

4.3 - Resultados para a enzima imobilizada

4.3.1–Estudo preliminar da metodologia de imobilização de β -galactosidase

Este estudo preliminar foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da concentração de glutaraldeído na imobilização de β -galactosidase. Os valores das concentrações de glutaraldeído e o processo de imobilização da enzima utilizado seguiram a metodologia citada no item 3.5.1. Após o processo de imobilização, a atividade enzimática do biocatalisador foi analisada diariamente conforme item 3.3 com o objetivo de verificar a estabilidade da enzima imobilizada. Após cada uso, as partículas eram lavadas com tampão acetato pH 4,5 e mantidas em geladeira, no mesmo tampão. As atividades iniciais alcançadas para a imobilização, utilizando glutaraldeído nas concentrações iguais a 1, 3 e 5% (v/v) foram respectivamente 475,6; 444,8 e 424 U_I. Os resultados experimentais expressos em atividades relativas estão ilustrados na Figura 4.43.

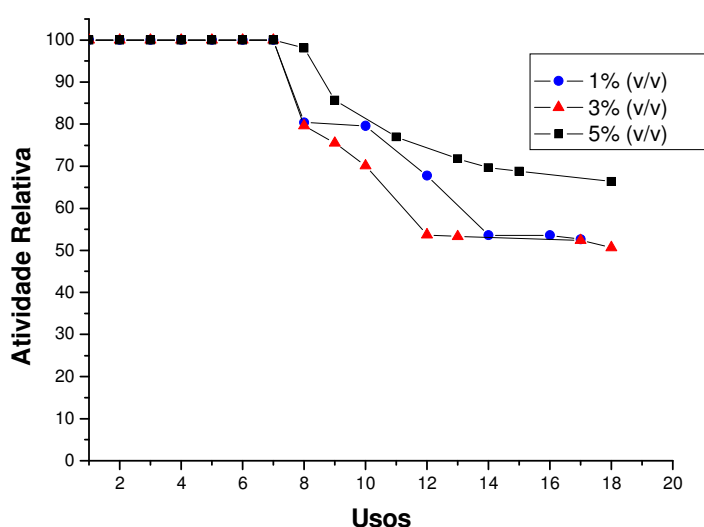


Figura 4.43 - Atividades relativas de β -galactosidase imobilizadas em alginato de sódio, para concentrações de glutaraldeído: 1%, 3% e 5 % (v/v).

As atividades dos três biocatalisadores imobilizados nas três concentrações de glutaraldeído foram determinadas diariamente, conforme descrito anteriormente. A influência

da concentração de glutaraldeído no processo de imobilização de β -galactosidase em alginato de sódio e gelatina foi estudada, com relação à máxima atividade de enzima imobilizada alcançada e em relação à estabilidade do biocatalisador obtido. Observa-se pela Figura 4.43 que nos 7 primeiros usos, os 3 conjuntos de biocatalisadores imobilizados mantiveram sua máxima atividade. No oitavo uso, para a concentração de 5%, houve apenas 2% de perda da atividade, enquanto nas outras concentrações a queda foi de aproximadamente 20%. Desta forma, a precipitação da suspensão enzima-alginato-gelatina em solução de CaCl_2 a 5% (v/v) em glutaraldeído até o oitavo dia de análise produziu partículas de enzima imobilizada com atividade levemente superiores em relação àquelas obtidas nas concentrações de 1 e 3% (v/v). Os tempos de meia vida para todas as concentrações foram 17 e 18 usos respectivamente para as concentrações 1 e 3% (v/v) e para a concentração de 5% (v/v), a meia vida não foi atingida até o 18º uso. Portanto, a enzima imobilizada em presença de glutaraldeído a 5% (v/v) na solução de CaCl_2 0,05M apresentou melhor retenção da enzima dentro das partículas de alginato. Neste trabalho, de acordo com TANRISEVEN e DOGAN (2002), as vantagens de alginato e gelatina foram combinadas. Imobilização de enzimas em alginato requer um processo adicional, uma vez que β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* tem peso molecular da ordem de 90000 Daltons, sendo assim necessário um processo adicional para manter a enzima dentro da partícula imobilizada, pois as enzimas com pesos moleculares da ordem de 300000 Daltons podem escapar das partículas de alginato.

4.3.2 – Otimização do processo de imobilização da enzima β -galactosidase

Com base nos testes preliminares de imobilização, item 4.3.1, optou-se por um estudo visando otimizar as condições de imobilização de β -galactosidase em presença de alginato de sódio, gelatina e glutaraldeído, tendo como objetivo analisar a atividade enzimática inicial e estabilidade catalítica.

Conforme descrito no item 3.5.2, após definida a matriz do planejamento estatístico, foram realizados os experimentos (em triplicata) e as respostas das atividades da imobilização da enzima foram avaliadas. Nesta etapa foi feita a otimização do processo de imobilização da enzima em relação às variáveis concentração de alginato, gelatina e glutaraldeído. A Tabela 4.18 apresenta os resultados obtidos para as atividades iniciais dos 16 experimentos, sendo X_1 a concentração de alginato (p/v); X_2 a concentração de gelatina (p/v); X_3 a concentração de glutaraldeído (v/v).

Tabela 4.18 – Resultados experimentais de taxa de reação em função das concentrações de alginato, gelatina e glutaraldeído

Valor codificado (valor real)				
Exp.	X ₁	X ₂	X ₃	Atividade Inicial (U _I)
1	-1(1,628%)	-1(0,88%)	-1(0,88%)	956,4±78,4
2	-1(1,628%)	-1(0,88%)	+1(7%)	873,6±65,5
3	-1(1,628%)	+1(7%)	-1(0,88%)	934,2±80,3
4	-1(1,628%)	+1(7%)	+1(7%)	858,6±59,2
5	+1(6%)	-1(0,88%)	-1(0,88%)	1021,8±78,7
6	+1(6%)	-1(0,88%)	+1(7%)	1095±88,7
7	+1(6%)	+1(7%)	-1(0,88%)	1099,8±75,9
8	+1(6%)	+1(7%)	+1(7%)	985,2±81,8
9	- α (1%)	0 (3,9%)	0(3,9%)	1083,6±85,6
10	+ α (6,62%)	0 (3,9%)	0(3,9%)	1181,4±100,4
11	0 (3,8%)	- α (0%)	0(3,9%)	865,8±65,8
12	0 (3,8%)	+ α (7,8%)	0(3,9%)	954,6±80,2
13	0 (3,8%)	0 (3,9%)	- α (0%)	882±70,6
14	0 (3,8%)	0 (3,9%)	+ α (7,8%)	925,8±63,9
15	0 (3,8%)	0 (3,9%)	0(3,9%)	971,4±82,6
16	0 (3,8%)	0 (3,9%)	0(3,9%)	993,6±79,5

Observa-se pela Tabela 4.18 que a atividade enzimática inicial alcançada nos experimentos variou de 858,6 a 1181,4 U_I. Verifica-se que a máxima atividade encontrada foi obtida para o experimento 10, onde de acordo com a Tabela 3.5 corresponde ao nível mais alto de concentração de alginato (6,62%) e os níveis intermediários de concentração de gelatina e glutaraldeído (3,9%). O menor valor de atividade enzimática foi obtido para o experimento 4, onde verifica-se o nível -1 para as variáveis concentração de alginato (1,62%), e nível +1 para as concentrações de gelatina (7%) e concentração de glutaraldeído (7%). Por esta análise inicial, observa-se que o processo de imobilização da enzima lactase depende

significativamente da variável alginato. Para a confirmação desta suposição, efetuou-se a partir dos resultados obtidos para as atividades analisadas, uma regressão múltipla utilizando o *software Statistica 7.0*, tendo como fatores os termos isolados, as interações e os termos quadráticos das três variáveis. Estão representados na Tabela 4.19 os parâmetros lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das três variáveis estudadas, sendo X_1 a variável alginato, X_2 gelatina e X_3 glutaraldeído e os seus níveis de significância.

Tabela 4.19 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC com todos os parâmetros

Fatores	Coefficiente	nível de significância
Intercepto	984,0734	0,000000
X_1	62,3038	0,006927
X_2	4,0042	0,804570
X_3	-12,6768	0,444217
X_1X_1	88,8763	0,007128
X_2X_2	-45,2936	0,087699
X_3X_3	-49,0960	0,069240
X_1X_2	0,6750	0,971945
X_1X_3	14,6250	0,457274
X_2X_3	-22,5750	0,266101

Após a realização da regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.15 completa com todos os parâmetros:

$$Y = 984,0734 + 62,3038X_1 + 4,0042X_2 - 12,6768X_3 + 88,8763X_1^2 - 45,2936X_2^2 - 49,096X_3^2 + 0,6750X_1X_2 + 14,625X_1X_3 - 22,575X_2X_3 \quad (4.15)$$

O coeficiente de determinação $R^2 = 88\%$ indica ajuste adequado aos dados experimentais de atividade, mostrando que 88% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica. Os parâmetros avaliados pelo teste de hipótese utilizando a estatística *t de Student* que apresentaram níveis de significância maiores que 10% foram negligenciados, como os termos lineares X_2 , X_3 e as interações X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 . Com a eliminação desses termos, obteve-se as seguintes análises de parâmetros apresentadas na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC com os parâmetros significativos

Fatores	Coefficiente	nível de significância
Intercepto	984,0734	0,000000
X_1	62,3038	0,000931
X_1X_1	88,8763	0,000975

Continuação da Tabela 4.20		
X_2X_2	-45,2936	0,044379
X_3X_3	-49,096	0,031703

Nesta regressão foram eliminados os parâmetros com nível de significância do teste F de Fisher superiores a 10%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. A Equação 4.16 é a forma reduzida para a regressão múltipla para a atividade de lactase imobilizada.

$$Y = 984,0734 + 62,3038X_1 + 88,8763X_1^2 - 45,2936X_2^2 - 49,0963X_3^2 \quad (4.16)$$

Na análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.21, verifica-se que o resultado para o teste F de Fisher ilustrou que o $F_{\text{calculado}}$ ($F_{\text{calc}} = 12,77$) foi maior que o F_{tabelado} ($F_T = 3,36$) para nível de significância de 5%, e o valor-p apresentou menor que 5% concluindo assim a significância do modelo. Logo, o resultado do teste mostrou que se poderia desprezar a hipótese de nulidade com confiabilidade de 95%.

Tabela 4.21– ANOVA para a resposta de atividade enzimática.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	111782,7	4	27945,68	12,77442	0,000406
Resíduos	24063,9	11	2187,63		
Total	135846,6				

$$F_T = F_{4,11; 0,05} = 3,36$$

Esses resultados indicam boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos nas Figuras 4.44 e 4.45 que ilustram boa concordância entre os valores preditos pelo modelo em função dos observados, e a aleatoriedade dos resíduos em torno do zero, respectivamente.

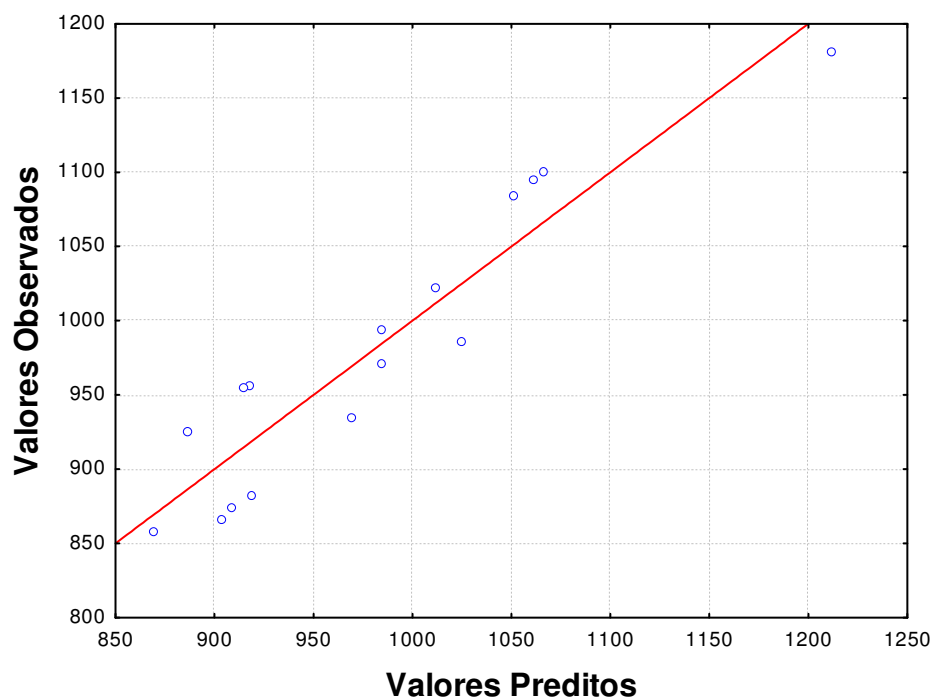


Figura 4.44 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

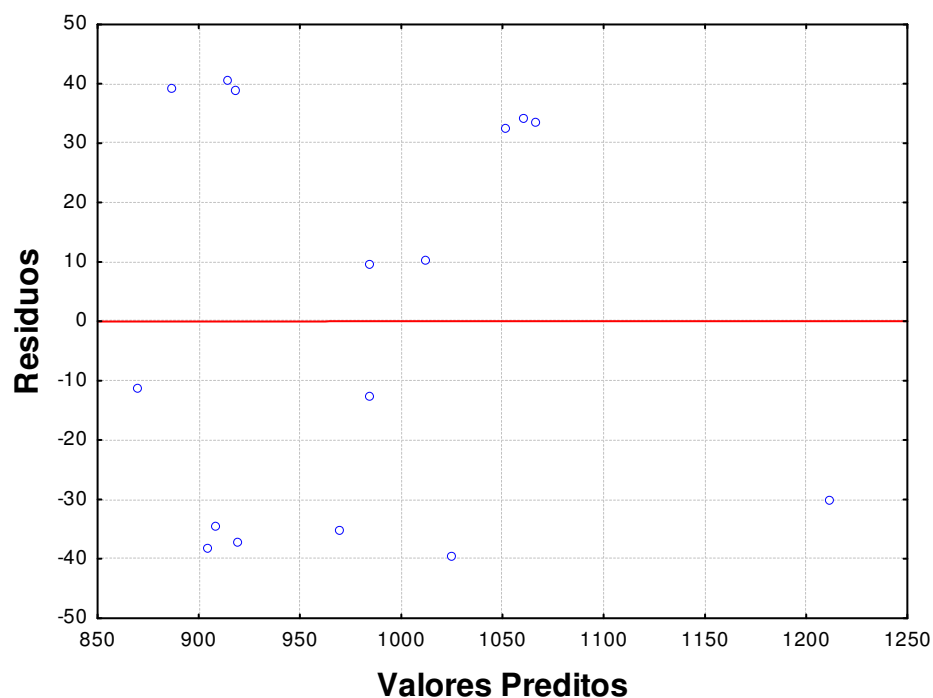


Figura 4.45 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática

Observando a Figura 4.44, nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos ao fornecidos pela equação empírica, fato este justificado pelo valor obtido para o coeficiente de determinação ($R^2=88\%$). Na Figura 4.45, vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do

zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo foi significativo, construiu-se as superfícies de respostas, analisadas duas a duas com a atividade inicial obtida e definiu-se as regiões de interesse. As superfícies de respostas e de contornos estão representadas nas Figuras 4.46 a 4.51.

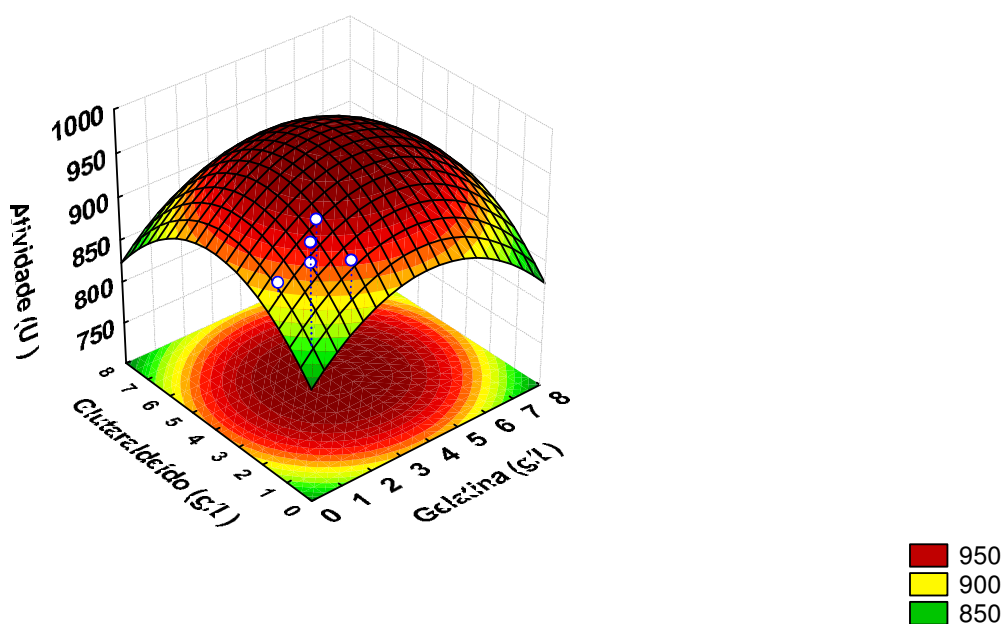


Figura 4.46 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis glutaraldeído e gelatina.

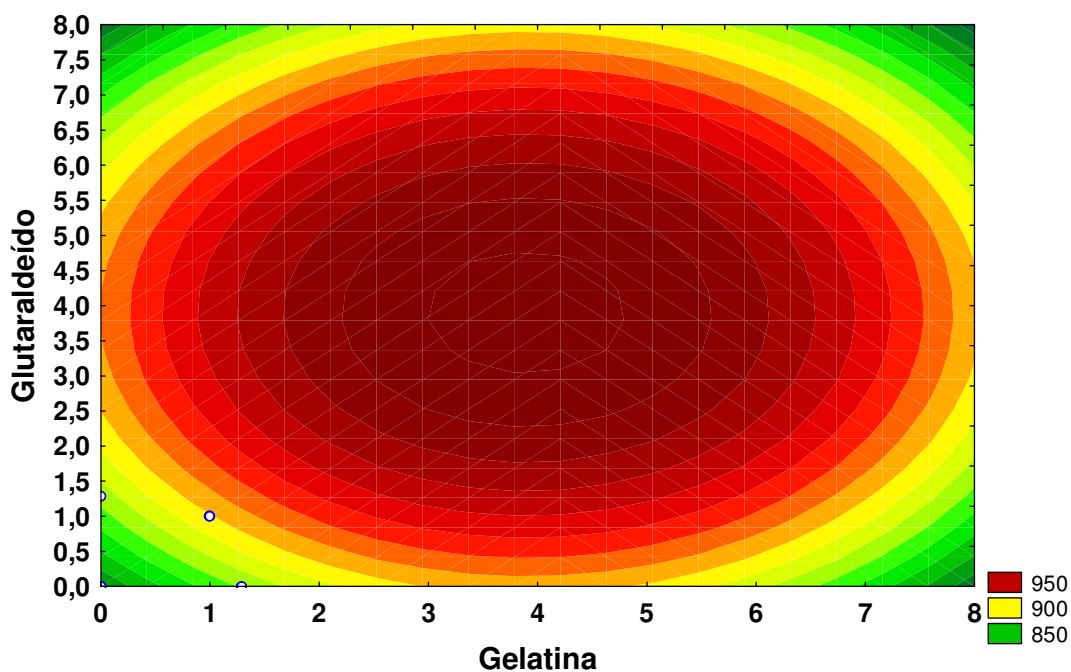


Figura 4.47 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis glutaraldeído e gelatina.

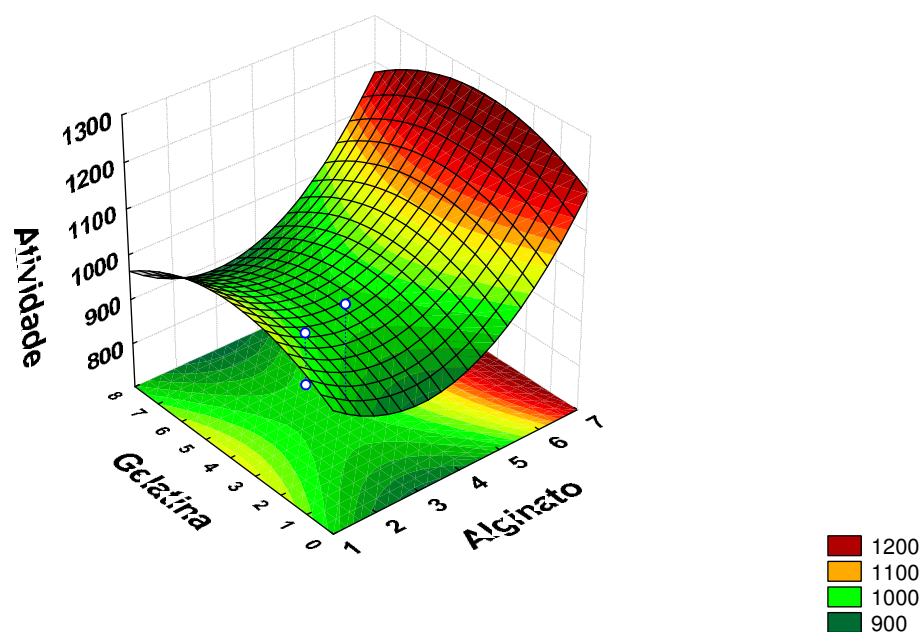


Figura 4.48 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis gelatina e alginato.

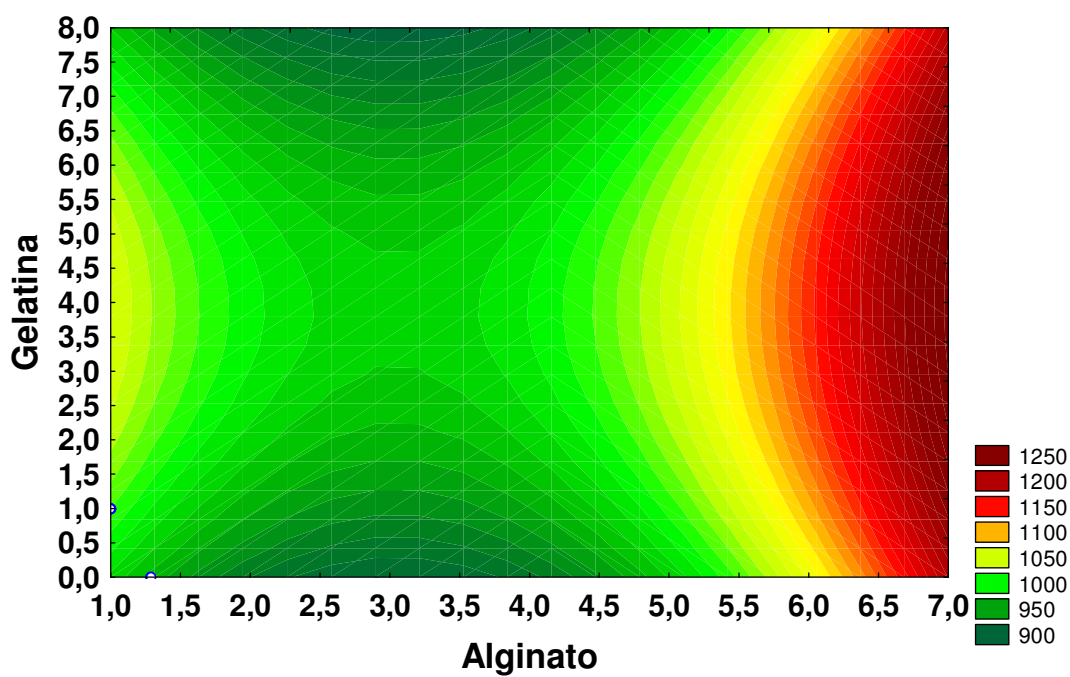


Figura 4.49 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis gelatina e alginato.

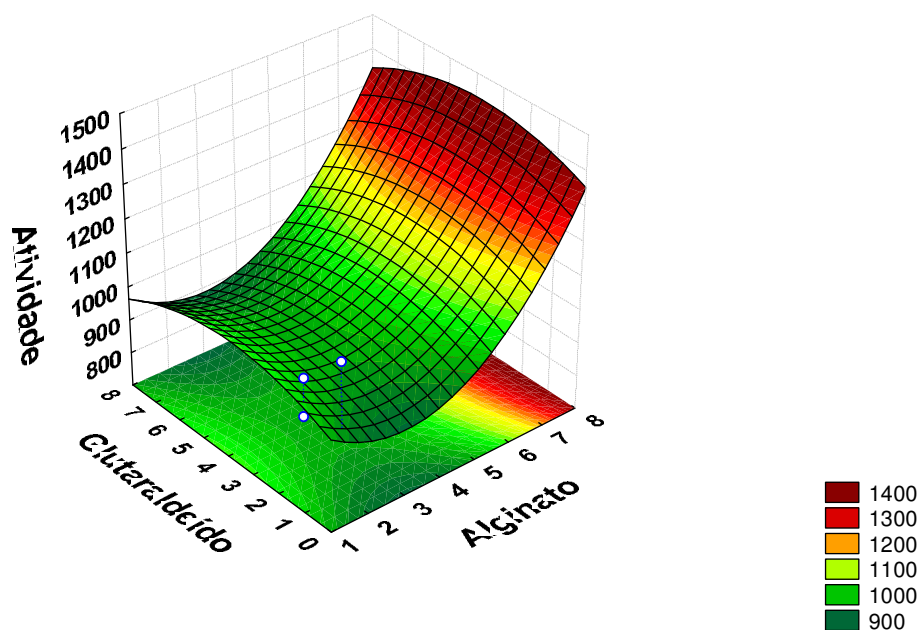


Figura 4.50 – Superfície de resposta para a atividade em função das variáveis glutaraldeído e alginato.

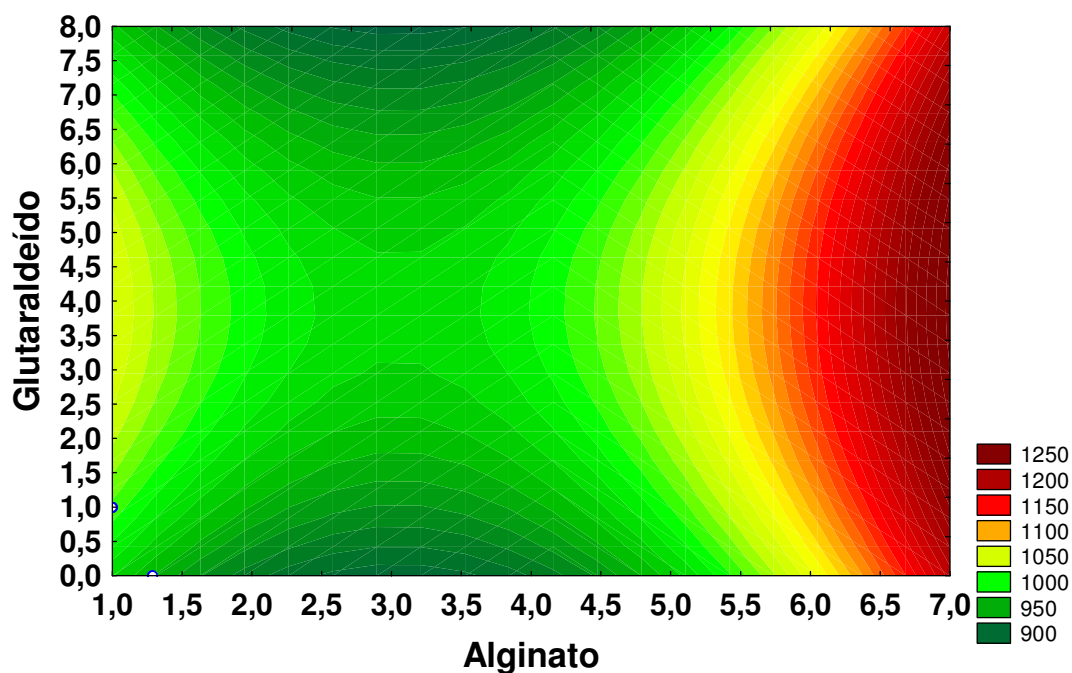


Figura 4.51 – Superfície de contorno para a atividade em função das variáveis glutaraldeído e alginato.

Observa-se pelas superfícies que envolvem alginato e gelatina ou alginato e glutaraldeído que as maiores atividades encontram-se nos maiores níveis de alginato e em todos os níveis das variáveis gelatina e glutaraldeído, mostrando que estas variáveis quando interagem com o alginato, não interferem diretamente na variável resposta. Mas observando-

se as curvas que envolvem as variáveis gelatina e glutaraldeído, os níveis que maximizam a atividade enzimática são os níveis centrais para ambas as variáveis. Com isto, observa-se que a variável mais ponderada na maximização da variável resposta é o alginato.

A partir da Equação completa (4.15) foi feita uma implementação de um algoritmo no programa *Maple V release 4* para calcular o ponto ótimo para a imobilização da enzima, visando maximizar a atividade enzimática. Utilizando as equações de codificação (3.21), (3.22) e (3.23) obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização:

$X_1 = 6,60\%$ de alginato;

$X_2 = 4,05\%$ de gelatina e

$X_3 = 3,64\%$ de glutaraldeído.

Nota-se pela análise das Figuras 4.46 a 4.51 e pelos valores das variáveis X_1 , X_2 e X_3 que maximizam a atividade, uma condição experimental próxima ao experimento 10. Esta condição corresponde com o nível $+\alpha$ (6,624%) para a variável concentração de alginato e nível 0 (3,9%) para as variáveis gelatina e glutaraldeído. Para a enzima imobilizada como no experimento 10, foi acompanhada a sua atividade em função do número de usos, ou seja, sua atividade foi determinada diariamente e os resultados apresentados na Figura 4.52.

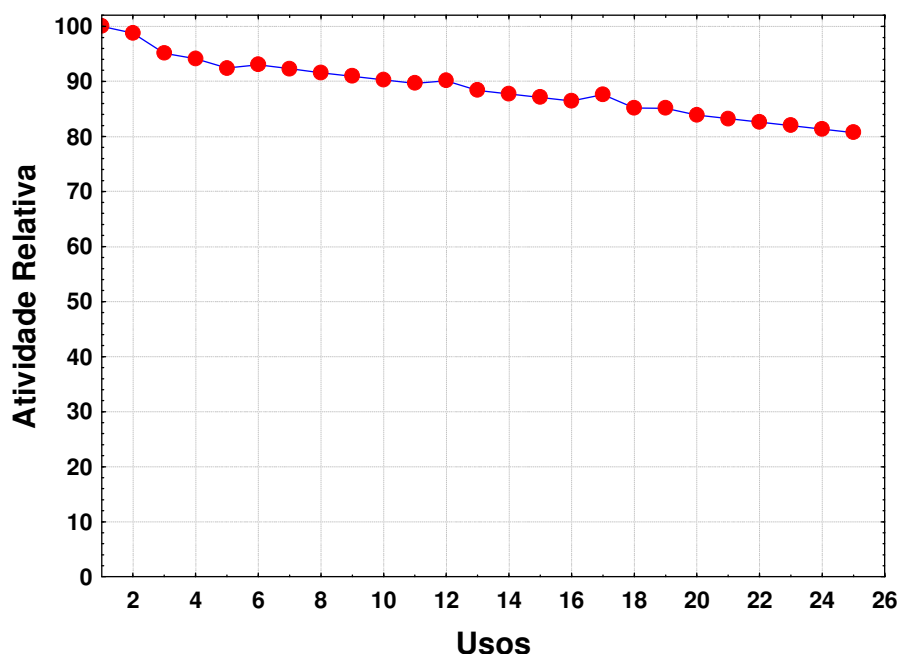


Figura 4.52 – Estabilidade da enzima na condição do experimento 10.

Observa-se pela Figura 4.52 que a atividade enzimática do experimento 10 teve queda de apenas 10% até na 12^a determinação de atividade. Do 12^o ao 25^o uso, houve decréscimo na atividade enzimática de 10%, apresentando queda significativamente baixa (20%) com 25 usos. Estes resultados ilustram ser este experimento (número 10) uma boa combinação das três variáveis (gelatina, alginato e glutaraldeído) para a retenção da enzima dentro do suporte. A média da variação percentual da atividade enzimática foi de 90,63% com desvio-padrão de 0,0454, fornecendo coeficiente de variação (CV) de apenas 5%, mostrando dispersão muito baixa, provando uma alta homogeneidade dos dados obtidos para as atividade iniciais enzimáticas durante estes 16 usos, ou seja, a atividade praticamente permaneceu constante nestes 25 experimentos mostrando ser este biocatalisador bastante estável nestas condições de imobilização.

Em paralelo, foram feitos novos testes de imobilização, utilizando as concentrações das variáveis otimizadas pelo PCC que foram de 6,60% de alginato; 4,05% de gelatina e 3,64% de glutaraldeído. Foi medida atividade inicial do biocatalisador imobilizado, e o resultado encontrado foi 5,64% superior ao encontrado para a atividade inicial do experimento 10 (Tabela 3.5). A Figura 4.53 ilustra o comportamento da atividade em 16 usos.

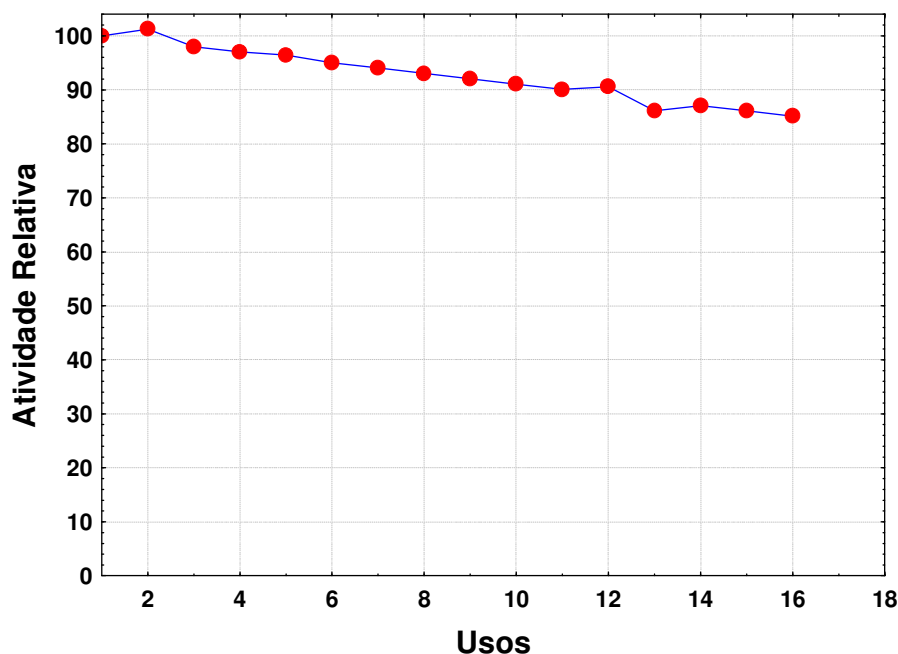


Figura 4.53 – Estabilidade enzimática do experimento otimizado pelo PCC.

Observa-se pela Figura 4.53 que até o 16^o uso, houve uma queda na atividade enzimática de apenas 15%. Conclui-se que tanto o experimento 10 quanto o experimento otimizado pelo PCC apresentaram excelente estabilidade da enzima imobilizada com relação

ao número de usos. Este fato já era esperado pois as duas condições encontraram-se dentro da região de otimização.

A partir desta etapa, em todos os experimentos de caracterização e estudos cinéticos envolvendo a enzima imobilizada, foram utilizadas partículas de biocatalisador imobilizado nestas condições otimizadas pelo planejamento estatístico.

4.3.3 - Estudo da influência da concentração de enzima no processo de imobilização

O rendimento de imobilização, definido como a razão entre a atividade da enzima imobilizada e da enzima livre usada, foi de 29,5% (EMREGUL *et al.* 2006, NOGALES e LÓPEZ, 2006). TANRISEVEN e DOGAN (2002) utilizando procedimento de imobilização semelhante, obtiveram rendimento de imobilização de 56%, porém este é um parâmetro que depende da quantidade de enzima que é exposta em contato com o suporte, uma vez que este pode apresentar saturação em relação à capacidade de reter atividade (RIBEIRO, 1989).

Uma vez definidas as concentrações de alginato, gelatina e glutaraldeído no processo de imobilização, foi realizado um estudo da influência de concentração inicial de enzima. Mantendo as concentrações de alginato em 6,6%, 4,05% de gelatina e 3,64% de glutaraldeído, variou-se as concentrações de enzima de 1 a 17,5%. Os resultados obtidos para a influência da concentração da enzima no processo de imobilização de β -galactosidase está ilustrado na Figura 4.54.

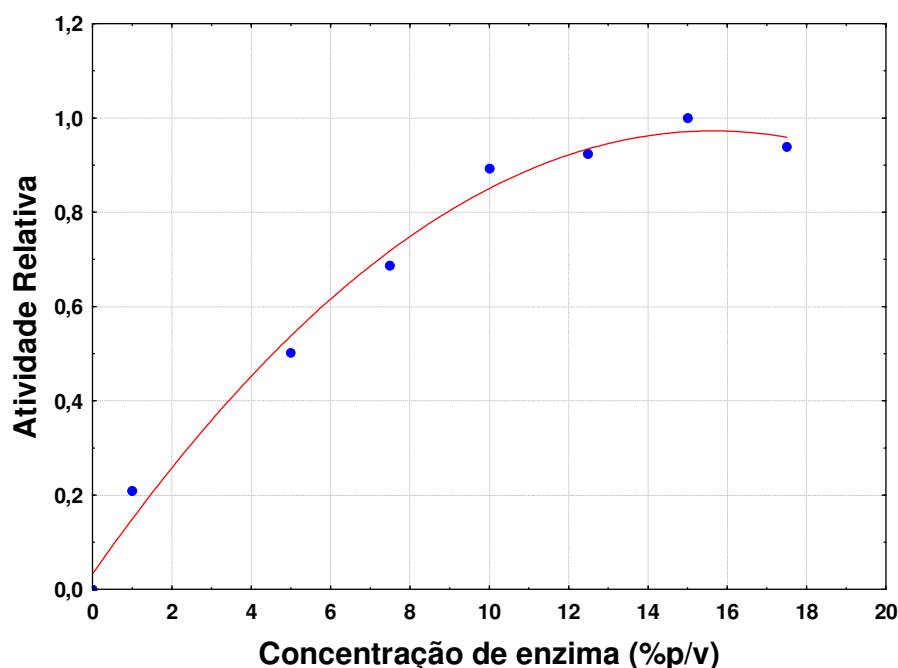


Figura 4.54 – Atividade relativa em função da concentração de enzima no processo de imobilização

A máxima atividade enzimática alcançada foi para a concentração de 15% de enzima no meio de imobilização, cujo valor obtido foi de 1550,64 U_I. Observa-se o valor de atividade obtido para a concentração de 10%(p/v) foi de 1384,45 U_I. Portanto, não houve aumento significativo no valor da atividade enzimática a partir da concentração de enzima de 10% (p/v%), uma diferença de apenas 10%. Visando reduzir o consumo de enzima, a partir deste experimento, optou-se por usá-la nos experimentos de imobilização diluída a 10% (p/v) e em alguns experimentos, conforme mencionado no item, 3.5, foi adotado a concentração de 1% (p/v).

4.3.4 - Influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada

Os resultados da influência simultânea do pH e da temperatura na atividade enzimática de lactase imobilizada, definidos pelo Planejamento Composto Central conforme item 3.5.4, estão representados na Tabela 4.22.

A Tabela 4.22 - Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento experimental.

Experimento	Valor real (valor codificado)		
	Temperatura (°C) (X ₁)	pH (X ₂)	Atividade Enzimática (U _I)
1	30 (-1)	3,2 (-1)	1500±112,5
2	58 (1)	3,2 (-1)	1050±71,4
3	30 (-1)	5,7 (1)	978±64,5
4	58 (1)	5,7 (1)	1944±116,6
5	44 (0)	4,4 (0)	1074±76,2
6	44 (0)	4,4 (0)	1212±82,4
7	44 (0)	4,4 (0)	1332±93,2
8	28 (-α)	4,4 (0)	1872±144,1
9	60 (+α)	4,4 (0)	1512±108,8
10	44 (0)	3 (-α)	1488±101,8
11	44 (0)	5,9 (+α)	1536±107,5

A atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 978 U_I (experimento 3), na temperatura de 30°C e pH 5,7 a 1944 U_I (experimento 4), onde foi utilizada a temperatura de 58° C e pH 5,7. Observa-se que em ambos experimentos, o pH foi igual a 5,7 (nível +1) e a temperatura variou de 30 para 58°C (nível -1 ao +1), observando uma forte dependência da variável resposta com a temperatura. Verifica-se ainda que a maior

resposta de atividade foi para o experimento 4, onde empregou-se o maior nível de temperatura. Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função do pH e temperatura fez-se uma regressão múltipla utilizando o software *Statistica 7.0* e as respectivas análises no teste *t-Student*, onde X_1 representa a temperatura e X_2 representa o pH. Estão representados na Tabela 4.23 os parâmetros lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das duas variáveis estudadas.

Tabela 4.23 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC

Fatores	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Intercepto	1499,183	0,000000
X_1 (L)	171,201	0,001673
X_2 (L)	79,953	0,035230
X_1X_2	354,000	0,000184
X_1 (Q)	99,459	0,049676
X_2 (Q)	-249,162	0,001330

Utilizando os resultados da atividade enzimática apresentados na Tabela 4.22, após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, obteve-se a Equação 4.17 completa com todos os parâmetros com coeficiente de determinação de 97,5%:

$$Y = 1499,18 + 171,2 X_1 + 79,95 X_2 + 354 X_1 X_2 + 99,46 X_1^2 - 249,16 X_2^2 \quad (4.17)$$

Os parâmetros avaliados pelo teste de hipótese utilizando a estatística *t de Student* que apresentariam níveis de significância maiores que 10% seriam negligenciados e portanto, todos os termos da Equação 4.17 foram considerados significativos. O coeficiente de determinação (R^2) de 97,4% indica ajuste adequado dos dados experimentais na obtenção da atividade de enzima imobilizada, mostrando que 97,4% da variabilidade dos dados foram explicadas pela Equação 4.17. Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.24 verifica-se que o F_{calc} foi altamente significativo ($p < 0,1$). O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para nível de significância de 1%. Esses

resultados indicam boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, e o comportamento dos resíduos expressos respectivamente nas Figuras 4.52 e 4.53.

Tabela 4.24 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p - valor
Regressão	987616	5	197523,2	38,21648	0,000549
Resíduos	25843	5	5168,5		
Total	1013459				

$$F_T = F_{5; 5; 0,01} = 10,97$$

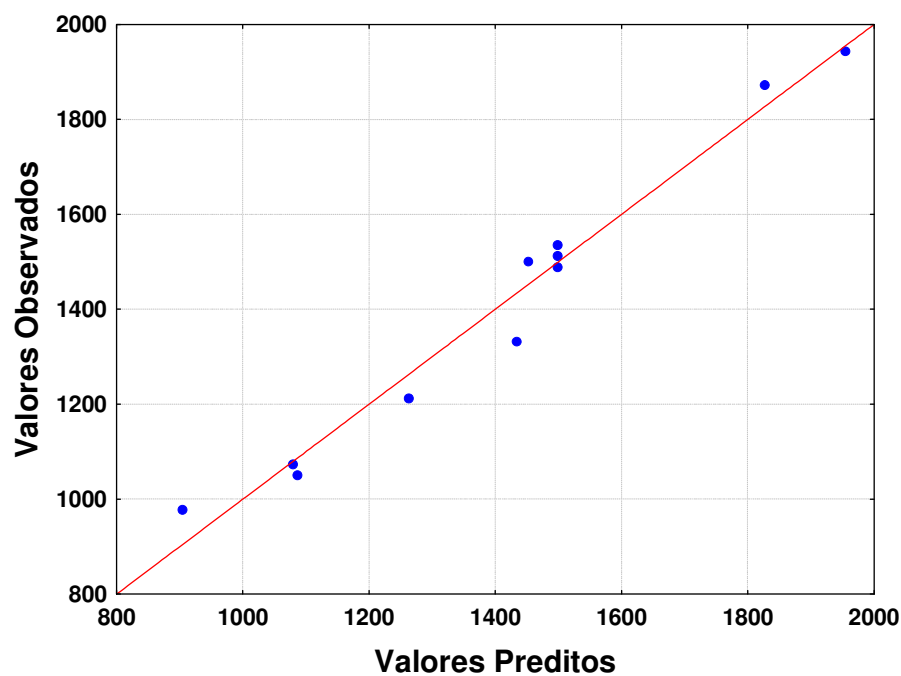


Figura 4.55 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

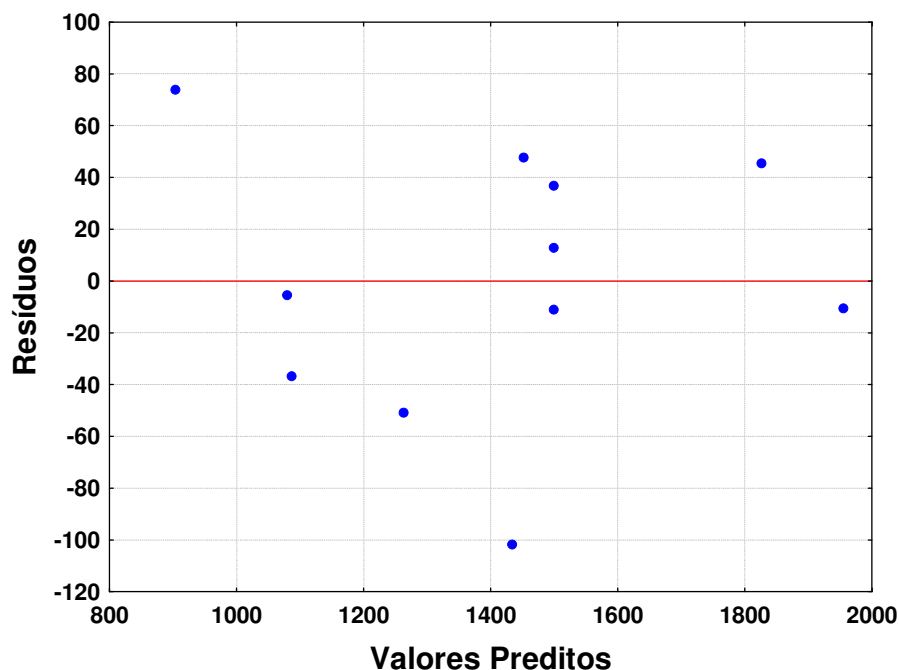


Figura 4.56 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Figura 4.55, nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica, com coeficiente de determinação igual a 97,5%. Observando a Figura 4.56, vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Como o modelo foi significativo, assim foi possível construir a superfície de resposta para analisar a região de interesse. A superfície de resposta está representada na Figura 4.57 juntamente com a respectiva superfície de contorno representada da Figura 4.58.

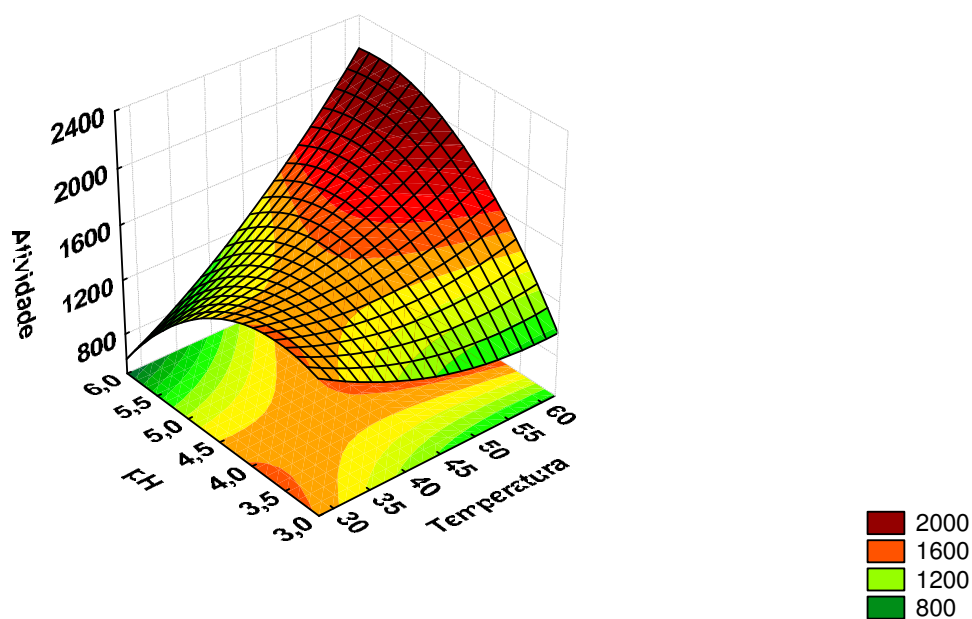


Figura 4.57 - Superfície de resposta no estudo da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de lactase imobilizada.

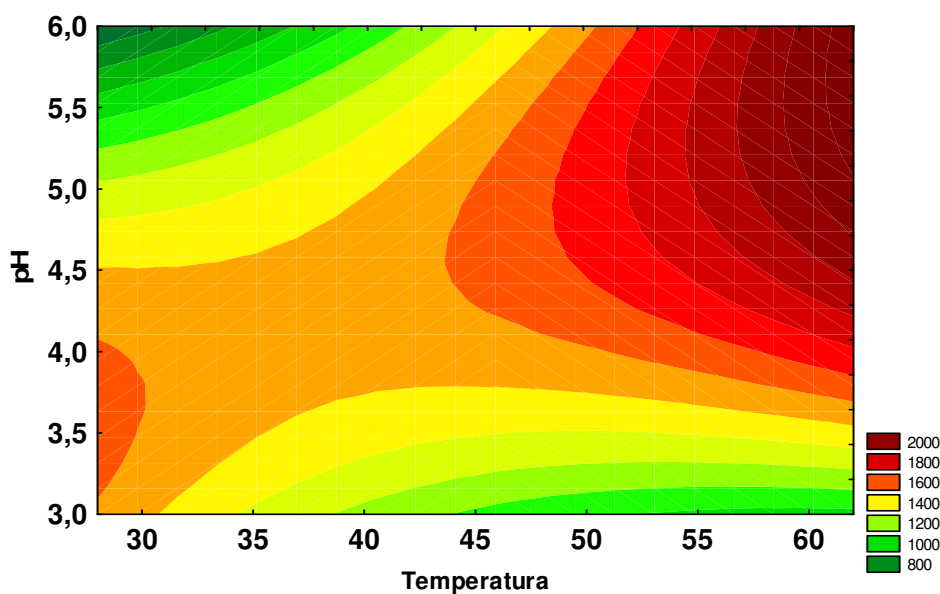


Figura 4.58 - Superfície de contorno no estudo da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática de lactase imobilizada.

Observa-se pela superfície de resposta e de contorno que as máximas atividades ocorreram nos maiores níveis de temperatura e nos níveis intermediários e altos de pH. Verifica-se ainda que nesta faixa de maximização da atividade, a maior atividade enzimática atua necessariamente nos maiores valores de temperatura, a partir de 58°C (nível +1),

enquanto o pH atua na faixa do nível intermediário (nível 0) até o nível $+\alpha$, ou seja, a resposta é mais influenciada pela variável temperatura. Isto pode ser constatado observando a Tabela 4.21 onde o coeficiente linear da variável pH apresenta menor valor dentre os coeficientes positivos e o coeficiente quadrático da variável pH atua de modo a diminuir o valor da variável resposta por possuir valor negativo.

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 4.17). Implementou-se um algoritmo no programa *Maple VIII* para calcular o ponto estacionário de obtenção da máxima atividade enzimática. As variáveis das coordenadas $X_1 = 1,1433$ e $X_2 = 0,4933$, representam os valores codificados que maximizam a resposta. Utilizando as equações de codificação (3.24) e (3.25) obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da atividade enzimática, sendo a temperatura (X_1) igual a 60°C e o pH (X_2) igual a 5. Para a validação do modelo, foi feito um experimento nas condições do ponto ótimo encontrado e a atividade obtida pelo ensaio foi de 1932 U_I e pelo modelo (Equação 4.17) a atividade máxima no ponto de maximização da atividade foi de 2034 U_I .

Na maioria dos trabalhos citados na literatura a faixa de temperatura e pH ótimos está próxima à encontrada neste trabalho. No trabalho de ATES e MEHMETOGLU (1997), TANRISEVEN e DOGAN (2002), MULIMANI e PRASHANTH (2005), GAUR *et al.* (2006), HUSAIN e HAIDER (2007), 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 enzimática ficou compreendida entre 45 e 60°C e a faixa de pH ótimo situou-se entre pH 4 a 5.

4.3.5 - Determinação da energia de ativação da reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada

Com o objetivo de determinar a energia de ativação da reação de hidrólise da enzima imobilizada, inicialmente estudou-se a influência da temperatura na atividade enzimática. Observa-se que para a faixa de temperatura estudada que foi de 10 a 80°C, a etapa de ativação térmica ocorreu no intervalo de 10 a 60°C onde a temperatura de maior atividade foi de 60°C. A faixa de temperatura de máxima atividade enzimática citada na literatura para a enzima imobilizada varia de 50 a 60°C (ATES e MEHMETOGLU 1997, TANRISEVEN e DOGNA, 2002), foi confirmada neste trabalho. Observa-se que a atividade da enzima decai a

aproximadamente 75,8% a 70 °C, ficando praticamente inativa a 80°C. A Figura 4.59 ilustra os resultados obtidos para a influência da temperatura na atividade enzimática.

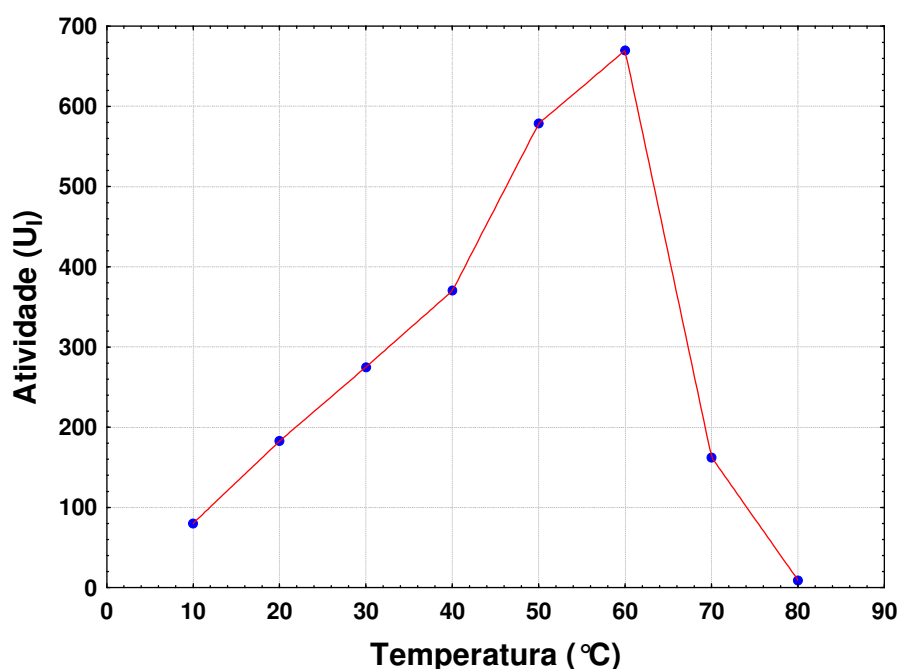


Figura 4.59 – Influência da temperatura na atividade

Utilizando os dados da etapa de ativação térmica (10 a 60°C), baseado nos resultados de atividade enzimática em função da temperatura, foi determinada a energia de ativação da reação de hidrólise, conforme Equação 3.26, ilustrado na Figura 4.60. O ajuste linear utilizando o *software Statistica 7.0* obteve alcançou coeficiente de determinação de 96,69% e está representada na Equação 4.18.

$$\ln A = 18,38 - 3905,96 \cdot \frac{1}{T} \quad (4.18)$$

O valor da energia de ativação de reação catalisada por β -galactosidase imobilizada foi de 7,74 kcal/mol de lactose. Este valor da energia de ativação da reação catalisada pela enzima na forma imobilizada está bastante próximo daquele encontrado para a forma livre da enzima, que foi de 6,9 kcal/mol. Este fato sugere que as limitações de transferência de massa nas partículas de enzima imobilizada são pequenas, porém este assunto será tratado na parte final deste trabalho.

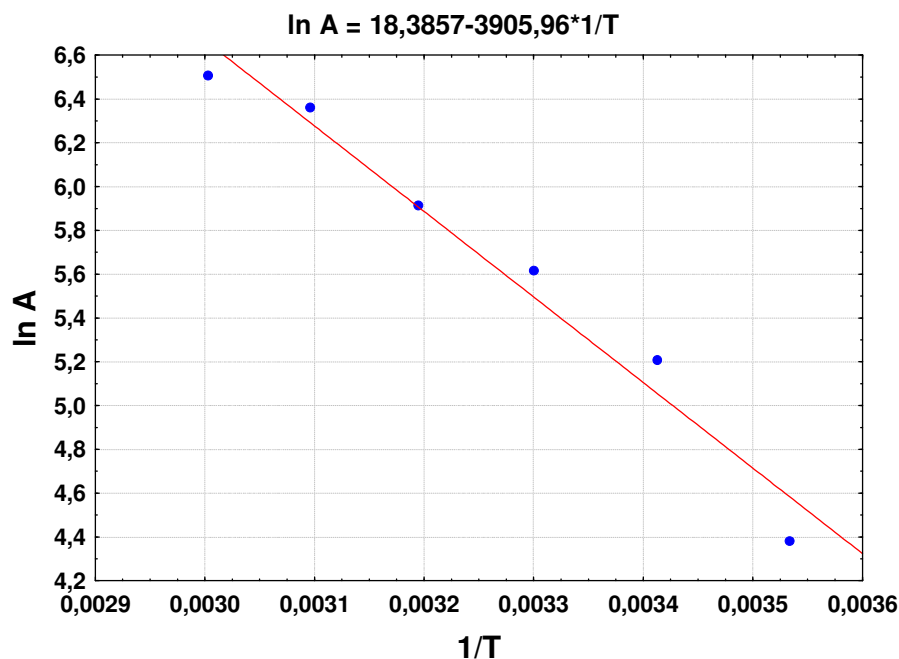


Figura 4.60 – Cálculo da energia de ativação térmica

No trabalho de EL-MASRY *et al.* (2001) a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em dois tipos de membranas de nylon, utilizando como substrato lactose. Os valores de energia de ativação encontrados foram 5,6 e 6 kcal/mol, menores do que aquele obtido para a enzima na forma livre que foi de 8,8 kcal/mol a pH 6,5 em tampão fosfato utilizando lactose a 68,4g/L.

4.3.6 - Estudo da estabilidade térmica da enzima imobilizada

A influência da temperatura na estabilidade de β -galactosidase na sua forma imobilizada foi estudada conforme o item 3.5.6. As atividades relativas em função do tempo de incubação, nas temperaturas estudadas, estão apresentadas nas Figuras 4.61 e 4.62.

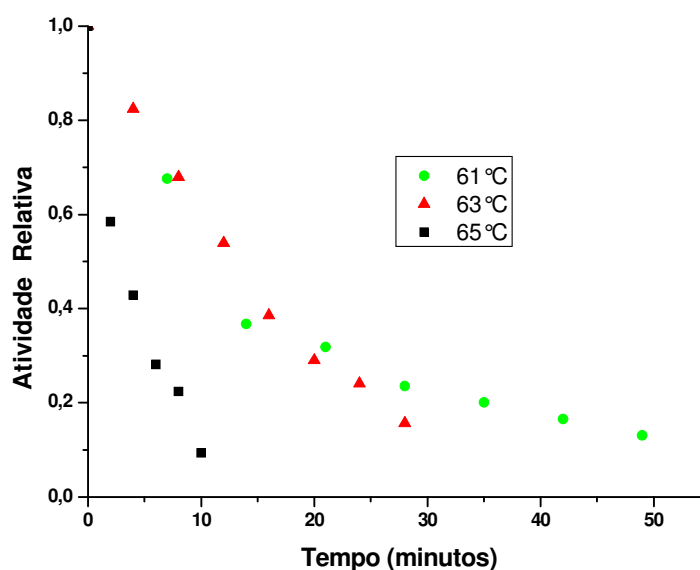


Figura 4.61 – Atividade relativa (A_i/A_0), em função do tempo, para as temperaturas de 61 a 65°C estudadas.

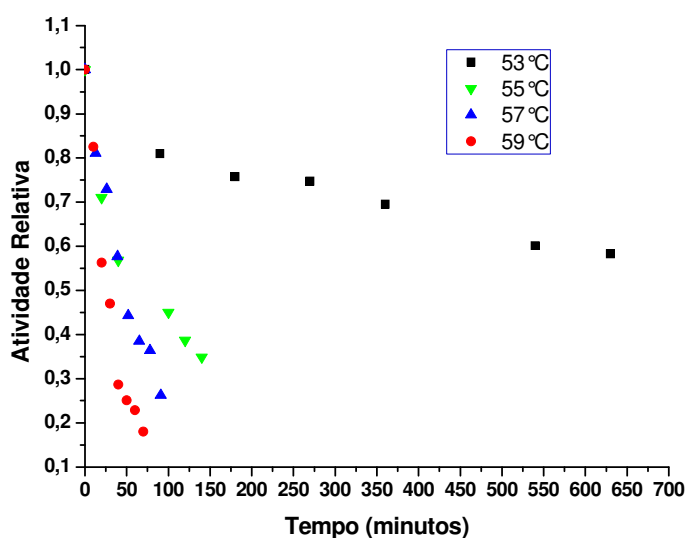


Figura 4.62 – Atividade relativa (A_i/A_0), em função do tempo, para as temperaturas de 53 a 59°C estudadas.

Uma análise das Figuras 4.61 e 4.62 evidenciam a forte dependência da estabilidade térmica da enzima imobilizada com a temperatura. Observa-se que para a temperatura de 65°C ocorreu rápida desnaturação da enzima onde em apenas 10 minutos houve perda de aproximadamente 90% da atividade. Já para as temperaturas mais baixas o biocatalisador imobilizado é mais resistente quanto à perda de atividade, por exemplo, para a temperatura de 53°C, observa-se que após 630 minutos ocorreu perda de 42%. Os resultados de atividade

relativa em função do tempo de incubação às várias temperaturas estudadas foram analisados do mesmo modo que foi feito para a enzima na forma solúvel, seguindo o procedimento do item 4.2.5.

Para as temperaturas de 53 a 65°C as Equações 3.1, 3.2 e 3.3 foram ajustadas por regressão não-linear, utilizando o *software Statistica 7.0*, pelo método Quasi-Newton (BISHOP *et al.* 1975) ou pelo método de Levenberg-Marquardt (MORE, 1977). As Tabelas de 4.25 a 4.31 e as Figuras de 4.63 a 4.83, ilustram os resultados obtidos para cada temperatura, o método numérico utilizado, o melhor ajuste com os coeficientes de determinação para cada equação, a soma dos quadrados dos desvios, os respectivos parâmetros ajustados e análise de significância, utilizando o teste *t-Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentaram níveis de significância menores que 10%. Como critério de escolha de ajuste, optou-se pelo ajuste que mais se adequava aos dados experimentais, adotando inicialmente o modelo que apresentasse significado físico dos parâmetros coerentes com o maior valor do coeficiente de determinação (R^2) e o menor valor de soma de quadrado dos desvios. Na Tabela 4.25 são apresentados os valores dos parâmetros ajustados para a temperatura de 65°C.

Tabela 4.25 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 65°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,2178 0	-----	-----	-----	98,7%	0,0068
Eq3.2	Levenberg	0,2473 0,003	-----	0,055 0,42	-----	98,86%	0,0059
Eq3.3	Levenberg	2,124 1	0,1798 0,22	0,789 0,99	-0,0088 0,92	99,44%	0,0029

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.63.

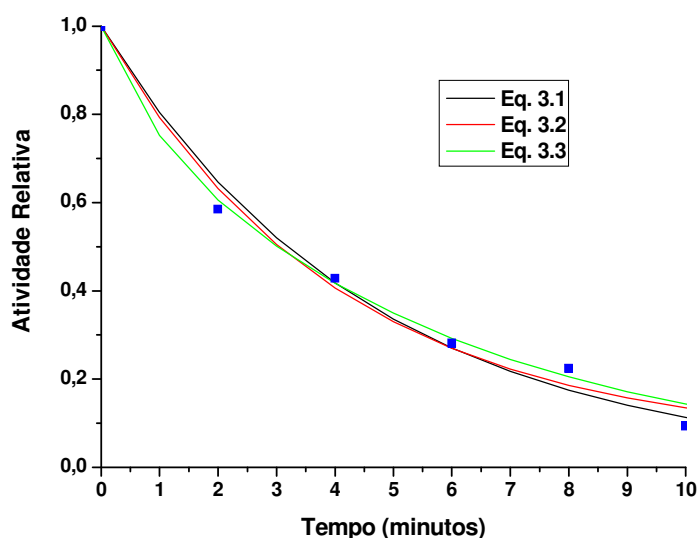


Figura 4.63 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 65°C.

Analisando a Figura 4.63, verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos preditos pelos 3 modelos. Observa-se pela Tabela 4.25, que para todos os 3 ajustes obtiveram alto valor para R^2 e uma baixa soma de quadrados de resíduos. Para a Equação 3.3, apesar de acusar o melhor valor de R^2 e a menor soma de quadrados de resíduos, foi obtido valores com valor-p maiores que 10%, ou seja, tornando-os não significativos pelo teste *t-Student*. A Equação 3.2 apresentou o valor do parâmetro α_1 também não significativo, com isto, somente a Equação 3.1 foi ajustada com parâmetros físicos significativos, mesmo apresentando entre os 3 ajustes o menor valor do coeficiente de determinação (R^2) e a maior soma de quadrados dos desvios, ou seja, o modelo de desativação de primeira ordem foi o que apresentou melhor ajuste com significados físicos dos parâmetros coerentes. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.18.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,2178)t} \quad (4.18)$$

A Figura 4.64 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.65 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.65 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.1 apresentaram valores próximos ao fornecido pela equação empírica, fato este que pode ser justificado pelo alto valor do coeficiente de determinação. Na Figura 4.65 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição o que tornaria o ajuste não adequado.

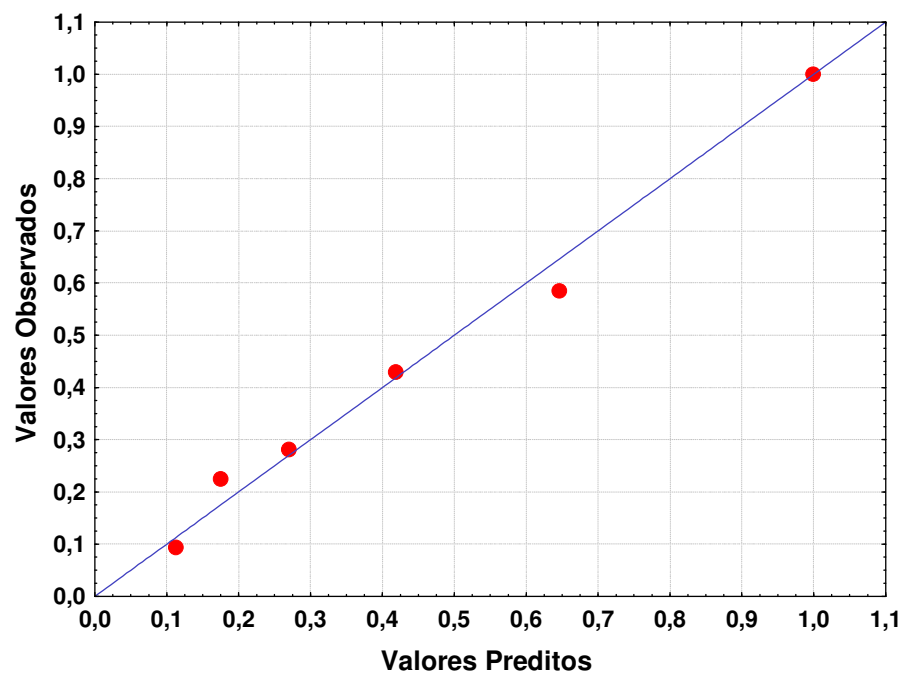


Figura 4.64 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

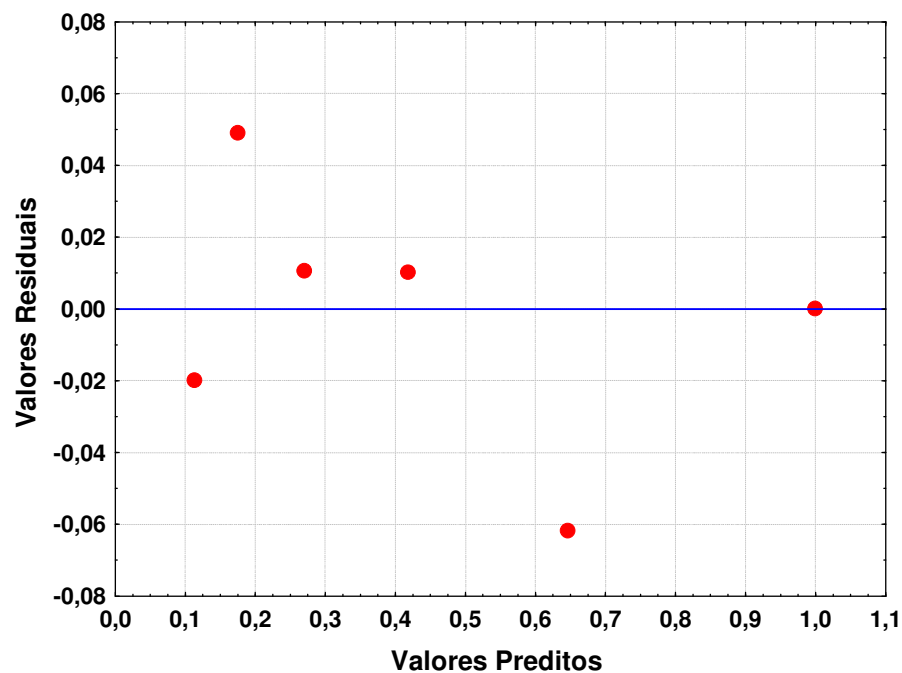


Figura 4.65 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.26 são apresentados os valores dos parâmetros ajustados para a temperatura de 63°C.

Tabela 4.26 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 63°C

	Método	k ₁ valor- p	k ₂ valor- p	α ₁ valor- p	α ₂ valor- p	R ²	Σ(V-V _{modelo}) ²
Eq3.1	Levenberg	0,0574 0	-----	----	-----	98,8%	0,0075
Eq3.2	Levenberg	0,0373 0	-----	-0,3095 0,029	-----	99,7%	0,0018
Eq3.3	Quasi	0,0634	2,2387	3,27	-0,0068	99,5%	0,0029

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.66.

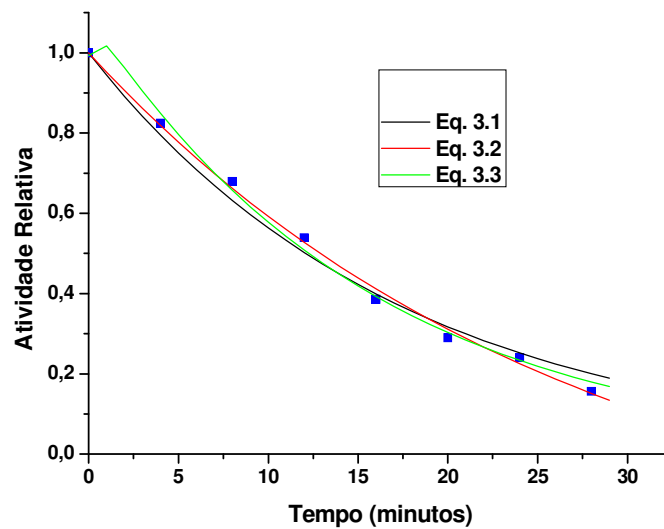


Figura 4.66 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 63°C.

Analisando a Figura 4.66 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos preditos pelos 3 modelos. Observa-se pela Tabela 4.24, que para todos os 3 ajustes obtiveram-se alto valor para R² e baixa soma de quadrados de resíduos. A Equação 3.2 e a Equação 3.3 apresentaram valores de α₁ e α₂ negativos, o que invalida o significado físico dos modelos. Com isto, somente a Equação 3.1 foi ajustada com parâmetros físicos significativos, mesmo apresentando entre os 3 ajustes o menor valor do coeficiente de determinação (R²) e a maior soma de quadrados dos desvio, ou seja, o modelo de desativação de primeira ordem foi o que apresentou melhor ajuste com parâmetros coerentes com significado físico. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.19.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0574) t} \quad (4.19)$$

A Figura 4.67 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.68 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.64 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.1 apresentaram valores próximos ao fornecido pela equação empírica, fato este justificado pelo alto valor do coeficiente de determinação. Na Figura 4.65 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição, o que tornaria o ajuste não adequado.

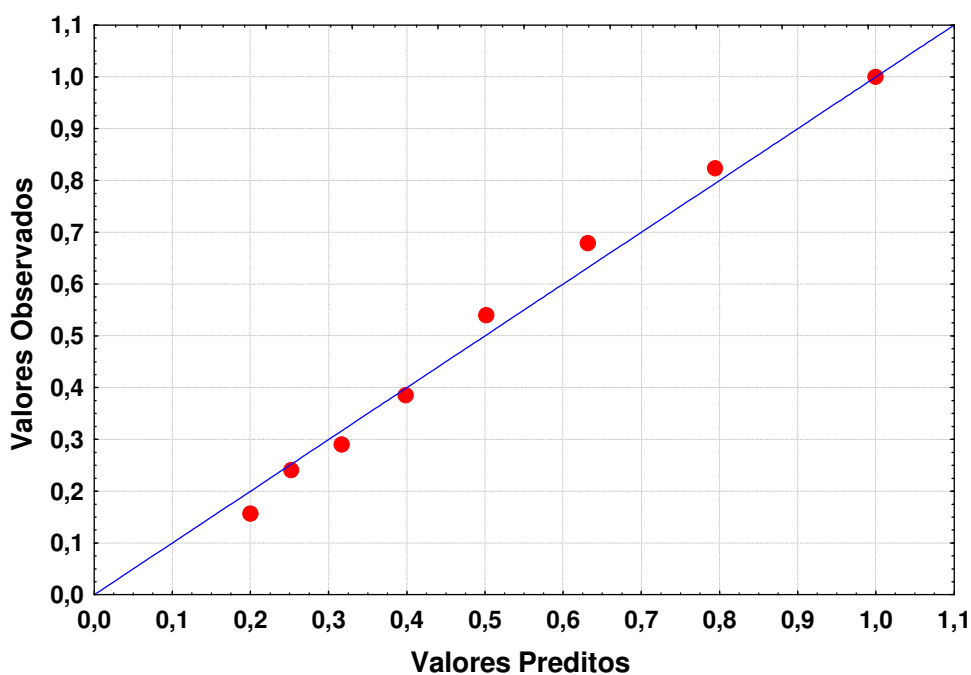


Figura 4.67 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

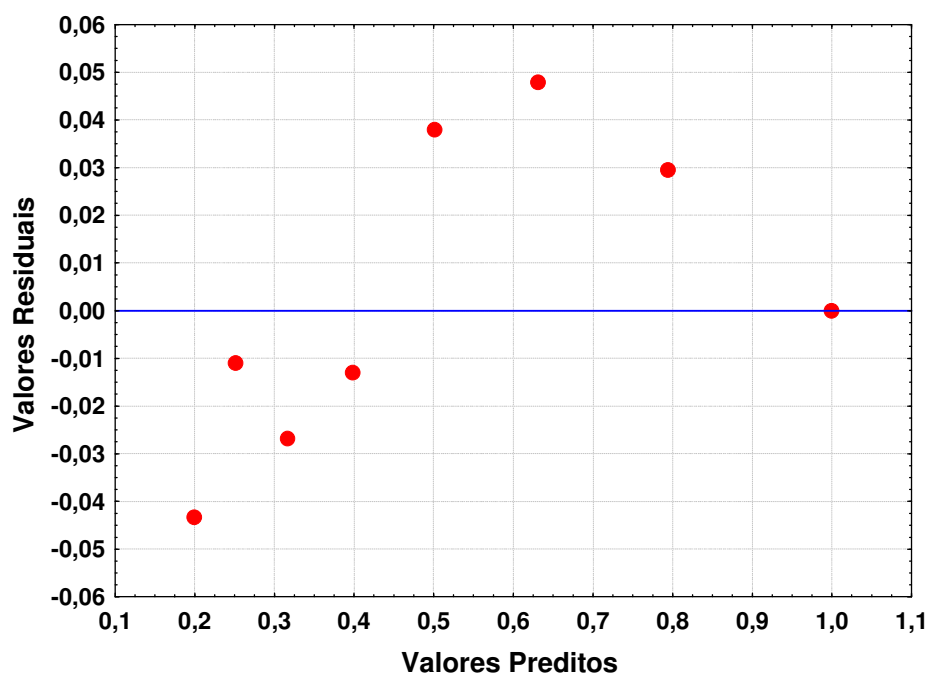


Figura 4.68 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.27 são apresentados os valores dos parâmetros ajustados para a temperatura de 61°C.

Tabela 4.27 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 61°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,0535 0	-----	----	-----	96,7%	0,0205
Eq3.2	Levenberg	0,0659 0	-----	0,1014 0	-----	99,9%	0,0003
Eq3.3	quasi	0,0106 -----	0,0857 ----	-5,56 -----	0,0089 -----	99,1%	0,0055

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.69.

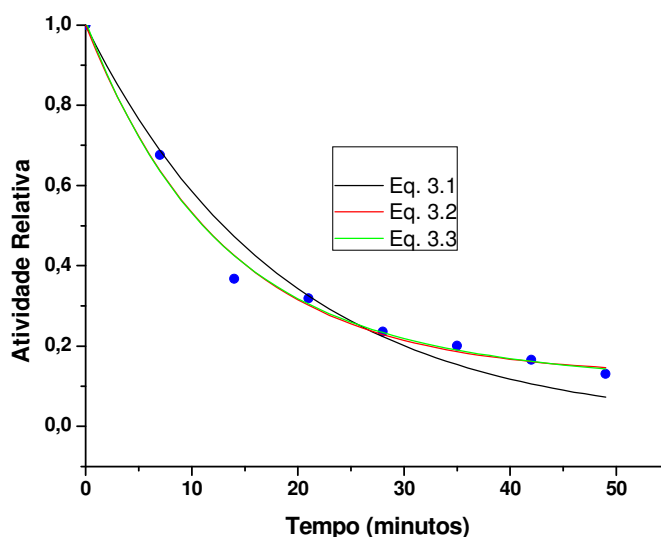


Figura 4.69 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 61°C.

Analisando a Figura 4.69 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos previstos para os 3 modelos. Para esta temperatura de 61°C foi possível ajustar as Equações 3.1 e 3.2 com parâmetros significativos e fisicamente coerentes. Comparando os parâmetros estatísticos obtidos pelas duas equações, observa-se que a Equação 3.2 apresentou melhor ajuste ao comparado com o modelo de desativação de primeira ordem devido ao menor valor da soma dos quadrados dos desvios e maior valor obtido do coeficiente de determinação (R^2). Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.20.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,1014) \cdot e^{(-0,0659)t} + 0,1014 \quad (4.20)$$

Observando a Tabela 4.25 os valores dos parâmetros obtidos para a Equação 3.3, o parâmetro α_1 apresentou valor negativo o que torna este ajuste não condizente com o significado físico do modelo.

A Figura 4.70 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.71 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.70 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.2 apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.71 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

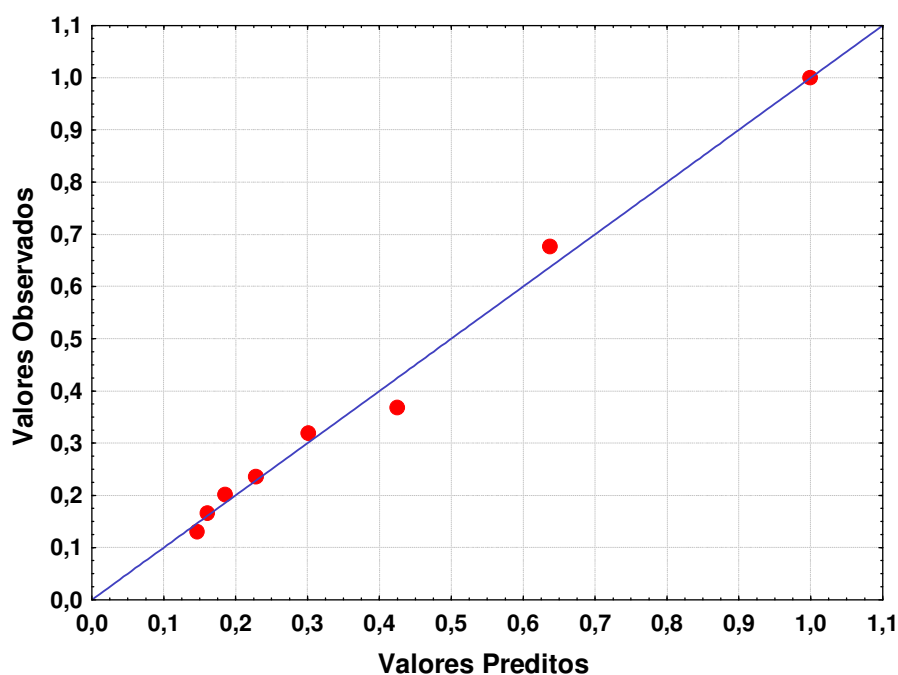


Figura 4.70- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

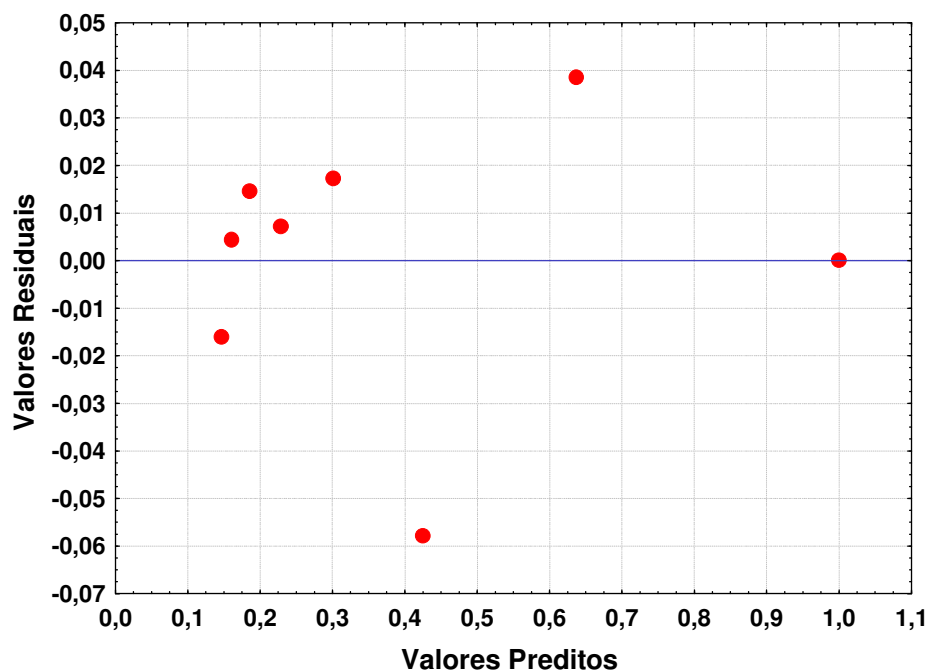


Figura 4.71 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.28 são apresentados os valores dos parâmetros ajustados para a temperatura de 59°C.

Tabela 4.28 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 59°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,026 0	-----	----	-----	98,5%	0,0093
Eq3.2	Levenberg	0,0280 0,001	-----	0,028 0,73	-----	98,5%	0,0090
Eq3.3	quasi	0,030 -----	2,05 ----	5,11 -----	0,02 -----	98,8%	0,0074

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.72.

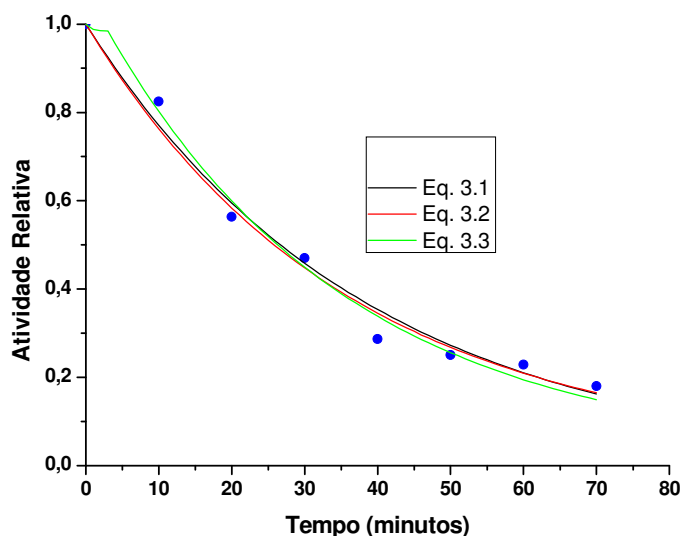


Figura 4.72 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 59°C.

Analisando a Figura 4.72 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos preditos apenas pelos ajustes das Equações 3.1 e 3.2. Observa-se que para a Equação 3.3, foi obtido valor maior que 1 para o parâmetro α_1 o que não condiz com o significado físico dos mesmos. A Equação 3.2 apresentou o valor do parâmetro α_1 com valor-p maior que 10% tornando-o não significativo pelo teste *t-Student*. Com isto, somente a Equação 3.1 foi ajustada com parâmetros físicos significativos, mesmo apresentando entre os 3 ajustes o menor valor do coeficiente de determinação (R^2) e a maior soma de quadrados dos desvio, ou seja, o modelo de desativação de primeira ordem foi o que apresentou melhor ajuste com significado físico e parâmetros coerentes. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.21.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,026) t} \quad (4.21)$$

A Figura 4.73 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.74 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.73 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.1 apresentaram valores próximos ao fornecido pela equação empírica, fato este justificado pelo alto valor do coeficiente de determinação. Na Figura 4.74 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição o que tornaria o ajuste não adequado.

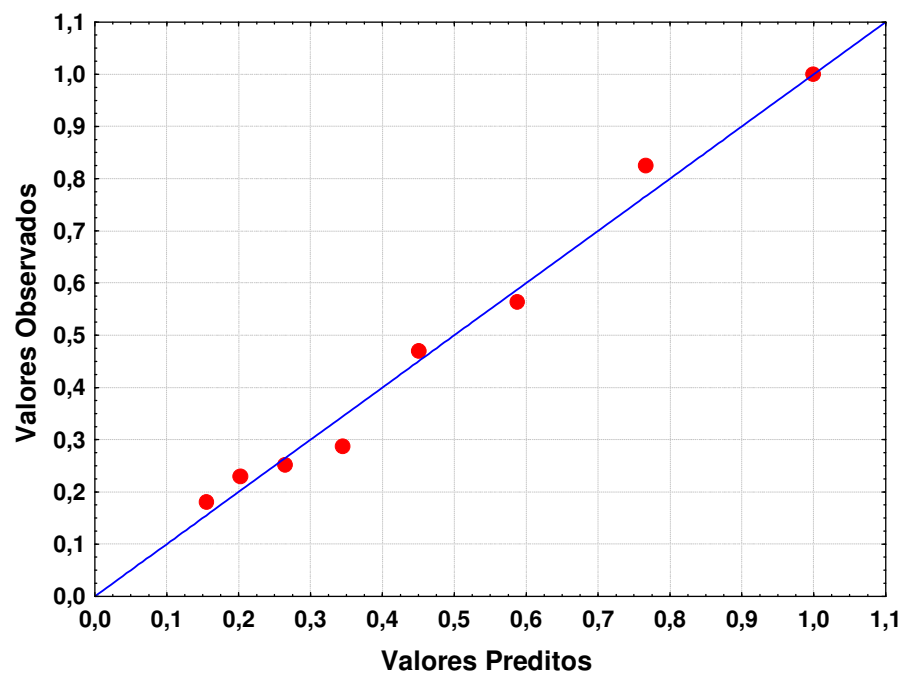


Figura 4.73 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

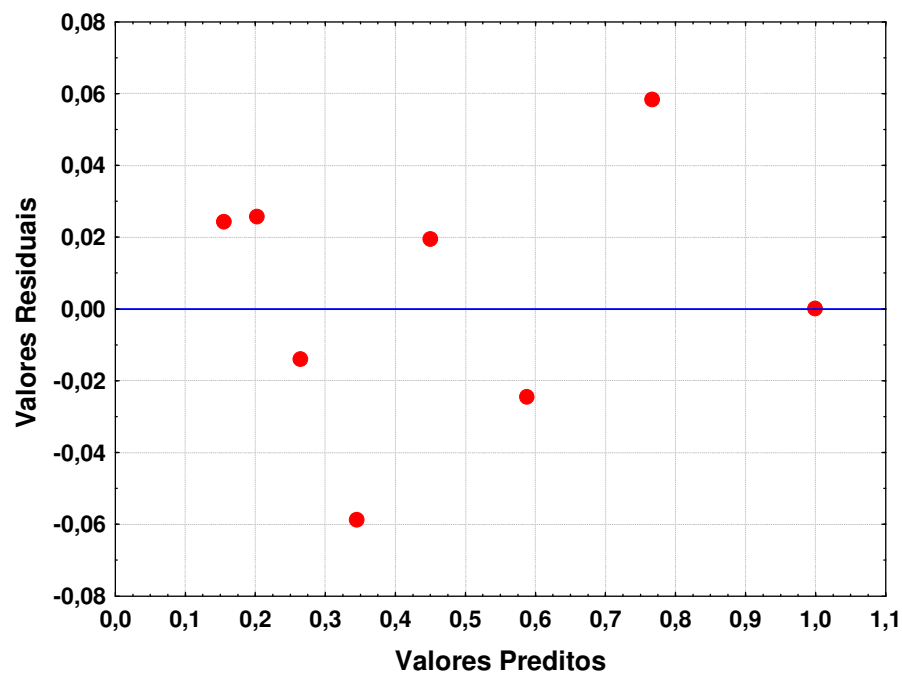


Figura 4.74 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.29 são apresentados os valores dos parâmetros ajustados para a temperatura de 57°C.

Tabela 4.29 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 57°C

	Método	k ₁ valor- p	k ₂ valor- p	α ₁ valor- p	α ₂ valor- p	R ²	Σ(V-V _{modelo}) ²
Eq3.1	Levenberg	0,014 0	-----	----	-----	99%	0,0045
Eq3.2	Levenberg	0,0142 0,0018	-----	-0,00202 0,98	-----	99%	0,0045
Eq3.3	quasi	0,0141 -----	5,203 ----	-0,8 -----	-0,004 -----	99%	0,0074

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.75.

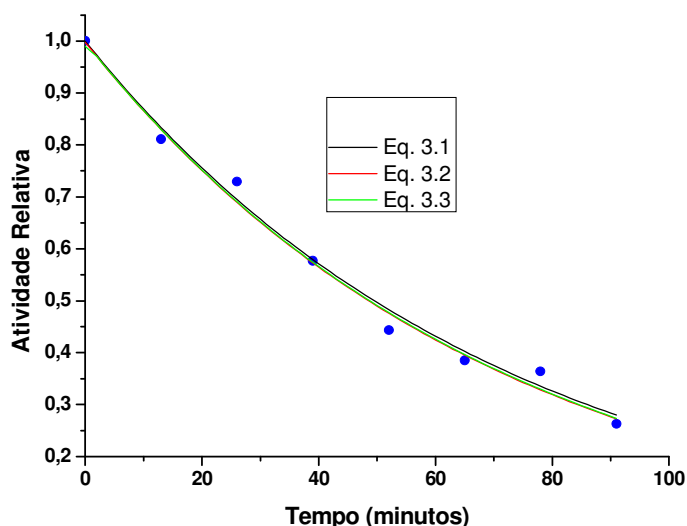


Figura 4.75 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 57°C

Analisando a Figura 4.75 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos preditos apenas pelos 3 modelos. Observa-se que para a Equação 3.3, foi obtido valores negativos para os parâmetros α_1 e α_2 que não condiz com o significado físico dos mesmos. A Equação 3.2 apresentou o valor do parâmetro α_1 negativo e com valor-p maior que 10% tornando-o não significativo pelo teste *t-Student*. Com isto, somente a Equação 3.1 foi ajustada com parâmetros físicos significativos. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.22.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0142)t} \quad (4.22)$$

A Figura 4.76 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.77 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura

4.76, nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.1 apresentaram valores próximos ao fornecido pela equação empírica, fato este justificado pelo alto valor do coeficiente de determinação. Na Figura 4.77 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição, o que tornaria o ajuste não adequado.

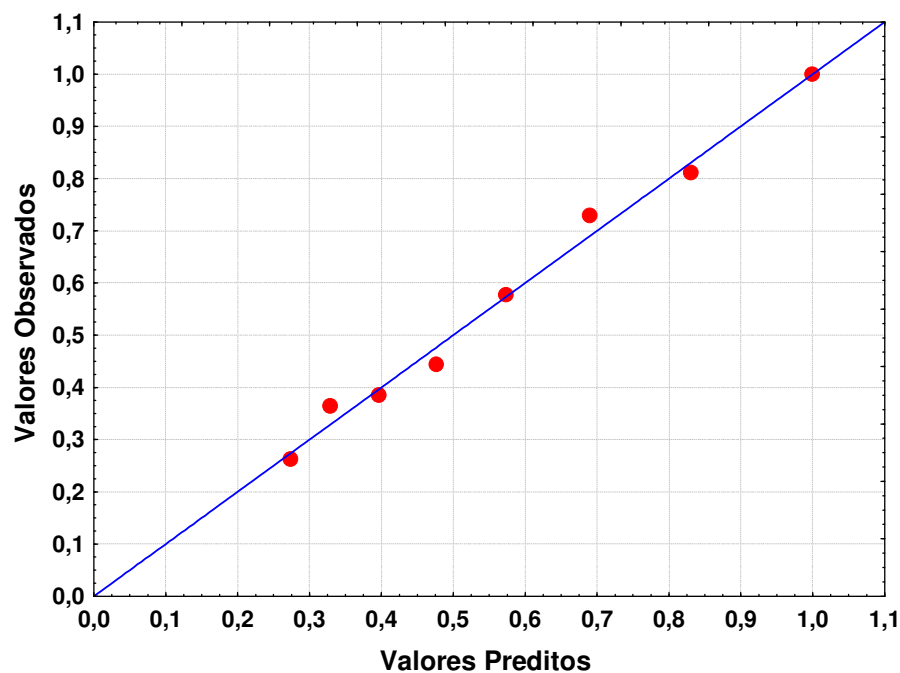


Figura 4.76 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

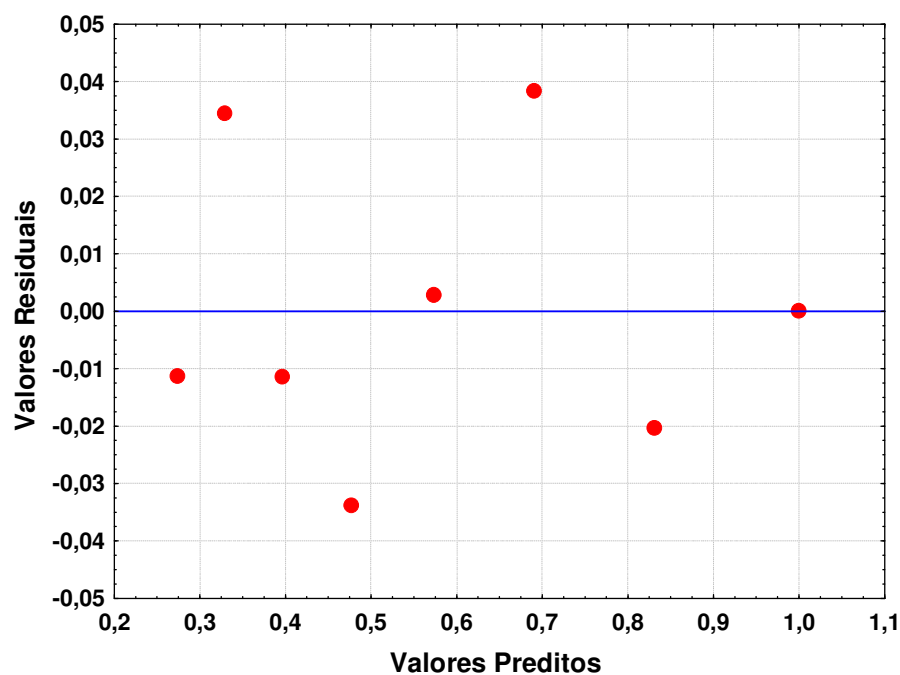


Figura 4.77 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.30 são apresentados os valores dos parâmetros ajustados para a temperatura de 55°C.

Tabela 4.30 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 55°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,0086 0	-----	-----	-----	91,8%	0,026
Eq3.2	Levenberg	0,0314 0,0003	-----	0,3715 0	-----	97,9%	0,0069
Eq3.3	quasi	0,0018 -----	0,038 -----	-10,768 -----	0,0045 -----	97,9%	0,0067

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.75.

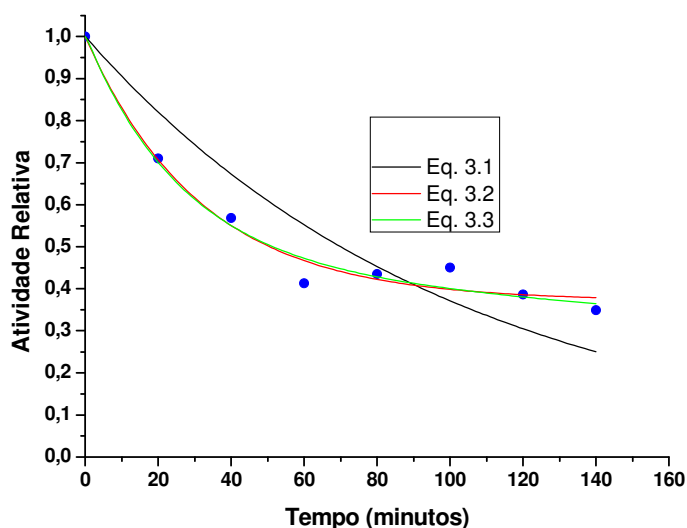


Figura 4.78 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 55°C

Analisando a Figura 4.78 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos previstos apenas para os modelos das Equações 3.2 e 3.3. Para a Equação 3.1, obteve-se o menor valor de R^2 e a maior soma de quadrados de desvios entre os 3 ajustes. Para a Equação 3.3, verifica-se alto valor de R^2 e a menor soma dos quadrados dos desvios, porém o parâmetro α_1 foi negativo e maior que 1, ou seja, fisicamente não significativo de acordo com o modelo. Com isto, apenas a Equação 3.2 pode ser ajustada com parâmetros significativos e fisicamente coerentes. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.23.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,3715) \cdot e^{(-0,0314)t} + 0,3715 \quad (4.23)$$

A Figura 4.79 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.80 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.79, nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.2 apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.80 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

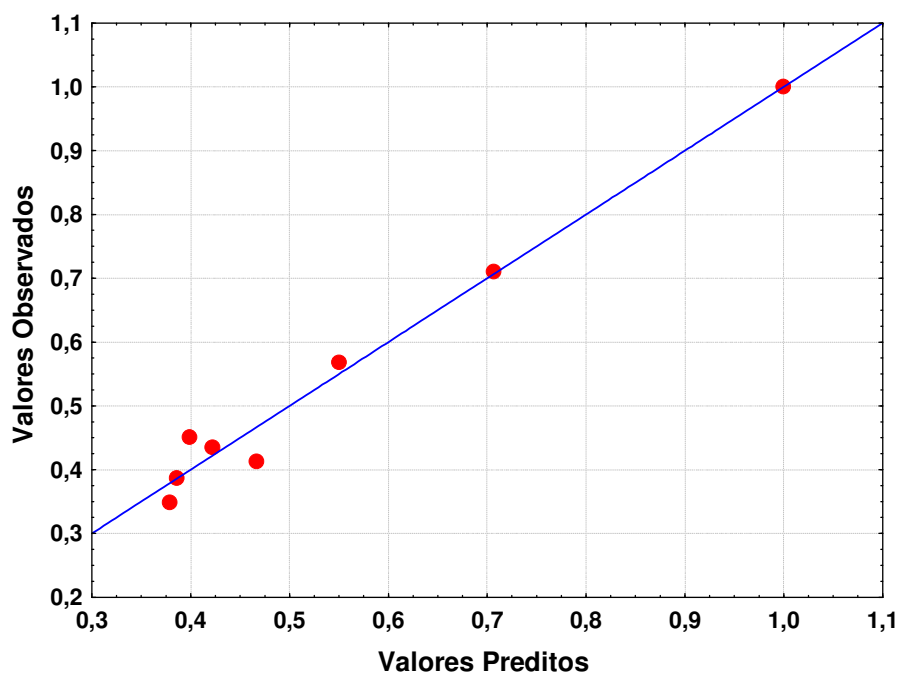


Figura 4.79 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

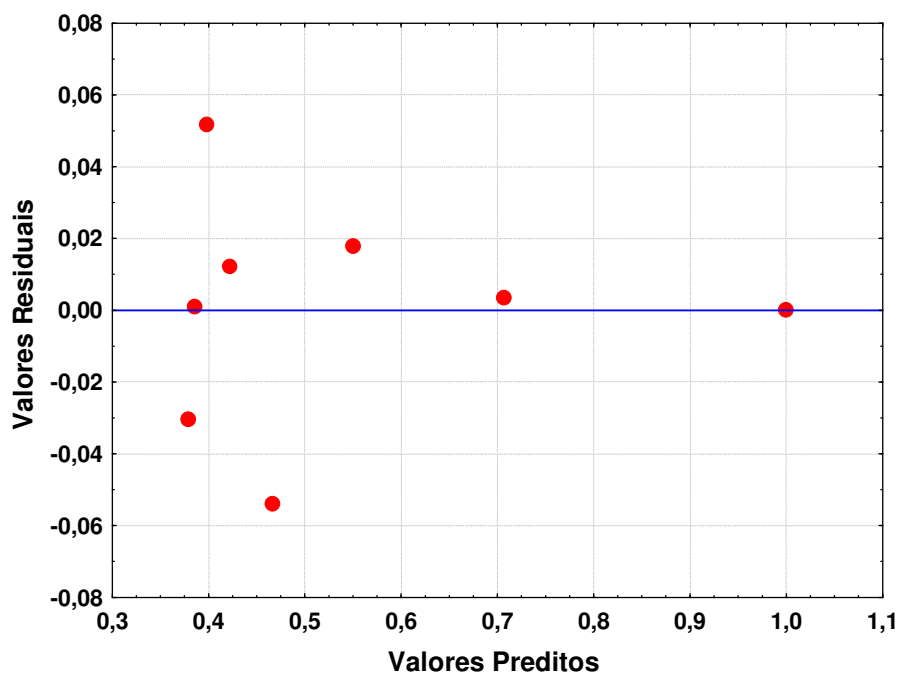


Figura 4.80 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Na Tabela 4.31 são apresentados os valores dos parâmetros ajustados para a temperatura de 53°C.

Tabela 4.31 – Ajustes dos parâmetros na desativação térmica para temperatura de 53°C

	Método	k_1 valor- p	k_2 valor- p	α_1 valor- p	α_2 valor- p	R^2	$\Sigma(V-V_{\text{modelo}})^2$
Eq3.1	Levenberg	0,0009 0	-----	----	-----	88,4%	0,013
Eq3.2	Levenberg	0,0042 0,013	-----	0,5702 0	-----	94,7%	0,0069
Eq3.3	quasi	0,00102 -----	5,0018 ----	9,99 -----	0,0071 -----	82,6%	0,0206

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos 3 modelos estão representados na Figura 4.81.

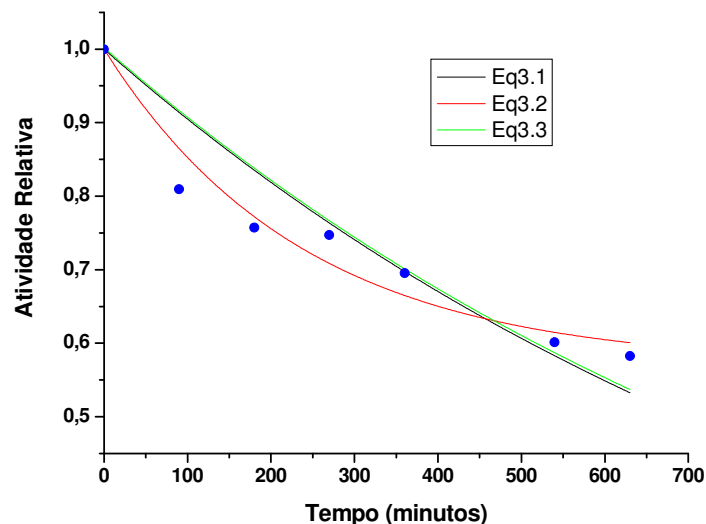


Figura 4.81 – Perfil da desativação térmica na temperatura de 53°C

Analisando a Figura 4.81 verifica-se bom ajuste entre os valores experimentais e os teóricos previstos apenas para o modelo da Equação 3.2. Para as Equações 3.1 e 3.3, obteve-se os menores valores R^2 e as maiores somas de quadrados de desvios, além disto, o parâmetros α_1 para a Equação 3.3 possui valor maior que 1, tornando estes dois modelos não adequados para a modelagem de desativação térmica. Com isto, apenas a Equação 3.2 pode ser ajustada com parâmetros significativos e fisicamente coerentes. Os parâmetros ajustados a este modelo estão representados na Equação 4.24.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,5702).e^{(-0,00424)t} + 0,5702 \quad (4.24)$$

A Figura 4.82 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.83 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero. Observando a Figura 4.82 nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática para a Equação 3.2 apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Na Figura 4.83 vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.

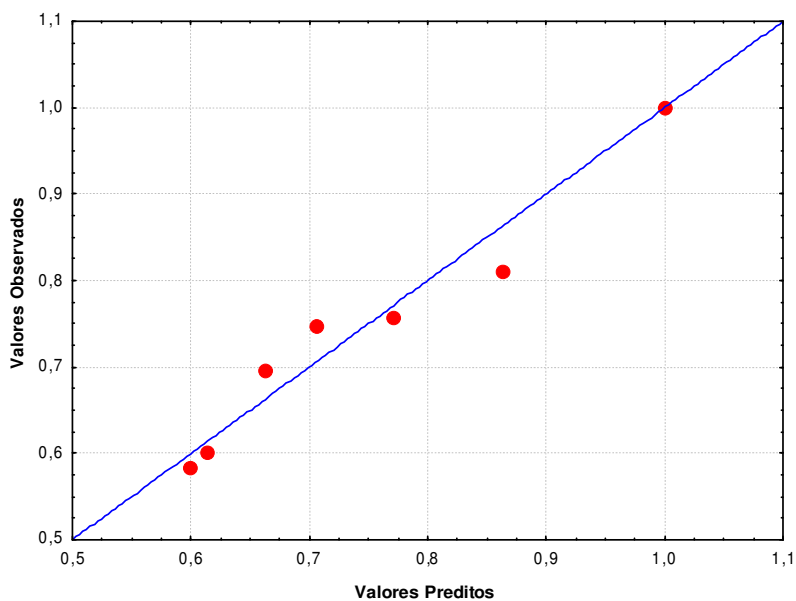


Figura 4.82- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática

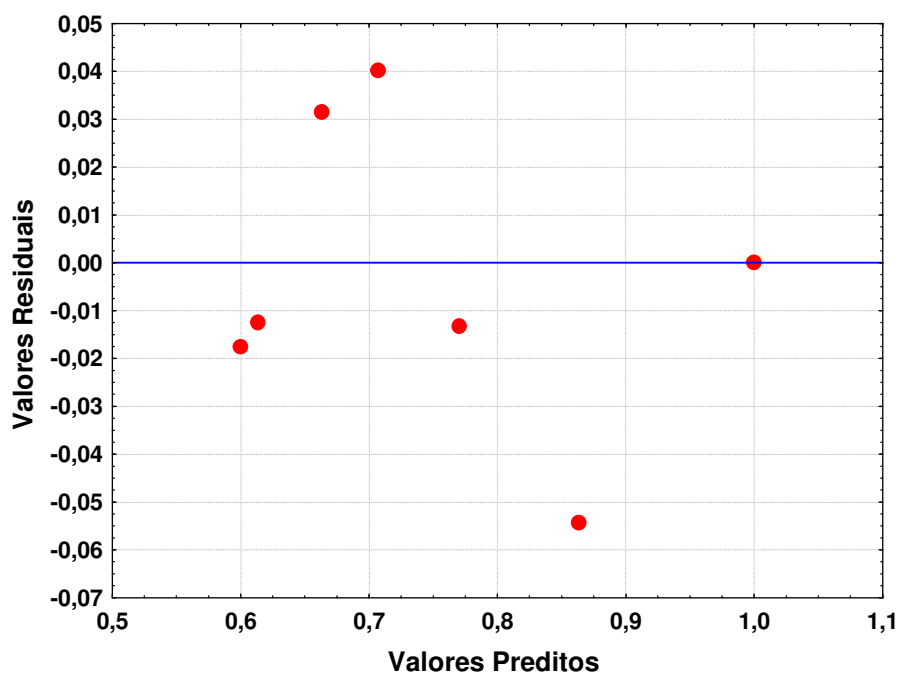


Figura 4.83 –Distribuição dos resíduos relativa à atividade enzimática.

Observando os resultados obtidos para a modelagem de desativação térmica em série representada pela Equação 3.3, esta não se ajustou bem a nenhuma das 7 temperaturas estudadas. Para a maior a temperatura (65°C), o melhor ajuste se deu à cinética de desativação de primeira ordem (Equação 3.1). Para as temperaturas de 63 e 61°C, o ajuste da Equação 3.1 poderia ter sido utilizado, mas os valores dos parâmetros ajustados para a modelagem de desativação em série em única etapa, Equação 3.2, apresentaram-se estatisticamente significativos (maior R^2 e menor soma de quadrados dos desvios) e com coerência física ao modelo melhores ao da Equação 3.1. Para a temperatura de 59°C os valores do parâmetro α_1 possui nível de significância maior que 10% de acordo com o teste *t-Student*, tornando inviável o uso da Equação 3.2 para o ajuste. Sendo assim, para esta temperatura, os parâmetros de desativação térmica se ajustaram ao modelo de primeira ordem. Para a temperatura de 57°C, os valores de R^2 e a soma dos quadrados dos desvios foram bastante próximos entre as Equações 3.1.e 3.2, mas o parâmetros α_1 possui valor negativo e nível de significância maior que 10% para a Equação 3.2. Portanto, para esta temperatura, foi adotado o ajuste da Equação 3.1. Para as temperaturas de 55 e 53°C, a Equação 3.2 ajustou-se melhor aos dados experimentais com altos valores de R^2 e baixas somas de quadrados de resíduos, o que já era de se esperar pois para baixas temperaturas esta equação ajusta-se melhor quando comparados aos outros modelos cinéticos (MARQUEZ, 2007). Além disso, quanto maior a temperatura, maior o parâmetro da constante da taxa de desativação térmica (k_d), o que está de acordo com a Equação de Arrhenius. Utilizando as constantes de desativação térmica (k_d) dos modelos ajustados, foram calculados os tempos de meia-vida para cada temperatura, utilizando a Equação 3.14 e os mesmos estão apresentados na Tabela 4.32.

Tabela 4.32 – Tempo de meia vida para as temperaturas estudadas

Temperatura (°C)	k_d	R^2	Equação do Modelo	$t_{1/2}$ (min)
65	0,2178	98,7%	4.18	3,18
63	0,0574	98,8%	4.19	12,07
61	0,0659	99,9%	4.20	12,33
59	0,026	98,5%	4.21	26,66
57	0,0142	99%	4.22	48,81
55	0,031	97,9%	4.23	50,55
53	0,0042*	94,7%	4.24*	----

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

Não foi possível calcular o tempo de meia vida para a temperatura de 53°C, pelo modelo da Equação 4.24, como pode ser notado na Tabela 4.32, pois assim como na enzima livre, apresentaram significados físicos incoerentes. Assim, foi utilizado o modelo de primeira ordem para todas as temperaturas, embora para algumas delas não seja o melhor ajuste estatístico, entretanto como os parâmetros apresentaram significado físico para todas as temperaturas estudadas, os tempos de meia vida obtidos estão apresentados na Tabela 4.33. Desta forma o modelo de desativação térmica em série com uma etapa não se mostrou satisfatório para descrever a desativação térmica da enzima na faixa de temperatura estudada.

Tabela 4.33 – Tempo de meia vida para cada temperatura utilizando modelo de primeira ordem de desativação térmica para a enzima imobilizada

Temperatura (°C)	k_d (min ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (min)
65	0,2178	96,7%	3,18
63	0,0574	98,8%	12,07
61	0,0535	96,7%	12,95
59	0,026	98,5%	26,66
57	0,014	99%	49,51
55	0,0086	91,8%	80,59
53	0,0009	88,4%	770,16

No trabalho de GAUR *et al.* (2006), a enzima β -galctosidade de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em três diferentes tipos de suportes: adsorção em celite, ligação covalente em quitosana e ligação cruzada com glutaraldeído. Para as três temperaturas verificadas, os tempos de meia vida obtidos foram bastante superiores aos valores encontrados neste trabalho. Para 55°C os valores foram 18; 14,17 e 17,37 horas para as imobilizações em quitosana, celite e ligação cruzada, respectivamente. Para 65°C estes valores foram 0,79 e 1,07 horas para as imobilizações em quitosana e ligação cruzada. Verifica-se aqui forte dependência da estabilidade térmica da enzima com o método de imobilização utilizado, justificando os diferentes valores obtidos para o tempo de meia vida. ALBAYRAK e YANG (2002) encontraram os valores de tempo de meia vida de 10040, 1155 e 49 horas para as temperaturas 40, 50 e 60°C, respectivamente, para β -galctosidade de *Aspergillus oryzae* imobilizada covalentemente em fibra de algodão.

Os resultados de k_d em função da temperatura obtidos para o ajuste de primeira ordem (Tabela 4.33) foram ajustados ao modelo de Arrhenius (Equação 3.5), para a

determinação da energia de ativação do processo de desativação térmica, conforme Figura 4.84 e Equação 4.25

$$\ln(k_d) = -36345 * \frac{1}{R} \cdot \frac{1}{T} + 105,9 \quad (4.25)$$

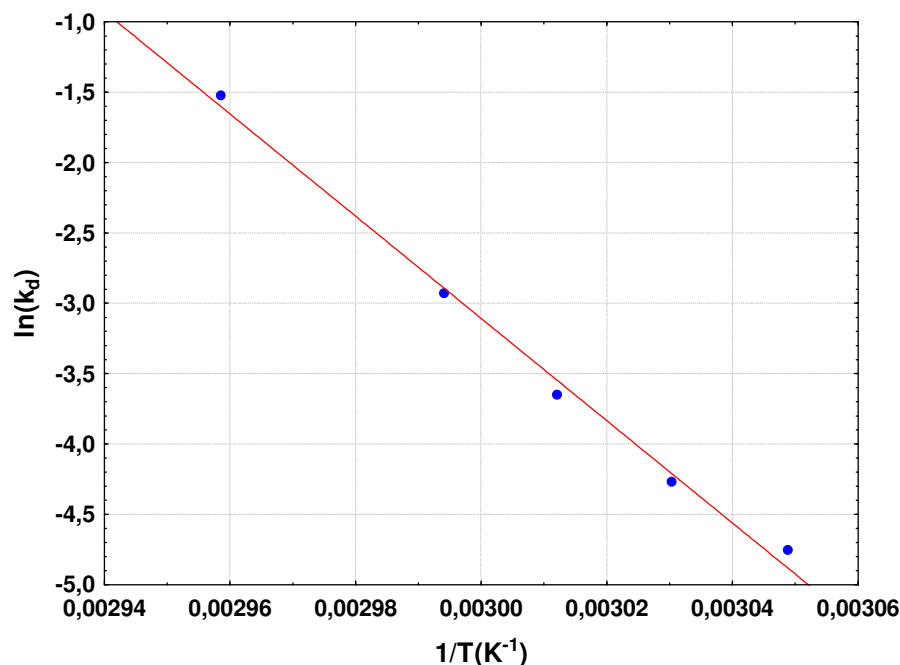


Figura 4.84 – Ajuste dos valores de k_d à Equação de Arrhenius.

O ajuste linear obtido alcançou coeficiente de determinação de 99,41% . Assim a energia de ativação do processo de desativação foi da ordem de 72,04 kcal/mol. Observa-se que este valor está um pouco afastados dos valores obtidos por alguns autores citados na literatura para a enzima de outras fontes. No trabalho de ZHOU e CHEN (2001), β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi imobilizada em superfícies de grafite por ligações cruzadas. Observou-se o valor de 47,5 kcal/mol para a energia de ativação do processo de desativação. HILL e BAKKEN (1992) imobilizaram β -galactosidase de *Bacillus circulans* e encontraram o valor de 43,23 kcal/mol.

4.3.7 - Estudo da estabilidade da enzima imobilizada em relação ao pH

Na Figura 4.85 são representadas as atividades relativas, A_i/A_0 , definida pela relação entre a atividade após 18 horas de incubação e a inicial.

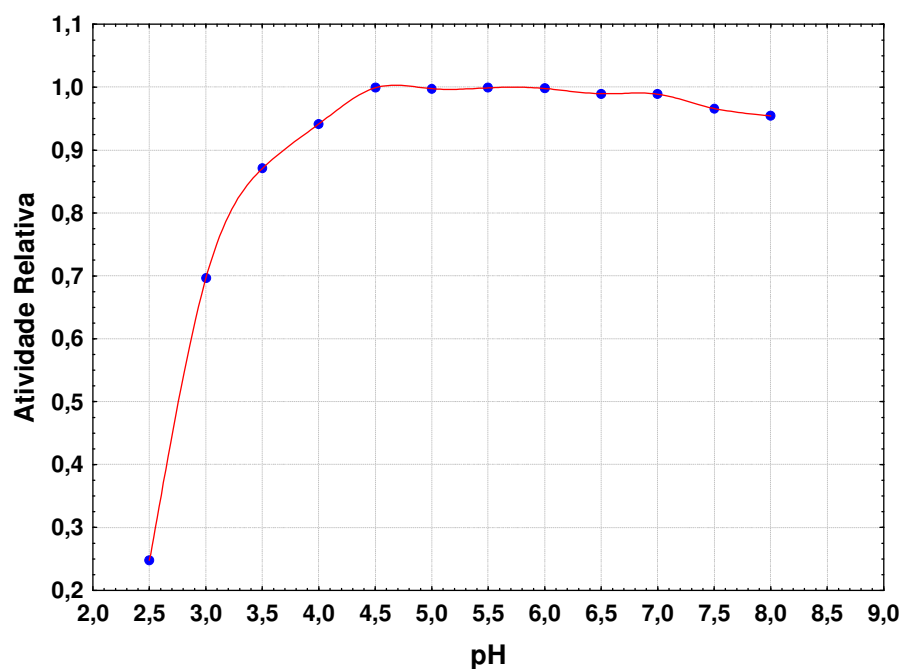


Figura 4.85 – Influência do pH na estabilidade enzimática

Observa-se que a atividade das amostras de enzimas imobilizadas mantiveram-se praticamente estáveis na faixa de pH de 4,5 a 7 com relação a atividade inicial (A_0), determinadas a pH 4,5, o que também foi observado nos resultados obtidos para a enzima na forma livre. Um fato importante a ser mencionado é que o pH de máxima atividade da enzima imobilizada, conforme item 4.3.4, foi 5,0.

4.3.8 - Influência da concentração inicial de galactose na atividade da enzima imobilizada

Os resultados observados da influência da concentração dos produtos na reação de hidrólise da lactose (glicose e galactose) para a enzima na forma solúvel, mostraram que apenas a galactose se comporta como inibidor da reação enzimática. Este resultado foi estendido para a enzima imobilizada visto que se trata da mesma enzima, só que agora de forma imobilizada. Portanto o objetivo deste estudo é verificar a influência da galactose na cinética de reação enzimática, verificando em qual modelo de inibição melhor se ajusta e se ocorre alguma alteração do modelo ajustado da enzima livre para a imobilizada. Os resultados experimentais de velocidade de reação de hidrólise da lactose por enzima β -galactosidase na forma imobilizada em presença de galactose (Gal) são apresentados na Tabela 4.34. As condições experimentais seguiram o item 3.5.8.

Tabela 4.34 - Resultados experimentais de taxa de reação (U_I) em função das concentrações iniciais de galactose (inibidor, g/L) e lactose (substrato, g/ L) no meio reacional.

Substrato	Inibidor	Atividade	Substrato	Inibidor	Atividade
5	0	152,4	40	0	580,2
5	2,5	117,6	40	2,5	411,6
5	10	108,6	40	5	357
10	0	306	40	7,5	322,8
10	2,5	147	60	0	104,4
10	5	121,2	60	2,5	447
10	7,5	106,2	60	5	427,8
10	10	102,6	60	7,5	429,6
20	0	417,6	60	10	471
20	2,5	341,4	80	0	79,8
20	5	279,6	80	2,5	335,4
20	7,5	264	80	5	323,4
20	10	252	80	7,5	520,2
30	0	580,8	80	10	507,6
30	2,5	278,4	100	0	804
30	5	279,6	100	2,5	563,4
30	7,5	406,2	100	5	328,8
30	10	285	100	7,5	590,4
			100	10	548,4

Os resultados da Tabela 4.34 foram ajustados por uma regressão não linear, realizada pelo *software Statistica 7.0*, utilizando o método de Levenberg-Marquardt aos modelos cinéticos de Inibição Competitiva, Inibição Não Competitiva, Inibição Acompetitiva, Inibição Mista Linear e Inibição Parcialmente Não Competitiva, representados pelas Equações 3.16, 3.17, 3.18, 3.19 e 3.20, respectivamente, seguindo a mesma metodologia dos experimentos na forma solúvel (item 3.4.7). A escolha do modelo de inibição adotado foi baseado em dois fatos: primeiramente o significado físico dos parâmetros fornecidos pelos ajustes de cada modelo e em seguida o modelo que forneceu melhor valor do coeficiente de determinação (R^2) e a menor soma de quadrados dos desvios. Na Tabela 4.35 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 galactose.