introduzir o xarope inicial em uma coluna de vidro encamisada da resina IR-120, onde ocorria a inversão.

2.2.2.3 – Inversão por Via Enzimática

Os métodos enzimáticos empregam as enzimas livres ou imobilizadas. Existem vários benefícios ao utilizar as enzimas imobilizadas em relação às solúveis, tais como a reutilização do biocatalizador heterogêneo, redução de custos e melhoria no controle do processo (CAO, 2005). A hidrólise heterogênea catalisada pela enzima invertase produz um xarope de alta qualidade com baixas concentrações de HMF e sem desenvolvimento de cor (CHEN et al., 2000; ALMEIDA et al., 2005).

Um processo típico de produção industrial consiste na adição de 100g de invertase em uma tonelada de xarope com teor de sólidos de 60%, que deverá ser mantida sob agitação constante e temperatura controlada em torno de 60°C, durante 12 horas, para a obtenção de um grau de inversão superior a 90% (MARTINS, 2000).

A temperatura do processo tem muita influência no controle da inversão. Em Cuba, estabeleceu-se a “regra de ouro”, que consiste em se manter a temperatura ótima de inversão igual ao grau Brix do xarope (CASTELLANI, 1973 *apud* VICENTE, 2000).

As principais aplicações industriais estão relacionadas com aquelas que utilizam o açúcar no estado dissolvido, tais como bebidas carbonatadas, sucos concentrados, xaropes medicinais, doces e molhos, onde o açúcar invertido tem sido preferencialmente utilizado pela sua estabilidade em altas concentrações, em função da

sua alta solubilidade, permitindo maior tempo de vida de prateleira dos produtos se comparado com aqueles que usaram soluções de sacarose (ERGINER et al., 2000).

2.3 – Enzimas Imobilizadas

Enzimas imobilizadas são enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e que podem ser usadas repetida e continuamente.

O uso de enzimas em processos industriais é relativamente baixo, o que se deve ao seu alto custo, à dificuldade de recuperação da mesma no final do processo e ainda à sua instabilidade. Isso restringe o uso de enzimas solúveis em processos industriais, pois com a dificuldade de recuperação e de isolamento, pode causar prejuízos econômicos uma vez que resquícios da enzima no produto final, no qual é necessária a desativação da mesma, torna o processo antieconômico (KENNEDY & CABRAL, 1987, ÖZDURAL et al., 2003). Além disso, o desenvolvimento e conhecimento de proteínas e avançadas técnicas de imobilização criam grande variedade de usos de enzimas em reações particulares, principalmente, devido à possibilidade de recuperação das mesmas (DAVID, 2004).

Com o objetivo de aproveitar as vantagens da catálise biológica em relação à química, foram desenvolvidos métodos a fim de fixar as enzimas em um suporte sólido. Assim a oportunidade de utilizar as enzimas nos processos industriais é aplicar as tecnologias de imobilização da mesma em um suporte insolúvel (BERGAMASCO et al., 2000).

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

- ✓ Processos com enzimas imobilizadas podem ser conduzidos preferencialmente de modo contínuo, usando leitos fixos ou fluidizados, por serem facilmente controlados;
- ✓ Reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- ✓ É possível usar alta dosagem de enzima por volume de reator, comparada ao uso de enzimas livres;
- ✓ Os produtos são facilmente separados do meio reacional;

- ✓ Em alguns casos a estabilidade e a atividade são aumentadas pela imobilização;

- ✓ Esta técnica permite a redução do capital operacional já que a vida útil de uma enzima imobilizada é suficientemente longa.

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

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

O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas com a finalidade de melhorar suas propriedades catalíticas só ocorreram no início da década de sessenta, quando extensivos estudos foram realizados em novas técnicas de imobilização, com vários suportes, obtendo preparações com altos teores de enzimas imobilizadas e características de estabilidade melhoradas (CHIBATA, 1978; AHMAD et al., 2001; DAVID, 2004).

Em 1969 CHIBATA et al. (1972) instalaram o primeiro processo industrial bem sucedido com enzimas imobilizadas, operando de modo contínuo, usando aminoacilase fúngica imobilizada em DEAE-Sephadex, para resolução de misturas racêmicas de aminoácidos.

Embora na década de 70 um grande número de trabalhos sobre enzimas imobilizadas tenha sido publicado, eles em sua maioria, restringiam o processo a pequenas escalas, sendo viável apenas para produtos de alto valor agregado. Contrariando essa expectativa surgiu em 1975 nos Estados Unidos um processo de produção em larga escala de um produto de baixo valor agregado, o xarope de glicose isomerizado (VICENTE, 2000).

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). Um grande sucesso industrial foi a isomerização da glicose em frutose catalisada por glicose isomerase adsorvida em DEAE-celulose (GODFREY, 2001, *apud* TOMOTANI & VITOLO, 2006).

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, 2004; SANJAY & SUGUNAN, 2005; OSMAN et al., 2005). 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 (produção de ácido 6-aminopenicilânico usando penicilina amidase imobilizada) (DAVID, 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 extracorporal (HEARN & NEUFELD, 2000).

2.3.1 – Métodos de Imobilização de Enzimas

A aplicação do método de imobilização das enzimas depende de fatores essenciais do processo, como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. O principal fator é selecionar um suporte adequado, o que é definido como uma parte não-catalítica da imobilização de enzimas, na qual a parte catalítica é construída. Assim o método escolhido deve atender as duas necessidades a catalítica, expresso em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a processos de controle e separação (DALLA-VECCHIA et al., 2004; CAO, 2005).

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

Nos últimos anos houve um crescimento do uso de técnicas de imobilização, acredita-se que cada método possui sua vantagem, cabe utilizar o método adequado, e se necessário combiná-los, a fim de obter melhores resultados (CAO, 2005).

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 2.2.

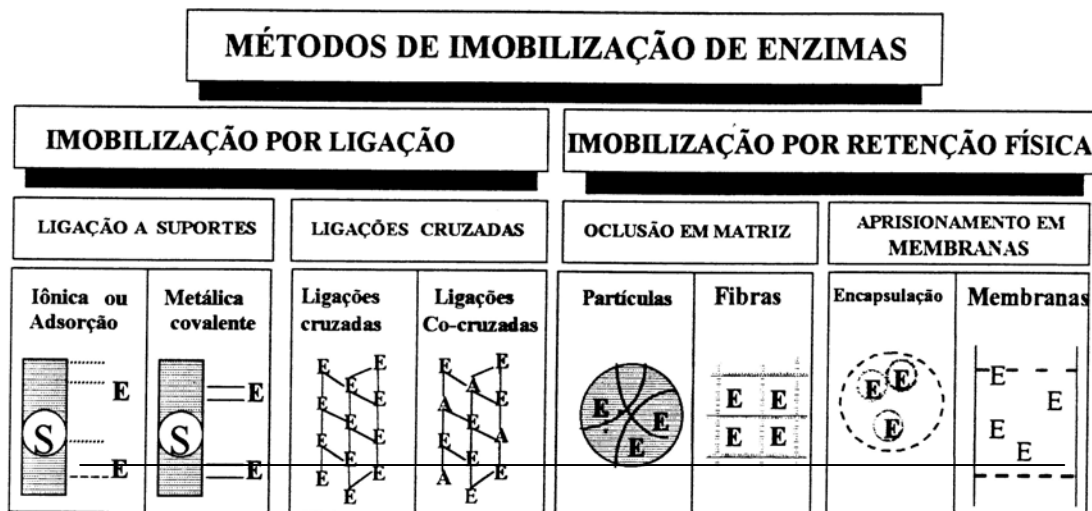


Figura 2.2 - Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzimas; S: suportes; A: albumina. (Adaptado de BLANCH e KLARK, 1996).

A imobilização por ligação envolve alteração na estrutura da enzima, pela ligação desta com o suporte insolúvel (ligação ao suporte) ou entre as moléculas da própria enzima (ligações cruzadas). Já a imobilização por retenção física não envolve nenhuma alteração da estrutura da enzima, com apenas alteração do seu microambiente (BLANCH & KLARK, 1996; VICENTE, 2000; BULCHHOLZ et al., 2005; CAO, 2005)

2.3.1.1 – Ligação a Suportes Insolúveis

São ligações entre as enzimas e um suporte sólido e é o principal método de imobilização. Pode ser dividido em cinco categorias de acordo com o tipo de interação enzima-suporte (adsorção física, ligação iônica, ligação metálica, ligação covalente e ligações cruzadas e co-cruzadas).

a) Adsorção física

Segundo WEETALL (1975) este método é muito pouco entendido, mas é o mais antigo. Consiste na exposição da solução enzimática ao suporte sob condições apropriadas, tais como, pH, natureza do solvente, força iônica da solução, quantidade de enzima, tempo de contato e temperatura. É um processo de fácil preparação e possibilita o reuso do suporte (OSMAN et al., 2005). A atividade da enzima imobilizada aumenta com a concentração da enzima, aproximando a um valor de saturação a altas concentrações de enzimas (KENNEDY & CABRAL, 1987).

A adsorção física de enzimas ao suporte é realizada por forças de ligação relativamente fracas. As principais ligações entre as moléculas de proteínas e o adsorvente são: pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (RIBEIRO, 1989). Como não ocorre reação química, existe pouca mudança conformacional da enzima e não há destruição do seu centro ativo, assim obtém-se um derivado semelhante à enzima solúvel. Se o suporte é adequado, o processo é simples e efetivo, mas a principal desvantagem é que a enzima adsorvida pode desprender do suporte durante a utilização, devido à fraca ligação entre enzima e suporte (KENNEDY & CABRAL, 1987 e MESSING, 1978).

Basicamente o que ocorre na adsorção é uma interação eletrostática entre a proteína carregada e a carga oposta do íon da resina (TOMOTANI & VITOLO, 2006). É comum utilizar o método de adsorção juntamente com o covalente para melhorar a interação da resina suporte evitando o desprendimento da enzima durante o processo.

SANJAY & SUGUNAN (2005) imobilizou invertase em sílica comercial (montmorillonite K-10) usando as duas técnicas: adsorção e ligação covalente. GÓMEZ et al. (2005) utilizaram um novo método de imobilização para invertase quimicamente modificada com polissacarídeos iônicos, baseado na formação de complexos de polieletrólitos, com suportes recobertos com polímeros de carga oposta. O biocatalisador de invertase imobilizada em quitina recoberto com alginato de sódio apresentou maior termo estabilidade do que a enzima nativa. Os valores ótimos de pH e temperatura para a atividade catalítica de invertase foram aumentados em relação à enzima livre.

No trabalho de D'SOUZA & GODBOLE (2002) a invertase foi imobilizada em casca de arroz por adsorção seguida de ligação cruzada utilizando 2% de glutaraldeído. Como a casca de arroz possui sílica obteve ótimas características de estabilidade.

OOSTEROM et al. (1998) também utilizou a adsorção seguida da ligação cruzada para imobilizar a enzima β -galactosidase em uma resina de troca iônica tipo Duolite S-761 para utilizar na síntese de galactosídios.

b) Ligação iônica

Este método de imobilização é baseado na ligação iônica entre a enzima e o suporte. Pode ocorrer a imobilização por adsorção juntamente com a iônica, a qual se diferencia apenas pela intensidade da interação enzima-suporte, mais forte no caso da iônica. Apesar de ser mais forte, os procedimentos de imobilização são os mesmos, cujas condições são brandas, em comparação com os métodos que envolvem as ligações covalentes e as mudanças de conformação produzidas são pequenas, implicando em uma atividade elevada em comparação à solúvel (ALMEIDA et al., 2005).

Como desvantagem deste método também há a possibilidade de desprendimento 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 são em menor escala suportes inorgânicos, principalmente sílica e resinas de troca iônica, preparadas principalmente a partir de matrizes orgânicas, com grupos trocadores de íons. 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 & CABRAL, 1987).

Um exemplo foi a imobilização de β -galactosidase em uma resina de troca iônica fracamente básica, Duolite A-568, em um reator de leito empacotado para a obtenção de glicose e galactose (OZDURAL et al., 2003). Na Tabela 2.3 são apresentadas alguns exemplos de resinas trocadoras de íons adequadas para ligação iônica.

Tabela 2.3 – Alguns exemplos de capacidade de trocadores iônicos (COLLINS et al., 1993).

Trocador	Tipo	Capacidade de alguns trocadores iônicos	
		Capacidade total meq/g ^a	meq/100mL ^b
Dowex 50 X-8	Ácido forte	5,1	170
Amberlite IR-120	Ácido forte	---	190
SP-Sephadex C-25	Ácido forte	2,3 ± 0,3	30
Amberlite IRC-84	Ácido fraco	---	400
CM-Sephadex C-25	Ácido fraco	4,5 ± 0,5	56
CM-Sephadex CL-6B	Ácido fraco	---	12
CM-Cellex	Ácido fraco	0,7 ± 0,1	---
Dowex 1	Base forte	3,2	140
Amberlite IRA 400	Base forte	---	140
QAE-Sephadex A-25	Base forte	3,0 ± 0,4	50
Dowex 3X-4	Base forte	2,8	190
Amberlite IRA 45	Base forte	---	190
DEAE-Sephadex A-25	Base forte	3,5 ± 0,5	50
DEAE-Sephadex CL-6B	Base fraca	---	15
DEAE-Sephacel	Base fraca	1,4 ± 0,1	17,1
Cellex D	Base fraca	0,7 ± 0,1	---

a: Valor obtido por titulação e referente à quantidade total de miliequivalentes em relação ao peso do trocador usado na determinação.

b: Valor obtido tomado por base 100 mL da suspensão do trocador.

c) Ligação metálica

Baseia-se em imobilizar enzimas empregando compostos de metais de transição ou óxidos metálicos precipitados a partir de seus sais, para ativar a superfície de suportes orgânicos ou inorgânicos (VICENTE, 2000). Esse método é baseado na propriedade de quelação dos metais de transição, que podem ser usados para ligar enzimas. Embora o tipo de ligação seja parcialmente covalente, observa-se o desprendimento da enzima do suporte em operações de longa duração (CABRAL, 1982; KENNEDY & CABRAL, 1987).

Os sais metálicos mais utilizados nos processos são: TiCl_3 , TiCl_4 , $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 , FeSO_4 , ZnCl_4 , SnCl_4 , SnCl_2 e VCl_3 . A técnica consiste em umedecer o suporte com uma solução metálica, secá-lo, lavá-lo para remover o excesso de sal e colocá-lo em contato com a solução de enzimas, normalmente no pH ótimo da enzima (VICENTE, 2000). Contudo as estabilidades conseguidas com tais catalisadores têm sido baixas devido à perda de enzimas para a solução (FLYNN, 1978).

Suportes orgânicos como papel de filtro, serragem, quitina, celulose e inorgânicos como celite, lã de vidro, alumina e sílica têm sido utilizados neste processo de imobilização (KENNEDY & CABRAL, 1987).

Devido à não reprodutibilidade dos resultados obtidos quando se usa o suporte inorgânico nesse método de imobilização, além das baixas estabilidades operacionais obtidas, várias modificações do mesmo têm sido propostas, como o uso de agentes de ligação cruzada, tais como glutaraldeído e ácido tânico (CABRAL, 1982; RIBEIRO, 1989).

d) Ligação covalente

É um método que consiste na formação de ligação covalente entre moléculas da enzima e o material do suporte. É o método mais difundido e investigado de imobilização, pois proporciona uma grande estabilidade funcional ao biocatalisador (GÓMEZ et al., 2004). As condições de reação requeridas para a formação dessa ligação geralmente não são brandas. Em alguns casos, a ligação altera a estrutura conformacional da enzima e o centro ativo da mesma, resultando em diminuição da atividade e mudança de especificidade de substrato. Como a ligação covalente é forte, a enzima imobilizada é estável e não ocorre perda da enzima para a solução, mesmo na presença de substrato ou soluções de alta força iônica (CHIBATA, 1978; KENNEDY & CABRAL, 1987).

A ligação covalente pode induzir alta resistência à 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 (BAYRAMOGLU et al., 2003).

A grande variedade de processos covalentes de imobilização e de matrizes com grupos químicos capazes de participarem diretamente ou serem ativados para formar as ligações, faz desse método uma aplicação quase geral. A maior dificuldade é o

conhecimento da estrutura da enzima, o que dificulta o estabelecimento de uma regra geral para a imobilização (MESSING, 1978; VICENTE, 2000).

RIBEIRO (1989), estudou o processo de imobilização de invertase de levedura por processo covalente em sílica de porosidade controlada, ativada por silanização e glutaraldeído.

CHEN et al. (2000), imobilizaram invertase covalentemente em partículas e filmes do copolímero de polianilina e ácido acrílico. A enzima imobilizada reteve de 20 a 40% de atividade comparada à enzima solúvel e melhorou a atividade da enzima a baixas temperaturas. Além disso, aumentou sua estabilidade no armazenamento em solução tampão.

BERGAMASCO et al. (2000) imobilizaram invertase em partículas de sílica de poros controlados pelo método de ligação covalente utilizando um método com silana e glutaraldeído e obtiveram uma atividade relativa baixa em torno de 24%.

Na imobilização da invertase por ligação covalente usando ligação cruzada com glutaraldeído em um suporte de lecitina de ervilha (lectin *Cajanus cajan*) obteve-se um complexo de alta resistência à inativação quando exposta em altas temperaturas, pH, desnaturantes e enzimas proteolíticas (AHMAD et al., 2001).

AMAYA-DELGADO et al. (2005) imobilizaram invertase covalentemente em nylon-6, a qual foi estável em uma ampla faixa de pH e temperatura similar a da enzima livre e COUTINHO FILHO et al. (2005) imobilizaram invertase em sílica de porosidade controlada, a qual mostrou ser um excelente suporte para imobilização desta enzima.

e) Ligações cruzadas e co-cruzadas

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

A maior vantagem deste método é a obtenção da enzima quase pura, pois requer apenas um agente bi ou multifuncional para uma reação muito simples de

imobilização. A desvantagem apresentada é a necessidade de grande quantidade de enzima, além da perda de atividade provocada pela participação do sítio ativo na ligação e as propriedades mecânicas indesejáveis da enzima imobilizada obtida, na forma de um produto gelatinoso (KENNEDY & CABRAL, 1987).

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

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

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

2.3.1.2 - Imobilização por Retenção Física

a) Imobilização de enzimas por oclusão

O método é baseado em retenção das enzimas nos espaços intersticiais, podendo ser feito em géis, fibras e por microencapsulação em membranas. O importante é reter as enzimas e permitir que as moléculas de substratos e produtos de pesos moleculares adequados possam se difundir através e dentro da rede polimérica (CHIBATA, 1978; KENNEDY & CABRAL, 1987; ISIK et al., 2003).

Como não há nenhuma ligação entre a enzima e a estrutura do suporte, este método pode ser aplicado para qualquer tipo de enzima ou mesmo a células e organelas. É um processo muito simples e as enzimas não sofrem modificações químicas (VICENTE, 2000).

A oclusão em matrizes pode ocorrer de duas formas em gel ou em fibras:

- Oclusão em géis: ocorrem em géis poliméricos insolúveis em água. Os géis são obtidos, normalmente, por polimerização em sistemas bifásicos, de forma a permitir o controle mecânico do tamanho da partícula. O grau de

ligação do polímero deve ser controlado para permitir uma distribuição do tamanho de poros adequada (KENNEDY & CABRAL, 1987).

- Oclusão em fibras: é um método similar ao de produção de fibras têxteis, pois aprisiona as enzimas 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 enzimas retidas. A principal fibra utilizada para esse método é o acetato de celulose (KENNEDY & CABRAL, 1987; VICENTE, 2000).

O método de aprisionamento em membranas envolve o confinamento da enzima em membranas semipermeáveis ou em micro cápsulas.

- Encapsulação: inclui a enzima em cápsulas poliméricas semipermeáveis que possibilita a passagem do substrato pela membrana externa. A grande vantagem do método é a imobilização de várias enzimas ao mesmo tempo e a grande área superficial de contato. E a desvantagem é que o processo não pode ser usado no caso de substratos de alto peso molecular (KENNEDY & CABRAL, 1987).
- Membranas (ultrafiltração e fibras ocas): o método consiste em colocar a solução da 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 & CABRAL, 1987).

TANRISEVEN & DOGAN (2001) imobilizaram invertase em cápsulas de alginato e esta resultou em 87% de atividade relativa e garantiu a atividade por 36 dias sem decréscimo. Com a imobilização foi possível garantir maior estabilidade a altos valores de pH (3-6) e temperatura (60°C).

Invertase foi imobilizada por uma reação de condensação de grupos epóxidos na estrutura da membrana porosa de pHEMA-GMA (2-hidroxietil metacrilato-glicidil metacrilato) com grupos amino da enzima, melhorando estabilidade térmica e em relação ao pH quando comparada a enzima livre no trabalho de DANISMAN et al. (2004).

BAGAL & KARVE (2006) utilizaram uma membrana porosa de biopolímero para imobilizar a invertase por meio de um composto de agarose-agar e a eficiência alcançada nesta imobilização foi de 91%.

2.3.2 – Comparação entre os Métodos de Imobilização

Nenhum método de imobilização pode ser considerado ideal, pois cada enzima possui suas particularidades de estrutura e de composição, além de cada processo industrial ter limitações características. Para encontrar o melhor método de imobilização para uma situação específica é preciso que resulte numa boa atividade e em alta estabilidade operacional (KENNEDY & CABRAL, 1987; VICENTE, 2000; RIBEIRO, 1989). A Tabela 2.4 apresenta algumas vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de imobilização:

Tabela 2.4 – Comparação entre os métodos de imobilização (CHIBATA, 1978; KENNEDY & CABRAL, 1987).

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

2.3.3 – Suportes para Imobilização

Vários suportes, naturais ou sintéticos, tem sido utilizados para a imobilização de enzimas. Embora se saiba que não existe um suporte universal, existem características primordiais a serem observados para a escolha de um suporte, baseados

em diferentes propriedades que afetam o processo de produção (MESSING, 1978; GALVÃO, 2004; CAO, 2005), como:

- Área de superfície e porosidade: é desejável ter materiais com alta área superficial ($>100\text{m}^2/\text{g}$) para cargas de enzima altas e alta porosidade para promover o acesso da enzima ao substrato. Os poros $>30\text{nm}$ são ideais para a difusão da enzima durante o processo de imobilização;
- Grupos funcionais na superfície: a quantidade de enzima que se une a matriz de um suporte depende da densidade de carga de grupos funcionais na superfície e sua distribuição. A escolha dos grupos funcionais, também afeta o rendimento e a estabilidade do material;
- Estabilidade mecânica e química: para prevenir a perda de enzimas, a integridade do suporte deve ser mantida e deve ser resistente à degradações químicas que possam ocorrer durante o processo;
- Tamanho e forma: é ideal ter partículas de tamanho uniforme, preferencialmente esferas para facilitar os propósitos de modelagem;
- Resistência microbiana: uma das principais preocupações de qualquer sistema de enzimas imobilizadas é a presença de microrganismos. A durabilidade do suporte é afetada pela resistência à degradação microbiana;
- Natureza hidrofóbica e hidrofílica: a compatibilidade do suporte com a fase líquida é importante para assegurar a troca do substrato e do produto na matriz. Também pode determinar o tempo de vida do complexo enzima-suporte a partir da adsorção ou de ligações não específicas;

Os suportes podem ser classificados de acordo com sua composição e morfologia. A Tabela 2.5 ilustra os diferentes tipos de suportes classificados.

Tabela 2.5-Classificação dos suportes de acordo com a composição (GALVÃO, 2004)

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

Os suportes podem ser classificados como porosos ou não-porosos. Os porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização e protege a enzima contra turbulências externas, já os não-porosos têm a desvantagem de não possuir grande área para a imobilização, mas elimina o problema de transferência de massa interna, devido à diminuição do tamanho das partículas e pelo aumento de velocidade de escoamento do fluido (CARDIAS, 1996 *apud* GALVÃO, 2004).

Na imobilização utilizando suportes porosos, estes devem ter poros de tamanho suficiente para permitir a acomodação da enzima e o acesso do substrato. Suportes porosos insolúveis para imobilização resultam em grandes áreas superficiais disponíveis, mas implica em dificuldades difusionais para entrada de reagentes e saídas de produtos, principalmente quando os substratos são macro-moléculas (GALVÃO, 2004; SZYMANSKA et al., 2007).

Os suportes porosos são mais adequados para o uso em reatores industriais, por permitirem acomodação de alta carga de enzimas. Eles podem apresentar uma distribuição controlada de poros uniformes ou não. Com a distribuição de poros aleatórios somente uma fração destes estará disponível para acomodar as enzimas. Suportes com distribuição controlada de poros são totalmente disponíveis para a imobilização, com um amplo intervalo de diâmetros de poros (COUTINHO FILHO et al., 2005; KENNEDY & CABRAL, 1987; RIBEIRO, 1989).

A maior parte dos suportes não permite o acoplamento direto da enzima, necessitando de uma etapa de ativação do mesmo. Utilizam para isso reagentes

ativadores como os brometos de cianogênio e reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos (GALVÃO, 2004).

Entre os suportes orgânicos e inorgânicos, os últimos apresentam melhores características para serem utilizados nos processos industriais, principalmente pela sua estabilidade à degradação física, química, térmica e microbiana, além da resistência mecânica e estabilidade industrial, que evita a compactação em processos contínuos e a possibilidade de regeneração do suporte por processo pirolítico (CABRAL, 1982; MESSING, 1978; RIBEIRO, 1989; COUTINHO FILHO et al., 2005). Os suportes orgânicos apresentam uma diversidade de radicais disponíveis para a ligação com as enzimas, enquanto os inorgânicos possuem um caráter inerte (KENNEDY & CABRAL, 1987).

Os polímeros são reportados como os principais suportes a serem usados para imobilizar invertase como nos trabalhos de TANRISEVEN & DOGAN (2001), GÓMEZ et al. (2005), GÜRSEL et al. (2003), KIRALP et al. (2003) e SANJAY & SUGUNAN (2005). Os maiores problemas ao utilizar os suportes de polímeros são o baixo pH e a baixa estabilidade térmica (SANJAY & SUGUNAN, 2005).

Existem inúmeros suportes para a adsorção de enzimas, como bentonita, cerâmicas porosas, alumina e resinas de troca iônica. São suportes baratos, abundantes, de alta resistência mecânica, quimicamente estáveis, não-tóxicos, não poluentes e de fácil regeneração (TOMOTANI & VITOLO, 2006).

BAYRAMOGLU et al. (2003) concluíram que o suporte poly (HEMA-GMA) (2-hidroxietil metacrilato glicidil metacrilato) foi excelente para imobilizar invertase, pois foi de fácil imobilização, sem necessitar de uma pré-ativação.

2.3.3.1 – Imobilização em Resinas

Resinas de troca iônica são muito utilizadas para imobilização de enzimas. A resina trocadora de íons deve conter íons próprios para efetuar a troca com rapidez suficiente, sendo necessário uma estrutura molecular aberta e permeável, de modo que as moléculas possam mover-se livremente. A natureza do trocador de íons é complexa e, em sua maioria são polímeros. Os íons ativos são cátions em um trocador catiônico e ânions em um trocador aniônico (COLLINS et al., 1993).

As propriedades físicas das resinas trocadoras de íons são determinadas pelo grau de reticulação, este determina a preferência de uma resina por um íon e o grau de

intumescimento da resina quando esta entra em contato com a água. As resinas altamente reticuladas são, geralmente, quebradiças, mais duras e mais impermeáveis que as de baixa reticulação (JEFFRERY et al., 1992; COLLINS et al., 1993).

As resinas catiônicas trocam seu cátion disponível com o cátion do meio até atingir o equilíbrio. As resinas aniônicas são semelhantes, trocam ânions, seu caráter básico deve-se à presença de grupos amônio quaternário, amina substituída e amina, sendo aquelas que têm amônio quaternário uma resina fortemente básica (JEFFRERY et al., 1992).

A troca de íons em uma resina fortemente ácida ocorre independentemente do pH, já se for uma resina fracamente ácida a troca se dá somente em soluções alcalinas, na sua forma salina, sendo fracas na forma carboxílica. As resinas fortemente básicas são muito ionizadas, tanto na forma de hidróxido como na de seu sal, também tem sua ação independente do pH (JEFFRERY et al., 1992; COLLINS et al., 1993).

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

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

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

2.4 – Cinética Enzimática

Cinética enzimática é definida como o estudo da velocidade da reação enzimática e como ela é alterada devido às mudanças nas condições experimentais, principalmente em respeito à concentração da enzima, concentração de ligantes (substratos, inibidores e ativadores), pH, força iônica e temperatura.

De acordo com SEGEL (1979) a análise correta destas mudanças das condições experimentais possibilita caracterizar a reação enzimática:

- Variando-se a concentração de substrato e produto é possível deduzir-se um mecanismo cinético da reação;
- O estudo dos efeitos da variação do pH e da temperatura nas constantes cinéticas pode fornecer informação em relação aos grupamentos dos sítios ativos;
- A análise cinética pode levar a um modelo para a reação enzimática e, reciprocamente, os princípios da cinética enzimática podem ser usados para escrever a equação da velocidade para um modelo proposto, o qual poderá então ser testado experimentalmente.

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

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

Com relação ao efeito da concentração do substrato, para situações onde efeitos inibitórios de substrato e de produto são desprezíveis, o modelo cinético mais utilizado é o de Michaelis-Menten, Equação 2.1 (BAILEY & OLLIS, 1986).

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad (2.1)$$

O parâmetro V_m indica a velocidade limitante de uma reação catalisada por enzima nas condições de saturação, sendo denominado velocidade máxima da reação (ou taxa máxima de reação), e K_m a constante do modelo de Michaelis-Menten.

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

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

ROCHA et al. (2006) obtiveram a descrição adequada da sua cinética utilizando inulinase livre e imobilizada pelas equações de Michaelis e Menten nas condições de temperatura e abaixo do pH ótimo. O uso do método de regressão não-linear para determinar os parâmetros cinéticos contando com o melhor ajuste dos dados experimentais foi comparado com a linearização convencional de Lineweaver-Burk. Obteve o K_m da inulinase livre igual a 153 g/L a 55°C e pH=4,5, enquanto o K_m aparente da inulinase imobilizada foi 108 g/L a pH=5,5 e 50°C.

2.4.1 – Presença de Inibidores no Meio Reacional

A determinação da cinética enzimática de reações na presença de inibidores pelo modelo de Michaelis-Menten, feitas as devidas modificações é relativamente simples e possível. Porém, à medida que os sistemas vão se tornando mais complexos a determinação cinética requer um tratamento mais detalhado e rigoroso. A seguir são apresentados alguns modelos cinéticos que consideram inibição pelo substrato ou pelos produtos da reação, todos derivados do modelo clássico de Michaelis-Menten, muito utilizados em processos com reações envolvendo um substrato, ou dois substratos, com um deles em excesso, como é comum nas reações de hidrólise (RIBEIRO, 1989).

Quando uma alta concentração de substrato está presente, esta pode inibir a taxa de reação. A velocidade da reação atinge um máximo conforme vai aumentando a concentração de substrato e após este ponto, um acréscimo de substrato inibe a reação. É assumido um mecanismo onde a segunda molécula de substrato se liga ao complexo ES, formando um complexo ESS. A Equação 2.2 representa este efeito inibitório, conhecida como modelo de inibição pelo substrato:

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.2)$$

Sendo: K_i é a constante de inibição pelo substrato.

Além da inibição pelo substrato, na literatura é apresentado grande número de modelos de inibição enzimática, tanto pelos produtos da reação, como por componentes do meio reacional, sendo os modelos mais comuns: inibição competitiva, não-competitiva, acompetitiva, mista linear e parcialmente não-competitiva, os quais são representadas pelas Equações 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 e 2.7 , respectivamente:

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (2.3)$$

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (2.4)$$

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (2.5)$$

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)} \quad (2.6)$$

$$v = \frac{V_m \cdot S \cdot \left(1 + \frac{\beta I}{K_i} \right)}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (2.7)$$

A inibição competitiva caracteriza pela competição entre o inibidor e o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto este agente se mantém ligado à enzima não ocorre reação, pois impede a formação do complexo enzima-substrato. Esse agente pode ser um análogo não metabolizável ou um derivado de substrato verdadeiro ou um produto da reação. Neste tipo de inibição o valor de K_m aumenta e V_m permanece constante. A Figura 2.3 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição competitiva.



Figura 2.3 - Representação esquemática do mecanismo de inibição competitiva (GALVÃO, 2004).

Na inibição não-competitiva o inibidor se liga ao um sítio diferente ao que o substrato iria se ligar, formando o complexo EI e o ESI, impedindo que o substrato se aloje perfeitamente em seu sítio ativo, diminuindo a velocidade de formação de produto. Esta inibição irá produzir redução em V_m , mas a afinidade da enzima pelo substrato não sofrerá alteração, ou seja, não haverá alteração no K_m . A Figura 2.4 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição não-competitiva.

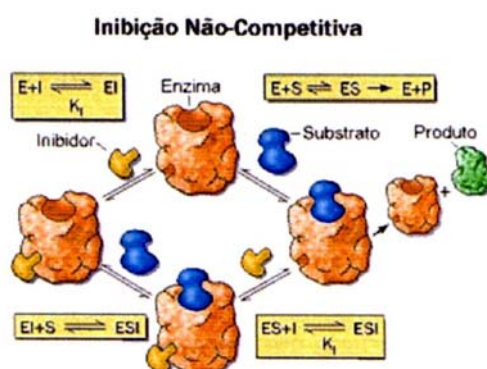


Figura 2.4 - Representação esquemática do mecanismo de inibição não competitiva (GALVÃO, 2004).

A inibição acompetitiva caracteriza-se pela formação de um complexo ESI inativo. Assim, qualquer que seja a concentração de substrato haverá sempre uma forma improdutiva (complexo ESI), reduzindo-se a velocidade máxima da reação. O valor do parâmetro K_m também diminui, pois parte do complexo produtivo ES é consumido no

processo de formação do complexo improdutivo. A Figura 2.5 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição acompetitiva.

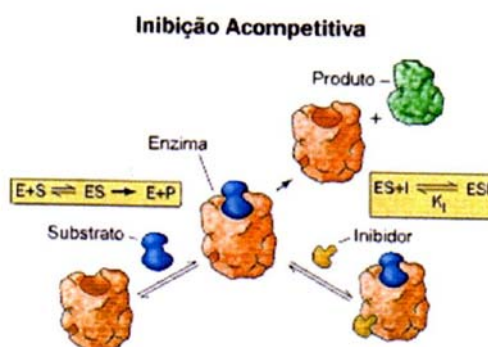


Figura 2.5 - Representação esquemática do mecanismo de inibição acompetitiva (GALVÃO, 2004).

Na inibição mista linear a presença do inibidor **I** na enzima modifica a constante de dissociação de K_m para $A \cdot K_m$. E na inibição parcialmente não competitiva o inibidor **I** modifica diretamente a velocidade máxima e o valor de K_i .

Um inibidor comum presente em várias reações é a concentração do substrato, por isso é importante estudar a concentração ideal de substrato que não oferece risco de inibição. A invertase é uma enzima muito sensível à inibição pela sacarose. BAGAL & KARVE (2006) estudaram a inibição pelo substrato na enzima livre e na imobilizada em membranas, em várias concentrações de sacarose, e obteve uma inibição de 12% na livre e de 20% na imobilizada.

2.4.2 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Cada sistema enzima-substrato apresenta valores característicos dos parâmetros cinéticos para cada modelo cinético considerado, para condições específicas de pH, temperatura e concentração de substrato. Para cinéticas com enzimas imobilizadas, os parâmetros cinéticos podem sofrer alteração em relação às livres. DANISMAN et al. (2004), sugeriram um aumento de K_m e uma diminuição de V_m na imobilização de enzimas em polímeros.

GÜRSEL et al. (2003) estudaram os parâmetros cinéticos K_m e V_m para invertase livre e imobilizada em temperatura e pH constantes, enquanto variava a concentração de substrato. O perfil da atividade enzimática seguiu a cinética de Michaelis e Menten, e os parâmetros K_m e V_m foram obtidos pelo método gráfico de Lineweaver-Burk, indicando diminuição para o valor de V_m e aumento de K_m para enzima imobilizada em relação à livre.

Os parâmetros cinéticos de invertase imobilizada e livre foram determinados por BAYRAMOGLU et al. (2003). O valor da constante de Michaelis K_m mostrou um significativo crescimento de 2,7 vezes quando a enzima estava imobilizada enquanto o V_m diminuiu.

CHANG & JUANG (2005) estudaram a cinética da reação enzimática de três enzimas: α -amilase, β -amilase e glucoamilase. Os valores encontrados de K_m e V_m das três enzimas foram maiores quando estas estavam imobilizadas, com exceção da glucoamilase que obteve o V_m maior quando o ensaio era com a enzima livre.

BORA et al. (2005) determinaram os valores de K_m e V_m igual a 45,12mM e 362,31 U/mg, respectivamente, para a invertase imobilizada. Para a enzima livre encontrou-se $K_m= 25,91$ mM e $V_m=416,67$ U/mg. Pode ser observado que o valor de K_m para a invertase imobilizada foi de 1,7 vezes à livre.

2.4.3 – Influência da Temperatura e do pH na Atividade e na Estabilidade

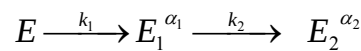
A temperatura exerce uma grande influência na atividade e estabilidade das enzimas. Um aumento desta imprime maior energia cinética às moléculas dos reagentes ocasionando maior número de colisões produtivas por unidade de tempo (SEGEL, 1979). As constantes de taxa de reação variam com a temperatura segundo o modelo de Arrhenius, Equação 2.8.

$$k = A * e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (2.8)$$

Sendo: k é a constante da taxa de reação, A é o fator de frequência para a reação, E_a é a energia de ativação e T é a temperatura absoluta.

O conhecimento da cinética de desativação das enzimas é de grande importância no projeto de reatores enzimáticos. A estabilidade das enzimas é um dos fatores primordiais na determinação da possibilidade de sua aplicação em muitos processos biotecnológicos. Segundo HENLEY & SADANA (1985) o modelo de

desativação de primeira ordem é freqüentemente adequado para representar a cinética de desativação enzimática. No entanto, por uma revisão na literatura disponível, verificaram que a taxa de decréscimo em atividade não é sempre constante. Esses autores classificaram as curvas de desativação em dois casos. Num deles, a atividade é sempre menor que a inicial e no outro, a atividade pode ser maior que a inicial num período de tempo e propõem uma cinética de desativação em série e agrupam os casos de desativação, encontrados nesta literatura, em várias categorias diferentes. O modelo de desativação térmica em série está representado no mecanismo seguinte.



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

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

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

O estado intermediário E_1 e o estado final E_2 são ambos homogêneos. Este modelo considera duas etapas de primeira ordem irreversíveis na presença da enzima ativa (E), tanto quanto as espécies modificadas (E_1 e E_2), sendo estas com atividades específicas diferentes da enzima na sua forma nativa (JURADO, *et al.*, 2004). A Equação 2.9 ilustra a expressão da atividade média que foi obtida derivando o estado final E_2 , admitindo valor específico de atividade diferente de zero GIACOMINI, *et al.* (2001):

$$A = \left[1 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \right] \exp(-k_1 t) - \left(\frac{k_1}{k_2 - k_1} \right) (\alpha_1 - \alpha_2) \exp(-k_2 t) + \alpha_2 \quad (2.9)$$

Se k_2 for igual a zero a Equação 2.9 se reduz à 2.10:

$$A = (1 - \alpha_1) \exp(-k_1 t) + \alpha_1 \quad (2.10)$$

Na maioria dos estudos de desativação térmica de enzimas, considera-se cinética de primeira ordem para relacionar atividade enzimática com o tempo, a uma dada temperatura (RIBEIRO, 1989). Supondo desativação de primeira ordem, obtém-se a Equação 2.11.

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A \quad (2.11)$$

Integrando a Equação 2.11 para o intervalo de tempo $t = 0$ até t , obtém-se a Equação 2.12.

$$A = A_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad (2.12)$$

Sendo k_d a constante cinética de desativação térmica, ou taxa específica de inativação térmica, representada na equação 2.9 por k_1 .

Um conceito comum em cinética química e enzimática é o tempo de meia vida, $t_{1/2}$, que é o tempo necessário para que a atividade relativa da enzima (A/A_0), da Equação 2.12, seja igual a 0,5, ou seja, o tempo necessário, a uma temperatura T , sob condições específicas, para que a atividade catalítica seja reduzida à metade da inicial. Da Equação 2.12, e com o conceito de tempo de meia vida, tem-se a Equação 2.13.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (2.13)$$

Por outro lado, k_d varia com a temperatura segundo o modelo de Arrhenius, dado pela Equação 2.14.

$$k_d = A \cdot \exp\left(\frac{-E_d}{R \cdot T}\right) \quad (2.14)$$

A Equação 2.14 na forma linearizada pode ser representada pela Equação 2.15, na qual é possível determinar a energia de ativação do fenômeno de desativação térmica da enzima estudada.

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (2.15)$$

Seguindo a lei de Arrhenius, CHANG & JUANG (2005) determinaram a desativação térmica das enzimas α -amilase, β -amilase e glucoamilase, na forma imobilizada e na livre por uma descrição da equação cinética de pseudo-primeira ordem.

Em uma reação enzimática o aumento da temperatura leva ao um aumento da taxa até atingir um máximo correspondente à “temperatura ótima”, depois decresce rapidamente devido à desnaturação da enzima. Na determinação desta temperatura

ótima deve se tomar cuidado para que a atividade da enzima seja constante pelo menos durante a realização do experimento, pois caso contrário tem-se dois efeitos, o aumento da taxa da reação e a desnaturação da enzima (SEGEL, 1979).

A estabilidade térmica da enzima depende do meio em que ela se encontra, tais como: pH, concentração de substrato, presença de estabilizadores e também se está na forma livre ou imobilizada (BAILEY & OLLIS, 1986).

O pH também exerce grande influência na atividade e estabilidade das enzimas. Os vários aminoácidos que compõe a proteína possuem grupos laterais básicos, neutros ou ácidos, portanto a enzima pode ser carregada positivamente ou negativamente, dependendo do pH. Tais grupos ionizáveis são frequentemente parte do sítio ativo, já que um mecanismo catalítico ácido-base está ligado à catálise enzimática. Assim a enzima para estar cataliticamente ativa só existe um estado particular de ionização. Dessa forma, a enzima ativa será uma fração maior ou menor da concentração total da enzima, dependendo do pH. A taxa da reação aumenta com pH até um valor ótimo a partir do qual a taxa decresce, ou devido à desnaturação ou a existência de estados de ionização inadequados (SEGEL, 1979; DIXON & WEBB, 1979).

BORA et al. (2005) obtiveram o pH ótimo tanto para a invertase livre quanto para a imobilizada igual a 5,0, embora as atividades residuais da enzima imobilizada foram menores do que a solúvel. A temperatura ótima das enzimas livres e imobilizadas também coincidiu por volta de 45°C e com o aumento de temperatura acima da ótima as enzimas livres decaíram rapidamente sua atividade, enquanto as imobilizadas retiveram um pouco mais de atividade, devido o aumento da sua estabilidade térmica.

A invertase adsorvida em sílica demonstrou um aumento em K_m e um alto efeito difusional devido à resistência à transferência de massa. Isso pode ser resultado da adsorção da enzima muito próximo ao sítio ativo. O pH ótimo foi inalterado na imobilização por ligação covalente, enquanto aumentou nas espécies adsorvidas. A estabilidade em relação ao pH também melhorou. Similarmente, a temperatura ótima e a estabilidade térmica foram aumentadas na imobilização (SANJAY e SUGUNAN, 2005).

Estudo cinético mostrou que invertase adsorvida em polietilenoglicol dimetacrilato quelado com cobre seguiu uma desativação térmica de pseudo-segunda-ordem e foi mais resistente à desnaturação a altas temperaturas do que a solúvel. O valor da constante K_m foi significativamente maior na forma adsorvida, o que indica

diminuição de afinidade da enzima pelo seu substrato, considerando que V_m foi menor na invertase adsorvida. A temperatura ótima da forma adsorvida foi 10°C acima da livre e a estabilidade de armazenamento aumentou com a adsorção (OSMAN et al., 2005). GOMÉZ et al. (2005) também obtiveram um aumento da temperatura ótima de 10°C e de 9°C na termoestabilidade a partir da imobilização da invertase.

AMAYA-DELGADO et al. (2005) observaram a influência do pH na atividade da invertase na hidrólise de sacarose na faixa de 5,0 a 7,0 e o pH de maior atividade tanto para a livre quanto para imobilizada foi de 5,5. A temperatura de maior atividade da invertase foi na faixa de 65 a 70°C para a imobilizada e 55 a 65°C para a livre, e ambas tiveram uma rápida queda a partir de 70°C.

2.4.4 – Efeito da Imobilização nas Propriedades da Enzima

A enzima imobilizada apresenta várias vantagens em relação à livre, porém alguma alteração nas propriedades físicas e químicas, depois da imobilização pode implicar em mudanças na atividade, estabilidade e cinética da enzima imobilizada. Nos processos utilizando enzimas imobilizadas o parâmetro de maior importância é a estabilidade operacional, pois somente com o tempo de meia-vida suficientemente longo os processos com enzimas imobilizadas serão mais econômicos se comparado com o uso de enzimas solúveis. Isto reduziria o custo devido a menor quantidade de enzima necessária, o qual deve ser suficiente para cobrir os custos de imobilização (ZANIN, 1989).

A estabilidade operacional da enzima imobilizada depende de fatores como: desprendimento da enzima do suporte; obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; perda do suporte por atrito ou dissolução; obstrução de leitos fixos, causando canais preferenciais e crescimento de microrganismos. (ZANIN, 1989).

Normalmente as enzimas imobilizadas mantêm sua atividade em condições de estocagem específicas de temperatura e pH. A estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas geralmente é superior a das livres, mas depende do método de imobilização, do suporte e da solução a ser estocada (CHIBATA, 1978; BAGAL & KARVE, 2006).

Quando a enzima é imobilizada o pH de maior atividade pode ou não se alterar. Se o suporte é carregado, as propriedades cinéticas da enzima imobilizada pode diferir da solúvel, mesmo na ausência de efeitos difusionais. Esse comportamento pode ser

atribuído ao fato de que as concentrações de espécies carregadas, tais como substrato, íons hidrogênio ou hidroxila e outros no microambiente da enzima imobilizada, são diferentes da solução externa, devido a interações eletrostáticas com cargas fixas no suporte (RIBEIRO, 1989).

A alteração no perfil de temperatura pode ser observada entre as enzimas livres e imobilizadas, o que pode ser causado pelos efeitos difusionais, mudanças conformacionais e efeitos estereoquímicos. Essas podem refletir em um aumento ou diminuição da temperatura ótima alcançada pela enzima imobilizada em relação à solúvel (RIBEIRO, 1989).

Em 2006, BAGAL & KARVE obtiveram uma excelente estabilidade de estocagem com a invertase imobilizada em membranas, uma vida de prateleira de 110 dias. Além disso, a invertase entrelaçada mostrou a melhor estabilidade operacional e foi reutilizada por até 12 ciclos. Os parâmetros cinéticos da invertase imobilizada e da solúvel sugeriram que a matriz oferece resistência mínima para a difusão do produto e do substrato.

2.5 – Reatores com Enzimas Imobilizadas

Das várias aplicações para enzimas imobilizadas a mais importante é sua aplicação industrial, por isso o assunto é tão discutido. Em processos industriais, as enzimas imobilizadas são empregadas em reatores químicos, normalmente similares aos utilizados em catálise química (CHIBATA, 1978; CAO, 2005; BULCHHOLZ et al., 2005).

Os reatores enzimáticos são classificados em homogêneos e heterogêneos, dependendo do número de fases presentes no processo, sendo que no processo homogêneo ocorre apenas uma fase, enquanto no heterogêneo há duas ou mais fases. Um exemplo de heterogêneo é a solução de substrato sendo a fase líquida e a enzima imobilizada a fase sólida. Outra classificação baseia-se na forma de operação, descontínuo (batelada) ou contínuo, ao grau de mistura: perfeita ou de escoamento tubular. O perfil de concentração dentro dos reatores pode variar apreciavelmente (RIBEIRO, 1989; CHIBATA, 1978; CAO, 2005; BULCHHOLZ et al., 2005).

Enzimas imobilizadas possibilitam uma catálise heterogênea com ótimas vantagens: é possível utilizar um único grupo de enzimas repetidas vezes e parar a reação apenas removendo fisicamente as enzimas imobilizadas da solução, além disso, inclui a facilidade de determinação analítica de uma mistura complexa em um volume

pequeno (ERGINER et al., 2000). Uma classificação de reatores levando em conta o modo de operação e as características hidrodinâmicas está representada na Tabela 2.6.

Tabela 2.6-Classificação de reatores enzimáticos (ZANIN, 1989).

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

2.5.1 – Reatores Descontínuos

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

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

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

Um reator batelada tipo tanque agitado (“BSTR”- Batch Stirred Tank Reactor) é de concepção bastante simples, pois trata-se de um tanque com um agitador mecânico, que permite um bom grau de mistura, apresentado na Figura 2.6a. Quando as enzimas imobilizadas são utilizadas neste reator estas devem ser separadas em uma etapa subsequente, podendo ser por filtração ou centrifugação, o que pode provocar perdas de

partículas do catalisador, bem como a desativação parcial das enzimas imobilizadas. Ainda pode haver a quebra de alguns suportes devido ao contato com o agitador. Para superar ou minimizar alguns desses problemas foram criados outros modelos de reatores descontínuos. Um desses é o reator com agitação provido de um cesto (“basket reactor”) que retém as enzimas imobilizadas, impedindo sua perda por atrito com o agitador ou no processo de separação de produtos (CARBERRY, 1976; MESSING, 1978).

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

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

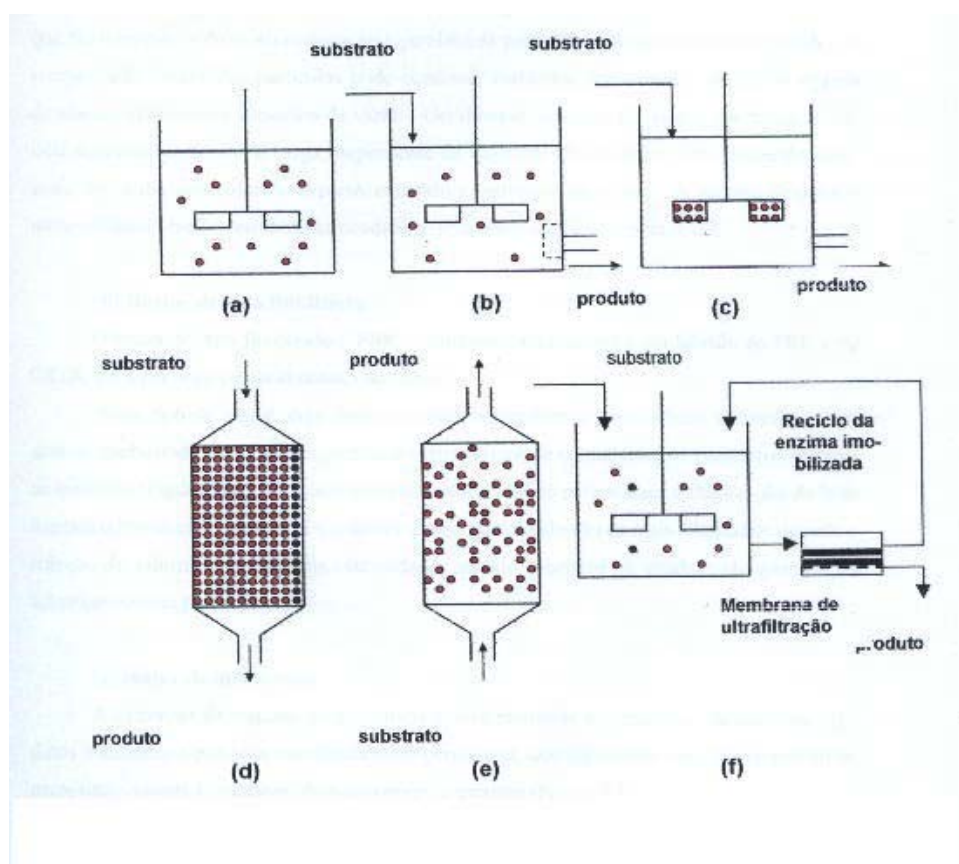


Figura 2.6 – Exemplos de reatores para enzimas imobilizadas (VICENTE, 2000).

2.5.2 – Reatores Contínuos

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

O reator contínuo tipo tanque agitado (“CSTR”) consiste em um tanque com entrada de substrato e saída de produtos. Possui uma eficiente agitação que promove o contato íntimo entre a enzima e o meio reacional, evitando gradiente de concentração e de temperatura. Existe uma variedade de configurações de CSTR, em sua forma mais simples, como mostrado na Figura 2.6b, o substrato é adicionado ao tanque contendo a enzima imobilizada, a qual fica em suspensão, enquanto que o produto e o substrato remanescente são retirados continuamente. Um filtro é colocado na saída do tanque impedindo que as enzimas imobilizadas sejam retiradas do sistema.

Outra configuração desse reator é mostrada na Figura 2.6c, na qual as enzimas imobilizadas são retidas nas pás do eixo de agitação, com intuito de minimizar a resistência à transferência de massa entre a fase líquida e o biocatalisador, e principalmente reduzir a quebra e o desgaste da partícula.

O reator tubular ideal é caracterizado por uma variação das concentrações dos componentes da entrada até a saída. O fluido escoar através de um tubo ou de uma coluna promovendo o chamado de fluxo pistonado. Os reatores tubulares utilizados com enzimas imobilizadas são de leito fixo, de leito fluidizado e de membrana. O reator de leito fixo (“PBR” – Packed Bed Reactor) é o mais utilizado na catalise heterogênea. Consiste de uma coluna recheada com partículas do biocatalisador, a qual é percolada pela solução de reagente a ser tratada, demonstrado na Figura 2.6d. O escoamento no reator pode ser ascendente ou descendente. A desvantagem de utilizar o fluxo descendente é a possível compactação natural das partículas ocasionando caminhos preferenciais do fluido na coluna.

RODRIGUES et al. (2000) estudaram a inversão da sacarose pela invertase imobilizada em resinas catiônicas Amberlite IR-120, as quais foram empacotadas nas

colunas por onde passava o xarope de sacarose e sofria a hidrólise. O reator era formado por uma coluna de vidro encamisada, um banho termostatizado com recirculação de água e uma bomba peristáltica. A condição de processo desenvolvida permitiu a obtenção de um produto final de alta qualidade, preservando a integridade das resinas. O produto final estava de acordo com as especificações da *National Soft Drink Association of USA*, podendo ser utilizada na fabricação de refrigerante.

Em escala de laboratório um reator de coluna contendo invertase imobilizada em CCL-Seralose extraída do *Cajanus cajan*, manteve a atividade enzimática por um mês e reteve 80% de atividade durante 60 dias à temperatura de 4°C (AHMAD et al., 2001).

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

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

O reator de leito fluidizado (“FBR” – Fluidized Bed Reactor) é um híbrido do PBR e do CSTR, em termos de comportamento de fluido. Possui a forma geométrica de uma coluna, onde as partículas imobilizadas ficam em suspensão, evitando o risco de colmatação (Figura 2.6e). O fator limitante para o uso desse tipo de reator é o custo energético necessário. São os mais adequados quando a reação ocorre em solução contendo substrato com elevada viscosidade ou ainda quando substrato ou produto são gasosos.

A operação de reatores de membranas é fundamentada na separação de enzimas, produtos e substratos por uma membrana semi-permeável que estabelece uma barreira seletiva, permitindo apenas a passagem do substrato e/ou produto (Figura 2.6f). Os reatores de membranas são divididos em duas categorias: aqueles que operam com substratos de baixo peso molecular que tanto o substrato quanto o produto permeiam a membrana e aqueles que convertem substratos de macromoléculas, em que somente o produto permeia a membrana. Entre as inúmeras vantagens desse processo está o aumento da transferência de massa, com conseqüente aumento da produtividade e a possibilidade de conduzir reações bifásicas. Por outro lado, a desvantagem é a possibilidade de escape das enzimas nos poros da membrana, causando uma redução

gradual da eficiência. No caso da enzima imobilizada na superfície da membrana, pode ocorrer inibição, normalmente por concentrações inadequadas de substratos e produtos, devido ao acúmulo gradual dos mesmos na forma de uma camada de gel adjacente à membrana (VICENTE, 2000).

BAYRAMOGLU et al. (2003) utilizaram um reator contínuo de leito fixo para hidrolisar a sacarose com invertase imobilizada em um filme de HEMA-GMA (poli(hidroximetil metacrilato-co-glicidil metacrilato)). Após 90 horas de operação a enzima não perdeu atividade e após 168 horas houve uma queda de 8% da atividade inicial, resultado da inativação da enzima em uso.

2.5.3 – Fatores que Influenciam a Seleção do Reator

De acordo com MESSING (1978), BAILEY & OLLIS (1986), CAO (2005) a seleção do tipo de reator a ser utilizado em um processo com enzimas imobilizadas depende de fatores como:

- Forma da enzima imobilizada

Uma enzima imobilizada pode se apresentar em diversas formas tais como: partículas, membranas, fibras.

Um reator tipo “CSTR” é aconselhado para partículas bem resistentes ao atrito, pois pode ocorrer redução do diâmetro médio das partículas do biocatalizador, que pode sair do reator, contaminando o produto final. A opção do reator tipo cesta reduz muito a intensidade dessa abrasão.

Partículas com diâmetro reduzido ($<300\mu\text{m}$) não deve ser utilizados em reatores de leito fixo, pois acarretam um aumento na queda de pressão ao longo do leito catalítico. Assim, a melhor opção para empregar enzimas imobilizadas deformáveis e de diâmetro reduzido é a utilização de leito fluidizado, o qual evita a queda de pressão e problemas de entupimento (VICENTE, 2000).

Enzimas na forma de membranas ou em fibras são mais adequadas ao uso de leito fixo e em alguns casos quando estão divididas em pedaços pequenos, pode utilizar reator tipo “CSTR”.

- Natureza do substrato

Substratos que contém sólidos em suspensão, natureza coloidal ou apresentam alta viscosidade são suscetíveis de bloquear reatores de leito fixo, conduzindo a

elevadas quedas da pressão. Por isso, neste caso o mais utilizado é o reator tipo “CSTR” que pode processar substratos coloidais e até insolúveis, desde que o grau de agitação seja intenso.

Para soluções de substratos que contenham impurezas insolúveis, as mesmas devem ser filtradas na entrada para ser possível a utilização em leito fixo.

- Requisitos operacionais de reação

Para sistemas que requerem controle de pH e temperatura, os reatores mais adequados são do tipo “CSTR”.

- Cinética da reação

As enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten, em que a velocidade da reação é menor em baixas concentrações de substrato, são menos produtivas em reatores tipo CSTR do que em leito fixo. Então quando se deseja um alto grau de conversão e apresenta gradientes de concentração de substrato no interior do reator o mais adequado é o de leito fixo.

- Teor de enzima no suporte

A concentração de biocatalisador (massa de suporte/volume de reator) é pequena em “CSTR”, mediana em leito fluidizado e alta em leito fixo. Logo se a capacidade do suporte em reter a enzima for baixa, a utilização de reatores tipo “CSTR” e leito fluidizado pode necessitar de um elevado tempo de residência ou operações em vários reatores em série, o que pode acarretar problemas de viabilidade econômica do processo.

- Características de transferência de massa

A possibilidade de utilização de partículas biocatalíticas de pequeno diâmetro (da ordem de 10 μ m), e a decorrente acessibilidade do substrato a estas nos reatores de leito fluidizado, conduzem à diminuição dos problemas de transferência de massa e de calor neste tipo de reator comparativamente ao de leito fixo, sem causar o problema de abrasão existente nos reatores do tipo “CSTR”.

- Facilidade de substituição do catalisador e sua regeneração

Quando há a necessidade de manipulação do biocatalisador no interior do reator para manutenção da atividade catalítica, ou seja, operações de retirada contínua ou periódica de enzimas imobilizadas, os reatores de leito fluidizado e tipo “CSTR” são as melhores opções.

- Facilidade de construção do reator e custo do mesmo

O reator tipo tanque contínuo agitado “CSTR” é o de concepção mais simples e, portanto, o mais simples de construir. Entretanto, os custos operacionais deste e do leito fluidizado são mais elevados que o de leito fixo, devido à necessidade de uma potencia alta de agitação e de fluidização do conteúdo do reator.

2.5.4 – Problemas Operacionais de Reatores Enzimáticos

Além dos problemas de natureza física, como entupimento, abrasão de partículas, dificuldades de fluidização, pode citar outros que contribuem para a desativação e queda de conversão, como o excesso de agitação, variações de temperatura por falha do controle termostático, variações de composição na corrente de alimentação e, principalmente, contaminação microbiana.

Em reatores submetidos a longos períodos de operação contínua, a contaminação pode se tornar um problema muito sério. Uma alternativa é um tratamento periódico do reator com agentes bacterostáticos ou fungicidas, não prejudiciais ao biocatalisador ou a esterilização do substrato na alimentação do reator (CHEETHAM, 1985). Outra opção seria a operação em temperaturas elevadas, mas depende do limite da estabilidade da enzima.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

3.1.1 – Enzima e Reagentes

A enzima utilizada neste trabalho foi invertase (β -frutofuranosidase frutohidrolase, E.C.3.2.1.26, Grau V, código 9001-57-4, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*), adquirida da Sigma. A atividade enzimática declarada no rótulo pelo fabricante era de 46 U/mg de sólido, sendo U definido como 1 micromol de sacarose hidrolisada a açúcar invertido por minuto a pH 4,5 e 55°C, que corresponde a 16,6 U_s. Esta enzima é utilizada na forma de pó e por todo trabalho a concentração da mesma refere-se a grama do produto comercial por litro (g/L).

O substrato utilizado foi sacarose de grau analítico das marcas Isofar e Vetec. Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

3.1.2 – Suportes para Imobilização

As resinas de troca iônica, Marathon A e Marathon C foram obtidas da Dow Chemical Company, são esferas totalmente perfeitas e Duolite A-568 e Duolite S-761 foram adquiridas da Rohm Hass. A resina aniônica fortemente básica Dowex Marathon A é aplicada em desmineralização de água; Dowex Marathon C é um trocador catiônico fortemente ácido, utilizado para aplicações em abrandamento e desmineralização de água; Duolite A-568 é um trocador aniônico fracamente básico, com ligações cruzadas de fenol-formaldeído que é usada como suporte de enzimas em várias aplicações de bioprocessos, possui um tamanho médio de poro de 0,78 mL/ grama de volume de poro; Duolite S-761 é um trocador aniônico fracamente básico que é utilizado para remoção de proteínas, impurezas orgânicas com aplicação comercial na purificação de fármacos, possui um tamanho médio de poro 0,43 mL/grama de volume de poro.

3.1.3 – Reator

O reator utilizado nos experimentos de hidrólise de sacarose por invertase nas formas livre e imobilizada foi um microrreator de mistura, com volume total de 200 mL, com camisa externa para circulação de água proveniente de um banho termostatzado para controle de temperatura e provido de agitação magnética. Para os ensaios com a enzima na forma imobilizada, as partículas da mesma eram retidas em uma cesta de aço inox de 100 mesh, evitando assim as colisões entre o agitador e as partículas catalíticas. O reator de mistura apresentava altura 8,2 cm e diâmetro interno 5,5 cm. e a cesta de aço inox possuía altura igual a 6,7 cm e diâmetro de 2,4 cm. A Figura 3.1 é uma foto da montagem experimental.



Figura 3.1 – Foto do reator utilizado para realizar os ensaios.

3.2 – Metodologia

3.2.1 – Determinação de Açúcares Redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

O método de DNS baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, ao mesmo tempo, na oxidação do grupo aldeído ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento da cor laranja-marrom forte. A sequência de reações é apresentada na Figura 3.2.

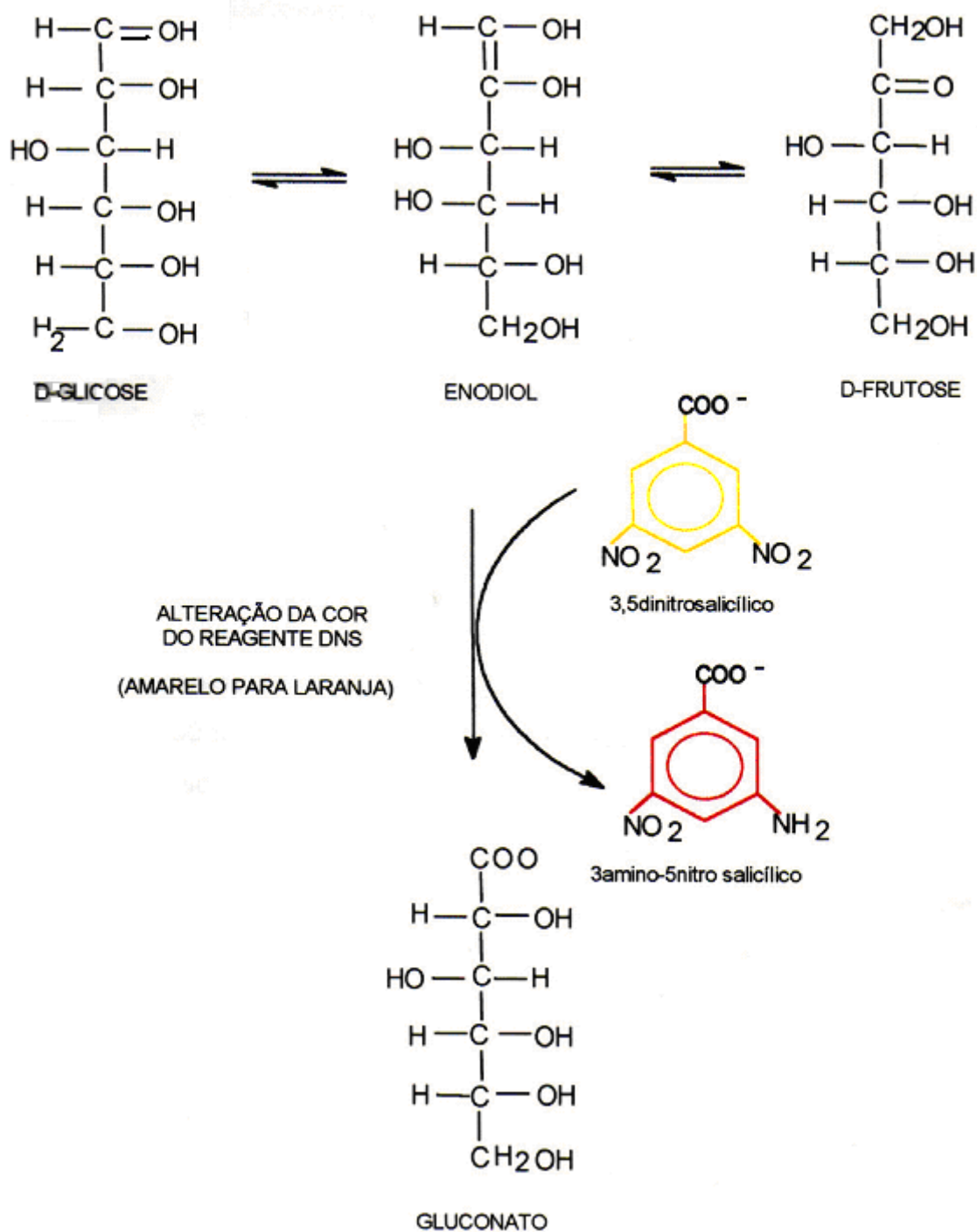


Figura 3.2 – Esquema de reações envolvidas no método DNS (BERGAMASCO, 1989 *apud* VICENTE, 2000).

O método de DNS utiliza os seguintes reagentes: ácido dinitrosalicílico, sal de Rochelle e hidróxido de sódio, cada uma com uma função específica.

Sal de Rochelle: constitui de uma solução de tartarato de sódio e potássio, usado para impedir a oxidação do reagente pelo oxigênio dissolvido.

Hidróxido de sódio: atua como redutor da ação da glicose sobre o ácido dinitrosalicílico.

Preparação do reagente: dissolvia-se 16 g de hidróxido de sódio em 200 mL de água destilada para a obtenção de uma solução 2 N. A seguir 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 500 mL de água destilada era misturada com a solução de hidróxido de sódio. Após essa diluição, adicionava-se 300 g de sal de Rochelle em banho Maria a 40°C completando o volume a 1000 mL com água destilada.

Para a determinação da concentração de açúcares redutores, 1 mL de amostra diluída de modo que a concentração destes situasse na faixa de 0,0 a 1,0 g/L era acrescentada a 2,0 mL de reagente DNS em um tubo de Folin-Wu e levada para um banho de água em ebulição por 5 minutos. Após este tempo, resfriavam-se os tubos em banho com gelo e completava o volume a 25 mL com água destilada, os quais eram homogeneizados e a seguir realizada a leitura da absorbância a 540 nm, em espectrofotômetro Thermo Spectronic modelo Genesys 10 UV, utilizando cubetas de vidro. A calibração do zero no aparelho era feita utilizando um teste em branco, onde 1 mL de água destilada substituída a amostra, seguindo o mesmo procedimento.

A curva de calibração do método do DNS, em termos de concentração de açúcares redutores em função da absorbância, foi determinada utilizando soluções de glicose na faixa de 0,0 a 1,0 g/L, com intervalo de 0,1 g/L.

Durante os ensaios foram obtidas curvas de calibração para toda solução de DNS preparada.

3.2.2 – Dosagem de Proteína

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.3 – Determinação da Atividade pelo Método das Taxas Iniciais

A atividade da enzima invertase em sua forma solúvel e imobilizada foi determinada pelo método das taxas iniciais de reação, utilizando o reator do item 3.1.3.

A reação de hidrólise de sacarose por invertase era realizada um volume reacional igual a 100 mL, nas condições de pH, temperatura e agitação definidas para cada experimento. Inicialmente colocava no reator a solução de sacarose no tampão adequado, e após atingir a temperatura desejada, acrescentava o volume necessário da solução de invertase livre para resultar em uma concentração desta de 0,01 g/L, marcando o tempo de início da reação. No caso das enzimas imobilizadas, após atingir a temperatura desejada para o experimento, adicionava ao reator a cesta com certa massa de invertase imobilizada nas resinas, iniciando a contagem do tempo. As amostras eram tomadas, normalmente em número de cinco, a intervalos de três em três minutos. Cada amostra era introduzida em um tubo Folin-Wu contendo 2mL de DNS, o qual inativa a enzima possibilitando determinar o teor de açúcares redutores naquele momento.

A taxa inicial de reação foi obtida a partir da inclinação da reta de concentração de açúcares redutores formados, em função do tempo.

A atividade de invertase livre foi expressa por grama de açúcar redutor produzido por litro de meio, por minuto, por grama de enzima. A atividade de invertase imobilizada foi expressa por grama de açúcar redutor produzido por litro de meio, por minuto, por grama de resina.

3.2.4 – Planejamento Composto Central

Para a realização de experimentos significativos e confiáveis, deve-se utilizar um método científico de planejamento. Além disso, quando o problema envolver dados que podem conter erros experimentais, um modo adequado de análise é por métodos estatísticos. Em qualquer análise experimental devem-se seguir duas etapas: o planejamento experimental e a análise estatística dos dados, esta última dependente do tipo de planejamento realizado.

As vantagens do uso do planejamento experimental são:

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

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

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

O valor de α , foi calculado pela Equação 3.1:

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

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

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

T = número de pontos adicionais no PCC;

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

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

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

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

X é o valor real da variável a ser calculado;

X_0 é o valor real da variável no ponto central;

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

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

A variável dependente, atividade enzimática é representada pela resposta (Y).

A equação do modelo polinomial de segunda ordem obtido por um método de regressão múltipla é representada pela Equação 3.4.

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

Sendo: Y = atividade enzimática

k = nº de variáveis independentes

x = variáveis independentes

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

Com a equação empírica da regressão múltipla é possível construir uma superfície de resposta que permite verificar a existência de uma região ótima para a atividade enzimática onde se encontra uma faixa de combinação das variáveis em questão, além de fornecer informações sobre a robustez do processo, ou seja, qual a

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

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

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

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

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

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

Sendo: b_0 é o termo independente;

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

$x'Bx$ é a contribuição quadrática.

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

O ponto estacionário (x_0) pode ser:

- Um ponto onde a superfície atinge um **máximo**;
- Um ponto onde a superfície atinge um **mínimo**, ou

- Um ponto nem de máximo, nem de mínimo $\Rightarrow$ **Ponto de sela** (“saddle point”).

Para determinar a natureza desse ponto estacionário foi necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem $(X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, \dots, 0)$ para o ponto estacionário x_0 (Figura 3.3). Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis, $w_1, w_2, \dots, w_k$.

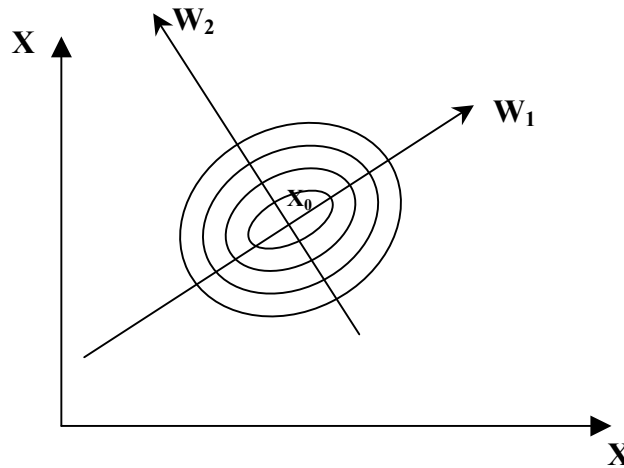


Figura 3.3 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

Então, obtêm-se a função de resposta em termos das novas variáveis:

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (3.8)$$

Sendo: y_0 : é a resposta estimada no ponto estacionário e,

$\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ são as raízes características

Os sinais dos λ 's e a grandeza dos λ 's ajudam a determinar a natureza do ponto estacionário e, a relação entre os w 's e os x 's também são importantes, pois indicam ao pesquisador regiões úteis para exploração.

Se $\lambda_i < 0$, sendo $i = 1, 2, \dots, k$, quando movimentamos em qualquer direção a partir do ponto estacionário, teremos um decréscimo de Y , isto é, o ponto estacionário x_0 é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se $\lambda_i > 0$, o ponto estacionário x_0 é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os λ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário x_0 não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

A obtenção dos pontos estacionários e a análise canônica dos dados para cálculo dos pontos de maximização das respostas foram realizados utilizando um algoritmo implementado no software *Maple* VIII (Anexo 1).

3.2.5 – Influência da Temperatura e do pH na Atividade de Invertase Livre.

Com o objetivo de determinar as melhores condições operacionais no processo de hidrólise de sacarose com invertase solúvel foi realizado um Planejamento Composto Central (PCC) com duas variáveis (temperatura e pH), totalizando 11 ensaios, 2^2 ensaios para investigação de um modelo linear, 3 réplicas centrais e 4 ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais) a uma distância α do ponto central, apresentados na Tabela 3.1. O valor do α ortogonal foi de 1,1474.

A atividade enzimática foi obtida pelo método das taxas iniciais de reação de hidrólise de sacarose, conforme o item 3.2.3, num mini-reator de mistura, item 3.1.3, contendo 100 mL de sacarose a 50 g/L, e concentração de invertase de 0,01 g/L. Os experimentos com a enzima solúvel, foram realizados com tampão acetato na faixa de pH 2,8 à 6,2, no intervalo de temperatura de 27 à 73°C.

Tabela 3.1 – Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da invertase livre.

Experimentos	Valor real (valor codificado)	
	Temperatura (°C)	pH
1	30 (-1)	3,0 (-1)
2	30 (-1)	6,0 (1)
3	70 (1)	3,0 (-1)
4	70 (1)	6,0 (1)
5	27 (- α)	4,5 (0)
6	73 (+ α)	4,5 (0)
7	50 (0)	2,8 (- α)
8	50 (0)	6,2 (+ α)
9	50 (0)	4,5 (0)
10	50 (0)	4,5 (0)
11	50 (0)	4,5 (0)

As equações de codificação para a temperatura e pH são Equações 3.9 e 3.10, respectivamente.

$$X_1 = \frac{T - 50}{20} \quad (3.9)$$

$$X_2 = \frac{pH - 4,5}{1,5} \quad (3.10)$$

Após obtidos os resultados dos experimentos, estes foram analisados por superfície de resposta e por análise canônica, conforme item 3.2.4.

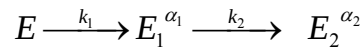
3.2.6 – Estabilidade da Enzima Livre em Relação ao pH

O procedimento experimental consistiu em preparar soluções de invertase a 0,8 g/L utilizando tampão acetato 10^{-1} M para a faixa de pH 3,0 à 6,0 em intervalos de pH 0,5 e utilizando tampão citrato-fosfato 10^{-1} M para a faixa de pH 6,5 à 8,0 em intervalos de pH 0,5. Essas soluções foram mantidas em um banho termostatzado à 25°C durante 24 horas. Após esse período determinou-se as taxas iniciais de reação de hidrólise de sacarose para cada solução de invertase no referido pH (atividade residual), seguindo os procedimentos do item 3.2.3. As condições reacionais foram: concentração inicial de sacarose 50 g/L, 30°C (temperatura que apresenta alta estabilidade térmica, mantendo atividade constante durante todo o experimento), pH 4,5 (condição de pH sugerida pelo fabricante), onde adicionou-se 1,25 mL das soluções de invertase previamente incubadas, resultando em 0,01 g/L de invertase no meio reacional. As atividades relativas foram obtidas pela relação entre as atividades residuais e a atividade inicial, antes da incubação.

3.2.7 – Estabilidade Térmica da Enzima Livre

Soluções de invertase a 2 g/L em tampão acetato pH 4,5, foram introduzidas em um banho termostatzado em temperaturas na faixa de 54 à 66°C e amostras das mesmas foram retiradas em intervalos adequados de tempo, para a determinação da atividade residual. Estas amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e a seguir 0,5 mL das mesmas foram adicionadas a 100 mL de solução de sacarose a 50g/L, resultando em uma concentração de invertase de 0,01 g/L, pH 4,5 na temperatura de 30°C para determinar as taxas iniciais da reação de hidrólise de sacarose conforme metodologia descrita no item 3.2.3

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 3.11, 3.12 e 3.13, para determinar os melhores ajustes e os parâmetros cinéticos.



$$\frac{A}{A_0} = e^{(-k_1 t)} \quad (3.11)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \cdot e^{(-k_1 t)} + \alpha_1 \quad (3.12)$$

$$\frac{A}{A_0} = \alpha_2 + \left(1 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \right) e^{(-k_1 t)} - \left(\frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \right) e^{(-k_2 t)} \quad (3.13)$$

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 desativação térmica em série e a energia de ativação do processo de desativação térmica foi calculada pela regressão linear da equação de Arrhenius (3.15).

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (3.14)$$

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.15)$$

Sendo: k_d = constante cinética de desativação térmica (corresponde ao valor de k_1 na Equação 3.11).

A = fator de frequência para a reação

E_a = energia de ativação do processo de desativação térmica

T = temperatura absoluta.

3.2.8 – Influência da Concentração Inicial de Sacarose na Atividade de Invertase Livre

Determinou-se as taxas iniciais de reação, conforme descrito no item 3.2.3, a 30°C, em tampão acetato pH 4,5, usando concentrações iniciais de sacarose variável de 2 a 500 g/L. As amostras retiradas do reator para medir a concentração de açúcar redutor era diluída sempre que necessária para que não ultrapassasse o limite correspondente a 1,0 g/L de açúcar redutor e tomando sempre o intervalo linear de concentração de redutores em função do tempo de reação.

O modelo cinético de inibição pelo substrato, Equação 3.16, foi ajustado aos resultados experimentais de taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato, sem adição de produtos da reação, por meio de regressão não linear utilizando o software *Statistic 7.0*, o que permitiu cálculo dos parâmetros e a análise da qualidade do ajuste.

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (3.16)$$

Sendo: v = velocidade da reação

V_m = velocidade máxima da reação

S = concentração de substrato

K_m = constante de Michaelis Menten

K_i = constante de inibição

3.2.9 – Imobilização da Invertase

3.2.9.1 – Escolha das Resinas para a Imobilização de Invertase

As resinas foram escolhidas a partir de testes como suporte para imobilização de invertase pelo método de adsorção.

As resinas Dowex Marathon A e C da Dow Chemical Company e as resinas Duolite A-568 e Duolite S-761, da Rohm Hass, inicialmente foram ativadas de acordo com recomendações do fabricante e a reativação das resinas foi pelo mesmo processo de ativação.

A resina Dowex Marathon A, foi ativada com seis volumes de hidróxido de sódio 3% por volume de leito de resina. A Dowex Marathon C, a qual é um trocador

catiônico fortemente ácido, foi ativada com cinco volumes de ácido sulfúrico 5% por volume de leito de resina.

A resina Duolite A-568 e a resina Duolite S-761 foram ativadas com uma solução de ácido clorídrico 1M, seguido de hidróxido de sódio 1M e lavado com água destilada. Em todas as etapas utilizou-se 10 volumes de solução por volume de resina.

Após a ativação das resinas foram realizados testes preliminares de imobilização de invertase. Em todos estes experimentos, incubou-se 10 mL de uma solução de invertase 1g/L em tampão acetato pH 3,5, com 1,0 g de resina, durante 24 horas, sob agitação de 45 rpm à 27°C em mesa agitadora. Após a imobilização, as resinas eram lavadas com tampão acetato pH 4,9 e utilizadas para determinação de atividade enzimática, pelo método das taxas iniciais de reação, item 3.2.3, com solução de sacarose 50g/L, pH 4,9 à 40°C.

A eficiência de imobilização na resina foi determinada pela atividade da invertase imobilizada (A_I), medida pelo método das taxas iniciais, e pelo índice de adsorção, calculado pela Equação 3.17, respectivamente:

$$IA = \frac{TPA - STP}{TPA} \quad (3.17)$$

Sendo: IA é o índice de adsorção;

TPA é o teor de proteína antes da imobilização

STP é o total de proteína no sobrenadante depois da imobilização.

3.2.9.2 – Influência do Tempo no Processo de Imobilização

Uma vez que Duolite A-568 foi o suporte que apresentou melhor retenção de atividade enzimática no processo preliminar de imobilização, a seqüência do trabalho foi conduzida com esta resina.

Amostras de 0,5g da resina Duolite A-568 ficaram imersas em solução de invertase 10g/L, em tampão acetato a pH 3,5 e 27°C por tempos de imobilização iguais a: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 18, 24, 27 e 40 horas. Após estes tempos de imobilização determinou-se as taxas iniciais de reação das respectivas amostras, conforme item 3.2.3, a 30°C, pH 4,5 e solução de sacarose 50 g/L, visando determinar o tempo ótimo para a imobilização de invertase na resina.

3.2.9.3 – Influência da Temperatura, do pH e da Concentração de Enzima no Meio de Imobilização

Após um tempo de imobilização de 24 horas não houve aumento significativo de retenção de atividade imobilizada e este foi escolhido como tempo de imobilização para o restante do trabalho.

O estudo da influência simultânea das variáveis concentração de enzima, pH do meio e temperatura no processo de imobilização foi realizado por um Planejamento Composto Central (PCC) com três réplicas centrais, totalizando 17 experimentos, utilizando-se o *software Statistica 7.0*. A temperatura variou de 9 a 45°C, o pH de 3,0 a 7,0 e a concentração de enzima de 0,5 a 19,5 g/L. Foram utilizados os tampões acetato 10⁻¹ M na faixa de pH 3,0 a 5,0 e citrato-fosfato 10⁻¹ M 6,5 a 7,0 dependendo do pH utilizado no experimento. O α de ortogonalidade utilizado no planejamento foi de 1,3531 e as Equações de codificação foram 3.18, 3.19 e 3.20, para temperatura, pH e concentração de invertase, respectivamente.

$$X_1 = \frac{T - 27}{13} \quad (3.18)$$

$$X_2 = \frac{pH - 5,0}{1,5} \quad (3.19)$$

$$X_3 = \frac{Conc. - 10}{7} \quad (3.20)$$

A imobilização foi realizada incubando 10 mL de uma solução de invertase a 10g/L, com 0,5 g de resina, durante 24 horas, nas condições definidas pelo PCC, Tabela 3.2, sob agitação de 60 rpm em mesa rotatória.

Tabela 3.2 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito da temperatura, do pH e da concentração da enzima na imobilização de invertase na resina Duolite A-568.

Experimentos	Valor real (valor codificado)		
	Temperatura (°C)	pH	Concentração de invertase (g/L)
1	14 (-1)	3,5 (-1)	3,0 (-1)
2	14 (-1)	3,5 (-1)	17,0 (1)
3	14 (-1)	6,5 (1)	3,0 (-1)
4	14 (-1)	6,5 (1)	17,0 (1)
5	40 (1)	3,5 (-1)	3,0 (-1)
6	40 (1)	3,5 (-1)	17,0 (1)
7	40 (1)	6,5 (1)	3,0 (-1)
8	40 (1)	6,5 (1)	17,0 (1)
9	27 (0)	5,0 (0)	10,0 (0)
10	27 (0)	5,0 (0)	10,0 (0)
11	27 (0)	5,0 (0)	10,0 (0)
12	9 (- α)	5,0 (0)	10,0 (0)
13	45 (+ α)	5,0 (0)	10,0 (0)
14	27 (0)	3,0 (- α)	10,0 (0)
15	27 (0)	7,0 (+ α)	10,0 (0)
16	27 (0)	5,0 (0)	0,5 (- α)
17	27 (0)	5,0 (0)	19,5(+ α)

Após a imobilização, os biocatalisadores obtidos foram lavados com tampão acetato pH 4,5 e utilizados para determinação de atividade pelo método das taxas iniciais a 30°C, pH 4,5 e solução de sacarose 50 g/L.

As condições de imobilização para os estudos subseqüentes correspondem às condições ótimas encontradas neste planejamento composto central.

3.2.9.4 – Influência do pH e Temperatura na Atividade da Enzima Imobilizada em Duolite A-568

O biocatalisador obtido nas condições de imobilização otimizadas anteriormente foi utilizado para estudar o efeito conjunto da temperatura e do pH na atividade da enzima imobilizada por um Planejamento Composto Central (PCC) com três réplicas centrais, conforme Tabela 3.3. A atividade enzimática foi obtida pelo método das taxas iniciais de reação de hidrólise de sacarose, num minireator de mistura contendo 100 mL de sacarose a 50 g/L, pH 4,5 a 30°C. Os experimentos foram realizados utilizando o tampão acetato com pH variável entre 2,7 a 5,1, e no intervalo de pH variável entre 7,0 a 7,5 utilizou-se tampão citrato-fosfato. O efeito da temperatura

foi analisado para temperaturas variáveis entre 13 a 74°C e o α ortogonal utilizado foi de 1,1474.

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

Experimentos	Valor real (valor codificado)	
	Temperatura (°C)	pH
1	17 (-1)	3,0 (-1)
2	17 (-1)	7,2 (1)
3	70 (1)	3,0 (-1)
4	70 (1)	7,2 (1)
5	13 (- α)	5,1 (0)
6	74 (+ α)	5,1 (0)
7	44 (0)	2,7 (- α)
8	44 (0)	7,5 (+ α)
9	44 (0)	5,1 (0)
10	44 (0)	5,1 (0)
11	44 (0)	5,1 (0)

As equações de codificação da temperatura e do pH são apresentadas nas Equações 3.21 e 3.22, respectivamente.

$$X_1 = \frac{T - 43,5}{26,5} \quad (3.21)$$

$$X_2 = \frac{pH - 5,1}{2,1} \quad (3.22)$$

Os resultados experimentais foram analisados conforme item 3.3.4, que permitiram determinar os valores ótimos de pH e de temperatura, os quais foram utilizados nos estudos cinéticos.

3.2.9.5 – Eficiência da Enzima Imobilizada em Relação ao Número de Usos

Amostras de 0,5g do biocatalisador imobilizado em Duolite A-568 sob condições ótimas já determinadas foram lavadas com tampão acetato pH 4,9 e determinadas as taxas iniciais de reação de hidrólise de sacarose pelo método descrito no item 3.2.3 sob as seguintes condições: temperatura 40°C, pH 4,9 (condições ótimas encontrada no item 3.2.9.4) e concentração inicial de sacarose 50 g/L. O experimento foi repetido 17 vezes e calculada a atividade relativa em relação à atividade inicial.

3.2.9.6 – Estabilidade da Enzima Imobilizada em Relação ao pH

Primeiramente imobilizou-se invertase em Duolite A-568 nas condições ótimas definidas no item 3.2.9.3. A enzima imobilizada era lavada e incubada em 10 mL de tampão, utilizando tampão acetato 10^{-1} M para a faixa de pH 3,0 à 6,0 em intervalos de 0,5 e utilizando tampão citrato-fosfato 10^{-1} M para a faixa de pH 6,5 à 8,0 em intervalos de 0,5. Essas soluções enzimáticas foram mantidas em banho termostatizado à 25°C durante 24 horas. Após esse período, os biocatalisadores foram lavados com tampão acetato 4,9 e colocadas na cesta de aço inox e determinada a atividade residual com uma solução de sacarose 50 g/L, pH 4,9 à temperatura de 40°C. A atividade relativa para cada valor de pH foi determinada pela relação entre a atividade residual e a atividade antes da incubação.

3.2.9.7 – Estabilidade Térmica da Enzima Imobilizada

Amostras de 0,1g do biocatalizador imobilizado nas condições ótimas encontradas no item 3.2.9.3 foram lavadas com tampão acetato pH 5,75 (pH de maior estabilidade) e misturadas com 5 mL do mesmo tampão e incubados em várias temperaturas em um banho termostatizado.

A temperatura de cada incubação variou na faixa de 51 a 63°C, e as amostras foram retiradas em intervalos adequados de tempo, resfriadas rapidamente em banho de gelo, transferidas para a cesta de aço inox e determinada a atividade residual no reator usando 100 mL de solução de sacarose a 50 g/L, pH 5,5 na temperatura de 40°C.

Os resultados de atividade enzimática obtidos foram analisados pela modelagem em série, utilizando as Equações 3.11, 3.12 e 3.13 por meio de regressões não-lineares para determinar os melhores ajustes e os parâmetros cinéticos.

Os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura, considerando o melhor ajuste dos resultados experimentais às Equações de desativação térmica em série (Equações 3.11, 3.12 e 3.13) e a energia de ativação do processo de desativação térmica foi calculada pela regressão linear da equação de Arrhenius (3.15).

3.2.9.8 – Influência da Concentração Inicial da Sacarose na Atividade de Invertase Imobilizada

A enzima imobilizada segundo as condições ótimas determinadas no item 3.2.9.3, foi lavada com tampão acetato pH 5,75 e transferida para a cesta de aço inox, determinando-se a seguir as taxas iniciais de reação, conforme descrito no item 3.2.3., a 40°C, pH 5,5, usando concentrações de sacarose variando entre 2 a 500 g/L.

Os resultados de taxas iniciais assim obtidos foram ajustados ao modelo de inibição pelo substrato (Equação 3.16) e determinados os parâmetros cinéticos por meio de uma regressão não linear.

3.2.9.9 - Influência da Concentração Inicial de Glicose e Frutose na Atividade de Invertase Imobilizada

Analizou-se a influência dos produtos da reação na hidrólise de sacarose em diferentes concentrações de sacarose, glicose e frutose no meio reacional, conforme Tabela 3.4. A determinação das taxas iniciais de reação foi realizada nas condições ótimas definidas no item 3.2.9.4 em pH 5,5 e a imobilização de invertase na resina Duolite A-568 seguiram as melhores condições de imobilização do item 3.2.9.3.

Os resultados experimentais de taxa inicial de reação foram ajustados aos modelos cinéticos de Inibição competitiva (Equação 3.23), Inibição não competitiva (Equação 3.24), Inibição acompetitiva (Equação 3.25), Inibição mista linear (Equação 3.26) e Inibição parcialmente não competitiva (Equação 3.27).

Inibição Competitiva

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.23)$$

Inibição Não Competitiva

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m * \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S * \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.24)$$

Inibição Acompetitiva

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.25)$$

Inibição Mista Linear

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)} \quad (3.26)$$

Inibição Parcialmente Não Competitiva

$$v = \frac{V_m \cdot S \left(1 + \frac{\beta I}{K_i} \right)}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.27)$$

Tabela 3.4 – Condições experimentais para o estudo da influência dos produtos da reação na taxa de hidrólise.

Ensaio	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Ensaio	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)
1	20	0	0	32	20	0	5
2	20	5	0	33	20	0	10
3	20	10	0	34	20	0	15
4	20	15	0	35	20	0	20
5	20	20	0	36	20	0	25
6	20	25	0	37	40	0	0
7	40	0	0	38	40	0	5
8	40	5	0	39	40	0	10
9	40	10	0	40	40	0	15
10	40	15	0	41	40	0	20
11	40	20	0	42	40	0	25
12	40	25	0	43	60	0	0
13	60	0	0	44	60	0	5
14	60	5	0	45	60	0	10
15	60	10	0	46	60	0	15
16	60	15	0	47	60	0	20
17	60	20	0	48	60	0	25
18	60	25	0	49	80	0	0
19	80	0	0	50	80	0	5
20	80	5	0	51	80	0	10
22	80	15	0	53	80	0	20
23	80	20	0	54	80	0	25
24	80	25	0	55	100	0	0
25	100	0	0	56	100	0	5
26	100	5	0	57	100	0	10
27	100	10	0	58	100	0	15
28	100	15	0	59	100	0	20
29	100	20	0	60	100	0	25
30	100	25	0				
31	20	0	0				

A partir dos resultados obtidos dos ajustes de parâmetros foi possível analisar o modelo que melhor descreve a influência dos produtos, glicose e frutose, na reação enzimática da invertase imobilizada.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Atividade da Invertase usada no Trabalho

Por meio dos resultados de taxas iniciais de reações de hidrólise de sacarose, determinados em quadruplicata conforme item 3.2.3, obtidos a 30°C, usando como substrato uma solução de sacarose de concentração 50g/L, em tampão acetato, pH 4,5 obteve-se uma atividade média de 4,06 U_S (grama de açúcar redutor produzido por litro, por minuto, por grama de invertase em pó comercial).

O teor de proteína determinado pelo método de Lowry conforme o item 3.2.2, foi de 15% de proteína na enzima em pó comercial.

4.2 – Influência da Temperatura e do pH na Atividade de Invertase Livre

Os resultados da influência simultânea do pH e da temperatura na atividade enzimática de invertase solúvel, definidos pelo Planejamento Composto Central conforme item 3.2.5, estão representados na Tabela 4.1.

A Tabela 4.1 – Matriz com resultados obtidos para avaliar a influência da temperatura e pH.

Experimentos	Valor real (valor codificado)		Atividade enzimática (U _S)
	Temperatura (°C) (x ₁)	pH (x ₂)	
1	30 (-1)	3,0 (-1)	6,95
2	70 (1)	3,0 (-1)	2,15
3	30 (-1)	6,0 (1)	5,09
4	70 (1)	6,0 (1)	0,06
5	50 (0)	4,5 (0)	18,04
6	50 (0)	4,5 (0)	19,69
7	50 (0)	4,5 (0)	18,58
8	27 (-α)	4,5 (0)	7,66
9	73 (+α)	4,5 (0)	0,18
10	50 (0)	2,8 (-α)	3,01
11	50 (0)	6,2 (+α)	15,12

A atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,06 U_s, na temperatura de 70°C e pH 6,0, a 19,69 U_s no ponto médio do planejamento composto central, onde estão as maiores atividades alcançadas nos ensaios do PCC.

De acordo com a literatura a atividade e estabilidade das enzimas são muito sensíveis a ação da temperatura, desta forma valores altos de temperatura implicaram em desnaturação da enzima como pode ser constatado nos resultados de atividade dos experimentos 2, 4 e 9.

Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função do pH e temperatura realizou-se uma regressão múltipla e analisou os valores de **p** encontrados pelo teste *t- Student*, onde X_1 representa a temperatura e X_2 representa o pH. Estão representados na Tabela 4.2 os parâmetros lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das duas variáveis estudadas.

Tabela 4.2 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	18,1199	2,1614	0,0003
X₁ (L)	-2,775	1,530	0,129
X₁ (Q)	-9,702	2,117	0,0059
X₂ (L)	1,149	1,530	0,372
X₂ (Q)	-5,794	2,117	0,040
X₁X₂	-0,057	1,970	0,977

Utilizando os resultados da atividade enzimática apresentados na Tabela 4.1, após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, obteve-se a Equação 4.1 completa com todos os parâmetros:

$$Atividade = 18,1199 - 2,775.X_1 + 1,149.X_2 - 9,702.X_1^2 - 5,794.X_2^2 - 0,057.X_1X_2 \quad (4.1)$$

O modelo com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação ajustada 4.2.

$$Atividade = 18,1199 - 2,775.X_1 - 9,702.X_1^2 - 5,794.X_2^2 \quad (4.2)$$

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,84 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na obtenção da atividade de enzima imobilizada, mostrando que 84% da variabilidade dos dados foram explicadas pela Equação 4.2.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.3, verifica-se que o F_{calc} foi altamente significativo ($p < 0,004$). O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.2.

Tabela 4.3 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	493,8654	3	164,62	12,44	0,003
Resíduos	92,6132	7	13,23		
Total	586,4787				

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

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

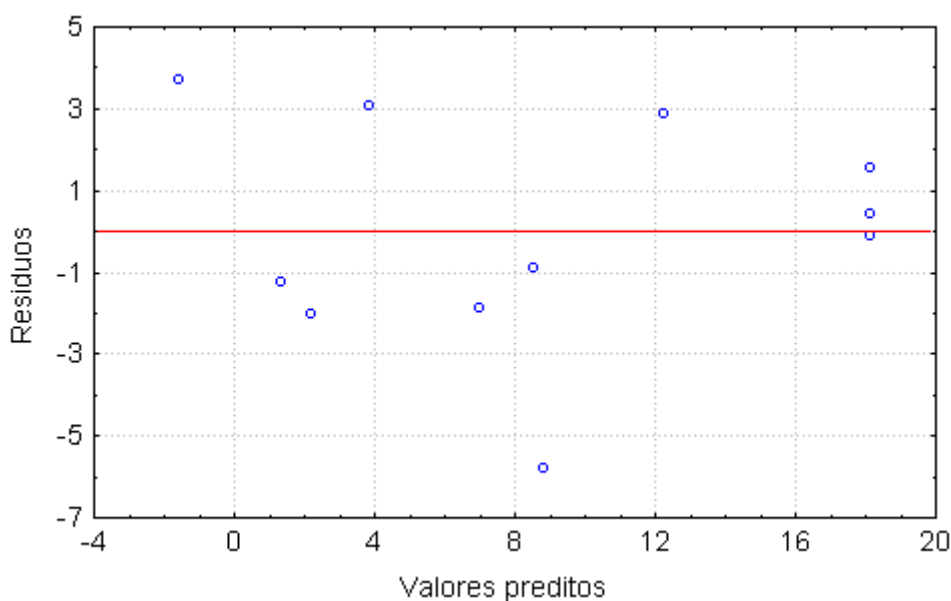


Figura 4.1 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

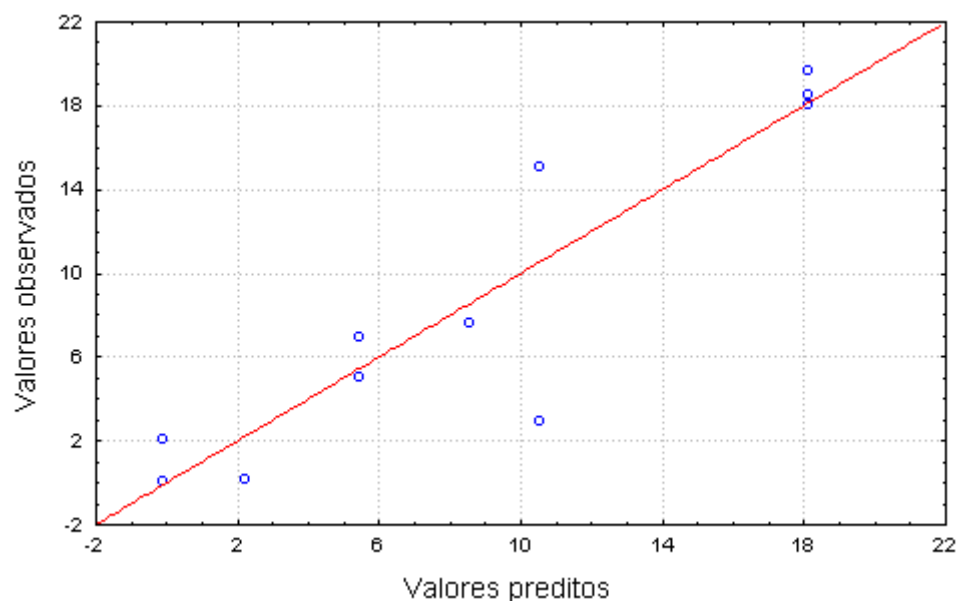


Figura 4.2 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

Observando a Figura 4.1, vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.2, nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

O modelo foi significativo, assim foi possível construir uma superfície de resposta para analisar a região de interesse. A superfície esta representada na Figura 4.3.

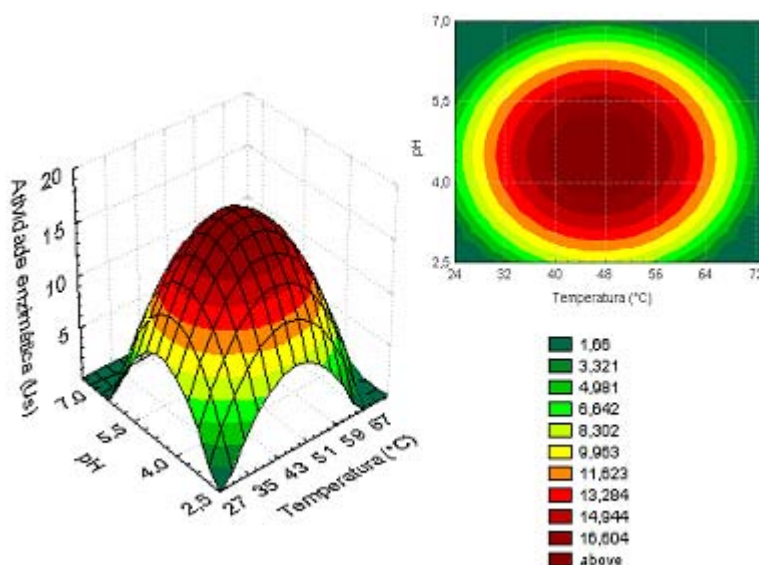


Figura 4.3 - Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de invertase livre.

Observa-se pela superfície de resposta que para uma faixa de temperatura e pH próximos ao ponto central do PCC, a atividade enzimática obtida é máxima. Assim a faixa de temperatura que alcança a máxima atividade está entre 39 a 55°C e o intervalo de pH está compreendido entre 3,7 a 5,1.

Na maioria dos trabalhos citados na literatura a faixa de temperatura e pH ótimos está próxima à deste trabalho. No trabalho de BAGAL & KARVE (2006), as influências da temperatura e do pH foram analisadas isoladamente uma da outra, mas mesmo assim obtiveram resultados próximos aos deste estudo. A faixa de temperatura que resultou em alta atividade ficou compreendida entre 30 e 50°C e o pH 4,5 foi o responsável pela maior atividade enzimática.

A fim de obter o ponto estacionário que maximiza a resposta de atividade enzimática no processo de imobilização, realizou-se uma análise canônica utilizando a equação completa (Equação 4.1). Implementou-se um algoritmo no programa *Maple VIII* para calcular o ponto estacionário de obtenção da máxima atividade enzimática. As variáveis das coordenadas $X_1 = -0,15$ e $X_2 = 0,13$, representam os valores codificados que maximizam a resposta.

Utilizando as equações de codificação (3.9) e (3.10) obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da atividade enzimática, sendo a temperatura (X_1) igual a 47°C e o pH (X_2) igual a 4,7.

Para a validação do modelo, foi realizado experimentos nas condições do ponto ótimo encontrado e a atividade obtida pelo ensaio foi de 17,38 U_s, sendo a atividade prevista pelo modelo (Equação 4.2) igual a 18,21 U_s.

4.3 – Estabilidade de Invertase Livre em Relação ao pH

A influência do pH na estabilidade de invertase solúvel foi estudada, incubando-se amostras de solução de invertase com atividade conhecida, em soluções tampão 10⁻¹ M, a 25°C durante 24 horas, a valores de pH na faixa de 3,0 a 8,0, com intervalos de 0,5. Utilizou-se o tampão acetato para o estudo de pH no intervalo de 3,0 a 6,0 e o tampão citrato-fosfato para pH 6,5 a 8,0. Após 24 horas, foram determinadas suas atividades residuais a 30°C (condição de temperatura que garante alta estabilidade térmica), utilizando solução de sacarose 50 g/L em tampão pH 4,5 (condições

recomendada pelo fabricante). Na Figura 4.4 são representadas as atividades relativas, A/A_0 , definidas pela relação entre a atividade após 24 horas de incubação e a inicial.

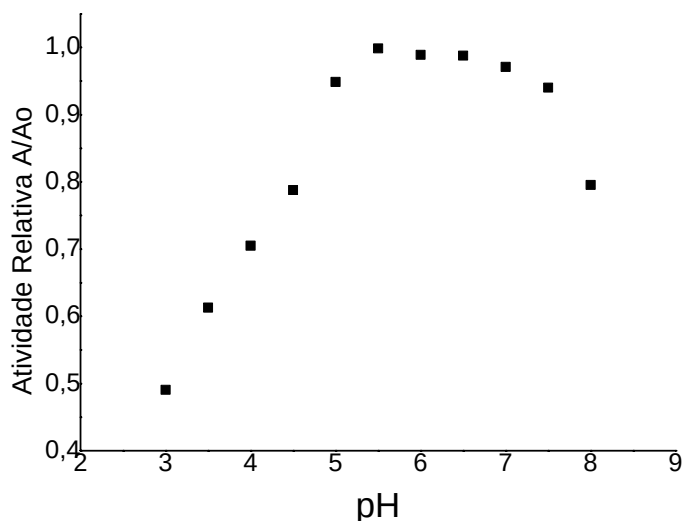


Figura 4.4 – Influência do pH na estabilidade de invertase solúvel.

Verifica-se pela Figura 4.4 um aumento da estabilidade de invertase solúvel para pH variando de 3,0 a 5,5, não perdendo atividade entre pH 5,5 até 7,5 e a partir desse ponto, com o aumento do pH houve um decréscimo da atividade relativa. O pH para a obtenção de máxima atividade enzimática obtida no item 4.2 foi de 4,7, próximo a faixa de estabilidade de invertase livre.

4.4 – Estabilidade Térmica de Invertase Livre

A influência da temperatura na estabilidade da invertase solúvel foi estudada conforme a o item 3.2.7. As atividades relativas em função do tempo de incubação, a várias temperaturas, estão apresentadas na Figura 4.5.

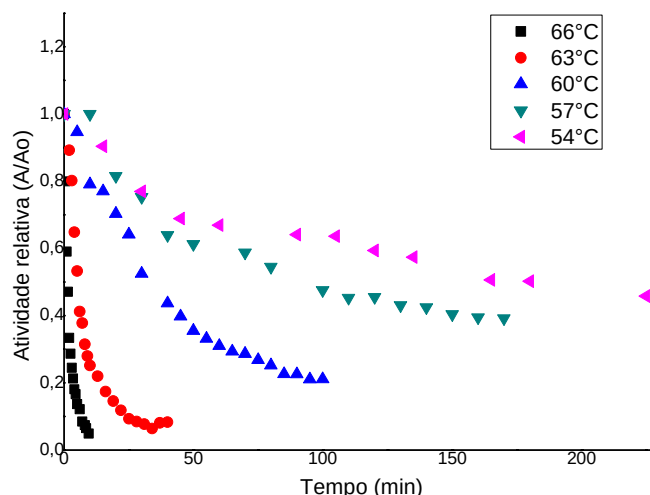
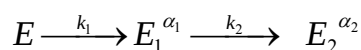


Figura 4.5 – Atividade relativa (A/A_0), em função do tempo, para as temperaturas estudadas.

Uma análise da Figura 4.5 evidencia a forte dependência da estabilidade térmica da enzima solúvel com a temperatura. Temperaturas maiores que 60°C implicam em rápida desnaturação da proteína enzimática.

Os resultados de atividade relativa em função do tempo de incubação às 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 3.11, 3.12 e 3.13 são representativas do mecanismo de desativação dado pelo modelo acima e os seus parâmetros cinéticos foram ajustados por regressão não-linear.

Para as temperaturas de 54 a 66°C as Equações 3.11, 3.12 e 3.13 foram ajustadas por uma regressão não-linear pelo método Quasi-Newton (BISHOP, 1975) e Levenberg-Marquardt (MOREÉ, 1977) utilizando o software *Statistica 7.0* e na Tabela 4.4 estão os resultados do melhor ajuste com os coeficientes de determinação para cada equação, os quadrados dos desvios, com os respectivos parâmetros ajustados e análise de significância, utilizando o teste *t-Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentam níveis de significância menores que 10%.

Tabela 4.4 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica.

Temperatura 66°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	Temperatura 57°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq.									Eq.								
3.11	k ₁	0,37051	p	0	0,99	0,013			3.11	k ₁	0,0068	p	0	0,93	0,0005		
3.12	k ₁	0,3986	p	0	0,98	0,032			3.12	k ₁	0,0173	p	0	0,98	0,0002		
	α_1	0,0297	p	0,248						α_1	0,3640	p	0				
3.13	k ₁	-0,0839	p	0,987	0,99	0			3.13	k ₁	0,0260	p	0,01	0,99	0,0004		
	α_1	5,8596	p	0,984						α_1	0,5248	p	0				
	k ₂	0,4250	p	0						k ₂	0,0025	p	0,08				
	α_2	0,0421	p	0,276						α_2	0,0032	p	0,86				
Temperatura 63°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	Temperatura 54°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq.									Eq.								
3.11	k ₁	0,1210	p	0	0,98	0,157			3.11	k ₁	0,0043	p	0	0,90	0,049		
3.12	k ₁	0,1380	p	0	0,99	0,016			3.12	k ₁	0,0155	p	0,0	0,98	0,0007		
	α_1	0,0570	P	0,05						α_1	0,4800	p	0				
3.13	k ₁	0,1157	p	0,99	0,78	0			3.13	k ₁	0,045	p	0,01	0,95	0,008		
	α_1	-0,2518	p	0,99						α_1	0,7166	p	0				
	k ₂	0,1158	p	0,99						k ₂	0,0023	p	0,02				
	α_2	0,087	p	0,001						α_2	0,0115	p	0,64				
Temperatura 60°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$									
Eq.																	
3.11	k ₁	0,0186	p	0	0,98	0,0086											
3.12	k ₁	0,0236	p	0	0,99	0,0020											
	α_1	0,0900	p	0,001													
3.13	k ₁	0,029	p	0	0,99	0,000002											
	α_1	0,195	p	0,177													
	k ₂	0,0038	p	0,335													
	α_2	0,031	p	0,189													

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

Para a temperatura de 66°C somente a Equação 3.11 foi ajustada com parâmetros significativos. A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos modelos estão representados na Figura 4.6.

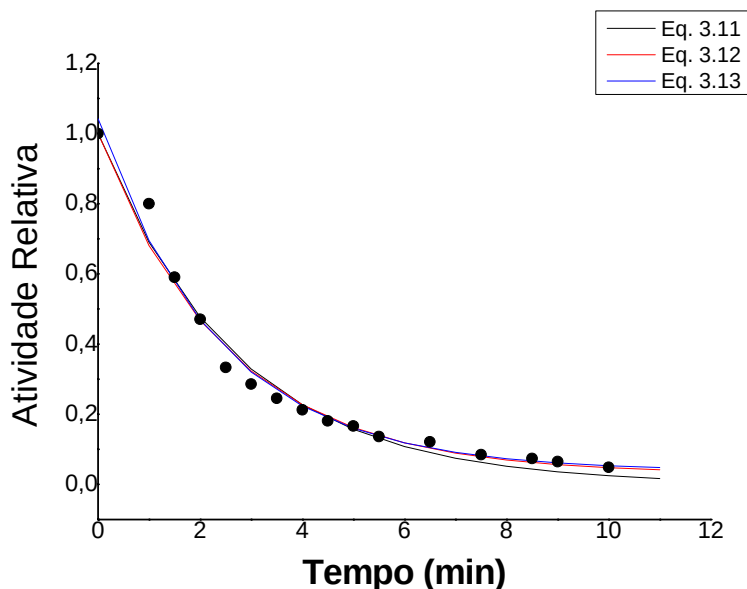


Figura 4.6 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 66°C.

Analisando a Figura 4.6 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos. O ajuste com a Equação 3.11 obteve coeficiente de determinação igual a 0,99 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,013. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.3.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,3705.t)} \quad (4.3)$$

Com as temperaturas 63°C e 60°C foi possível ajustar as Equações 3.11 e 3.12 com parâmetros significativos, mas o melhor ajuste foi a Equação 3.12, devido ao menor valor dos quadrados dos desvios e maior valor encontrado do coeficiente de determinação. Os resultados experimentais e os ajustados pelos modelos estão representados nas Figuras 4.7 e 4.8, para a temperatura de 63°C e 60°C, respectivamente.

Os parâmetros ajustados pelos modelos da Equação 3.12 estão representados na Equação 4.4 para a temperatura de 63°C e na Equação 4.5 para temperatura de 60°C, com coeficiente de determinação igual a 0,99 para as duas temperaturas.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,057).e^{(-0,138.t)} + 0,057 \quad (4.4)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,09).e^{(0,0236.t)} + 0,09 \quad (4.5)$$

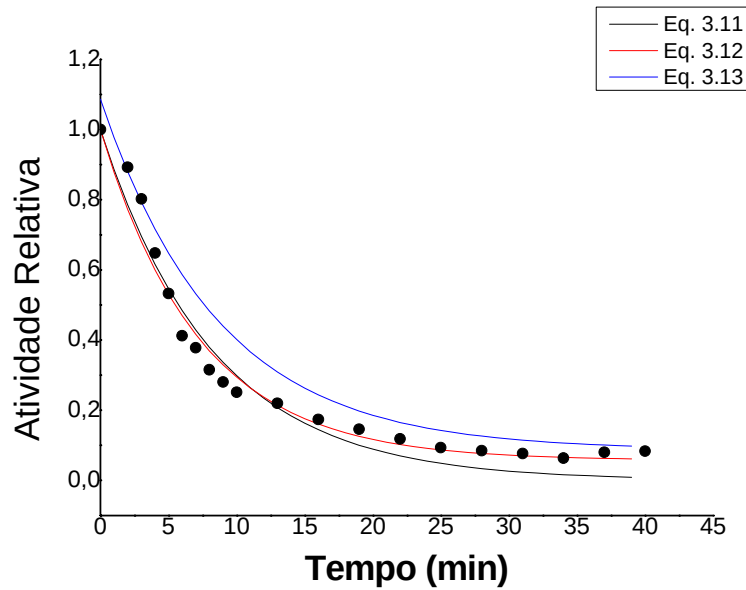


Figura 4.7 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C.

Para as menores temperaturas analisadas neste estudo, ou seja, para as temperaturas 57 e 54°C, os resultados de atividade relativa foram ajustados às Equações 3.11, 3.12 e 3.13, obtendo todos parâmetros significativos apenas nas Equações 3.11 e 3.12. Observa-se na Tabela 4.4 que o parâmetro α_2 para a Equação 3.13 não é significativo para nenhuma das duas temperaturas. Os ajustes dos modelos estão representados nas Figuras 4.9 e 4.10 para 57°C e 54°C, respectivamente. Foram escolhidos o modelo da Equação 3.12 como os mais adequados devido aos coeficientes de determinação 0,99 para 57°C e 0,98 para 54°C e aos menores valores da somatória dos quadrados de desvios.

Os modelos com os parâmetros ajustados pela Equação 3.12 estão representados na Equação 4.6 para 57°C e Equação 4.7 para temperatura de 54°C.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,364).e^{(-0,0173.t)} + 0,364 \quad (4.6)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,463).e^{(-0,0155.t)} + 0,463 \quad (4.7)$$

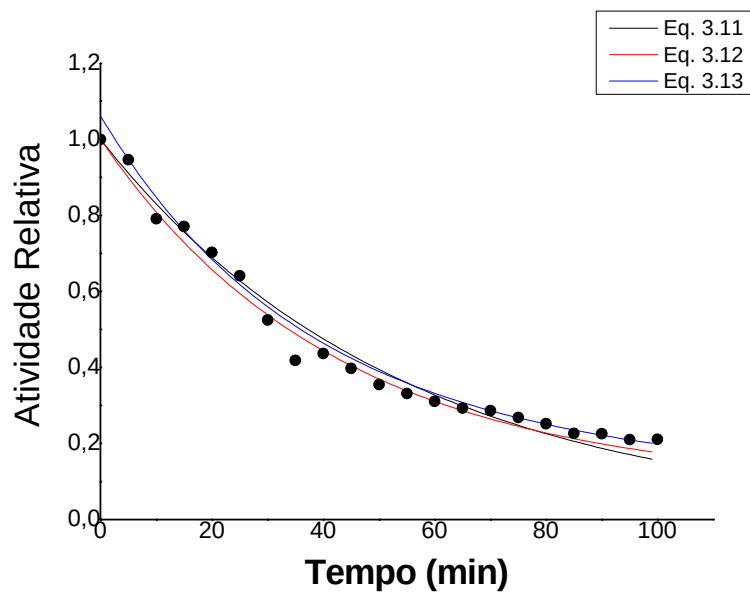


Figura 4.8 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 60°C.

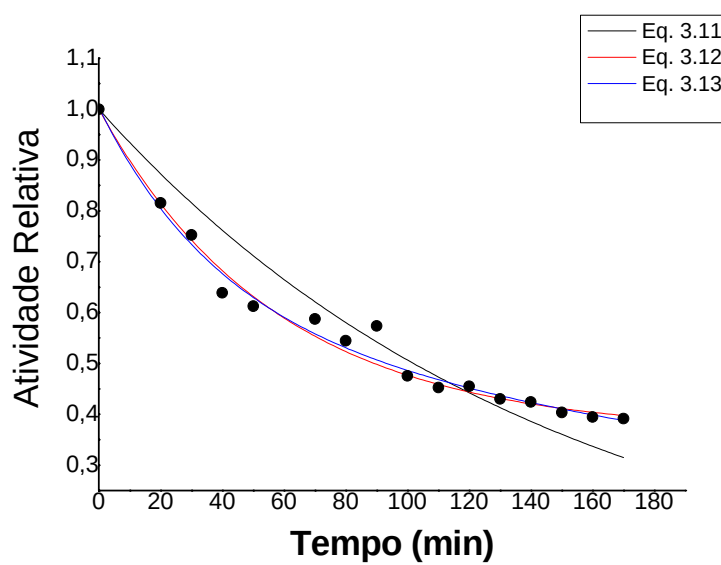


Figura 4.9 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C.

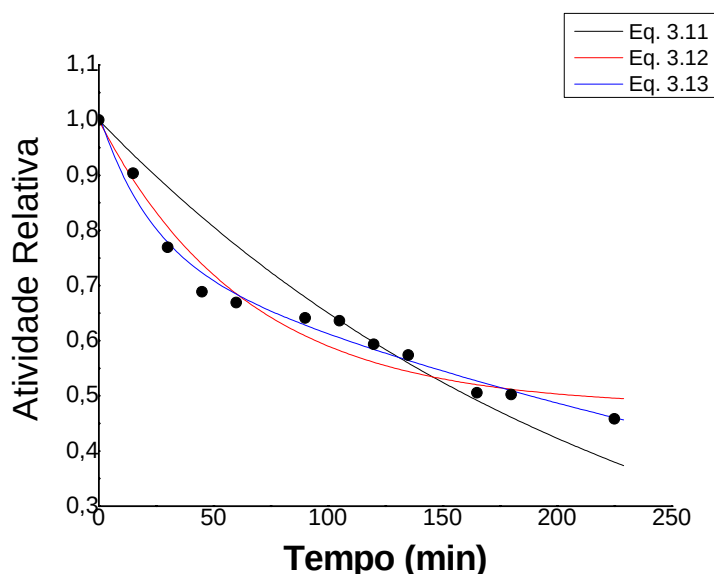


Figura 4.10 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 54°C.

Observa-se que quanto maior a temperatura melhor é o ajuste à cinética da Equação 3.11, enquanto as temperaturas mais baixas se ajustam melhores aos outros modelos cinéticos.

Além disso, 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 a Equação de Arrhenius, k_d é diretamente proporcional à temperatura.

Com as constantes de ativação do processo de desativação térmica dos modelos de melhor ajuste para cada temperatura foram calculados os tempos de meia-vida, apresentados na Tabela 4.5, pela Equação 3.11, 3.12 e 3.13.

Tabela 4.5 – Tempo de meia vida para cada temperatura.

Temperatura (°C)	k_d	Equação do Modelo	$t_{1/2}$ (min)
66	0,370	3.11	1,87
63	0,138	3.12	5,47
60	0,024	3.12	33,78
57	0,017	3.12	89,16
54	0,015	3.12	210,19

Uma regressão linear com os resultados de k_d em função da temperatura foi possível determinar a energia de ativação do processo de desativação térmica com a equação de Arrhenius (Equação 3.15), como pode ser observado na Figura 4.11.

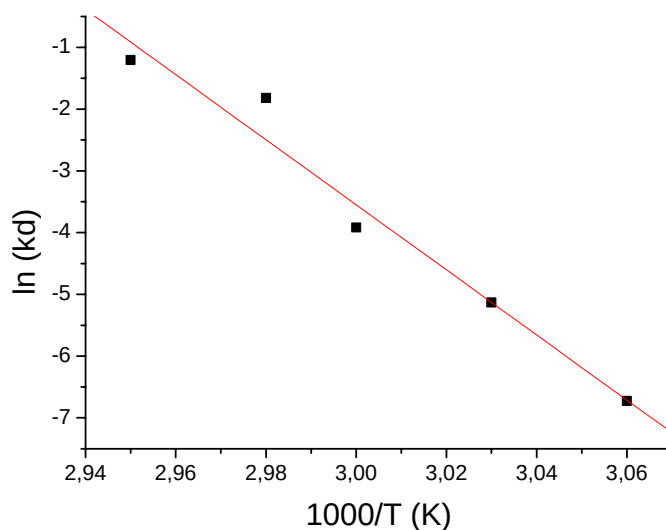


Figura 4.11 – Regressão linear da equação de Arrhenius.

O ajuste linear obtido alcançou uma determinação de 0,99 e está representada na Equação 4.8.

$$\ln(Kd) = -53077,24.(1/T) + 155,65 \quad (4.8)$$

Assim a energia de ativação encontrada foi da ordem de 360 kJ/mol ou 86 kcal/mol.

4.5 – Influência da Concentração de Substrato na Cinética da Reação da Enzima Livre

Os resultados experimentais de taxas iniciais de reação de hidrólise de sacarose, com invertase livre, na ausência de produtos de reação, são apresentados na Tabela 4.6. Eles foram obtidos a 30°C, conforme item 3.2.3, usando uma concentração de enzima de 0,01 g/L em tampão acetato 4,5.

Tabela 4.6 – Taxas iniciais de reação (v), em função da concentração inicial de substrato (S), para invertase livre.

Experimentos	Concentração inicial sacarose (g/L) - S	Taxas iniciais (U_S) - v
1	2	4,0
2	5	7,0
3	7,5	9,0
4	10	12,0
5	15	15,0
6	20	16,0
7	30	17,0
8	40	18,0
9	45	19,0
10	50	19,0
11	55	24,0
12	60	22,0
13	70	22,0
14	75	22,0
15	90	21,0
16	100	21,0
17	150	20,0
18	200	18,0
19	250	17,0
20	300	16,0
21	350	14,0
22	450	17,0
23	500	9,0

Os resultados experimentais foram ajustados ao modelo de inibição pelo substrato pela Equação 3.16, e os parâmetros determinados por uma regressão não-linear utilizando o software *Statistica 7.0*. O ajuste alcançou um coeficiente de determinação de 98,7% e uma comparação entre os resultados experimentais e os preditos pelo modelo obtido pode ser observado na Figura 4.12.

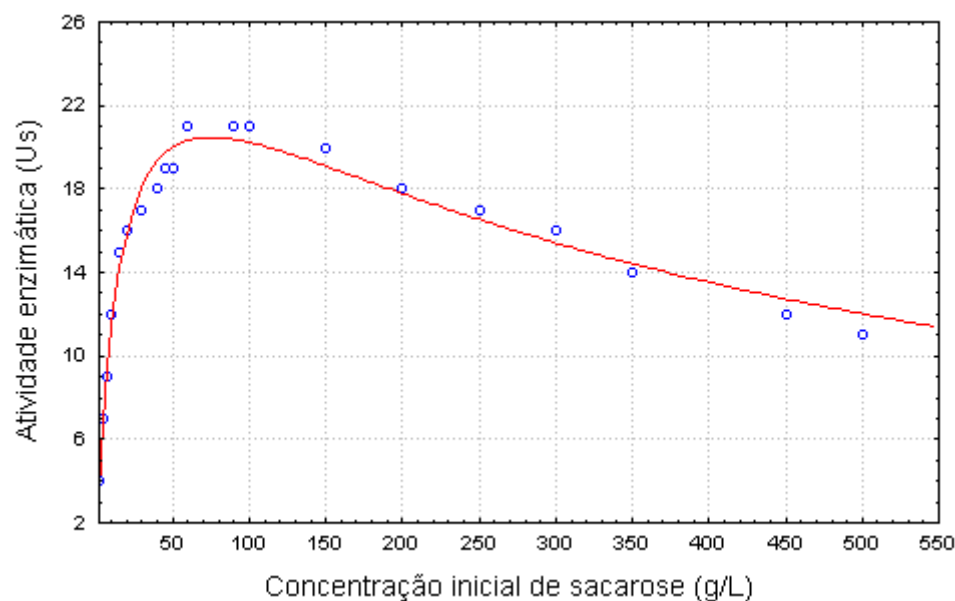


Figura 4.12 – Perfil da influência da concentração de sacarose na atividade da enzima livre.

Os parâmetros ajustados estão apresentados na Equação 4.9.

$$v = \frac{28,917.S}{15,471 + S + \frac{S^2}{363,27}} \quad (4.9)$$

Sendo: $V_m = 28,917 \text{ U}_S = 0,0803 \text{ M}_{\text{sac}}/\text{min}$

$K_m = 15,471 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{L} = 45,2 \text{ mM}_{\text{sac}}$

$K_i = 363,27 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{L} = 1,06 \text{ M}_{\text{sac}}$

Esses valores estão próximos aos valores encontrados na literatura para a invertase livre, por exemplo, no trabalho de ISIK et al. (2003) foi encontrado um K_m de 59mM, em 1989 RIBEIRO encontrou um K_m de 62,3mM. BORA et al. (2004), determinaram um K_m de 25,91Mm e SANJAY & SUGNAN (2005), K_m 26,6mM.

4.6 – Imobilização de invertase

4.6.1 – Escolha do Suporte

As resinas Dowex Marathon A e C da Dow Chemical Company e as resinas Duolite A-568 e Duolite S-761, da Rohm Hass após ativação, foram preliminarmente testadas em triplicatas com relação à retenção de atividade de invertase a partir de soluções da enzima conforme item 3.2.9.1.

Os testes preliminares de imobilização de invertase nas resinas citadas anteriormente indicaram que apenas Duolite A-568 e Duolite S-761 apresentaram atividade enzimática imobilizada, sendo que a atividade alcançada com a primeira foi bastante superior, como pode ser verificado na Tabela 4.7. Em função destes resultados, na sequência do trabalho foi utilizado como suporte para imobilização a resina Duolite A-568.

A unidade utilizada para expressar atividade da invertase imobilizada é U_i (grama de açúcar redutor por litro, minuto, grama de resina).

Tabela 4.7 – Resultados preliminares de imobilização de invertase nas resinas

Resinas	IA (%)	$A_i (U_i)$
Dowex Marathon A	$35,44 \pm 0,31$	0
Dowex Marathon C	$22,70 \pm 0,75$	0
Duolite A-568	$54,81 \pm 0,41$	$0,562 \pm 0,03$
Duolite S-761	$39,10 \pm 1,61$	$0,274 \pm 0,02$

Sendo IA calculada pela Equação 3.17 e A_i a atividade da invertase imobilizada.

A presença de adsorção de proteínas pelas resinas Marathon A e C e a não atividade enzimática pode ser causada pela alteração da forma da enzima ou pela adsorção da resina por proteínas diferentes à invertase.

4.6.2 – Influência do Tempo no Processo de Imobilização

A influência do tempo no processo de imobilização de invertase na resina Duolite A-568 é apresentada na Figura 4.13, na qual verifica-se um aumento significativo de atividade da enzima imobilizada até 24 horas. Com base nestes resultados, todos os experimentos de imobilização realizados neste trabalho utilizaram um tempo de 24 horas.

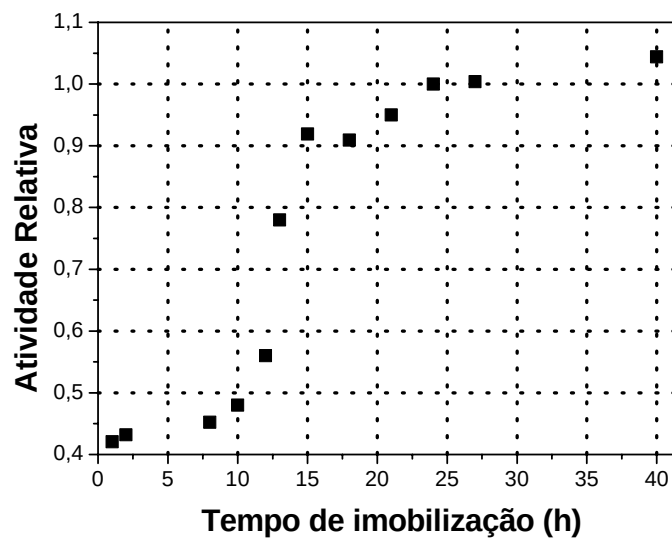


Figura 4.13 – Influência do tempo de imobilização na atividade enzimática relativa da invertase imobilizada.

4.6.3 – Otimização do Processo de Imobilização

Visando otimizar o processo de imobilização de invertase na resina Duolite A-568, foram estudadas as influências conjuntas da temperatura (X_1), pH (X_2) e concentração de enzima (X_3) no meio por um Planejamento Composto Central (PCC), conforme apresentado no item 3.2.9.3. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência da temperatura, do pH e da concentração de invertase no processo de imobilização.

Experimentos	Valor real (valor codificado)			Atividade enzimática (U_i)
	Temperatura °C (X_1)	pH (X_2)	Concentração de invertase - g/L (X_3)	
1	14 (-1)	3,5 (-1)	3,0 (-1)	0,4822
2	14 (-1)	3,5 (-1)	17,0 (1)	2,1956
3	14 (-1)	6,5 (1)	3,0 (-1)	0,5342
4	14 (-1)	6,5 (1)	17,0 (1)	0,7618
5	40 (1)	3,5 (-1)	3,0 (-1)	0,6682
6	40 (1)	3,5 (-1)	17,0 (1)	2,3204
7	40 (1)	6,5 (1)	3,0 (-1)	1,3322
8	40 (1)	6,5 (1)	17,0 (1)	1,7288
9	9 (- α)	5,0 (0)	10,0 (0)	1,9222
10	45 (+ α)	5,0 (0)	10,0 (0)	3,2266
11	27 (0)	3,0 (- α)	10,0 (0)	1,3176
12	27 (0)	7,0 (+ α)	10,0 (0)	2,6404
13	27 (0)	5,0 (0)	0,5 (- α)	0,4144
14	27 (0)	5,0 (0)	19,5 (+ α)	4,2622
15	27 (0)	5,0 (0)	10,0 (0)	4,5354
16	27 (0)	5,0 (0)	10,0 (0)	5,0254
17	27 (0)	5,0 (0)	10,0 (0)	4,9366

Observa-se pela Tabela 4.8 que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,4144 U_i à 5,0254 U_i . Os maiores valores de atividade alcançados foram nos ensaios do ponto central do PCC.

Os resultados experimentais de atividade enzimática imobilizada foram ajustados por regressão múltipla. Assim, estão representados na Tabela 4.9 os termos lineares, as interações e os termos quadráticos das três variáveis estudadas e as respectivas análises do **p** valor encontrado, que é uma consequência do teste *t Student*.

Tabela 4.9 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	4,66	0,389	0,000006
X₁ (L)	0,33	0,219	0,177
X₁ (Q)	-1,01	0,289	0,009
X₂ (L)	0,041	0,219	0,856
X₂ (Q)	-1,34	0,289	0,002
X₃ (L)	0,79	0,219	0,008
X₃ (Q)	-1,14	0,289	0,005
X₁X₂	0,18	0,265	0,515
X₁X₃	0,013	0,265	0,96
X₂X₃	-0,34	0,265	0,237

Após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, utilizando os resultados da atividade enzimática apresentados na Tabela 4.9, obteve-se a Equação 4.10 completa:

$$\text{Atividade} = 4,66 + 0,33.X_1 + 0,041.X_2 + 0,79.X_3 - 1,01.X_1^2 - 1,34.X_2^2 - 1,14.X_3^2 + 0,18.X_1X_2 + 0,013.X_1X_3 - 0,34.X_2X_3 \quad (4.10)$$

Devido a grande variedade inerente aos processos bioquímicos que envolvem enzimas, foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p < 0,1$). Observa-se na Tabela 4.9 que as variáveis não significativas do modelo foram a temperatura e o pH nos seus termos lineares ($X_1(L)$ e $X_2(L)$), as interações temperatura/pH (X_1X_2), temperatura/concentração de enzima (X_1X_3) e pH/concentração de enzima (X_2X_3).

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 4.11.

$$\text{Atividade} = 4,6598 + 0,7886.X_3 - 1,018.X_1^2 - 1,3432.X_2^2 - 1,147.X_3^2 \quad (4.11)$$

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,87 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na obtenção da atividade de enzima imobilizada, mostrando que 87% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta (Equação 4.11).

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.10 verifica-se que o F_{calc} foi significativo ($p < 0,01$). O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos nas Figuras 4.14 e 4.15.

Tabela 4.10 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	37,6094	9	4,1788	7,4179	0,0075
Resíduos	3,9434	7	0,5633		
Total	41,5527				

$$F_T = F_{9; 7; 0,1} = 2,72$$

A Figura 4.14 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero e a Figura 4.15, a representação dos valores preditos em função dos observados.

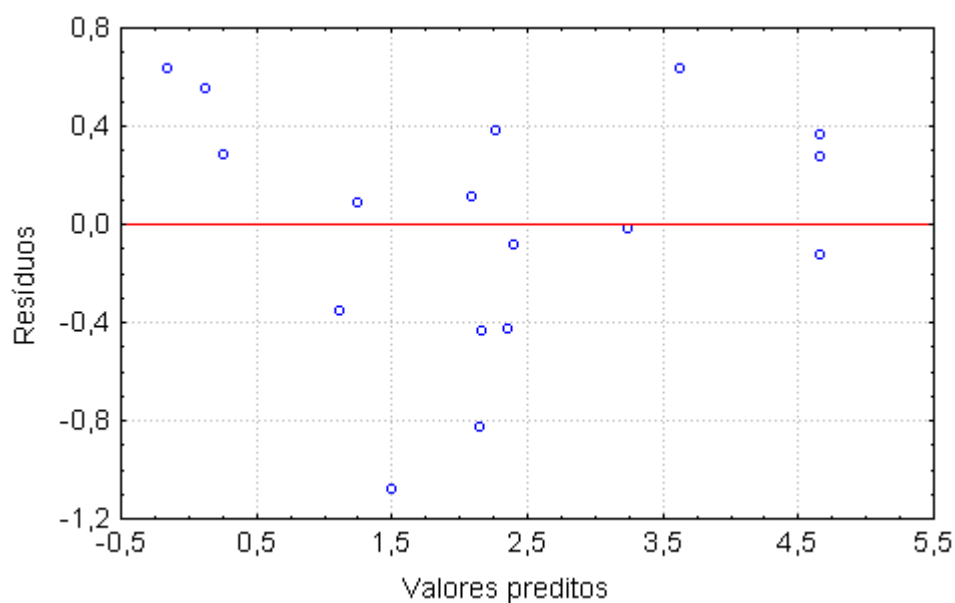


Figura 4.14 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.

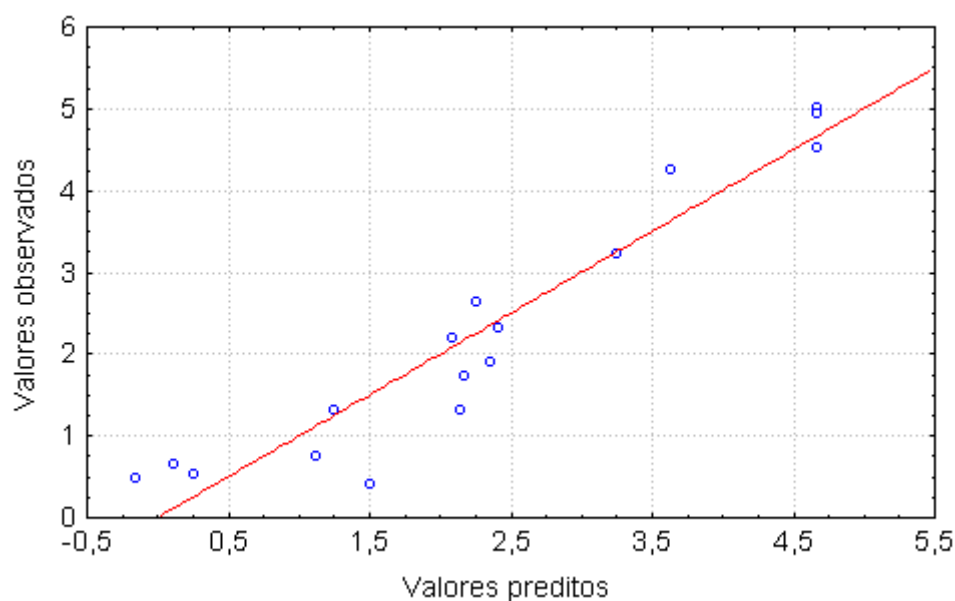


Figura 4.15 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

Observando a Figura 4.14, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.15, nota-se que as respostas experimentais para

obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

Como o modelo foi significativo foi possível construir as superfícies de respostas, analisadas duas a duas, e definir regiões de interesse. As superfícies estão representadas nas Figuras 4.16, 4.17 e 4.18.

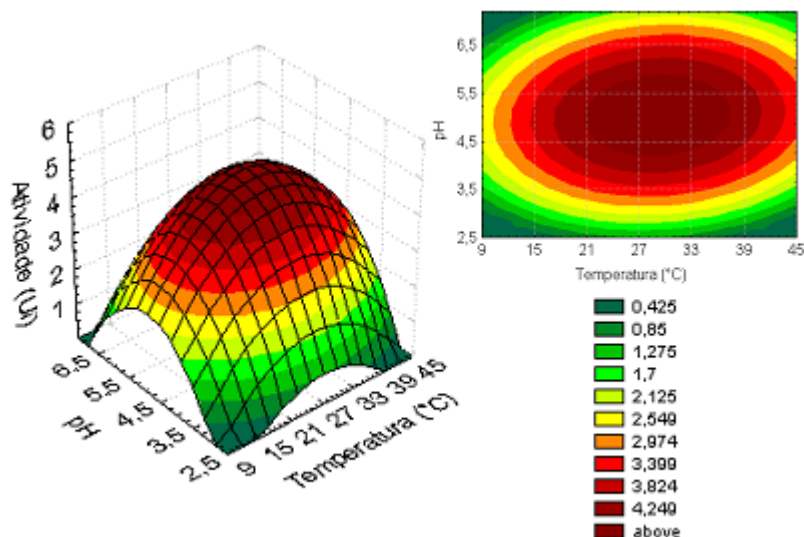


Figura 4.16 – Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade de invertase imobilizada no processo de imobilização de invertase em Duolite A-568.

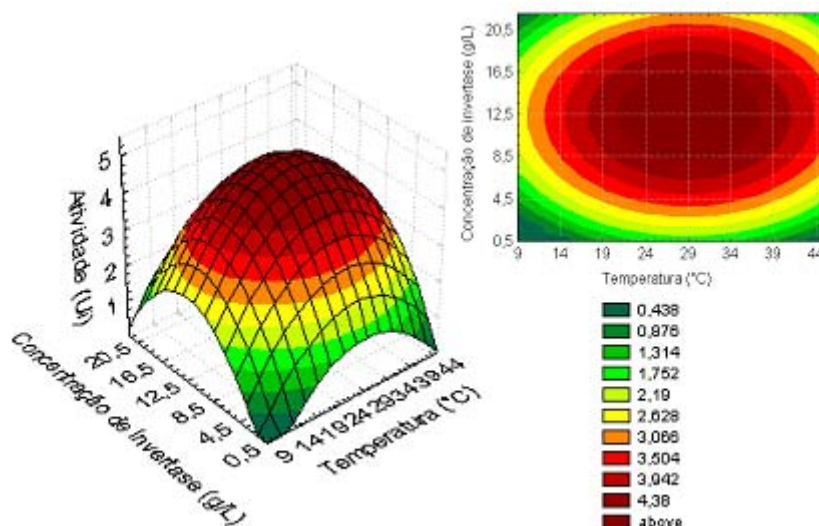


Figure 4.17 – Superfície de resposta da influência da temperatura e da concentração de enzima na atividade de invertase imobilizada no processo de imobilização de invertase em Duolite A-568.

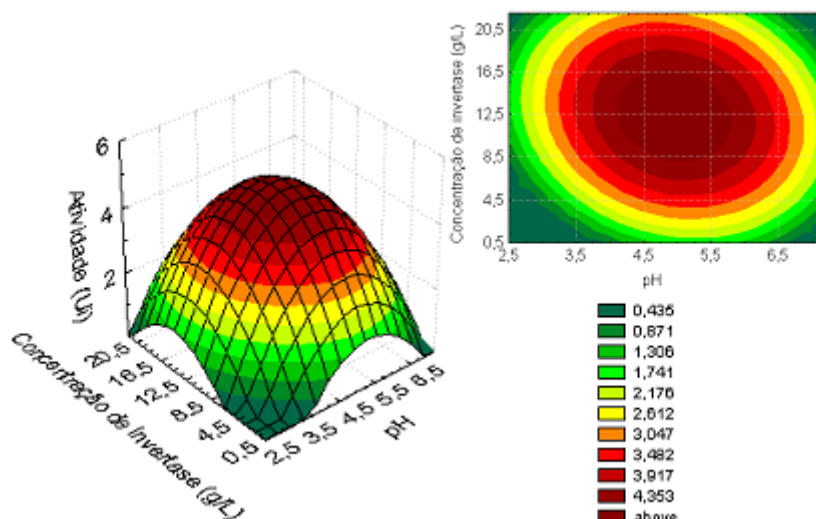


Figure 4.18 – Superfície de resposta da influência do pH e da concentração de enzima na atividade de invertase imobilizada no processo de imobilização de invertase em Duolite A-568.

Observa-se que em todas as superfícies existe uma região correspondente à uma resposta máxima. Analisando as Figuras 4.16, 4.17 e 4.18 observa-se que a faixa de pH e de temperatura correspondente à máxima atividade esta compreendida próxima ao ponto central, a região de máxima atividade engloba a temperatura de 21 a 36°C e o pH de 4,2 a 5,7. Nas Figuras 4.17 e 4.18, observa-se que a região de maior atividade correspondente à concentração enzimática está um pouco deslocada para a esquerda, ou seja, engloba o ponto central e acima dele, a concentração de invertase varia de 8,5 a 16,5 g/L na região de máxima atividade obtida.

A fim de obter o ponto estacionário que maximiza a resposta de atividade enzimática no processo de imobilização, realizou-se uma análise canônica utilizando a equação completa (Equação 4.10). As variáveis das coordenadas $X_1 = 0,058$; $X_2 = 0,210$ e $X_3 = 0,508$, representam os valores codificados que maximizam a resposta.

Utilizando as Equações de codificação 3.18, 3.19 e 3.20 obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da atividade enzimática. Os valores encontrados para a maximização da atividade foram a temperatura (X_1) igual a 29°C, o pH (X_2) igual a 5,0 e concentração de invertase (X_3) igual a 12,5 g/L.

No trabalho de ARICA & BAYRAMOGLU (2006) a condição que melhor adsorveu invertase em um suporte à base de polietilenoimina foi pH 5,5, utilizando a proporção de 52 mg de invertase por grama de catalisador a 20°C.

Para a validação do modelo, foram realizados experimentos nas condições do ponto ótimo encontrado e a atividade obtida pelo ensaio foi 4,606 U_i e calculando-se a

atividade enzimática pelo modelo da Equação 4.11, obteve-se atividade de 4,704 U_i , próxima da experimental.

4.6.4 – Otimização da Imobilização em Relação à Temperatura e pH

Utilizando-se as melhores condições para imobilizar invertase por adsorção na resina fracamente básica Duolite A-568, estudou-se as condições de temperatura e pH que resultaria em maior atividade enzimática, representadas por X_1 e X_2 , respectivamente. Conforme a matriz de planejamento de experimento composto central apresentada no item 3.2.9.4, estes foram realizados obtendo resposta para cada ensaio, apresentada na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Matriz com os resultados obtidos de atividade enzimática de invertase imobilizada para avaliar a influência da temperatura e do pH.

Experimentos	Valor real (valor codificado)		Atividade enzimática (U_i)
	Temperatura °C (X_1)	pH (X_2)	
1	17 (-1)	3,0 (-1)	2,667
2	17 (-1)	7,2 (1)	1,972
3	70 (1)	3,0 (-1)	0,233
4	70 (1)	7,2 (1)	1,400
5	13 ($-\alpha$)	5,1 (0)	2,200
6	74 ($+\alpha$)	5,1 (0)	0,126
7	44 (0)	2,7 ($-\alpha$)	4,382
8	44 (0)	7,5 ($+\alpha$)	4,000
9	44 (0)	5,1 (0)	4,623
10	44 (0)	5,1 (0)	4,062
11	44 (0)	5,1 (0)	4,905

A atividade alcançada durante os experimentos variou de 0,126 U_i , na temperatura mais alta do planejamento (experimento 6), à 4,905 U_i , no ponto médio do Planejamento Composto Central (experimento 11). As maiores atividades alcançadas estão nos experimentos 9,10 e 11, ou seja nos ensaios do ponto médio do PCC, observa-se grande reprodutividade das respostas de atividade enzimática nestes experimentos.

Com as atividades obtidas pelo planejamento é possível avaliar um modelo matemático para descrever o processo. Assim, estão representados na Tabela 4.12 os termos lineares, as interações e os termos quadráticos das duas variáveis estudadas obtidos por uma regressão múltipla e os respectivos valores de **p** encontrados pelo teste *t- Student*.

Tabela 4.12 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	4,557	0,182	0,000002
X₁ (L)	-0,812	0,129	0,0015
X₁ (Q)	-2,624	0,179	0,00002
X₂ (L)	0,005	0,129	0,9696
X₂ (Q)	-0,324	0,179	0,1294
X₁X₂	0,465	0,166	0,03840

Utilizando os resultados da atividade enzimática apresentados na Tabela 4.12, após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, obteve-se a Equação 4.12 completa:

$$\text{Atividade} = 4,557 - 0,812.X_1 + 0,005.X_2 - 2,624.X_1^2 - 0,324.X_2^2 + 0,465.X_1X_2 \quad (4.12)$$

O parâmetro avaliado pelo teste de hipótese utilizando a estatística *t de Student* que apresentou nível de significância maior que 10% foi negligenciado, como o pH no seu termo linear $X_2(L)$. Com a eliminação deste, obteve-se as seguintes relações apresentadas na Tabela 4.12.

O modelo com as variáveis significativas codificadas esta representado na Equação 4.13.

$$\text{Atividade} = 4,557 - 0,812.X_1 - 2,624.X_1^2 - 0,324.X_2^2 + 0,465.X_1X_2 \quad (4.13)$$

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,98 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na obtenção da atividade de enzima imobilizada.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.13, verifica-se que o F_{calc} foi altamente significativo ($p < 0,0001$). O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.19 e 4.20.

Tabela 4.13 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.

Fonte de variação	Soma de quadrados	de graus de liberdade	de Quadrado médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	29,4924	5	5,8985	52,9967	0,000025
Resíduos	0,5565	5	0,1113		
Total	30,0489				

$$F_T = F_{5; 5; 0,1} = 3,45$$

A Figura 4.19 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero e a Figura 4.20, a representação dos valores preditos versus observados.

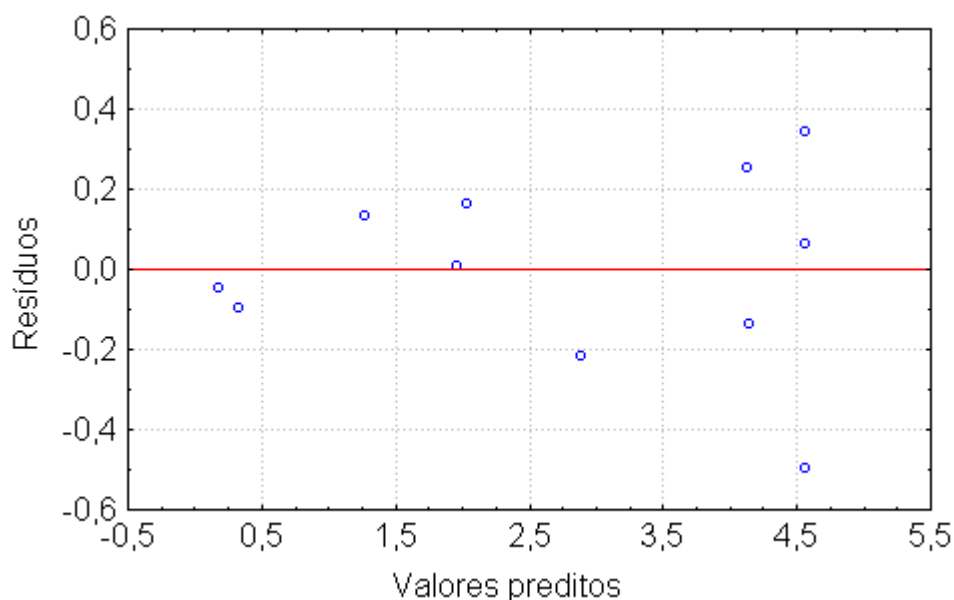


Figura 4.19 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.

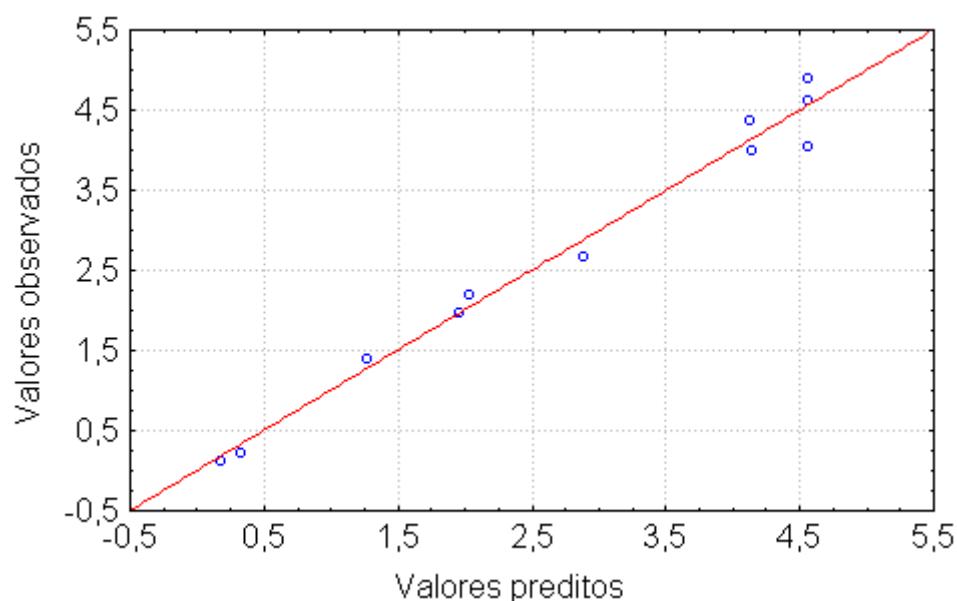


Figura 4.20 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

Observando a Figura 4.19, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.20, nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica, com coeficiente de determinação de 98%.

O modelo foi altamente significativo, assim foi possível construir uma superfície de resposta para analisar a região de interesse. A superfície está representada na Figura 4.21.

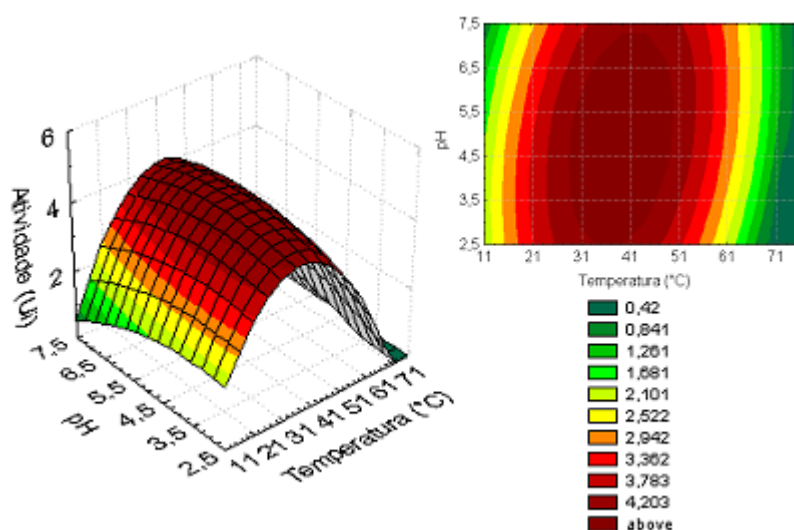


Figura 4.21 - Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de invertase imobilizada.

Observa-se pela superfície de resposta que para uma faixa de temperatura próxima ao ponto central do PCC, para toda a faixa de pH estudada a atividade enzimática obtida é máxima. Assim a faixa de temperatura que alcança a máxima atividade esta entre 30,0 a 49,0°C.

A fim de obter o ponto estacionário que maximiza a resposta de atividade enzimática no processo de imobilização, realizou-se uma análise canônica utilizando a equação completa (Equação 4.12). Implementou-se um algoritmo no programa *Maple* VIII para calcular o ponto estacionário de obtenção da máxima atividade enzimática. As variáveis das coordenadas $X_1 = -0,1644$ e $X_2 = -0,1097$, representam os valores codificados que maximizam a resposta.

Utilizando as equações de codificação 3.21 e 3.22 obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da atividade enzimática. Os valores encontrados para a maximização da atividade foram na temperatura (X_1) de 40°C e pH (X_2) de 4,9.

No trabalho de TOMOTANI & VITOLO (2006), a temperatura e o pH ótimo encontrada para invertase imobilizada na resina Dowex 1x4 foi de 45°C e 5,0, respectivamente, valores próximos aos obtidos neste trabalho. A diferença que o estudo realizado por estes autores para otimizar os valores de temperatura e pH foram feitos isolados, fixando um pH de 5,5 para encontrar a melhor temperatura de trabalho e fixando uma temperatura de 37°C para encontrar o pH ótimo.

A fim de validar o modelo, foram realizados experimentos nas condições do ponto ótimo encontrado e a atividade média obtida pelos ensaios foi de 4,82 U_i . Comparando com a atividade enzimática prevista pelo modelo utilizando os valores codificados do ponto estacionário na Equação 4.13 o valor obtido foi igual a 4,63 U_i , próximo ao dos ensaios.

O valor de pH de máxima atividade enzimática foi praticamente o mesmo, tanto para a enzima na forma livre, quanto imobilizada. Estes resultados contrariam aqueles de TOMOTANI & VITOLO (2006) que imobilizaram a invertase em uma resina aniônica Dowex 1X4, e verificaram que o pH que maximizou a atividade da enzima imobilizada foi menor que o da enzima na forma livre. Porém, a enzima imobilizada do presente trabalho apresentou uma temperatura ótima menor que a livre,

resultado que está de acordo com os resultados obtidos por TOMOTANI & VITOLO (2006).

4.6.5 – Estabilidade da Enzima Imobilizada em Relação ao Número de Usos

A invertase imobilizada em Duolite A-568 nas condições de imobilização otimizadas no item 4.6.3 foi analisada quanto à estabilidade em relação ao número de usos e os resultados de atividade enzimática residual, determinados conforme item 3.2.9.5, estão representados na Figura 4.22.

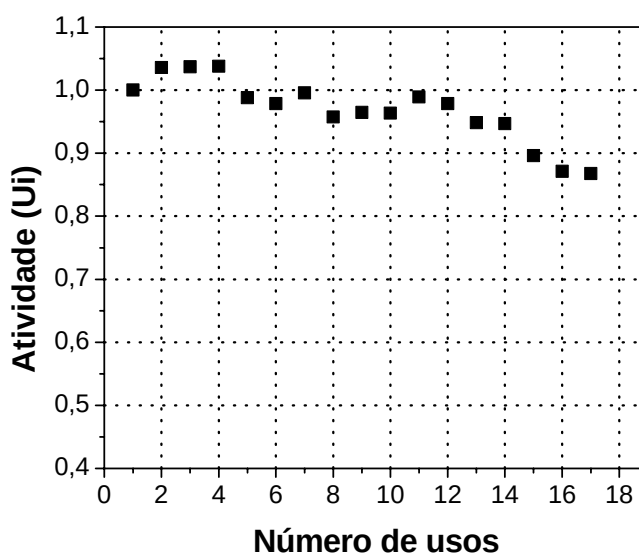


Figura 4.22 – Perfil de atividade enzimática em relação ao número de usos.

Uma análise da Figura 4.22 indica que após 14 processos bateladas a medida de atividade enzimática da enzima imobilizada reteve 90% da original, iniciando uma queda na atividade a partir daí, mantendo 87% da atividade inicial após 17 usos.

Este comportamento da estabilidade enzimática em relação ao pH está de acordo com os resultados de MILOVANOVIC et al. (2006), no qual após 40 ciclos manteve 90% da atividade de invertase imobilizada em alginato de cálcio.

4.6.6 – Estabilidade de Invertase Imobilizada em Relação ao pH

A estabilidade da invertase imobilizada em relação ao pH foi analisada, incubando-se amostras da enzima imobilizada, de atividade conhecida, em soluções tampão 10^{-1} M, a 25°C durante 24 horas, a valores de pH variando de 3,0 a 8,0, em

intervalos de 0,5, conforme o item 3.2.9.6. Na Figura 4.23 são representadas as atividades relativas, A/A_0 , definidas pela relação entre a atividade após 24 horas de incubação e a inicial em função do pH.

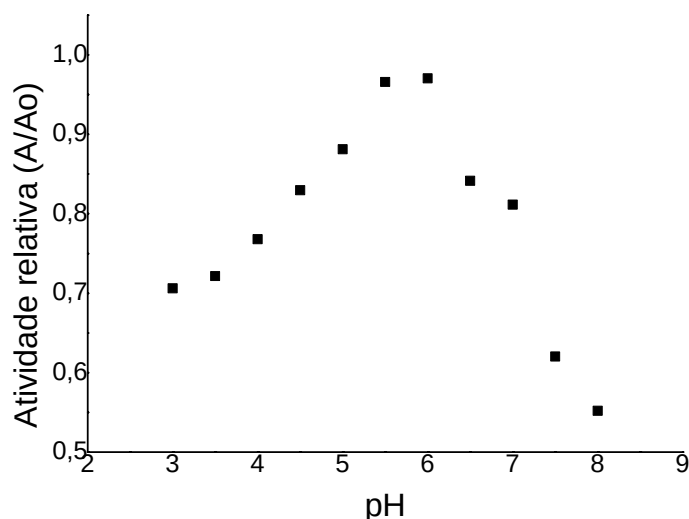


Figura 4.23 – Influência do pH na estabilidade de invertase imobilizada em Duolite A-568.

Observa-se na Figura 4.23 um aumento da estabilidade de invertase imobilizada para pH variando de 3,0 a 5,5, praticamente não perdendo atividade entre 5,5 a 6,0, uma faixa bem menor se comparada à enzima livre, que se mostrou estável na faixa de 5,5 a 7,5. Segundo TOMOTANI & VITOLO (2006), ARICA & BAYRAMOGLU (2006), DAVID et al. (2006), o pI (ponto isoelétrico) de invertase situa-se na faixa de pH 3,4 a 4,5, o que significa que para valores baixos de pH há um predomínio de cargas positivas nas moléculas da enzima, facilitando o seu desprendimento da resina. Por outro lado para valores altos de pH ocorre uma tendência de ligação dos grupos $(OH)^-$ presentes no meio na resina competindo com a ligação da enzima na resina.

Para uso do biocatalisador imobilizado pode ser conveniente usar um pH do meio reacional na faixa de maior estabilidade, uma vez que a influência do pH na atividade da enzima imobilizada é pouco significativa na faixa de 2,7 a 7,5 conforme Figura 4.21. Nos experimentos de estabilidade em relação ao pH, durante 24 horas de incubação em pH 5,0, a atividade enzimática residual foi de 88%, o que justifica trabalhar na faixa de maior estabilidade.

Este comportamento da estabilidade relativa ao pH, com uma faixa pequena de estabilidade está de acordo com o trabalho de COUTINHO FILHO et al. (2005), onde a estabilidade ficou na faixa de 4,5 a 5,0 com invertase imobilizada em sílica de porosidade controlada.

4.6.7 – Estabilidade Térmica da Invertase Imobilizada

A estabilidade térmica da invertase imobilizada foi analisada conforme o item 3.2.9.7. Os resultados de atividade relativa em função do tempo, a várias temperaturas, são apresentados na Figura 4.24.

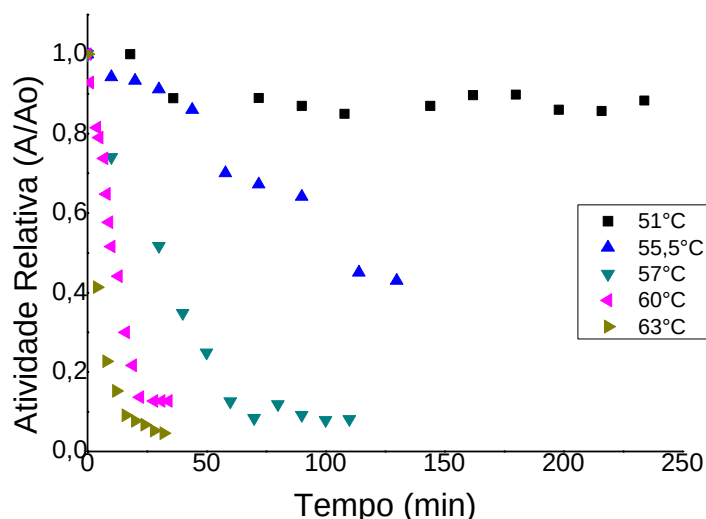
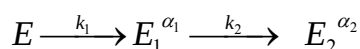


Figura 4.24 – Atividades relativas (A/Ao), em função do tempo, para diferentes temperaturas.

Uma análise da Figura 4.24 evidencia a forte dependência da estabilidade da invertase imobilizada em relação à temperatura. Temperaturas maiores que 57°C implicam em rápida desnaturação da proteína enzimática.

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



Os resultados de atividade relativa (A/Ao) para invertase imobilizada para as temperaturas de 51 a 63°C em função do tempo foram ajustados às Equações 3.11, 3.12

e 3.13 por uma regressão não-linear pelo método Quasi-Newton (BISHOP, 1975) e Levenberg-Marquardt (MORE, 1977) utilizando o software *Statistica 7.0*. Os resultados dos melhores ajustes alcançados para cada temperatura com os coeficientes de determinação para cada equação, os quadrados dos desvios, os respectivos parâmetros ajustados e a análise de significância utilizando o teste *t-Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentam níveis de significância menores que 10%, estão apresentados na Tabela 4.17.

Observa-se na Tabela 4.17 que em nenhuma das temperaturas estudadas foi possível ajustar a cinética de desativação segundo a Equação 3.13, com todos parâmetros significativos, o que também ocorreu no trabalho de COUTINHO FILHO et al. (2005), considerando este modelo, com dois estágios intermediários, como representativo da desativação da invertase imobilizada em sílica de porosidade controlada.

Somente para temperaturas de 51°C e 63°C foi possível ajustar a cinética segundo a Equação 3.12, com parâmetros significativos, como pode ser visualizado pelos valores dos níveis de significância na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Análise da desativação térmica.

Temperatura 63°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	Temperatura 55,5°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq.									Eq.								
3.11	k ₁	0,182	p	0	0,99	0,0039			3.11	k ₁	0,0058	p	0	0,96	0,012		
3.12	k ₁	0,228	p	0	0,99	0,00003			3.12	k ₁	0,0014	p	0,66	0,96	0,007		
	α_1	0,063	p	0						α_1	-1,30	p	0,79				
3.13	k ₁	0,056	p	0,005	0,99	0			3.13	k ₁	0,009	p	0,14	0,98	0		
	α_1	-3,342	p	0,009						α_1	0,906	p	0,07				
	k ₂	0,306	p	0						k ₂	0,03	p	0,57				
	α_2	0,0009	p	0,917						α_2	-0,012	p	0,76				
Temperatura 60°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	Temperatura 51°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq.									Eq.								
3.11	k ₁	0,065	p	0	0,98	0,0038			3.11	k ₁	0,0008	p	0	0,25	0,03		
3.12	k ₁	0,054	p	0	0,97	0,0064			3.12	k ₁	0,023	p	0,09	0,84	0,0003		
	α_1	-0,11	p	0,205						α_1	0,85	p	0,05				
3.13	k ₁	0,0406	p	0,99	0,98	0			3.13	k ₁	5,02	p	0,99	0,27	0		
	α_1	-0,593	p	0,99						α_1	0,9206	p	0				
	k ₂	0,0405	p	0,99						k ₂	0,0003	p	0,39				
	α_2	0,037	p	0,32						α_2	0,0001	p	0,99				
Temperatura 57°C							R ²	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$									
Eq.																	
3.11	k ₁	0,027	p	0	0,99	0,000002											
3.12	k ₁	0,027	p	0,0001	0,99	0,00002											
	α_1	-0,003	p	0,9935													
3.13	k ₁	0,035	p	0,79	0,98	0											
	α_1	0,337	p	0,88													
	k ₂	0,046	p	0,89													
	α_2	0,009	p	0,84													

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

Para a temperatura de 63°C os ajustes alcançados com os modelos das Equações 3.11 e 3.12 apresentaram todos os parâmetros significativos e 0,99 de

coeficiente de determinação. Os ajustes dos resultados experimentais e os previstos pelos modelos estão representados na Figura 4.25.

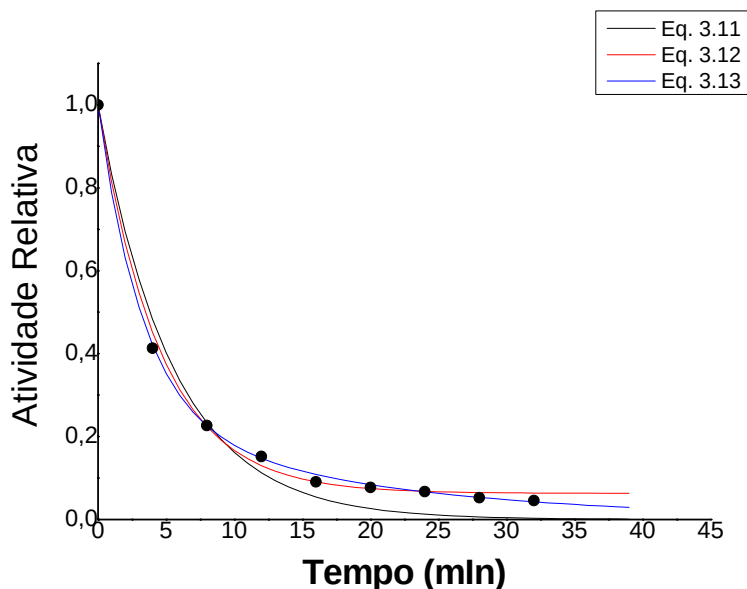


Figura 4.25 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C.

Analisando a Figura 4.25 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,00003 verifica-se que o melhor ajuste entre os valores experimentais e teóricos são obtidos com a Equação 3.12. Os parâmetros ajustados ao modelo estão representados na Equação 4.14.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,063).e^{(-0,228.t)} + 0,063 \quad (4.14)$$

Para as temperaturas de 60 e 55,5°C os modelos cinéticos das Equações 3.12 e 3.13 não se ajustaram de maneira significativa, pois apesar dos coeficientes de determinação serem maiores e os quadrados dos desvios serem menores os parâmetros obtidos não possuem significado físico. O parâmetro α_1 e α_2 são as razões específicas de atividade $\frac{E_1}{E}$ e $\frac{E_2}{E}$, respectivamente, não sendo possível admitir valor negativo.

Assim os ajustes aos modelos cinéticos, para 60 e 55,5°C estão representados nas Figuras 4.26 e 4.27, respectivamente.

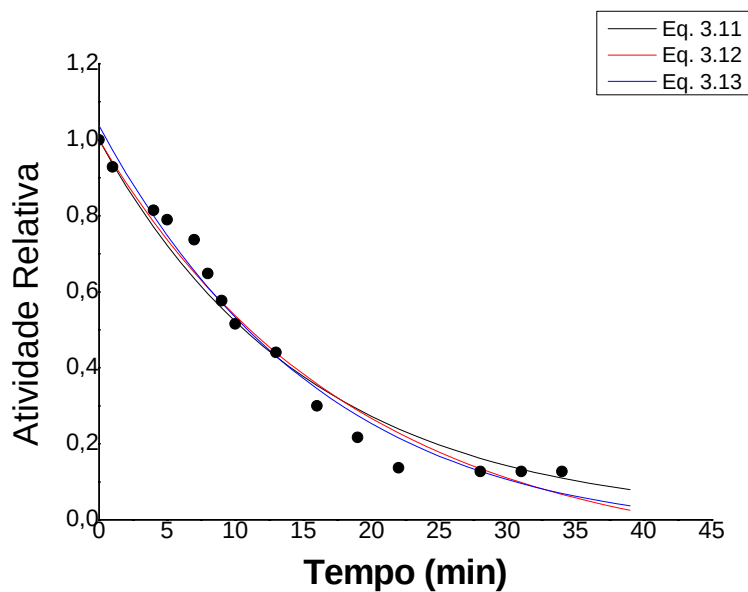


Figura 4.26 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 60°C.

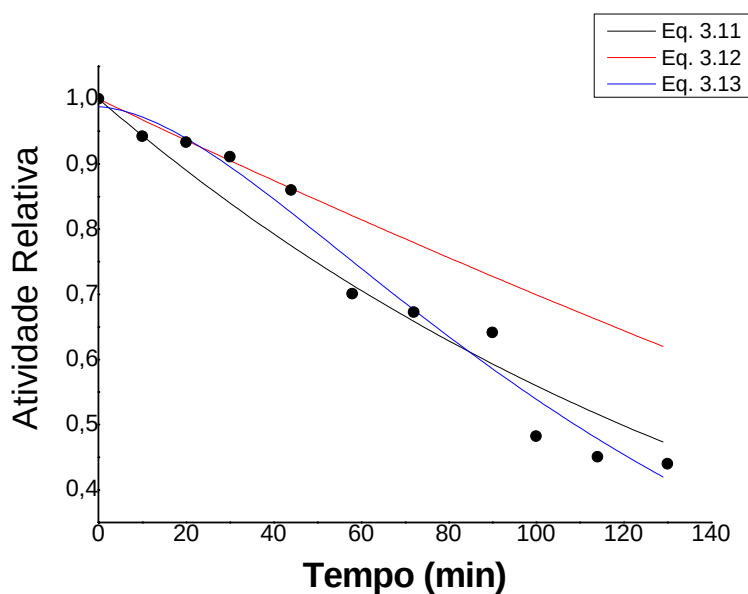


Figura 4.27 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 55,5°C.

Observa-se na Figura 4.26 para temperatura de 60°C um ajuste entre os valores experimentais e teóricos, com a Equação 3.11 obteve-se um coeficiente de determinação igual a 0,98 e soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0038. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.15.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,065.t)} \quad (4.15)$$

Verifica-se um ajuste entre os valores experimentais na temperatura de 55,5 e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,95 e com a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,012 ao ajuste à Equação 3.11. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.16.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0058.t)} \quad (4.16)$$

Comparando os resultados apresentados na Tabela 4.14 para a temperatura de 57°C, para os três tipos de cinética, observa-se que a cinética da Equação 3.11 corresponde ao melhor ajuste devido ao coeficiente de determinação igual a 0,99, ao valor da somatória dos quadrados dos desvios igual a 0,000002 e por apresentar parâmetros significativos. Os ajustes dos modelos cinéticos aos resultados experimentais estão representados na Figura 4.28.

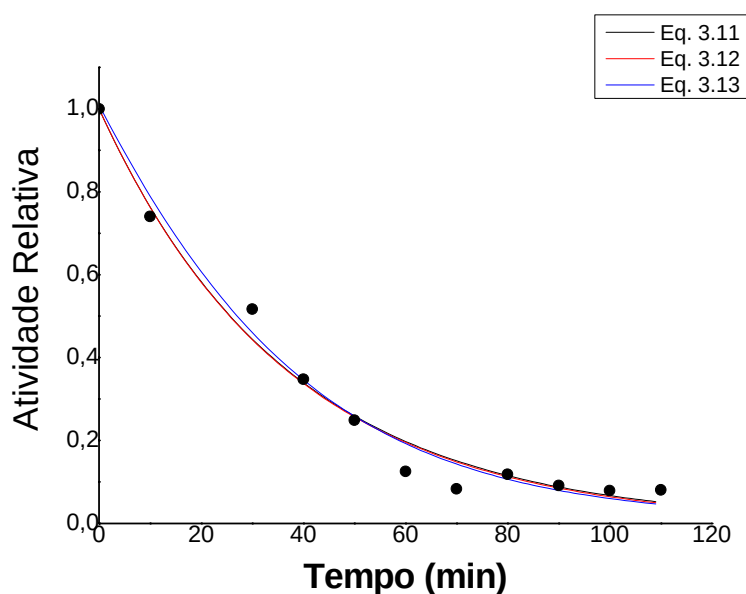


Figura 4.28 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C.

Os parâmetros ajustados ao modelo da Equação 3.11 na temperatura de 57°C está representado pela Equação 4.17.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,027.t)} \quad (4.17)$$

Para a temperatura de 51°C o ajuste da cinética de desativação da Equação 3.11 resultou em um baixo coeficiente de determinação, observado na Tabela 4.14, igual a 0,25. Assim o possível ajuste foi com o modelo cinético da Equação 3.12 o qual apresentou parâmetros significativos. Os ajustes aos modelos estão representados na Figura 4.29.

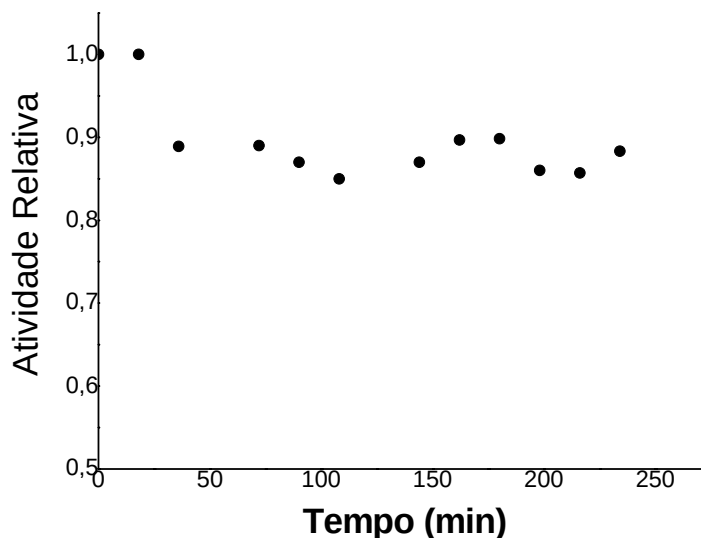


Figura 4.29 - Perfil da desativação térmica na temperatura de 51°C.

As atividades relativas encontradas na temperatura de 51°C são, praticamente, constantes com o tempo, por isso não ajustou a nenhuma das equações que descrevem o modelo de desativação térmica em série, demonstrando ser o biocatalisador imobilizado extremamente estável a baixas temperaturas. Após 4 horas de incubação da enzima imobilizada nesta temperatura, a atividade relativa era da ordem de 90% e não apresentava tendência de queda.

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 4.15, pela Equação 3.14.

Tabela 4.15 – Cálculo do tempo de meia vida para cada temperatura em estudo.

Temperatura (°C)	k_d	Equação do Modelo	$t_{1/2}$ (min)
63	0,228	3.12	3,33
60	0,065	3.11	10,66
57	0,027	3.11	25,67
55,5	0,0058	3.11	119,50
51	0,023*	3.12*	-

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

Os tempos de meia-vida de invertase imobilizada foram menores do que os tempos de meia-vida da invertase livre para as temperaturas 63, 60 e 57°C. Para temperaturas mais baixas, como a de 51°C, para invertase imobilizada e 54°C para invertase solúvel, a enzima imobilizada alcança alto valor no tempo de meia-vida, como pode ser observado comparando as Figuras 4.5 e 4.24.

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

Para encontrar a energia de ativação do processo de desativação térmica realizou-se uma regressão linear na equação de Arrhenius (Equação 3.15), utilizando as constantes de desativação térmica dos melhores ajustes citados na Tabela 4.14, como pode ser observado na Figura 4.30.

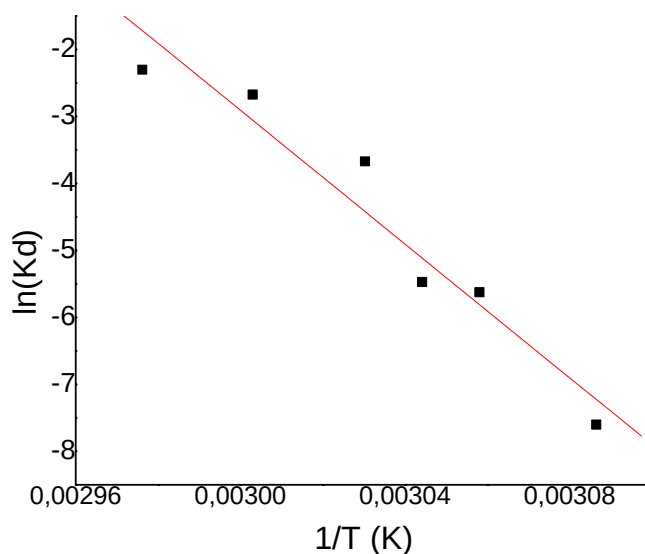


Figura 4.30 – Regressão linear da equação de Arrhenius.

O ajuste linear obtido alcançou uma determinação linear de 0,97 e está representada na Equação 4.18.

$$\ln(k_d) = -49936.(1/T) + 146,9 \quad (4.18)$$

Assim a energia de ativação encontrada foi da ordem de 415 kJ/mol ou 99 kcal/mol.

4.6.8 – Influência da Concentração de Substrato na Cinética da Reação da Enzima Imobilizada

Para invertase imobilizada na resina Duolite A-568, os resultados experimentais de taxas iniciais de reação de hidrólise de sacarose, na ausência de produtos de reação, são apresentados na Tabela 4.16. Eles foram obtidos a 40°C, conforme item 3.2.9.8, usando tampão acetato 5,0.

Tabela 4.16 – Taxas iniciais de reação (v), em função da concentração inicial de substrato (S), para invertase imobilizada.

Experimentos	Concentração inicial sacarose (g/L) - S	Taxas iniciais (U_i) - v
1	5	1,762
2	10	3,351
3	20	5,203
4	30	5,989
5	40	6,069
6	60	6,62
7	70	7,746
8	75	8,02
9	90	8,804
10	150	11,61
11	200	11,82
12	250	10,5
13	350	8,354
14	450	6,392
15	500	6,122

Os resultados experimentais da Tabela 4.16 foram ajustados ao modelo de inibição pelo substrato (Equação 3.16) e os parâmetros determinados por uma regressão não-linear utilizando o software *Statistica 7.0*, gerando a Equação 4.19. O ajuste alcançou um coeficiente de determinação de 0,93 e uma comparação entre os resultados experimentais e os preditos pelo modelo obtido pode ser observado na Figura 4.31.

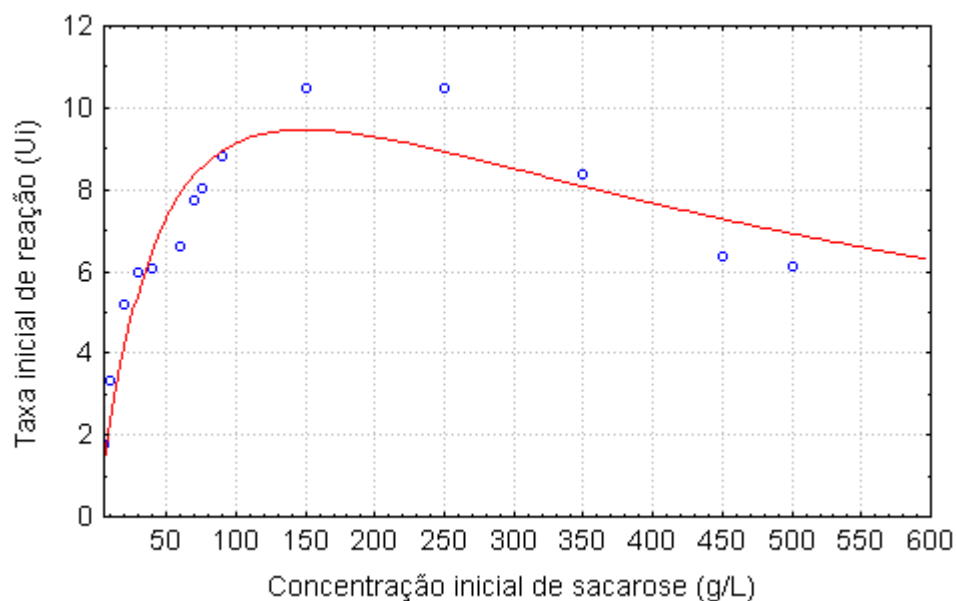


Figura 4.31 – Perfil da influência da concentração de sacarose na atividade da enzima imobilizada.

$$v = \frac{17,09.S}{60,23 + S + \frac{S^2}{370,23}} \quad (4.19)$$

Sendo:

$$V_m = 17,09 \text{ U}_S = 17,09 \text{ g}_{\text{açúcar redutor}}/\text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{invertase}} = 0,047 \text{ M}_{\text{sac}}/\text{min}$$

$$K_m = 60,23 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{L} = 176 \text{ mM}_{\text{sac}}$$

$$K_i = 370,23 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{L} = 1,08 \text{ M}_{\text{sac}}$$

Os parâmetros cinéticos da Equação 4.20 para invertase imobilizada diferiram significativamente com relação à aqueles da enzima livre apresentados na Equação 4.9. Merece destaque o valor da constante de Michaelis (K_m), igual a 176 mM para invertase imobilizada e 45,2 mM para invertase livre, um aumento de 3,9 vezes, fato este que sugere resistências difusionais na hidrólise com a enzima imobilizada.

Os resultados da constante de Michaelis para invertase livre e imobilizada foram próximos aos valores obtidos no trabalho de REBROS et al. (2007), que encontraram K_m de 44,8 mM para solúvel e 160,5 mM para invertase imobilizada em cápsulas de polivinil álcool.

TOMOTANI & VITOLO (2006), obtiveram valores próximos da constante de Michaelis para invertase livre e imobilizada em Dowex 1x4, não sugerindo problemas difusionais. Os efeitos difusionais ocorrido com invertase adsorvida em Duolite A-568 foi menor quando comparado ao efeito de invertase adsorvida em Montmorillonite K-10 no trabalho de SANJAY & SUGUNAN (2005), pois neste trabalho o valor de K_m sofreu um acréscimo de 14 vezes em relação ao da enzima livre. Um aumento de 19 vezes da constante de Michaelis de invertase adsorvida em um polímero de etileno glicol dimetacrilato n-vinil imidazol (poly(EGDMA-VIM)) em relação à enzima livre foi observado no trabalho de OSMAN et al. (2005).

4.6.9 – Influência da Concentração dos Produtos na Cinética da Reação da Enzima Imobilizada

Os resultados experimentais de taxa de reação de hidrólise da sacarose (v) por enzima invertase imobilizada em presença de glicose (G) ou frutose (F) são apresentados na Tabela 4.17. As condições experimentais seguiram o item 3.2.9.9.

Tabela 4.17 - Resultados experimentais de taxa de reação em função das concentrações iniciais de sacarose, glicose e frutose no meio reacional.

S (g/L)	G (g/L)	F (g/L)	v (U _i)
20	0	0	2,858
20	5	0	2,522
20	10	0	2,349
20	15	0	1,62
20	20	0	1,31
30	5	0	3,488
30	10	0	3,305
30	15	0	2,99
30	20	0	2,53
40	0	0	4,473
40	5	0	3,798
40	10	0	3,87
40	15	0	1,62
40	20	0	3,29
40	25	0	2,78
60	0	0	5,48
60	5	0	4,882
60	10	0	3,89
60	15	0	4,28
60	20	0	1,95
60	25	0	3,00
20	0	0	2,507
20	0	5	2,208
20	0	10	2,045
20	0	15	1,68
30	0	0	3,99
30	0	5	3,324
30	0	10	3,2
30	0	15	0,266
40	0	5	4,076
40	0	10	3,71
40	0	15	3,63
40	0	25	3,18
60	0	0	4,827
60	0	5	5,076
60	0	10	5,1
60	0	15	5,06
60	0	20	5,05
60	0	25	2,59

Os resultados da Tabela 4.17 foram ajustados por uma regressão não linear, realizados pelo software *Statistica 7.0*, utilizando o método de Levenberg-Marquardt (MORE, 1977), aos modelos cinéticos Inibição Competitiva, Inibição Não Competitiva, Inibição Acompetitiva, Inibição Mista Linear e Inibição Parcialmente Não Competitiva, representados pelas Equações 3.23, 3.34, 3.35, 3.26 e 3.27, respectivamente. Na Tabela

4.18 estão apresentados os parâmetros ajustados com as respectivas análises de *t-Student*, os coeficientes de determinação e a somatória dos quadrados dos desvios, para o efeito de inibição dado pela glicose.

Tabela 4.18 - Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de glicose como inibidor

Modelos de inibição I = Glicose		V_m	K_m	K_i	α	β	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	R²
Competitiva	Parâmetros	8,89	35,40	17,47	-	-	0,012046	0,96
	Valor-p	0	0,0017	0,0005	-	-		
Não Competitiva	Parâmetros	10,02	49,32	38,023	-	-	0,02957	0,96
	Valor -p	0	0,003	0	-	-		
Acompetitiva	Parâmetros	12,52	73,89	14,78	-	-	0,057141	0,95
	Valor -p	0,001	0,0048	0,018	-	-		
Mista Linear	Parâmetros	8	35	17	34.10 ⁴	-	0,012049	0,95
	Valor -p	0	0	0	0,63	-		
Parcialmente Não Competitiva	Parâmetros	9,98	50,19	99,49	-	-0,01	0,02556	0,96
	Valor -p	0,0001	0,0005	0,62	-	0,42		

Com base nos resultados da Tabela 4.18, os parâmetros com nível de significância menor que 10% na análise *t-Student* foram considerados significativos. Pela análise dos coeficientes de determinação, pelos valores dos quadrados dos desvios, pela significância dos parâmetros pela análise *t-Student* e pelo significado físico dos mesmos, os modelos que melhor se ajustaram foram inibição competitiva e não competitiva pela glicose.

Analizando os ajustes na determinação dos parâmetros do modelo inibição mista linear verifica-se que o parâmetro α apresentou um valor muito alto, igual a 34.10⁴. Substituindo este valor na Equação 3.26 o termo $(G/(\alpha \cdot K_i))$ tende a zero, transformando esta equação na Equação 3.23 do modelo de inibição competitiva, embora todos os outros parâmetros estatístico validem o modelo cinético mista linear.

Os parâmetros do modelo parcialmente não competitivo não foram significativos de acordo com a análise *t-Student*, além disso, o parâmetro β apresentou um valor negativo, sem significado físico, portanto este modelo foi descartado.

Os ajustes dos modelos inibição competitiva (Equação 4.20) e inibição não-competitiva (Equação 4.21) pela glicose estão apresentados nas Figuras 4.32 e 4.34, na forma de superfície de resposta. Nas Figuras 4.33 e 4.35 observa-se que os valores observados experimentalmente estão próximos aos preditos pelos modelos.

$$v = \frac{8,89.S}{\left(S + 35,4 \cdot \left(1 + \frac{G}{17,47} \right) \right)} \quad (4.20)$$

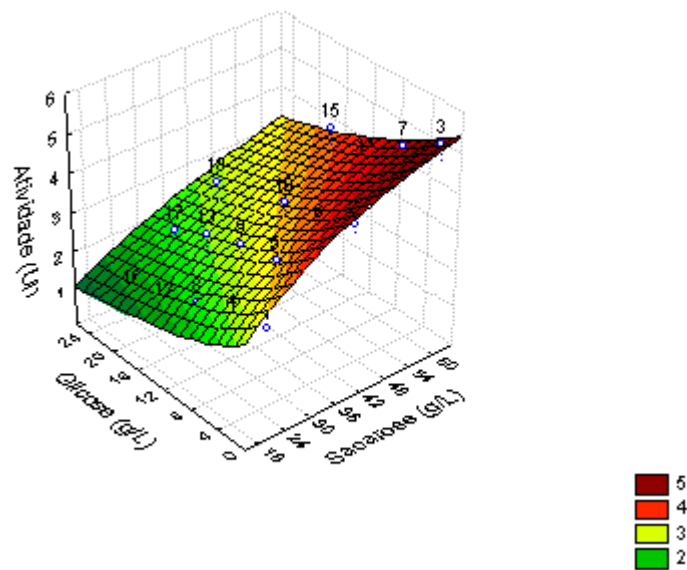


Figura 4.32 – Perfil da influência da concentração de glicose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição competitiva.

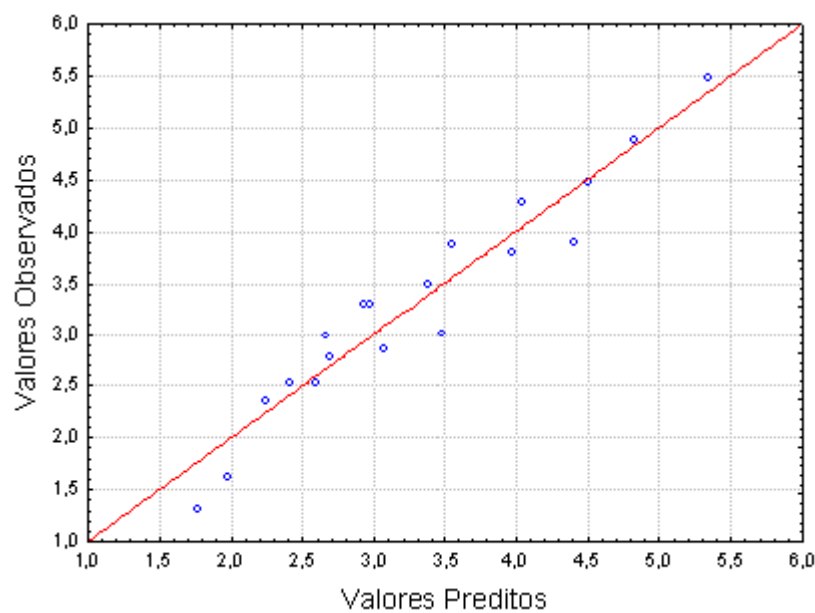


Figura 4.33 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta de atividade enzimática.

$$v = \frac{10,02.S}{\left(49,32 * \left(1 + \frac{G}{14,78} \right) + S * \left(1 + \frac{G}{14,78} \right) \right)} \quad (4.21)$$

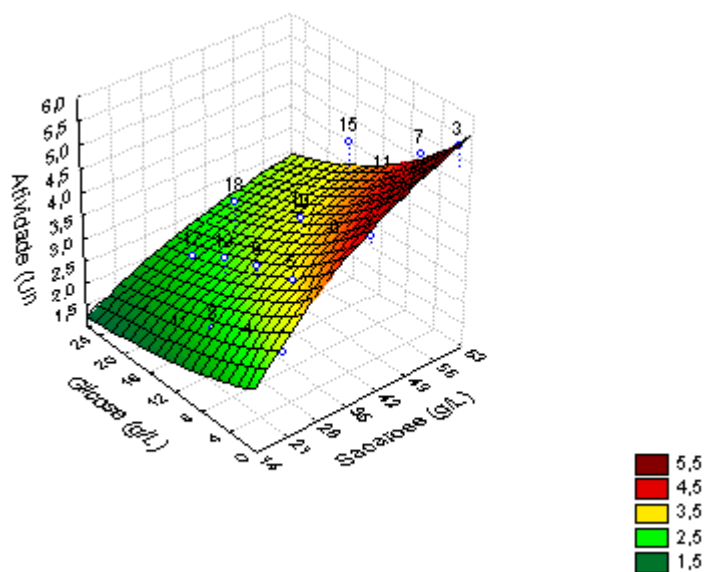


Figura 4.34 – Perfil da influência da concentração de glicose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição não competitiva.

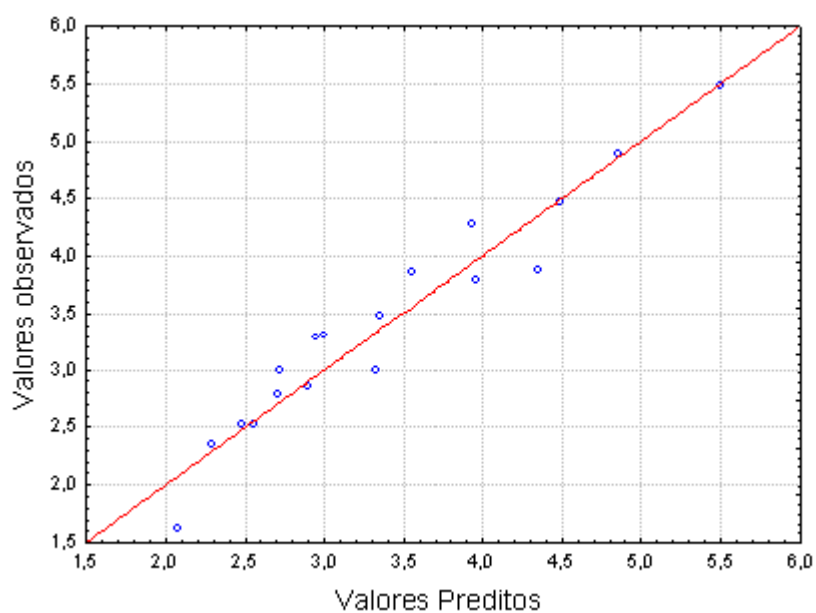


Figura 4.35 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição não competitiva para a resposta de atividade enzimática.

Para o efeito de inibição da frutose estão apresentados na Tabela 4.19 os parâmetros ajustados com as respectivas análises de *t-Student*, os coeficientes de determinação e a somatória dos quadrados dos desvios.

Tabela 4.19 - Parâmetros dos modelos cinéticos estudados em presença de frutose como inibidor:

Modelos de inibição I = Frutose		V_m	K_m	K_i	α	β	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$	R^2
Competitiva	Parâmetros	12,97	85,55	83,72	-	-	0,03091	0,97
	Valor l-p	0,0001	0,036	0,04	-	-		
Não competitiva	Parâmetros	13,93	96,44	147,90	-	-	0,01448	0,97
	Valor -p	0,003	0,005	0,07	-	-		
Acompetitiva	Parâmetros	14,44	104,55	67,19	-	-	0,01418	0,95
	Valor -p	0,021	0,015	0,26	-	-		
Mista linear	Parâmetros	13	86	84	84.10^3	-	0,01436	0,96
	Valor -p	0	0	0	0,59	-		
Parcialmente não competitiva	Parâmetros	13,11	88,22	0,659	-	0,90	0,01436	0,96
	Valor -p	0,0007	0,01	0,92	-	0,93		

Com base nos resultados da Tabela 4.19, os parâmetros com nível de significância menor que 10% na análise *t-Student* foram considerados significativos. Pela análise dos coeficientes de determinação, pelos valores dos quadrados dos desvios, pela significância dos parâmetros pela análise *t-Student* e pelo significado físico dos mesmos, os modelos que melhor se ajustaram foram inibição competitiva e não competitiva pela frutose.

Os ajustes dos modelos inibição competitiva (Equação 4.22) e inibição não-competitiva (Equação 4.23) pela frutose estão apresentados nas Figuras 4.36 e 4.38 na forma de superfície de resposta. Nas Figuras 4.37 e 4.39 observa-se que os valores observados experimentalmente estão próximos aos preditos pelos modelos.

Além disso, comparando os valores dos parâmetros K_i alcançados na inibição pela frutose e pela glicose, conclui-se que a concentração da frutose no meio de reação resulta em menor inibição. Ao contrário dos resultados encontrados no trabalho de COUTINHO FILHO (1996), que obteve valores de K_i próximos à competição provocada pela frutose e pela glicose.

$$v = \frac{12,97.S}{\left(S + 85,55 \cdot \left(1 + \frac{G}{83,72} \right) \right)} \quad (4.22)$$

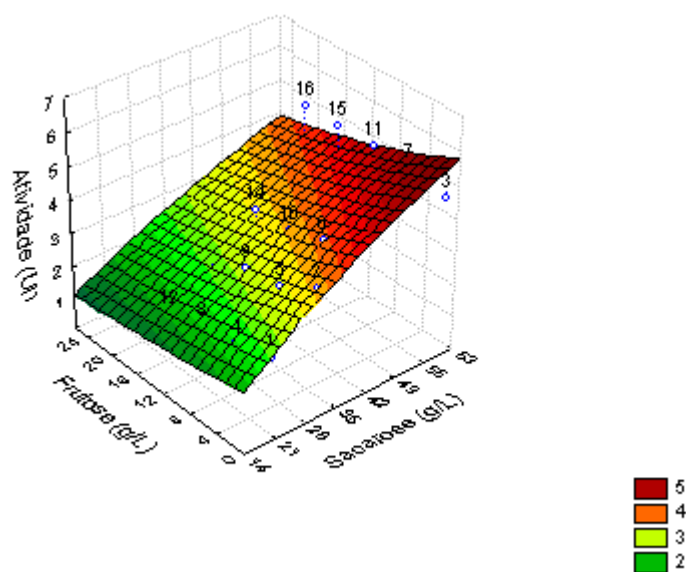


Figura 4.36 - Perfil da influência da concentração de frutose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição competitiva.

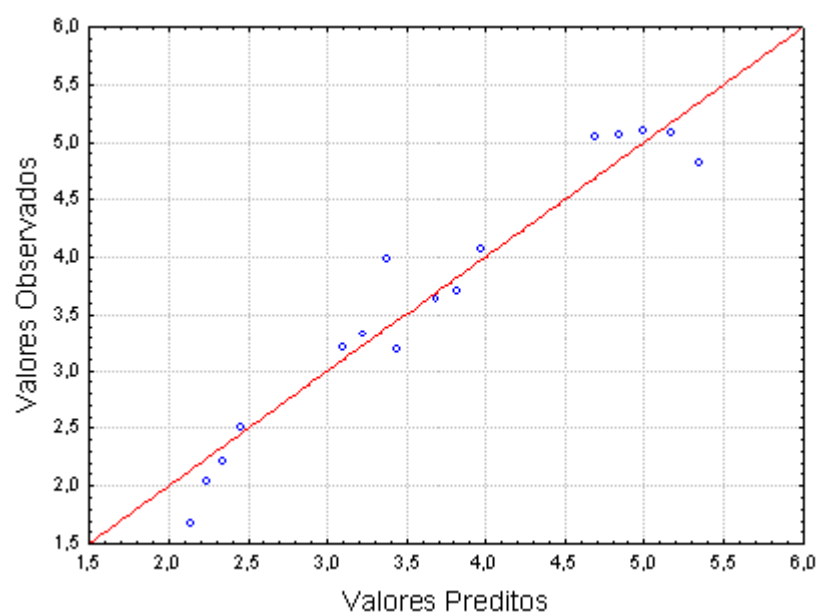


Figura 4.37 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição competitiva para a resposta de atividade enzimática

$$v = \frac{13,93.S}{\left(96,44 * \left(1 + \frac{G}{147,9} \right) + S * \left(1 + \frac{G}{147,9} \right) \right)} \quad (4.23)$$

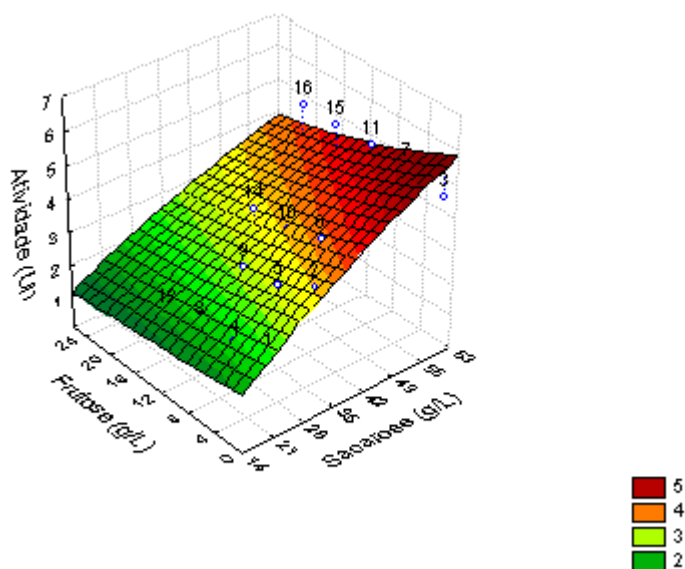


Figura 4.38 – Perfil da influência da concentração de frutose na atividade da enzima imobilizada, pelo modelo de inibição não competitiva.

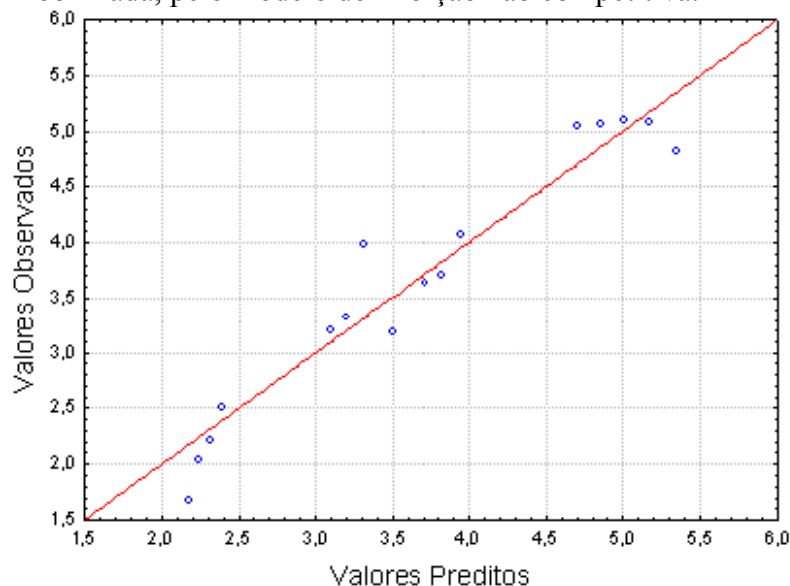


Figura 4.39 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo de inibição não competitiva para a resposta de atividade enzimática

Os resultados da inibição da reação de hidrólise pelos produtos da mesma encontrados por outros pesquisadores não diferem muito dos atuais: COUTINHO FILHO (1996), concluiu pela análise das somatórias dos quadrados dos desvios que tanto a glicose como a frutose comportam-se como inibidores parcialmente não-competitivo. RIBEIRO (1989), verificou-se que a glicose comporta-se como inibidor parcialmente não competitivo e a frutose como inibidor não-competitivo. COMBES E MONSAN (1993), concluíram que a glicose comporta-se como inibidor competitivo e a frutose como inibidor parcialmente não-competitivo.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Entre as resinas estudadas a que apresentou melhores resultados na imobilização de invertase por adsorção e ligação iônica foi a Duolite A-568. As melhores condições no processo de imobilização foram: tempo de imobilização 24 horas, temperatura 29°C, pH 5,0 e concentração da enzima no meio 12,5 g/L.
- A resina de troca iônica Duolite A-568 mostrou-se um bom suporte para imobilizar invertase, pois é 100% regenerável e manteve uma boa estabilidade de usos.
- A temperatura e o pH ótimos para a atividade de invertase solúvel foi 47°C e 4,7, respectivamente, já para invertase imobilizada houve uma redução da temperatura ótima para 40°C e no pH ótimo foi 4,9.
- O intervalo de estabilidade da invertase solúvel em relação ao pH foi entre 5,5 a 7,5, enquanto o intervalo para invertase imobilizada foi de 5,5 a 6,0.
- A estabilidade térmica de invertase livre ou imobilizada possui comportamento semelhante, pois em temperaturas mais altas (66 e 63°C) a atividade relativa segue a Equação de Arrhenius, decrescendo rapidamente com o tempo e para temperaturas mais baixas (57 e 54°C) foi possível ajustar os resultados experimentais pela cinética de desativação em série.
- O biocatalisador imobilizado apresenta uma maior estabilidade térmica em baixas temperaturas se comparado com invertase solúvel.
- A energia de ativação do processo de desativação térmica de invertase solúvel (360 kJ/mol) foi menor do que de invertase imobilizada (415 kJ/mol), demonstrando esta última ser mais sensível à variação de temperatura.
- A reação de hidrólise de sacarose catalisada por invertase livre e imobilizada seguiu o modelo de inibição pelo substrato. O valor de K_m

para enzima imobilizada foi 3,9 vezes maior do que para enzima livre, sugerindo resistência à transferência de massa na catálise com invertase imobilizada.

- O método de imobilização de invertase por adsorção nesta resina é simples e não altera a cinética da reação.
- Em relação à inibição provocada na velocidade de hidrólise pela concentração de produtos no meio reacional, observou-se que a glicose exerce maior inibição que a frutose. Para os dois açúcares redutores, glicose e frutose, os melhores ajustes dos resultados experimentais aos modelos cinéticos foram de inibição competitiva e não competitiva.

5.2 – Sugestões

- Estudar os efeitos difusionais na cinética da reação com o biocatalisador imobilizado;
- Estudar a cinética de hidrólise do processo em reator de leito fixo;
- Testar outras resinas de troca iônica para imobilizar invertase;
- Estudar outros métodos de imobilização nas resinas trocadoras de íons;
- Estudar o processo de imobilização por adsorção e ligação cruzada com glutaraldeído em resinas;
- Estudar a influência de íons metálicos na taxa de reação de hidrólise de sacarose;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S.; ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Immobilization and stabilization of invertase *Cajanus cajan* lectin support. Bioresource Technology, v. 79, p. 121-127, 2001.
- AKGÖL, S.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol micropheres. Food Chemistry, v. 74, p. 281-288, 2001.
- ALMEIDA A. C. S.; ARAÚJO L. C.; COSTA A. M.; ABREU C. A. M.; LIMA M. A. G. A.; PALHA M. L. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. Process Biotechnology, v. 8, 2005.
- AMAYA-DELGADO, L.; HIDALGO-LARA, M. E.; MONTES-HORCASISTAS, M. C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. Food Chemistry, v.99, p. 299-304, 2005.
- ARICA M. Y.; BAYRAMOĞLU 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.
- 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.
- BAYRAMOĞLY, G.; AKGÖL, S.; BULUT, A.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Covalente immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl metacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. Biochemical Engineering Journal, v. 14, p. 117-126, 2003.
- BERGAMASCO R.; BASSETTI F.J.; MORAES F.; ZANIN G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. Brazil Journal Chemical Engineering, v.17, p. 4-7, 2000.
- BISHOP, Y. M. M., FIENBERG, S. E., HOLLAND, P. W. Discrete multivariate analysis. Cambridge, MA: MIT Press, 1975.
- BLANCH H. W. & CLARK D. S. Biochemical Engineering. New York, Marcel Dekker, 1996.
- 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.

- BOWSKI F. O., SAINI R., RYU D.Y., VIETH W. R. Kinetic modelling of the hydrolysis of sucrose by invertase. Biotechnology Bioengineering, v. 13, p. 641-656, 1971.
- BOX G. E. P., HUNTER W. G., HUNTER T.S. Statistics for Experimenters. United States of America and Canada, John Wiley & Sons, Inc, 1978.
- BULCHHOLZ K.; KASCHE V.; BORNSCHEUER U. T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. 2005.
- 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.
- CABRAL, F. A. Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), 1989.
- CAO L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. 2005.
- CAO L. Immobilised enzymes: science or art? Current Opinion in Chemical Biology, v. 9, p. 217-226, 2005.
- CARBERRY J.J. *Chemical and Catalytic Reaction Engineering*. New York, Mc-Graw-Hill, 1976.
- CHANG M., JUANG R. Activities, stabilities and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. Enzyme and Microbial Technology, v.36, p. 75-82, 2005.
- CHEETHAM P. S. J. Principles of industrial enzymology: basis of soluble and immobilized enzymes in industrial process. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2º edition, Chichester, John Wiley & Sons, 1985.
- CHEN, Y.; KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. European Polymer Journal, v. 36, p. 2095-2103, 2000.
- CHIBATA I. *Immobilized Enzymes-Research and Development*. Tokyo. Kadansha Ltd, 1978.
- CHIBATA I.; TOSA T.; SATO T.; MORI T.; MATSUO Y. Preparation and industrial application of immobilized aminoacyclases. *Fermentation Technology Today*, p. 383-389, 1972.
- COMBES D. & MONSAN P. Sucrose hydrolysis by invertase. Characteriation of products and substrate inhibition. Carbohydrate Rersarch, v. 117, p. 215-228, 1983.

- 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.
- COUTINHO FILHO, U.; RIBEIRO E. J.; MAUGERI FILHO F. Estabilidade de invertase imobilizada em sílica. Anais do Simpósio Nacional de Fermentação, 2005.
- COLLINS H.C.; BRAGA G. L.; BONATO P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Editora da Unicamp. Campinas, 1993.
- D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. Journal. Biochemical and Biophysical Methods, v. 52, p. 59-62, 2002.
- DALLA-VECCHIA R., NASCIMENTO M.G., SOLDI . Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. Química Nova, v. 27, 2004.
- DANISMAN, T.; TAN, S.; KACAR, Y.; ERGENE, A. Analytical, Nutritional and Clinical Methods: Covalent immobilization of invertase on microporous PHEMA-GMA membrane. Food Chemistry, v. 85, p. 461-466, 2004.
- DAVID A. E. Immobilizaion of enzymes on nanoporous sílica composites. Tese de doutorado. University of Maryland, College Park, 2004.
- DAVID A. E., WANG N. S., YANG V. C., YANG A. J. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. Journal of Biotechnology, v. 125, p. 395-407, 2006.
- DIXON M. & WEBB E. C. Enzymes. 3 ed. London, Longman Group Limited, 1979.
- DRAETTA I.S. Isolamento, purificação e cinética da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, v. 4, p. 23-37, 1971.
- EMREGUL E., SUNGUR S., AKBULUT U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. Food Chemistry, v. 97, p. 591-597, 2006
- ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. Reactive & Functional Polymers, v. 45, p. 227-233, 2000.
- 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.
- GALVÃO C. M. A. Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Lático usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes. Tese de Doutorado.

Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCAR), 2004.

- GÁSCON S., NEUMANN N. P., LAMPEN J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast. The Journal of Biological Chemistry, v. 3, p. 33-38, 1981.
- GIACOMMINI C., IRAZOQUI G., BATISA-VIEIRA F., BRENA B. M. influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. Journal Molecular Catalysis. B: Enzymatic, v. 11, p. 597-606, 2001.
- GÓMEZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p. 22-27, 2005.
- GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAĞCI, Y.. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. Reactive & Functional Polymers, v. 57, p. 57-65, 2003
- HEARN E. & NEUFELD R. J. Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease. Process Biochemistry, v. 35, p. 1253-1260, 2000.
- HENLEY J. P.; SADANA A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. Enzyme Microbiology Technology, v. 7, p. 50-60, 1985.
- IEMMA A. F. & RODRIGUES M. I. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Editora Casa do Pão. 2005.
- ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I.; YAĞCI, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. European Polymer Journal, v.39, p. 2375-2381, 2003.
- JURADO E., CAMACHO F., LUZÓN G., VICARIA J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. Enzyme and Microbial Technology, v.34, p.33-40, 2004.
- KENNEDY J. F. & CABRAL J. M. S. Enzyme Immobilization – in Biotechnology, v. 7a, p. 347-404, 1987.
- KIRALP, S.; TOPPARE, L.; YAĞCI, Y. Immobilization of invertase in copolymers of thiophene functionalized methyl ester with pyrrole. Synthetic Metals, v. 135, n. 136, p. 79-80, 2003.
- KIRK OTHMER D. F. Encyclopedia of Chemical Technology. New York, John Wiley & Sons, 1994.

- MARTINS M. Açúcar invertido: propriedades e aplicações. Food Ingredients, p.96-97, 2000.
- MESSING, R. A. Carriers for immobilized biologically active systems in advances in biochemical engineering, v. 10, 1978.
- MILLER G. L. Use of Dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyses Chemistry, v.31, p. 426-428, 1959.
- MILOVANOVIC A., BOZIC N., VUJCIC Z. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. Food Chemistry, v. 10.
- MORÉ J. J. The Levenberg-Marquardt Algorithm: Implementation and Theory. In G.A. Watson, (ed.), Lecture Notes in Mathematics 630, p. 105-116. Berlin: Springer-Verlag, 1977.
- NELSON J. M.; GRIFFIN E. G. Adsorption of invertase, Journal American Chemical, v. 38, p. 1109-1114, 1916.
- 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, p. 88-94, 2005.
- OOSTEROM M. W., BELLE H. J. A., RANTWIJL F., SHELDON R.A. Immobilised β -galactosidases and their use in galatoside synthesis. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, . 134, p. 267-274, 1998.
- ÖZDURAL A. E.; TANYOLAÇ D.; BOYACI I. H.; MUTLU M.; WEBB C. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. Biochemical Engineering Journal, v. 14, p. 27-36, 2003.
- 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.
- REBROS M., ROSENBERG M., MLICHOVÁ Z., KRISTOFÍKOVÁ L., Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. Food Chemistry, v. 102, p. 784-787, 2007.
- ROCHA J.R., CATANA R., FERREIRA B. S., CABRAL J. M. S., FERNANDES P. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food Chemistry, v. 95, p. 77-82J, 2006.
- RODRIGUES M. V. N.; RODRIGUES R. A. F.; SERRA G.E.; ANDRIETTA S. R.; FRANCO T. T. Produção de xarope de açúcar invertido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 20, p. 103-109, 2000.

- 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.
- SEGEL I. H. Bioquímica, Teoria e Problemas. Traduzido Grassiano D.M., Rio de Janeiro, Livros técnicos e Científicos Editora, 1979.
- 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.
- TANRISEVEN, A.; DOĞAN, S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. Process Biochemistry, v. 36, p. 1081-1083, 2001.
- TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. Process Biochemistry, v. 41, p. 1325-1331, 2006.
- 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.
- JEFFREY G. H., BASSET J., MENDHAM J., DENNEY R. C. Vogel, Análise Química Quantitativa. Traduzido por Horacio Macedo, 5 ed. Rio de Janeiro, LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1992.
- WEETALL H. H. Immobilized enzymes and their application in the food and beverage industry. Process Biochemistry, p. 3-30, 1975.
- WISEMAN A. & WOODWARD J. Industrial yeast invertase stabilization. Process Biochemistry, v. 10, p. 24-30, 1975.
- ZANIN, G. M. Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 1989.

ANEXO 1

Exemplo da análise canônica para o Planejamento Composto Central da otimização do meio de imobilização, implementado no Maple VIII.

Sendo:

Atividade enzimática = y_1 ;

$T = x_1$;

$pH = x_2$;

Concentração de invertase = x_3 ;

Forma canônica para o PCC para imobilização - T , pH e [enzima]

> **restart;**

> **y1:= 4.66 + 0.33*x1**

+0.041*x2+0.79*x3+0.18*x1*x2+0.013*x1*x3-0.34*x2*x3-1.01*x1^2-1.34*x2^2-1.14*x3^2;

$$y_1 := 3.66 + 0.33 x_1 + 0.041 x_2 + 0.79 x_3 + 0.18 x_1 x_2 + 0.013 x_1 x_3 - 0.34 x_2 x_3 - 1.01 x_1^2 - 1.34 x_2^2 - 1.14 x_3^2$$

Reduzir para a forma canônica o modelo ajustado de ordem 2:

> **with(linalg):**

Warning, the protected names norm and trace have been redefined and unprotected

> **B:=matrix(3,3,[-1.01,0.09,0.0065,0.09,-1.34,-0.17,0.0065,-0.17,-1.14]);**

$$B := \begin{bmatrix} -1.01 & 0.09 & 0.0065 \\ 0.09 & -1.34 & -0.17 \\ 0.0065 & -0.17 & -1.14 \end{bmatrix}$$

> **charpoly(B, lambda);**

$$\lambda^3 + 3.49 \lambda^2 + 3.99535775 \lambda + 1.504595285$$

> **lambda:=[eigenvals(B)];** raízes características

$$\lambda := [-1.452319979, -1.064013256, -0.9736667645]$$

> **b:=matrix(3,1,[1.944,0.906,1.069]);**

$$b := \begin{bmatrix} 1.944 \\ 0.906 \\ 1.069 \end{bmatrix}$$

> **x0:=evalm(-0.5*inverse(B)&b);**

$$x_0 := \begin{bmatrix} 0.9964083325 \\ 0.3514282136 \\ 0.4221349630 \end{bmatrix}$$

> **for i from 1 to 3 do x:=x0[i,1] od;**

$$x := 0.9964083325$$

$$x := 0.3514282136$$

$x := 0.4221349630$

> **x01:=0.058;**

$x01 := 0.058$

> **x02:=0.2102;**

$x02 := 0.2102$

> **x03:=0.5075;**

$x03 := 0.5075$

> **y0:=4.66 + 0.33*x01
+0.041*x02+0.79*x03+0.18*x01*x02+0.013*x01*x03-
0.34*x02*x03-1.01*x01^2-1.34*x02^2-1.14*x03^2;**
 $y0 := 4.051592693, 1.208643235$

Portanto a forma canônica ajustada é :

> **y:=y0+lambda[1]*w[1]^2 +lambda[2]*w[2]^2
+lambda[3]*w[3]^2;**
 $y := (4.051592693, 1.208643235) - 1.452319979 w_1^2 - 1.064013256 w_2^2$
 $- 0.9736667645 w_3^2$