UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

EMPREGO DE REATOR COM MEMBRANA
NA OBTENÇÃO DA FRUTOSE E ÁCIDO
GLICÔNICO
A PARTIR DA SACAROSE

Luiz Carlos Martins das Neves

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Michele Vitolo

São Paulo

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

EMPREGO DE REATOR COM MEMBRANA
NA OBTENÇÃO DA FRUTOSE E ÁCIDO
GLICÔNICO
A PARTIR DA SACAROSE

Luiz Carlos Martins das Neves

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Michele Vitolo

São Paulo

2006

18.812

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012668

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

NS18e Neves, Luiz Carlos Martins das
Emprego de reator com membrana na obtenção da frutose e
ácido glicônico a partir da sacarose / Luiz Carlos Martins das
Neves. -- São Paulo, 2006.
176p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Vitolo, Michele

1. Biotecnologia 2. Biorreator : Biotecnologia 3. Enzima :
Biotecnologia I. T. II. Vitolo, Michele, orientador.

620.8 CDD

Luiz Carlos Martins das Neves

EMPREGO DE REATOR COM MEMBRANA
NA OBTENÇÃO DA FRUTOSE E ÁCIDO GLICÔNICO
A PARTIR DA SACAROSE

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de Doutor

Professor Doutor Michele Vitolo

(Orientador / Presidente)

Mauri Sérgio Alves Palma
(1º Examinador)

Álvaro Antônio Alencar de Queiroz
(2º Examinador)

Suzana Caetano da Silva Lannes
(3º Examinador)

Alfredo Eduardo Maiorano
(4º Examinador)

São Paulo, 10 de agosto de 2006

***“É infeliz quem despreza a
sabedoria e a disciplina.***

***Sua esperança é vazia,
suas fadigas não produzem frutos
e suas obras são inúteis.”***

(Livro da Sabedoria de Salomão 3,11)

***Aos meus pais Wilson e Anailde,
todo o meu carinho e respeito.***

***Dedico a vocês este trabalho e
agradeço pelos ensinamentos,
apoio constante, convívio
amoroso e o prazer de fazer
parte de uma família unida
e em paz.***

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas vitórias conquistadas.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela oportunidade de realizar este trabalho e ter alcançado mais esta conquista pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao Professor Michele Vitolo pela amizade e orientação, pelo apoio, compreensão, sugestões e ensinamentos passados, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e que tanto ajudaram em meu crescimento profissional.

Aos Professores Adalberto Pessoa Jr., José Abrahão Neto, João Carlos M. Carvalho e Thereza Christina Vessoni Penna pelas contribuições imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório Ester, Marina, Carlota, Ângelo, Ângela, Priscila, André, Tábata, Kátia, Márcio, Thaís e Letícia pela amizade, excelente convívio e toda a cooperação dada a mim.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Sumário	i
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xxi
Lista de Símbolos	xxii
Resumo	xxv
Abstract	xxvi
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1. Sobre os biocatalisadores	5
3.1.1. Invertase	6
3.1.2. Glicose-Oxidase	9
3.2. Sobre os biorreatores	13
3.2.1. Biorreatores com membrana	16
3.3. Sobre os produtos	23
3.3.1. Frutose	23
3.3.2. Ácido Glicônico	26
4. Material e Métodos	31
4.1. Materiais	31
4.1.1. Enzimas	31
4.1.1.1. Invertase	31
4.1.1.2. Glicose-oxidase	31
4.1.1.3. Catalase	31
4.1.2. Reagentes e Vidrarias	31
4.1.3. Membranas	32
4.2. Equipamentos	32
4.2.1. Biorreator	32
4.2.2. Outros	32

4.3	Métodos	34
4.3.1	Determinação da atividade enzimática da invertase	34
4.3.2	Determinação da atividade enzimática da glicose-oxidase	34
4.3.3	Descrição de um ensaio típico no biorreator com membrana	36
4.3.4	Separação dos Produtos	36
4.4	Determinações Analíticas	39
4.4.1	Determinação da concentração de açúcares redutores totais	39
4.4.2	Determinação da concentração de glicose	40
4.4.3	Determinação da concentração de proteínas totais	40
4.4.4	Determinação da concentração de ácido glicônico	41
4.4.5	Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio	41
4.4.6	Determinação da concentração de oxigênio dissolvido	42
4.4.7	Titulação Complexométrica de íons cálcio (Ca^{++})	43
4.5	Análise dos resultados	43
4.5.1	Cálculo das constantes cinéticas das enzimas	43
4.5.2	Cálculo dos parâmetros termodinâmicos	43
4.5.3	Cálculo dos resultados obtidos nos ensaios	44
4.5.4	Cálculo da concentração de frutose formada	44
4.5.5	Cálculo da concentração de sacarose consumida	45
4.5.6	Cálculo do grau de conversão da reação de hidrólise da sacarose	45
4.5.7	Cálculo da água oxigenada formada, glicose consumida e ácido glicônico formado para ensaios sem adição de catalase	46
4.5.8	Cálculo da concentração de glicose na saída do biorreator para ensaios com adição de catalase	47
4.5.9	Cálculo do ácido glicônico formado para ensaios	47

	com adição de catalase	
4.5.10	Cálculo da quantidade de peróxido de hidrogênio residual (H_2O_2) para ensaios com adição de catalase	48
4.5.11	Cálculo do grau de conversão da reação de oxidação da glicose (Y) para ensaios com adição de catalase	48
4.5.12	Cálculo da velocidade específica de reação ou produtividade para a glicose-oxidase	48
4.5.13	Cálculo da velocidade específica de reação ou produtividade para a catalase	49
5	Resultados e Discussão	50
5.1	Hidrólise da Sacarose em Reator com Membrana	50
5.1.1	Efeitos das condições operacionais	50
5.1.1.1	Efeito da vazão específica	51
5.1.1.2	Efeito da concentração de invertase	56
5.1.1.3	Efeito da concentração de substrato	62
5.1.1.4	Estudo da estabilidade enzimática frente à temperatura	64
5.1.2	Determinação dos parâmetros cinéticos	71
5.1.3	Determinação dos parâmetros termodinâmicos	73
5.2	Oxidação da Glicose em Reator com Membrana	76
5.2.1	Efeito das condições operacionais	78
5.2.1.1	Efeito da concentração de oxigênio dissolvido	78
5.2.1.2	Efeito da vazão específica (D)	83
5.2.1.3	Efeito da concentração de glicose oxidase (GO)	89
5.2.1.4	Efeito da concentração de catalase (C)	93
5.2.1.5	Efeito da concentração de glicose (G)	107
5.2.1.6	Estudo da estabilidade enzimática frente à temperatura	112
5.2.1.7	Estudo da estabilidade enzimática frente ao pH	117
5.2.2	Determinação dos parâmetros cinéticos	119

5.2.3	Determinação dos parâmetros termodinâmicos	121
5.3	Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em etapa única (multienzimático)	123
5.3.1	Multienzimático sem reciclo	123
5.3.2	Multienzimático com reciclo	141
5.4	Separação dos produtos	146
5.4.1	Neutralização do Ácido Glicônico (1000 mM) em presença de Frutose	146
5.4.2	Cristalização do Gliconato de Cálcio em presença de Frutose	148
6	Conclusões	150
7	Referências Bibliográficas	152
Anexo A	Declaração de dispensa de análise em comitê de ética	166
Anexo B	Currículo Lattes - CNPq	167
Anexo C	Instruções para os membros da Banca Examinadora	176
Anexo D	Autorização	177
Anexo E	Ata de Defesa de Tese	178

Índice de Figuras

Figura 1.1	Custo de produção (US\$/t) para o açúcar de acordo com a região produtora. Fonte: Sindaçúcar (Sindicato das indústrias produtoras de açúcar e álcool). Brasil – CS: região centro-sul; Brasil – NE: região nordeste.	1
Figura 3.1	Estrutura da invertase de <i>S. cerevisiae</i> (Fonte: http://www.rcsb.org/pdb).	7
Figura 3.2	Estrutura da glicose-oxidase de <i>A. niger</i> (Fonte: http://www.rcsb.org/pdb).	10
Figura 3.3	Esquemas de diferentes configurações de reatores enzimáticos (BOMMARIUS, 1993; WANG et al., 1979).	16
Figura 3.4	Estrutura molecular da frutose	23
Figura 3.5	Estrutura molecular do ácido glicônico	26
Figura 4.1	Esquema Experimental dos ensaios em reator com membrana Bioengineering® de 10 mL (volume útil).	33
Figura 4.2	Fotografia do Reator com membrana Bioengineering® de 10 mL (volume útil) em operação durante experimento.	33
Figura 4.3	Imagem do Reator com membrana <i>Bioengineering</i> ® de 10 mL (volume útil)	34
Figura 4.4	Formação de H ₂ O ₂ pela ação da glicose oxidase sobre a glicose em função do tempo (Leitura feita em $\lambda = 240\text{nm}$)	35
Figura 4.5	Variação da Absorbância (240nm) em função da concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).	42
Figura 5.1	Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em 3,0 U/mL (◇), 4,5 U/mL (○), 6,0 U/mL (□) e 12 U/mL (Δ) e sob as condições: [S]=100 mM, D = 1,0 h ⁻¹ , Q = 30 mL/h e pH 5,5	52
Figura 5.2	Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r _l (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em 6,0 U/mL (Δ), 12 U/mL (◇) e 24 U/mL (○) e sob as condições: [S]=100 mM, D = 1,5 h ⁻¹ ,	53

	Q = 15 mL/h e pH 5,5	
Figura 5.3	Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em 3,0 U/mL ($\diamond$), 6,0 U/mL ($\square$), 12 U/mL ($\triangle$) e 24 U/mL ($\circ$) e sob as condições: [S]=100 mM, D = 2,0 h ⁻¹ , Q = 20 mL/h e pH 5,5	54
Figura 5.4	Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em 3,0 U/mL ($\triangle$), 6,0 U/mL ($\square$) e 20 U/mL ($\circ$) e sob as condições: [S]=100 mM, D = 3,0 h ⁻¹ , Q = 30 mL/h e pH 5,5	55
Figura 5.5	Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em 1,0 h ⁻¹ ($\triangle$), 1,5 h ⁻¹ ($\diamond$) 2,0 h ⁻¹ ($\square$) e 3,0 h ⁻¹ ($\circ$) e sob as condições: [S]=100 mM, [I]=6,0 U/mL, T= 35°C e pH 5,5	57
Figura 5.6	Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em 3,0 h ⁻¹ ($\diamond$), 2,0 h ⁻¹ ($\square$) e 1,5 h ⁻¹ ($\circ$) e sob as condições: [S]=100 mM, [I]=24 U/mL, T= 35°C e pH 5,5	58
Figura 5.7	Perfil do grau de conversão X no ensaio de verificação da perda de atividade enzimática nas vazões específicas de 2,0 ($\diamond$) e 1,0 h ⁻¹ ($\blacksquare$) e sob as condições: [S]=100 mM, [I] = 6,0 U/mL e pH 5,5	61
Figura 5.8	Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade específica de reação r (Fig. B) para os testes variando a concentração de sacarose em 5,0 mM (*), 10 mM ($\triangle$), 25 mM ($\blacktriangle$), 50 mM ($\blacksquare$) e 100 mM ($\blacklozenge$) sob as condições: D = 2,0 h ⁻¹ , [I] = 6,0 U/mL, T = 35°C e pH 5,5	63
Figura 5.9	Perfil do do logaritmo da velocidade de reação r em função do tempo para o ensaio a 30°C na hidrólise da sacarose	67

Figura 5.10	Perfil do logaritmo da velocidade de reação r para o ensaio a 35°C na hidrólise da sacarose	68
Figura 5.11	Perfil do logaritmo da velocidade de reação r para o ensaio a 40°C na hidrólise da sacarose	68
Figura 5.12	Perfil do logaritmo da velocidade de reação r para o ensaio a 50°C na hidrólise da sacarose	69
Figura 5.13	Constante de inativação térmica (k_d) como função da temperatura (T) durante o regime permanente para os ensaios variando a temperatura na hidrólise da sacarose	70
Figura 5.14	Gráfico baseado no método de linearização preconizado por <i>Lineweaver-Burk</i> para o cálculo das constantes cinéticas da <i>Bioinvert</i> [®] presente em reator com membrana CSTR e sob as condições: $[I] = 6,0$ U/mL, $D = 1,5$ h ⁻¹ , $T = 35^\circ\text{C}$ e pH 5,5.	72
Figura 5.15	Logaritmo da constante de inativação (k_d) em função do inverso da temperatura de processo ($1/T$). Estudo da energia de ativação térmica para os ensaios de hidrólise de sacarose	73
Figura 5.16	Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a vazão específica em 1,0 h ⁻¹ (□), 3,0 h ⁻¹ (Δ) e 6,0 h ⁻¹ (◇). Mantiveram-se constantes a temperatura (30°C), pH (5,5), concentração de glicose (2,5 mM), concentração de oxigênio (6,0 mg/L) e concentração de glicose oxidase (10 U/mL).	79
Figura 5.17	Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a vazão específica em 1,0 h ⁻¹ (□), 3,0 h ⁻¹ (Δ) e 6,0 h ⁻¹ (◇). Mantiveram-se constantes a temperatura (30°C), pH (5,5), concentração de glicose (2,5 mM), concentração de oxigênio (8,0 mg/L) e concentração de glicose oxidase (10 U/mL).	80

Figura 5.18	Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a vazão específica em $1,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ)	84
Figura 5.19	Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a vazão específica em $1,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$), $2,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ ($\diamond$)	85
Figura 5.20	Perfil da velocidade de reação r (A) e grau de conversão Y (B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a vazão específica em $0,5 \text{ h}^{-1}$ ($\diamond$), $1,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ)	87
Figura 5.21	Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a vazão específica em $1,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ)	88
Figura 5.22	Variação do grau de conversão - Y ($\square$) e taxa específica de reação - r_{GO} ($\diamond$) em função da concentração de glicose-oxidase (GO)	89
Figura 5.23	Variação do grau de conversão - Y ($\square$) e taxa específica de reação - r_{GO} ($\diamond$) em função da concentração de glicose-oxidase (GO)	90
Figura 5.24	Perfil da velocidade de reação da GOD r_{GOD} (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a concentração de catalase em 100 U/mL ($\diamond$), 200 U/mL ($\blacksquare$) e 300 U/mL (Δ). Os experimentos foram efetuados a 30°C , $\text{pH } 5,5$, $\text{GO} = 10 \text{ U/mL}$, $[\text{G}] = 5,0 \text{ mM}$, $\text{O}_2 = 8,0 \text{ mg/L}$ e $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$	94
Figura 5.25	Perfil da velocidade de reação da catalase r_{cat} (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio na saída do reator (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a concentração de catalase em 100 U/mL ($\diamond$), 200 U/mL ($\blacksquare$) e	95

300 U/mL (Δ). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, GO = 10 EU/mL, [G] = 5,0 mM saturado em O₂ e D = 3,0 h⁻¹

- Figura 5.26 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da glicose-oxidase r_{GO} para os ensaios de oxidação da glicose com presença (100 U/mL) ($\blacksquare$) e ausência de catalase (Δ). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, GO = 10 EU/mL, [G] = 5,0 mM, [O₂] = 8,0 mg/L e [D] = 3,0 h⁻¹ 97
- Figura 5.27 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GOD r_{GOD} (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a proporção entre glicose oxidase e catalase em 1:10 (Δ), 1:20 ($\blacklozenge$), 1:30 ($\bigcirc$) e 1:40 ($\blacksquare$). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, [O₂] = 8,0 mg/L e D = 3,0 h⁻¹ 98
- Figura 5.28 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase r_{Cat} (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a proporção entre glicose oxidase e catalase em 1:10 (Δ), 1:20 ($\blacklozenge$), 1:30 ($\bigcirc$) e 1:40 ($\blacksquare$). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, [O₂] = 8,0 mg/L e D = 3,0 h⁻¹ 99
- Figura 5.29 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GOD r_{GOD} (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a concentração de glicose oxidase e catalase em 10:200 ($\blacklozenge$), 20:400 ($\ast$) e 40:800 ($\blacksquare$). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, [O₂] = 8,0 mg/L e D = 3,0 h⁻¹ 101
- Figura 5.30 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase r_{Cat} (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a concentração de glicose oxidase e catalase em 10:200 ($\blacklozenge$), 20:400 ($\ast$) e 40:800 ($\blacksquare$). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, [O₂] = 8,0 mg/L e [D] = 3,0 h⁻¹ 102

- Figura 5.31 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase r_{Cat} (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a concentração de glicose oxidase e catalase em 10:200 (♦), 20:400 (*) e 40:800 (■). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, $[\text{O}_2] = 8,0 \text{ mg/L}$ e $[D] = 3,0 \text{ h}^{-1}$ 104
- Figura 5.32 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a vazão específica – D em $2,0 \text{ h}^{-1}$ (*), $3,0 \text{ h}^{-1}$ (♦) e $6,0 \text{ h}^{-1}$ (■). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, saturado em O_2 e utilizando 10 U/mL de GO e 200 U/mL de catalase 105
- Figura 5.33 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GO (r_{GO} - Fig. A) e grau de conversão (Y - Fig. B) para os ensaios de oxidação, variando a concentração de glicose em 20 mM (♦), 50 mM (□), 100 mM (▲), 200 mM (■), 500 mM (*) e 1000 mM (◆) 108
- Figura 5.34 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação, variando a concentração de glicose em 20 mM (♦), 50 mM (□), 100 mM (▲), 200 mM (■), 500 mM (Δ) e 1000 mM (◆) 109
- Figura 5.35 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GO (r_{GO} - Fig. A) e grau de conversão (Y - Fig. B) para os ensaios de oxidação, variando a concentração de glicose em 5 mM (♦), 10 mM (□), 20 mM (▲) e 40 mM (■) 110
- Figura 5.36 Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação, variando a concentração de glicose em 5 mM (♦), 10 mM (□), 20 mM (▲) e 40 mM (■) 111

Figura 5.37	Perfil do logaritmo da velocidade de reação (r) para o ensaio a 30°C	113
Figura 5.38	Perfil do logaritmo da velocidade de reação (r) para o ensaio a 35°C	114
Figura 5.39	Perfil do logaritmo da velocidade de reação r para o ensaio a 40°C	114
Figura 5.41	Perfil do logaritmo da velocidade de reação (r) para o ensaio a 50°C	115
Figura 5.42	Perfil da constante de inativação térmica (k_d) como função da temperatura (T) durante o regime permanente para os ensaios variando a temperatura	115
Figura 5.43	Perfil da taxa de reação (r) para a glicose-oxidase ($\diamond$) e catalase ($\blacksquare$) como função do pH durante o regime permanente em reator com membrana operando em CSTR	117
Figura 4.44	Gráfico baseado no método de linearização preconizado por <i>Lineweaver-Burk</i> para o cálculo das constantes cinéticas da glicose oxidase <i>Sigma</i> [®] presente em um reator com membrana CSTR	119
Figura 5.45	Perfil do logaritmo da constante de inativação (k_d) em função do inverso da temperatura de processo ($1/T$). Estudo da energia de desativação térmica para os ensaios de oxidação da glicose	121
Figura 5.46	Variação da concentração de frutose $[F]$ (Δ) e ácido glicônico $[HG]$ ($\blacksquare$) no decorrer do tempo para o processo multienzimático de hidrólise da sacarose (20 mM) e oxidação da glicose formada em reator com membrana operando em CSTR	124
Figura 5.47	Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (X) ao variar-se a concentração de invertase em 6,0 U/mL ($\blacklozenge$) e 12 U/mL ($\blacksquare$) e taxa de conversão para a oxidação da glicose resultante (Y) ao variar-se a concentração de invertase em 6,0 U/mL ($\diamond$) e 12 U/mL ($\square$) para o processo	125

multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se pH 5,5, 30°C, $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$

- Figura 5.48 Logaritmo da velocidade específica de reação para a invertase ($\ln r_i$) em função do tempo de processo ao empregar-se 6,0 U/mL (◆) e 12 U/mL (■) desta enzima e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C, 100 rpm, glicose oxidase (10 U/mL) e catalase (200 U/mL) 126
- Figura 5.49 Concentração de peróxido de hidrogênio ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) presente no interior do reator com membrana operando em CSTR para o processo multi-enzimático de bioconversão da sacarose (50 mM) em frutose e ácido glicônico ao utilizar-se 6,0 U/mL (◆) e 12 U/mL (■) e mantendo-se pH 5,5, 30°C, 100 rpm, glicose oxidase (10 U/mL) e catalase (200 U/mL) 127
- Figura 5.50 Logaritmo da velocidade específica de reação para a glicose oxidase ($\ln r_{GO}$) em função do tempo de processo ao empregar-se 6,0 U/mL (◆) e 12 U/mL (■) de invertase e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C, 100 rpm, glicose oxidase (10 U/mL) e catalase (200 U/mL) 128
- Figura 5.51 Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (X) ao variar-se a concentração de invertase em 6,0 U/mL (◆), 12 U/mL (▲) e 24 U/mL (■) e taxa de conversão para a oxidação da glicose resultante (Y) ao variar-se a concentração de invertase em 6,0 U/mL (◇), 12 U/mL (Δ) e 24 U/mL (□) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$ 129
- Figura 5.52 Logaritmo da velocidade específica de reação para a invertase ($\ln r_i$) em função do tempo de processo ao empregar-se 6,0 U/mL (◆), 12 U/mL (▲) e 24 U/mL (■) desta enzima e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C, 100 rpm, glicose oxidase (10 U/mL) e catalase (200 130

- U/mL)
- Figura 5.53 Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (X - ◆) e taxa de conversão para a oxidação da glicose resultante (Y) ao variar-se a concentração de glicose oxidase e catalase, respectivamente, em 0,5 U/mL / 470 U/mL (◆), 1,0 U/mL / 940 U/mL (□) e 2,5 U/mL / 2350 U/mL (Δ) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$ 131
- Figura 5.54 Concentração de peróxido de hidrogênio ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) na saída do reator com membrana ao variar-se a concentração de glicose oxidase e catalase, respectivamente, em 0,5 U/mL / 470 U/mL (□), 1,0 U/mL / 940 U/mL (◆) e 2,5 U/mL / 2350 U/mL (Δ) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$ 132
- Figura 5.55 Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (X - ◆) e taxa de conversão para a oxidação da glicose resultante (Y) ao variar-se a concentração de glicose oxidase, respectivamente, em 0,25 U/mL (Δ), 1,0 U/mL (□) e 2,5 U/mL (◆) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), concentração de catalase (2350 U/mL), pH 5,5, 30°C e $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$ 134
- Figura 5.56 Concentração de peróxido de hidrogênio ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) na saída do reator com membrana ao variar-se a concentração de glicose oxidase e catalase, respectivamente, em 0,25 U/mL (◆), 1,0 U/mL (Δ) e 2,5 U/mL (□) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase 134

(24 U/mL), concentração de catalase (2350 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$

- Figura 5.57 Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (S) (X - ◆) e taxa de conversão para a oxidação da glicose (G) resultante (Y) ao variar-se a concentração de glicose oxidase (GO) e catalase (C), respectivamente, em 0,5 U/mL / 470 U/mL (◇) e 0,25 U/mL / 235 U/mL (□) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (I) (24 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$ 135
- Figura 5.58 Logaritmo neperiano da velocidade específica de reação para a invertase ($\ln r_i$) (◆), logaritmo neperiano da velocidade específica de reação para a glicose oxidase ($\ln r_{GO}$) (■) e logaritmo neperiano da velocidade específica de reação para a catalase ($\ln r_C$) (▲) em função do tempo de processo ao empregar-se, respectivamente, 24 U/mL, 0,5 U/mL e 470 U/mL destas enzimas e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C e 100 rpm 136
- Figura 5.59 Logaritmo neperiano da velocidade específica de reação para a invertase ($\ln r_i$) (◆), logaritmo neperiano da velocidade específica de reação para a glicose oxidase ($\ln r_{GO}$) (■) e logaritmo neperiano da velocidade específica de reação para a catalase ($\ln r_C$) (▲) em função do tempo de processo ao empregar-se, respectivamente, 24 U/mL, 0,25 U/mL e 235 U/mL destas enzimas e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C e 100 rpm 137
- Figura 5.60 Concentração de peróxido de hidrogênio ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) na saída do reator com membrana ao variar-se a concentração de glicose oxidase e catalase, respectivamente, em 0,25 U/mL / 235 U/mL (■) e 0,5 U/mL / 470 U/mL (◇) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 139

- 100 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$
- Figura 5.61 Concentração de Frutose ([F] - ◆), ácido glicônico ([HG] - ■) e peróxido de hidrogênio ($[\text{H}_2\text{O}_2]$ - ▲) resultante durante o processo multi-enzimático de bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico utilizando açúcar mascavo (impuro) e mantendo-se as seguintes condições operacionais: S = 50 mM, I = 24 U/mL, GO = 0,5 U/mL, C = 470 U/mL, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$, pH 5,5, 30°C e 100 rpm 140
- Figura 5.62 Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (S) (X - ◆) e taxa de conversão para a oxidação da glicose (G) resultante (Y) para a primeira (■) e segunda (reciclo) (▲) passagens pelo reator com membrana operando em processo multi-enzimático empregando-se 50 mM de sacarose, concentração de invertase (I) (24 U/mL), concentração de glicose oxidase (1,0 U/mL), concentração de catalase (940 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$ 142
- Figura 5.63 Concentração de peróxido de hidrogênio ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) na saída do reator com membrana para a primeira (■) e segunda (reciclo) (▲) passagens pelo reator com membrana operando em processo multi-enzimático empregando-se 50 mM de sacarose, concentração de invertase (I) (24 U/mL), concentração de glicose oxidase (1,0 U/mL), concentração de catalase (940 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$ 143
- Figura 5.64 Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (S) (X - ◆) e taxa de conversão para a oxidação da glicose (G) resultante (Y) para a passagem pelo primeiro (■) e segundo (▲) reator com membrana operando em processo multi-enzimático empregando-se 50 mM de sacarose, concentração de invertase (I) (24 U/mL), concentração de glicose oxidase (1,0 U/mL), concentração de catalase (940 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$ 144

- Figura 5.65 Rendimento de cristais (η) em função do tempo para a cristalização do gliconato de cálcio a partir de uma solução 1 M de ácido glicônico em meio tamponado e com etapa de lavagem de cristais após a separação. Cristais obtidos após manter-se pelo tempo estudado à 8°C

149

Índice de Tabelas

Tabela 1.1	Mercado Brasileiro para o Ácido Glicônico. Faturamento anual (US\$ _{FOB}), total comercializado (Kg) e preço médio estabelecido (US\$/t)	2
Tabela 1.2	Mercado Brasileiro para a Frutose. Faturamento anual (US\$ _{FOB}), total comercializado (Kg) e preço médio estabelecido (US\$/t).	2
Tabela 4.1	Valores de $[\alpha]_{\text{obs}}$ obtidos para a misturas de sacarose, frutose, glicose e ácido glicônico.	41
Tabela 5.1	Testes para definição das condições operacionais de hidrólise da sacarose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima <i>Bioinvert</i> [®]	50
Tabela 5.2	Testes preliminares de ajuste das condições operacionais dos ensaios para estudo da estabilidade frente a temperatura da hidrólise da sacarose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima <i>Bioinvert</i> [®]	66
Tabela 5.3	Testes para o estudo da estabilidade frente à temperatura da hidrólise da sacarose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima <i>Bioinvert</i> [®]	66
Tabela 5.4	Resultados obtidos para os testes de ajuste da conversão da sacarose. Descrição da concentração de sacarose ($[S]$), concentração de <i>Bioinvert</i> [®] ($[I]$), velocidade específica (D) e conversão média (X)	67
Tabela 5.5	Parâmetros cinéticos obtidos para a <i>Bioinvert</i> [®] quando utilizada em processo contínuo (CSTR) em reator com membrana	72
Tabela 5.6	Dados da velocidade específica de reação inicial (r_0), constantes de inativação térmica (k_d) e da energia de ativação térmica (E_a) para a <i>Bioinvert</i> [®] em testes de hidrólise da sacarose em reator com membrana CSTR	74

Tabela 5.7	Testes variando a concentração de oxigênio dissolvido das condições operacionais de oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose oxidase <i>Sigma</i> [®]	78
Tabela 5.8	Testes para estudo da influência da vazão específica sobre a oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose oxidase <i>Sigma</i> [®]	83
Tabela 5.9	Testes para estudo da influência da vazão específica sobre a oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose oxidase <i>Sigma</i> [®]	93
Tabela 5.10	Conversão (Y), constante de inativação térmica (k_d) e tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$) para a enzima GO no regime permanente em experimentos com presença (100 U/mL) e ausência de catalase no meio reacional contendo 10 U/mL de GO e 5,0 mM de glicose em reator com membrana operando em CSTR a vazão de $3,0 \text{ h}^{-1}$	96
Tabela 5.11	Testes para estudo do efeito da vazão específica (D) sobre o sistema multienzimático GO/Catalase mantido na proporção 1:20 em reator com membrana operando em CSTR	103
Tabela 5.12	Testes variando concentração de glicose para a oxidação em biorreator com membrana utilizando as enzimas glicose oxidase e catalase <i>Sigma</i> [®]	107
Tabela 5.13	Ensaio preliminares de ajuste das condições operacionais dos ensaios para estudo da estabilidade frente à temperatura da oxidação da glicose em biorreator com membrana utilizando a enzima glicose oxidase e catalase <i>Sigma</i> [®]	112
Tabela 5.14	Resultados obtidos para os ensaios de ajuste da conversão da glicose. Descrição da concentração de	112

	glicose (G), concentração de glicose oxidase <i>Sigma</i> [®] (GO), catalase <i>Sigma</i> [®] (C) e conversão média (Y)	
Tabela 5.15	Ensaio para estudo da estabilidade frente à temperatura da oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose oxidase <i>Sigma</i> [®]	113
Tabela 5.16	Ensaio para estudo da estabilidade frente ao pH da oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose oxidase <i>Sigma</i> [®]	117
Tabela 5.17	Parâmetros cinéticos obtidos para a glicose oxidase <i>Sigma</i> [®] quando utilizada em processo contínuo (CSTR) em reator com membrana	119
Tabela 5.18	Dados da velocidade específica de reação inicial (r_0), constante de inativação térmica (k_d) e da energia de desativação térmica (E_d) para a glicose oxidase <i>Sigma</i> [®]	121
Tabela 5.19	Testes para definição das condições operacionais de bioconversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico empregando as enzimas invertase, glicose oxidase e catalase em reator com membrana operando em CSTR	123
Tabela 5.20	Condições operacionais dos testes de bioconversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico em biorreator com membrana operando em CSTR	141
Tabela 5.21	Variação da concentração de ácido glicônico neutralizado até pH 7,0 e sob 30°C e rendimento obtido durante cristalização de 24 horas a 10°C.	147
Tabela 5.22	Variação da concentração de hidróxido de cálcio utilizado na neutralização e sob 30°C e rendimento obtido (η)	147
Tabela 5.23	Relação entre a massa teórica (m^T_{cristais}) e real (m^R_{cristais}) de cristais e o rendimento em cristais (h) obtidos	148

para a separação do gliconato de cálcio na presença de frutose efetuados a 8°C e 30°C por 48 horas e sem lavagem de cristais

Lista de Siglas

BM	Biorreator com membrana
CSTR	Reator contínuo de agitação mecânica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELBC	“external liquid bubble column” – coluna de bolhas de passagem externa de líquido
EMRB	Reator enzimático com membrana <i>Bioengineering</i> [®]
GDH	Glicose-desidrogenase
GOD	Glicose-oxidase
HFCS	“High Fructose Corn Syrup” – Xarope de frutose de elevada concentração
HFR	“Hollow Fiber Reactor” - Reator de fibra oca
HTM	“High Test Molasses” – Melaço
ILBC	“internal liquid bubble column” – coluna de bolhas de passagem interna de líquido
MBR	Reator com membrana e reciclo
MWCO	“Molecular Weight Cut Off” – Peso molecular onde 90% do soluto é retido
PFR	“plug-flow reactor” – Reator de fluxo pistonado
pH	Potencial hidrogeniônico
RM	Reator enzimático com membrana

Lista de Símbolos

Alfabeto Latino

$\Delta G'$	Variação da energia livre de Gibbs
$\Delta H'$	Variação da entalpia
$\Delta S'$	Variação da entropia
$[AG]_{\text{formada}}$	Concentração de ácido glicônico formado (mM)
$[ART]_F$	Concentração de açúcares redutores formados (mg/mL)
$[Cat]$	Concentração de enzima catalase (U/mL)
$[F]$	Concentração de Frutose (mM)
$[G]$	Concentração de glicose (mM)
$[G]_{\text{consumida}}$	Concentração de glicose consumida (mM)
$[G]_{\text{Inicial}}$	Concentração de glicose na alimentação do biorreator (mM)
$[G]_{\text{Saída}}$	Concentração de glicose contida nas amostras coletadas na saída do biorreator (mM)
$[GOD]$	Concentração de enzima glicose-oxidase (U/mL)
$[H_2O_2]$	Concentração de peróxido de hidrogênio (mM)
$[H_2O_2]_{\text{consumido}}$	concentração de peróxido consumido (mM)
$[H_2O_2]_{\text{residual}}$	concentração de peróxido residual na saída do reator (mM)
$[I]$	Concentração de enzima Bioinvert [®] (U/mL)
$[produto]$	Concentração de ácido glicônico ou frutose formados pela reação enzimática
$[Prot]$	Concentração de proteínas totais (µg/mL)
$[S]$	Concentração de sacarose (mM)
$[S]_0$	Concentração inicial de sacarose (mg/mL)
$[S]_{\text{consumida}}$	Concentração de sacarose consumida (mM)
$^{\circ}C$	Grau centígrado
ABS	Absorbância (nm)
ART	Açúcares redutores totais (mg/mL)
Ca^{++}	Íons cálcio

CaCO_3	Carbonato de cálcio
D	Vazão Específica (h^{-1})
Da / kDa	Dalton / Quilodalton
E_d	Energia de desativação térmica (kJ/mol.K)
FADH^+	Flavina – Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada)
FADH_2	Flavina – Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
g / Kg	Grama / Quilograma
h	Constante de Planck ($3,978 \cdot 10^{-32} \text{ J/min}$)
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio ou água oxigenada
k	Constante de Boltzman ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$)
k_d	Constante de inativação térmica (h^{-1})
K_{eq}	Constante de equilíbrio químico
K_M	Constante de Michaelis - Mentem
$K_{m_{ap}}$	Constante de Michaelis-Menten aparente obtida a partir da linearização preconizada por <i>Lineweaver-Burk</i> para um processo contínuo operando em CSTR.
m_{real}	Massa real de cristais de gliconato de cálcio (g)
$m_{teórica}$	Massa teórica de cristais de gliconato de cálcio (g)
NaOH	Hidróxido de cálcio
O_2	Oxigênio
r	Velocidade específica de reação enzimática ($\text{mg}_{\text{Produto}}/\text{U.h}$)
R	Constante universal dos gases ($8,314 \text{ J/k.mol}$)
r_{Bio}	Velocidade específica de reação da Bioinvert [®] ($\text{mg}_{\text{ART}}/\text{U.h}$)
r_{GOD}	Velocidade específica de reação da Bioinvert [®] ($\text{mg}_{\text{AG}}/\text{U.h}$)
t	Tempo de reação (min)
T	Temperatura de processo ($^{\circ}\text{C}$ ou K)
t_{ensaio}	Tempo Reacional (tempo de experimento) (h)
UE	Unidade Enzimática
U_{Go}	Unidade de atividade enzimática da glicose-oxidase

	($\text{mg}_{\text{H}_2\text{O}_2} / \text{mL} \cdot \text{min}$)
U_{INV}	Unidade de atividade enzimática invertásica ($\text{mg}_{\text{ART}} / \text{mL} \cdot \text{min}$)
$\text{US\$}/\text{t}$	Dólares americanos por tonelada
$\text{US\$}_{\text{FOB}}$	Dólares americanos “free on board”
v	Velocidade, ou atividade, invertásica (U/mL)
V_{amostra}	Volume total de amostra utilizado (mL)
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima de reação (mmol/h)
X	Grau de conversão da hidrólise da sacarose (%)
Y	Grau de conversão da oxidação da glicose (%)

Alfabeto Grego

$\mu\text{m} / \text{nm}$	Micrometro / nanometro
ϕ	Vazão (L/h)
η	Rendimento da cristalização do gliconato de cálcio (%)
λ	Comprimento de onda (nm)
v_{max}	Velocidade específica de reação máxima obtida a partir da linearização preconizada por <i>Lineweaver-Burk</i> para um processo contínuo operando em CSTR.
$\tau_{1/2}$	Tempo de meia-vida da enzima (h)

Resumo

Frutose e Ácido Glicônico são produtos importados empregados em diferentes setores nas áreas química, farmacêutica e alimentícia, representando um mercado de dois milhões de dólares (US\$ 2,0 milhões) por ano. Por sua vez, a sacarose pode ser empregada como matéria-prima para a obtenção destes produtos através de conversão enzimática empregando invertase e glicose-oxidase. O uso de biorreatores com membrana (MBR) mostra-se interessante em processos enzimáticos, pois, ao serem empregados em processos contínuos permitem, simultaneamente, produção e separação dos produtos, reduzindo a formação de subprodutos e, eventual, inibição da enzima por excesso de substrato ou produtos. A sacarose é convertida em xarope de açúcar invertido (solução equimolar de frutose e glicose) pela invertase (*Bioinvert[®]*, enzima comercial), seguido pela oxidação da glicose em ácido glicônico pela ação da glicose oxidase (GO). O processo de conversão multi-enzimático da sacarose foi obtido através da alimentação de sacarose (50 mM) em reator com membrana (MBR) contendo invertase (24 U/mL), glicose-oxidase (0,5 U/mL) e catalase (470 U/mL) e operando com vazão específica de 6,0 h⁻¹, 35°C e pH 5,5. As condições operacionais otimizadas possibilitaram a conversão completa da sacarose (X = 100 %) e da glicose resultante (Y = 100%) com velocidades específicas de reação de 4,2 mmol/U.h, 0,60 mmol/U.h e 0,00062 mmol/U.h, respectivamente, para a invertase, glicose oxidase e catalase. A respeito da oxidação da glicose, a adição de catalase no meio reacional se fez necessária para minimizar os efeitos inibitórios sobre a GO através do peróxido de hidrogênio formado.

Abstract

The fructose and gluconic acid are products of great application in chemical, pharmaceutical and food industry. The actual Brazilian market for these compounds is about US\$ 2 millions, whereas the sucrose, the raw-material used for their production, represents about 2.4% of the Brazil's GNP. This conversion increases the value added to the sugarcane, usually marketed as a commodity, because the fructose and gluconic acid are more valuable products than sucrose. The use of membrane bioreactor (MBR), which operates under mild conditions regarding internal pressure, temperature and pH, has been growing along the years for enzyme catalyzed processes. Moreover, in the MBR the reaction and separation of the products occur simultaneously, avoiding the formation of by-products and the eventual inhibition of the enzyme caused by excess of substrate or products. The sucrose is converted to the inverted syrup (an equimolar solution of fructose and glucose) by invertase (in this work was employed *Bioinvert*[®], a commercial invertase) followed by the oxidation of glucose in gluconic acid by the glucose oxidase (GO). The multi-enzymatic conversion of sucrose was attained when carried out under initial substrate of 50mM and invertase, glucose oxidase and catalase concentrations, respectively, of 24.0 U/mL, 0.5 U/mL and 470 U/mL in a membrane reactor utilizing a dilution rate of 6.0 h⁻¹, 35°C and pH 5.5. The optimized operational conditions led to a conversion yield of 100% for sucrose hydrolysis and glucose oxidation steps resulting in enzyme productivity of 4.2 mmol/U.h, 0.60 mmol/U.h and 0.00062 mmol/U.h, respectively, to invertase, glucose oxidase and catalase. In regard to the glucose oxidation, the addition of catalase in the reaction medium was necessary, in order to minimize the inhibition of the GO by the hydrogen peroxide formed.

1. INTRODUÇÃO

O açúcar produzido no Brasil, proveniente da agroindústria canavieira, é um dos mais competitivos do mundo, movimentando cerca de R\$ 36 bilhões por ano (Fonte: Secretaria de Comércio Exterior – COMEX, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio, dados 2003), correspondendo a aproximadamente 2,4% do PIB nacional, além de ser um dos setores que mais empregam no país, com a geração de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, e congregar mais de 70 mil agricultores. A estimativa da moagem anual gira em torno de 340 milhões de toneladas de cana, produzindo 24 milhões de toneladas de açúcar através de suas 302 indústrias em atividade, sendo 218 na região Centro-Sul e 84 na região Norte-Nordeste.

Figura 1.1. Custo de produção (US\$/t) para o açúcar de acordo com a região produtora. Fonte: Sindaúcar (Sindicato das indústrias produtoras de açúcar e álcool). Brasil – CS: região centro-sul; Brasil – NE: região nordeste.

A região centro-sul do Brasil apresenta o menor custo de produção de açúcar do mundo (Figura 1.1), o que favorece a comercialização deste produto, bem como sua utilização como matéria-prima em outros processos. O açúcar apresenta um elevado consumo na indústria alimentícia,

encontrando utilização em diferentes setores e sob as várias formas com que o açúcar pode ser comercializado (cristal, refinado ou invertido).

Devido o seu baixo custo de produção e grande utilização em diversos setores industriais, aliado ao fato de ser um setor industrial tradicional e firmemente implantado no país, torna-se interessante agregar valor ao açúcar tradicional (sacarose) utilizando-o como matéria-prima na obtenção de outros produtos com aplicações em diferentes setores (farmacêutico, químico e de alimentos). De encontro a esta afirmação, temos a obtenção de frutose e ácido glicônico a partir da sacarose como um processo potencialmente interessante e merecedor da atenção dada neste projeto.

Tabela 1.1. Mercado Brasileiro para o Ácido Glicônico. Faturamento anual (US\$ FOB), total comercializado (Kg) e preço médio estabelecido (US\$/t).

Ano	Comércio (US\$ FOB)	Produção (Kg)	Preço Médio (US\$/Kg)
2000	1.345.096	1.423.244	0,94
2002	1.236.137	1.548.951	0,79
2003	1.161.533	1.355.934	0,85

Tabela 1.2. Mercado Brasileiro para a Frutose. Faturamento anual (US\$ FOB), total comercializado (Kg) e preço médio estabelecido (US\$/t).

Ano	Comércio (US\$ FOB)	Produção (Kg)	Preço Médio (US\$/Kg)
2000	686823	812985	0,84
2002	626878	755600	0,82
2003	696178	816325	0,85

Fonte: Secretaria de Comércio Exterior, Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio, Brasília, 2003.

De acordo com as tabelas 1.1 e 1.2, ácido glicônico e frutose são produtos que movimentam um mercado total de quase 2,0 milhões de dólares por ano no Brasil, sendo ambos totalmente importados pelo país.

O xarope de frutose encontra grande aceitação no mercado de adoçantes naturais, podendo estar também em mistura com glicose, formando o açúcar invertido. Da mesma forma, o ácido glicônico e seus sais são largamente

empregados na área alimentícia (acidulantes, aditivos químicos, removedores de sedimentos), farmacêutica (terapia de reposição de íons, padrões analíticos) (ERZINGER, 2000), química (limpeza de superfícies metálicas) e têxtil (branqueadores). Por serem produtos importados se mostra economicamente interessante o desenvolvimento de processos industriais, a partir de estudos e tecnologias nacionais, que substituam tais importações.

O Laboratório de Enzimologia Industrial do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo vêm desenvolvendo nos últimos anos projetos envolvendo a produção, purificação e imobilização de enzimas de interesse comercial, bem como suas aplicações em processos biotecnológicos. Vindo de encontro às linhas de pesquisa aqui descritas, temos neste trabalho, o estudo da utilização de um reator enzimático com membrana para a produção de frutose, glicose e ácido glicônico a partir da sacarose, empregando o sistema enzimático invertase / glicose oxidase.

Para a execução do estudo, invertase solúvel BIOINVERT[®] (comercializada pela empresa *Deltagen Pty Ltda.*) e glicose oxidase SIGMA[®] foram utilizadas como catalisadores enzimáticos das reações, respectivamente, de hidrólise da sacarose e oxidação da glicose.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Estabelecer as condições do processo enzimático para obtenção de frutose e ácido glicônico a partir da sacarose em Reator com Membrana (RM).

2.2. Objetivos Específicos:

Avaliar o desempenho do reator com membrana da *Bioengineering*[®] na conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico, utilizando invertase e glicose oxidase (GO) dissolvidas em tampão adequado, segundo dois arranjos operacionais distintos, além da avaliação do método de separação dos produtos:

- Conversão enzimática em duas etapas (hidrólise e oxidação em reatores distintos).
- Conversão multienzimática (hidrólise e oxidação simultâneas em um único reator).
- Separação por cristalização do ácido glicônico (na forma de sal de cálcio) na presença de frutose.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A catálise química e enzimática são as bases de diversos processos industriais sendo que estas tecnologias competem entre si na obtenção de importantes compostos químicos (BELTRAME *et al.*, 2004). A catálise enzimática, também chamada de bioconversão é a reação química catalisada por uma ou mais enzimas, células ou organelas celulares sendo executada em meio com alta ou baixa atividade de água. Devido suas características, este tipo de reação encontra nos reatores com membrana uma possibilidade viável de se aumentar a conversão de reações que sofram inibição por produto ou mesmo as que sejam termodinamicamente desfavoráveis (GIORNO e DRIOLI, 2000; GAN *et al.*, 2005; BOONTAWAN *et al.*, 2006).

3.1. Sobre os Biocatalisadores:

Os avanços tecnológicos vêm permitindo cada vez mais a aplicação de catalisadores em processos industriais. A catálise enzimática apresenta vantagem sobre a catálise química tradicional por apresentar características como a realização em condições brandas de pH e temperatura, favorecendo a manipulação de substâncias sensíveis a condições extremas de processo, a alta seletividade (do ponto de vista químico, da regioseletividade e enantioseletividade), a formação de subprodutos menos tóxicos e facilmente tratáveis e a possibilidade de se executarem reações simultâneas (BOMMARIUS, 1993; GORDON, *et al.*, 1994; GOULAS *et al.*, 2004) e com reciclo (CURCIO *et al.*, 2006). Estas vantagens fazem dos processos enzimáticos uma importante alternativa para setores como a obtenção de produtos químicos orgânicos, produtos alimentícios e farmacêuticos, hormônios, vitaminas e outros produtos de origem bioquímica.

A disponibilidade de biocatalisadores tem aumentado em decorrência dos avanços da biotecnologia (novas técnicas de cultivo celular, isolamento e manipulação genética: cruzamentos, mutações, DNA recombinante, hibridoma), resultando em aumento do número de aplicações em processos

industriais, dentre os quais citam-se, a conversão da insulina suína em humana, a produção de aspartame, acrilamida, inulina penicilinas semi-sintéticas, hidrólise da celulose, oligodextranas (SMITH, 1996; ABRAHÃO-NETO *et al.*, 2001; ROCHA-FILHO & VITOLO, 1998; GAN *et al.*, 2005; DÍAZ *et al.*, 2006). Um outro aspecto a destacar, é a competição vantajosa da biocatálise, quando possível de ser aplicada, frente os processos tradicionais de extração (fortemente dependente da disponibilidade da matéria-prima e baixo rendimento em produto final), fermentação (econômica apenas em grandes volumes) e de síntese química (mais poluente, maior consumo de energia e menor enantioseletividade).

Um grande número de enzimas vem sendo imobilizado por diferentes técnicas e suportes apresentando elevados rendimentos e viabilizando sua aplicação em biorreatores e biossensores. Dentre as principais áreas de aplicação para as enzimas imobilizadas temos a indústria alimentícia e farmacêutica. Biossensores construídos a partir de sistemas enzimáticos imobilizados também vem permitindo monitorar processos fermentativos, tratamento de resíduos industriais e em diagnósticos clínicos (BAYRAMOGLU *et al.*, 2003; MALITESTA & GUASCITO, 2005).

3.1.1. Invertase

A invertase (EC.3.2.1.26, β -fructofuranosideo fructohidrolase) é uma enzima que catalisa a hidrólise de carboidratos β -fructofuranosídicos, devido o grupo β -fructofuranosil, que é parte da molécula do substrato que se encaixa no sitio ativo da enzima, possuir todas as suas hidroxilas livres (VITOLO, 1979).

Trata-se de uma glicoproteína com massa molar de 270 kDa (possui cerca de 30 cadeias de manana por molécula de proteína) que se localiza na parede celular do *Saccharomyces cerevisiae*, sua principal fonte, onde podemos encontrar duas formas dessa enzima com igual capacidade hidrolítica. Uma delas é encontrada no espaço periplasmático e têm como característica o fato de ser glicolisada, enquanto uma forma não-glicolisada é encontrada no citosol (REDDY & MALLEY, 1990).

A invertase possui estrutura quaternária formada por duas cadeias peptídicas, mas que podem se aglutinar formando agregados supra moleculares tetra, hexa e/ou octaméricos apresentando atividade catalítica e termoestabilidade crescentes (READY *et al.*, 1989; De QUEIROZ *et al.*, 1996). É estável a temperaturas entre 30 e 50° C e pH: 3,5 – 5,5 (sendo o ótimo igual a pH = 4,6). Observa-se para esta enzima, que a velocidade da reação diminui frente concentrações de sacarose superiores a 120 g/L, como consequência do aumento da viscosidade do meio reacional e/ou diminuição da atividade de água (TREVISAN, 1993; ALMEIDA-CUNHA & VITOLO, 1984).

Figura 3.1. Estrutura da invertase de *S. cerevisiae* (<http://www.rcsb.org/pdb>)

A invertase é uma enzima altamente eficiente para a conversão da sacarose em glicose e frutose (BAYRAMOGLU *et al.*, 2003). Desta conversão resulta o açúcar invertido (mistura equimolar de glicose e frutose com poder rotatório levógiro) que possui índice de dulçor superior ao do dissacarídeo e não cristaliza com facilidade.

A hidrólise da sacarose pode ser feita por via ácida em reator contínuo operado em contracorrente, obtendo-se, no entanto, um produto contaminado por compostos resultantes das modificações sofridas pelas hexoses (glicose e frutose) nas condições de processo (75-80° C e meio fortemente ácido). Por esse motivo, o xarope invertido por via ácida deve ser submetido a tratamentos de purificação, enquanto que nenhum tratamento

extra é necessário para o xarope oriundo da hidrólise enzimática (processo executado em temperatura e pH moderados).

O emprego da enzima na forma solúvel tem a desvantagem de obrigar o uso de reator descontínuo com a conseqüente impossibilidade de recuperação do biocatalisador. Porém, o uso de reatores com membrana permitem a aplicação da invertase solúvel na hidrólise enzimática em processos contínuos, uma vez que a enzima ficará mantida no interior do reator (AZEVEDO & RODRIGUES, 2001).

A invertase tem sido imobilizada por diversas técnicas e em diferentes tipos de suportes (ARICA *et al.*, 2006), além de seu desempenho ter sido, também, estudado em reatores com membrana (ALFANI, *et al.*, 2000). As características favoráveis já apontadas para este tipo de biorreator, a eficiência e a disponibilidade comercial da invertase, estimulam os estudos para viabilizar o uso do biorreator com membrana contendo invertase na hidrólise da sacarose. Recentemente, no entanto, surgiu na literatura um trabalho preconizando o uso da invertase em reator de leito fixo, através da imobilização em filme de poli-2-hidroxietilmetacrilato-co-glicidilmetacrilato (BAYRAMOGLU, *et al.*, 2003).

A invertase encontra uso potencial e, por diversas vezes, real em setores como o de confeitaria, podendo ser utilizada para melhorar a qualidade da textura e aparência de produtos contendo sacarose (SMOLENSKY *et al.*, 1975), na produção de mel artificial (ISIK *et al.*, 2003), na preparação do HTM ("High Test Molasses", tipo de melaço em que não ocorre a cristalização da sacarose) (VITOLLO, *et al.*, 1985), em biossensores (SAHMETLIOGLU *et al.*, 2006), como enzima-modelo em estudos de liofilização e congelamento/descongelamento (BREDA, *et al.*, 1992) e na avaliação da aplicabilidade de novos suportes inertes para a imobilização de enzimas (De QUEIROZ, *et al.*, 2002).

WOODWARD & ORR (1998) descreveram um método de produção de hidrogênio a partir da conversão enzimática da sacarose utilizando as enzimas invertase, glicose-desidrogenase (GDH), hidrogenase e glicose-isomerase em um processo multi-enzimático. Este processo poderia ser

utilizado, então, para a produção potencial de uma fonte alternativa de energia.

A invertase *Bioinvert*[®] é uma alfa -D-Fructofuranosidase obtida a partir do cultivo de uma cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*. Apresenta-se sob a forma de um líquido claro, levemente viscoso e com uma ligeira tonalidade âmbar. Apresenta odor característico não muito forte estando livre de ácido sórbico e ácido benzóico, porém, contendo estabilizantes.

3.1.2. Glicose oxidase (GO)

A glicose oxidase (EC.1.1.3.4) (GO; β -D-glucose; 1-oxidorreductase) é uma enzima que catalisa a oxidação da β -D-glucose em D-glicono- δ -lactona e peróxido de hidrogênio, utilizando o oxigênio molecular como aceptor de elétron. Em uma etapa subsequente, a D-glicono- δ -lactona é hidrolizada para ácido glicônico e o complexo FADH₂-enzima é reoxidado pelo oxigênio.

A glicose oxidase apresenta massa molar entre 150 e 190 kDa, dependendo da fonte da qual foi obtida, sendo constituída por 16% de carboidratos (manose, galactose e glicosamina na forma N-acetil), duas cadeias polipeptídicas idênticas ligadas por pontes de dissulfeto, tendo cada subunidade um íon Fe⁺² e uma molécula de FAD (CRUEGER & CRUEGER, 1990). O K_M da GO situa-se na faixa entre 15 mM a 100 mM, dependendo da fonte da enzima.

Segundo RABA & MOTTOLA (1995), o K_M para GO de *Aspergillus niger* é igual a 15 mM, a molécula absorve intensamente nos comprimentos de onda 278 nm, 380 nm e 460 nm, a absorvidade molar a 450 nm é de $1,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, coeficiente de sedimentação de 7,93 s (em água a 20° C), coeficiente de difusão (em água a 20° C) de $5,02 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e massa molar de 154 kDa. A enzima tem pH_{ótimo} = 5,6, pI = 4,2, estabilidade frente ao pH entre 4,0 e 6,0, mantendo cerca de 50% de sua atividade inicial em valores de pH entre 3,5 e 7,0 (PAZUR, 1966; TREVISAN, 1993; CRUEGER & CRUEGER, 1990). A glicose oxidase atua bem a temperaturas entre 30° C e 40° C, sendo instável frente a temperaturas acima de 50° C (CRUEGER & CRUEGER, 1990; TREVISAN, 1993).

Figura 3.2: Estrutura da glicose-oxidase de *A. niger* (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>)

A enzima apresenta importância comercial considerável na indústria de alimentos (CRUEGER & CRUEGER, 1990) e, também, encontra aplicação em diversas análises clínicas e em biosensores (RICHTER, 1987; PANDEY *et al.*, 1992; YILDIZ *et al.*, 2005). Segundo RABA & MOTTOLA (1995), a GO é utilizada tanto na forma solúvel quanto imobilizada e, isto se deve à sua alta especificidade pela glicose, uma substância de ocorrência generalizada tanto a nível laboratorial (análises clínicas, por exemplo) quanto industrial (fermentação alcoólica, por exemplo) e cuja concentração quase sempre precisa ser determinada.

Dentre as aplicações preconizadas ou efetivas da GO na forma solúvel tem-se: a) em kits enzimáticos para dosagem da glicose em solução e utilizando ortodianizidina como indicador colorimétrico (GODFREY & WEST, 1996); b) na indústria de alimentos, em associação com a catalase, para a desglicosação de ovos e como agente estabilizador das propriedades organolépticas de alimentos em geral (cerveja, peixe durante a refrigeração, enlatados e refrigerantes) (CRUEGER & CRUEGER, 1990); c) em medicamentos anticancerígenos, cujo efeito se deveria à formação da água oxigenada *in situ*, que, por sua vez, potencializaria a formação de radicais livres auxiliando a ação destes medicamentos (RABA & MOTTOLA, 1995; Dos SANTOS, 2001); d) na estimativa da transferência do oxigênio em processo fermentativo semi-sólido (ZHAO *et al.*, 2002); e) na remoção de oxigênio em refrigerantes e alimentos enlatados (ISIK *et al.*, 2003).

O uso da GO na forma imobilizada parece dominar atualmente os estudos para a aplicação desta enzima. Dentre seus empregos efetivos ou previstos tem-se: a) a marcação de antígenos e anticorpos na técnica da enzimaímmunoensaio (ELISA) (RABA & MOTTOLA, 1995); b) em biossensores através da construção de eletrodos para o monitoramento contínuo dos níveis de glicose no sangue de pacientes diabéticos podendo estar sozinha ou associada a outras enzimas ou a complexos inorgânicos (MORCILLO *et al.*, 2002; CRUEGER & CRUEGER, 1990). Inclusive, WILLNER (2002) propôs o acoplamento de dois eletrodos enzimáticos (um contendo a GO e o outro citocromo c/citocromo oxidase) para confeccionar uma célula de biocombustível, que no futuro poderia ser usada como marca-passo implantado no paciente, obtendo a energia para seu funcionamento a partir da oxidação da glicose corpórea. TRAU & RENNEBERG (2003), por sua vez, propuseram para uso em biossensores a GO aprisionada em polímeros orgânicos (hidroclorato de poli-alilamina, poli-4-estirenosulfonato de sódio, ácido poliacrílico, por exemplo) na forma de filmes com espessuras situadas entre 5nm e 500 µm. Dentro desta mesma linha, merece menção o trabalho de FANG *et al.* (2002), no qual foi descrito o aprisionamento da GO em camadas formadas com nanopartículas de sílica (diâmetros entre 9 e 45 nm) ou de magnetita (diâmetro de 12 nm), propiciando a miniaturização do biossensor. A imobilização de GO e sua possível aplicação em eletrodos biossensores encontram interesse também no controle de diversos processos industriais, especialmente, na área de alimentos, como citado por YILDIZ *et al.* (2005) que propuseram a utilização de copolímeros como suportes para o encapsulamento da enzima sendo o eletrodo testado na determinação de glicose em suco de laranja. O sucesso na imobilização da invertase e glicose oxidase em diferentes suportes pode ser evidenciado no trabalho apresentado por SAHMETLIOGLU *et al.* (2006) que mostrou a viabilidade na imobilização das duas enzimas em suportes idênticos viabilizando o emprego de sistemas imobilizados contendo as duas enzimas e favorecendo a utilização em processos ou biossensores multienzimáticos; c) em reatores para a conversão da glicose em ácido glicônico.

Neste caso, dispõe-se de reatores de dimensões reduzidas para fins puramente analíticos (dosagem da glicose “*on line*”; acoplados a aparelhos analíticos ou diretamente ao reator) ou de maior porte em plantas industriais (geralmente para a produção de ácido glicônico a partir da glicose). Pela literatura observa-se que os reatores empregados são do tipo leito fixo, porém, quando claramente do tipo BM, a GO acha-se unida à membrana (RABA & MOTTOLA, 1995; CRUEGER & CRUEGER, 1990; GIORNO & DRIOLI, 2000 e BRAHIM *et al.*, 2002). Recentemente foi descrito um biorreator do tipo leito fluidizado, usando ar comprimido como agente mantenedor da fluidez do leito, carregado com glicose oxidase aprisionada dentro de lipossomas, que, por sua vez, foram ligados covalentemente a quitosana (WANG *et al.*, 2003a; YOSHIMOTO, *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003b).

Entretanto, segundo KAPAT *et al.* (1998), algumas das aplicações para a glicose oxidase descritas acima são prejudicadas pelo alto preço das preparações comerciais e pela presença de catalase como contaminante.

Os preparados comerciais da glicose oxidase obtidos do *Aspergillus niger* são geralmente contaminados pela catalase, o que, dependendo da aplicação da enzima, pode não ser vantajoso (caso de biossensores calibrados para a medida amperométrica da água oxigenada formada na oxidação da glicose). Segundo KAPAT *et al.* (1998) a contaminação se deve ao fato da enzima glicose oxidase ser produzida intracelularmente e quando secretada, não se consegue impedir a secreção de outras formas enzimáticas.

No processo de conversão da sacarose a ácido glicônico e frutose pelo sistema invertase / GO a presença da catalase é vantajosa, porque ao decompor a água oxigenada há a liberação do oxigênio, que ao reduzir o FAD regenera a atividade catalítica da GO. Para se eliminar a interferência gerada pelo peróxido de hidrogênio formado durante a catálise enzimática pode-se utilizar, também, o dióxido de manganês como catalisador para a sua degradação (BAO *et al.*, 2001 a).

Diversas técnicas de imobilização vêm sendo aplicadas para que a enzima glicose oxidase possa ser utilizada em biorreatores, entre elas, a imobilização em um reator com membrana de emulsão líquida (PAL *et al*, 2002) ou através do encapsulamento em gel como o obtido a partir da hidroxietilcelulose (QIAN *et al*, 2002).

NAKAO *et al* (1997) compararam a oxidação enzimática da glicose, através da utilização da glicose oxidase, em três diferentes modelos de reator, sendo dois modelos de *airlift* e um modelo de *bubble column* e observaram que os reatores do tipo *airlift* ELBC (*external liquid bubble column*) apresentam menor produtividade do que o *bubble column* e o *airlift* ILBC (*internal liquid bubble column*) devido a uma maior transferência de massa ocorrendo no caso dos dois últimos modelos de reator, indicando, que a transferência de oxigênio é fundamental para a produtividade no processo enzimático (WANG *et al*, 2003a; BAO *et al*, 2000).

3.2. Sobre os biorreatores

Sabendo-se que a eficiência da biocatálise depende do binômio biocatalisador/biorreator faz-se necessário observar os diversos tipos de biorreatores que podem ser utilizados em processos de bioconversões.

Os biorreatores são equipamentos nos quais um agente de natureza biológica (células, enzimas, organelas celulares ou anticorpos) é utilizado para transformar um dado substrato em produto (GIORNO & DRIOLI, 2000). Em termos operacionais, o biorreator pode ser do tipo descontínuo ou contínuo.

O biorreator descontínuo é o mais comum para esta aplicação onde, geralmente, as enzimas são utilizadas em soluções solúveis, ou “livres”. Porém, apesar de sua praticidade, este tipo de processo apresenta diversas limitações de uso como a baixa produtividade, elevado custo final de processo, variações na composição final dos lotes (conhecido como efeito “batch to batch”), a necessidade de inativar a enzima ao final da reação, a necessidade de uma nova carga de enzima a cada processo iniciado e o

longo período necessário para se completar a reação (em muito, devido à presença de inibição por substrato e por produto). Este tipo de biorreator acaba sendo o preferido nos casos em que o biocatalisador é barato, não requer cofator ou possui meia-vida curta (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). Apesar de ser o tipo mais simples para operar e modelar tem o inconveniente de dificultar ou até mesmo impossibilitar a recuperação do biocatalisador no final do processo (ILLANES, 1994). No caso do biocatalisador ser solúvel dever-se-ia adaptar na linha de saída uma unidade de ultrafiltração, a qual permitiria recuperá-lo e reciclá-lo no processo (CURCIO *et al.*, 2002). Por outro lado, se o biocatalisador é susceptível à inibição por substrato passa a ser recomendável o emprego do processo descontínuo-alimentado, porque ao se adicionar o substrato paulatinamente ter-se-ia a possibilidade de manter sua concentração abaixo do limite inibitório (SENGUPTA & MODAK, 2001).

Contribuindo para a limitação no uso de reatores descontínuos temos a legislação a respeito da presença de enzimas em produtos industrializados. As agências regulatórias costumam classificar as enzimas como aditivos para alimentos, apesar de serem encontrados em todas as formas vivas, e sofrem rigoroso controle em sua utilização. Por causa disto, as indústrias dos setores alimentício e farmacêutico têm demonstrado grande interesse no desenvolvimento de métodos de aplicação de enzimas sem que as mesmas permaneçam no produto final obtido (CHERYAN, 1998).

Uma das maneiras mais utilizadas para se contornar as diversas desvantagens apresentadas no uso de enzimas livres ou na forma de solução em reatores descontínuos é a imobilização das mesmas em diferentes tipos de suportes. A imobilização de enzimas permite o desenvolvimento de processos contínuos mais eficientes em reatores do tipo “leito fixo”, onde a enzima passa a ser reutilizada no processo e o custo final será reduzido. Além da possibilidade de reutilização da enzima, temos neste tipo de processo um melhor controle e um produto final de qualidade mais uniforme.

Apesar das vantagens acima citadas, temos na imobilização de enzimas algumas desvantagens a serem consideradas como a perda de atividade da enzima promovida pelo tipo de imobilização empregado, podendo gerar perdas entre 10 e 90% da atividade obtida com a enzima livre. Em alguns casos, a imobilização também poderá afetar a especificidade, devido à eventuais mudanças na orientação *enzima-substrato*, problemas de restrições difusionais ou efeito estérico (CHERYAN, 1998).

O biorreator contínuo surgiu como uma extensão aplicativa da técnica de imobilização de biocatalisadores. Com o biocatalisador ligado por método físico ou químico em matrizes inertes e insolúveis foi possível operar biorreatores contínuos com diferentes configurações, a saber, colunas com o material imobilizado empacotado (reator de fluxo pistonado) ou mantido suspenso em meio líquido através da alimentação da solução substrato sob pressão gerada por bomba peristáltica (reator de leito fluidizado). Uma variante para manter o biocatalisador imobilizado em suspensão é o biorreator contínuo de tanque agitado (CSTR), cuja configuração básica seria a de um reator descontínuo, ao qual se adaptou um sistema contínuo de introdução e de retirada de material. Os biorreatores dos tipos leito fluidizado e contínuo de tanque agitado não possuem problemas relacionados ao estabelecimento de gradientes radiais ou axiais de pH, temperatura e concentrações de substrato e produto (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). Em geral, o biorreator contínuo e com agitação (CSTR) acaba sendo a primeira escolha para o desenvolvimento de um novo processo, porque possui grande flexibilidade operacional (por exemplo, pode-se trabalhar com um amplo intervalo de velocidades de agitação) e de utilização (não é desenhado para um processo em particular, podendo, inclusive, ser usado na configuração descontínua).

Figura 3.3: Esquemas de diferentes configurações de reatores enzimáticos (BOMMARIUS, 1993; WANG et al., 1979).

3.2.1. Biorreatores com membrana

No contexto dos biorreatores contínuos, merece destaque o biorreator com membrana (BM), que pode ser configurado de dois modos distintos, a saber, reator contínuo com agitação (CSTR) ao qual se acopla uma membrana ou um recipiente cilíndrico desprovido de sistema de agitação contendo grande número de membranas de filtração tangencial do tipo fibra oca dispostas em um arranjo tipo feixe. Este último tipo de BM é conhecido pelo nome "hollow-fiber reactor" (HFR).

Segundo GIORNO & DRIOLI (2000), em um biorreator com membrana, que não o HFR, o arranjo biocatalisador/membrana pode ser de dois tipos. Em um deles, o biocatalisador não está ligado à membrana, a qual, neste caso, atua como uma unidade de separação, impedindo o escape do biocatalisador no permeado. No outro tipo, o biocatalisador encontra-se unido à membrana, a qual atua tanto como sítio de catálise quanto como unidade de separação. Quando não há interação entre o biocatalisador e a

membrana, têm-se as situações em que a membrana está em um módulo acoplado em série ao biorreator (caso de um CSTR típico), sendo o biocatalisador impelido e removido continuamente de sua superfície (caso em que o biocatalisador é reciclado ao CSTR) ou o biocatalisador é confinado dentro do módulo com a membrana (caso em que não há reciclo do biocatalisador). Existe, também, o arranjo em que o CSTR tem uma membrana como integrante de sua base (nesta configuração o sistema funciona como CSTR e módulo de separação simultaneamente, sem a necessidade de reciclo). Quando existe união entre o biocatalisador e a membrana, pode-se ter o biocatalisador aprisionado na membrana, depositado na forma de gel sobre a superfície da membrana ou ligado através de interação química (adsorção, ligação iônica ou ligação covalente). Para este caso, pode-se, também, dispor de um único sistema CSTR/módulo de separação.

Os biorreatores com membrana mostram-se uma alternativa interessante para a imobilização de enzimas devido à sua capacidade de desenvolver processos com elevados níveis de conversão. Para tanto, é necessário que esta membrana seja de natureza química e conformação física adequadas para que se mantenha a enzima dentro do reator ou separá-la do restante da solução.

Reatores com membrana podem ser utilizados na produção, processamento e operações de tratamento e são, particularmente, atrativos devido à capacidade de funcionarem sob condições moderadas de pressão e temperatura, além de reduzirem a formação de subprodutos de reações. Os biorreatores com membrana aparecem como alternativa viável aos reatores tradicionais de enzimas imobilizadas (leito fixo, CSTR-tradicional, leito fluidizado), já que o biocatalisador não precisa estar, necessariamente, ligado a um suporte insolúvel (PRAZERES & CABRAL, 1994). Neste último aspecto, diferencia-se do reator agitado tradicional, embora mantenha todos os atributos favoráveis deste tipo de reator contínuo. Lembra-se que o BM, em princípio, permite integrar em uma única etapa a conversão catalítica, a separação/concentração do produto e a recuperação do biocatalisador.

Estes aspectos podem promover significativa produtividade e redução de custos por ocasião da ampliação de escala (GIORNO & DRIOLI, 2000). O BM apresenta as seguintes vantagens: catálise homogênea, ausência de limitações difusionais, estéricas e conformacionais, alta atividade por unidade de volume, possibilidade de se trabalhar em condições assépticas, produtividade constante garantida pela constância da dosagem da enzima e possibilidade de uso de sistemas multi-enzimáticos (ALFANI *et al.*, 2000; GAN *et al.*, 2005).

Os primeiros estudos sobre os biorreatores com membrana resumiram-se na tentativa de hidrolisar o amido à glicose, usando α -amilase retida em um sistema de filtração convencional. O principal problema observado relacionou-se à concentração de polarização da membrana, acarretando diminuição do fluxo ao longo do tempo e perda da enzima. O BM só começou a se tornar viável após os avanços ocorridos na tecnologia de membranas, as quais passaram a ser produzidas com espessura adequada, diâmetro e formato dos poros uniformes (microfiltração: 0,1 – 0,2 μ m; ultrafiltração: 0,1 μ m - 5nm; nanofiltração: menor que 2 nm), além das características químicas definidas das mesmas (hidrofilicas, hidrofóbicas, neutras ou carregadas), as quais resultam da natureza dos materiais empregados, a saber, polímeros orgânicos (por exemplo: polisulfonas, celulose, acetato de celulose, politetrafluoretileno, etc.) e inorgânicos (representados basicamente pelas cerâmicas porosas) (FANE & CHANG, 2002; SHIN & KANG, 2003).

Os reatores com membrana podem ser operados com reciclo de enzima consistindo, basicamente, de um tanque de agitação mecânica onde ocorre a catálise enzimática tendo um sistema de filtração para a separação da enzima acoplado para retorno ao reator do substrato não reagido. A principal desvantagem na utilização desta configuração de reatores está nas dimensões necessárias para se operar com um reator com membrana e reciclo e que serão maiores do que as necessárias para se operar com um reator de fluxo pistonado, por exemplo, de forma a se igualar as produtividades nos dois casos. Assim, para se atingir a mesma taxa de

conversão alcançada em outros tipos de biorreatores, sem que as dimensões necessárias para esse fim se tornem inviáveis, tem-se como alternativa a utilização de vários biorreatores com membrana operando em série. Desta forma, no último estágio (reator), atinge-se a mesma conversão enzimática obtida quando da utilização de outros modelos de biorreatores (descontínuo, “*plug-flow*”).

No caso de reatores com membrana e reciclo operando em série as taxas de conversão obtidas em cada unidade operacional dependerão da vazão específica utilizada, onde, para vazões específicas mais elevadas, as taxas de conversão em cada unidade operacional tenderão a ser as mesmas. No caso de baixas vazões específicas resultam-se taxas de conversão maiores na última unidade de operação.

Devido aos problemas de custos (membrana, bombas, controladores) e da complexidade do sistema de produção envolvido, não é comum a existência de processos que utilizem mais que três estágios (reatores) acoplados. Porém, mostra-se interessante a utilização de uma única unidade de separação (membrana) no estágio final do processo quando se operando em CSTR, principalmente, nos casos onde substrato e produto são permeáveis à membrana. Para esta configuração de reator, a performance atingida pelo sistema operado em reciclo será uma função da razão de reciclo (R/F) e, para razões de reciclo elevadas o catalisador tende a se distribuir de forma uniforme ao longo da série de reatores enquanto que, para razões de reciclo mais baixas, as maiores conversões tendem a ocorrer no último estágio do sistema em operação.

Apesar de mais caro e complicado, a utilização de unidades de separação (membrana) em cada estágio (reator) pode ser interessante em determinados casos, como na conversão através de sistemas multienzimáticos, onde a conversão se dá com uma sequência de reações enzimáticas e um melhor resultado poderá ser alcançado ao se otimizar a conversão de cada enzima em um estágio (reator) do sistema.

O BM configurado como CSTR é o mais usado podendo-se identificar estudos recentes preconizando sua aplicação na obtenção de ciclodextrinas

(SLOMINSKA *et al.*, 2002), fructooligossacarídeos (SHEU *et al.*, 2001), catecol (BOSHOF *et al.*, 2003), proteólise da caseína (CURCIO *et al.*, 2000) e da hemoglobina (BELHOCINE *et al.*, 2000). GIORNO & DRIOLI (2000) identificaram o uso do BM nos setores agro-alimentar (na hidrólise da pectina por pectinase em sucos de fruta, em enologia, na remoção da lactose do soro e/ou leite integral e modificação de óleos e gorduras), químico-farmacêutico (dentre outros, citam-se a título de exemplos, as conversões do ácido fumárico e L-aspartico, respectivamente, em ácido L-aspartico e L-alanina, a obtenção do ibuprofeno a partir de seu ciano-éster e a obtenção de oligonucleotídeos a partir de DNA) e biomédico (órgãos artificiais para uso extracorpóreo). Recorda-se, também, que o BM configurado desta maneira, foi objeto de uma das primeiras patentes (de propriedade da *Degussa AG/GBF*) visando o seu uso industrial em processo contínuo para a produção de L-aminoácidos (metionina e valina), estando a aminoacilase retida em uma membrana de ultrafiltração (BOMMARIUS, 1993). DÍAZ *et al.* (2006) estudaram a hidrólise da inulina em frutose através do desenvolvimento de um reator com membrana (EMR). Para tanto se buscaram as melhores condições operacionais em termos de pH, concentração de substrato e proporção enzima/substrato utilizando a enzima livre e realizando em seguida estudos sobre o suporte mais adequado focando a imobilização da enzima para tornar o processo economicamente mais vantajoso.

O BM configurado como HFR mostrou-se útil no caso de se usar células íntegras (de origem animal ou microbiana) como biocatalisadores (CALABRÓ *et al.*, 2002; GOVENDER *et al.*, 2003). Lembra-se que o HFR, atualmente, está sendo preconizado no tratamento de águas residuais, usando o lodo ativado como biocatalisador (WINTGENS *et al.*, 2003) ou, ainda, como simples sistema de microfiltração (KANG *et al.*, 2003). Atualmente, uma das aplicações mais interessantes para os reatores com membrana está na hidrólise enzimática da celulose (GAN *et al.*, 2005). Estudos em configurações de reatores tubulares com membrana mostraram um aumento de 10% na conversão média além de permitir uma conversão

de 70% para um processo contínuo ao se utilizarem pellets moídos como substrato (BÉLAFI-BAKÓ *et al.*, 2006). Outra aplicação para o HFR está na utilização desta configuração de reator para a hidrólise do óleo de oliva por microfiltração e utilizando lipase de *Candida rugosa* imobilizada obtendo a mesma eficiência catalítica encontra em outros arranjos de reatores com membrana (DENG *et al.*, 2006).

Embora o transporte através da membrana possa se dar por difusão (a separação se baseia, apenas, no gradiente de concentração estabelecido entre as duas faces da membrana) ou por convecção (resultante do estabelecimento de um gradiente de pressão ou temperatura através da membrana), os BM mais usados, que requerem fluxos elevados, valem-se deste último mecanismo de transporte (CURCIO *et al.*, 2002).

A direção do fluxo introduzido no BM e a travessia do fluido através da membrana podem ser paralelos (ambos perpendiculares à superfície da membrana) ou perpendiculares entre si (o fluido alimentado tangencia a superfície da membrana e a travessia se dá perpendicularmente à superfície da mesma) (CURCIO *et al.*, 2002;). Este último padrão de operação do BM é o mais indicado para evitar o fenômeno da polarização da membrana (PESSOA-Jr & KILIKIAN, 2001; BYHLIN & JONSSON, 2002). Caso se faça o reciclo do efluente, a eficiência do BM será ainda maior. Atualmente o custo das membranas não afeta substancialmente o custo global do reator, porque são bastante estáveis e podem ser regeneradas várias vezes. Por isso, ao invés de minimizar a área da membrana para um determinado fluxo, prefere-se fornecer área de membrana suficiente para otimizar o tempo de operação de um BM (BOMMARIUS, 1993).

Apesar da retenção de enzimas por membranas e a imobilização em suportes sólidos serem consideradas duas técnicas distintas de retenção do biocatalisador, a linha divisória entre elas não é nítida, sobretudo quando se imagina a membrana como uma superfície de imobilização, sendo o BM, neste caso, considerado como um tipo especial de reator para enzimas imobilizadas. Finalmente, os biorreatores de membrana podem ser utilizados em escala de laboratório para monitoramento contínuo da atividade de

enzimas, avaliando-se a desativação por pH ou pela temperatura em condições operacionais. Pode ser útil, também, na identificação de mecanismos de inibição enzimática. Em escala industrial para recuperação e reutilização de biocatalisadores solúveis, na facilidade de separação dos produtos e como técnica de reator de enzimas imobilizadas com elevada área superficial.

O potencial de aplicações desta tecnologia tem levado ao desenvolvimento de diversas áreas, entre as quais, a indução de microrganismos para a obtenção de enzimas específicas, desenvolvimento de metodologias de purificação de enzimas, desenvolvimento de novas técnicas e procedimentos de imobilização de enzimas e obtenção de processos produtivos mais eficientes.

A utilização de biocatalisadores nos processos em larga escala mostra-se interessante porque permitem as biotransformações uma integração com as demais etapas de produção. Estes biocatalisadores podem ser utilizados sobre a forma suspensa em solução, sendo mantido no interior do reator pela membrana, ou sob a forma imobilizada (através da aplicação de técnicas como a adsorção, gelificação, cruzamento, ligação iônica, ligação covalente, etc.), onde a membrana pode funcionar ao mesmo tempo como um suporte para o catalisador e como uma unidade de separação.

A utilização de reatores com membrana mostra-se uma alternativa interessante devido à diferença nas dimensões entre a enzima e as moléculas dos produtos obtidos, de forma que estes reatores podem ser utilizados para a separação contínua da enzima acoplado a um sistema de reciclo para que ela retorne ao reator e possa ser reutilizada. Outra possível aplicação para os reatores com membrana é a sua utilização em um sistema integrado, onde a enzima permaneça confinada em um dos lados da membrana no interior do reator. Neste segundo caso, temos a adição e remoção contínuas de substrato e produto através do reator, sendo esta configuração geralmente operada em reatores do tipo fluxo pistonado.

3.3. Sobre os Produtos

3.3.1. Frutose

A frutose é a ceto-hexose mais importante entre os carboidratos. Ocorre no mel e nos frutos, dos quais toma o nome, e participa da formação da sacarose, como único constituinte desse polissacarídeo chamado inulina. É sempre encontrada na forma de d-frutose, que é levogira e, por esse motivo, chamada levulose. Obtém-se por hidrólise da inulina, por aquecimento em meio ácido.

Figura 3.4: Estrutura molecular da Frutose.

Os xaropes de alto teor de frutose são adoçantes utilizados em alimentos e bebidas em substituição à sacarose, devido seu maior poder adoçante e melhores propriedades funcionais, conferindo aspecto e estabilidade mais adequados ao produto (FERNANDES *et al.*, 2006). Até a década de setenta, a frutose era produzida tradicionalmente a partir de soluções de açúcar invertido, usando o método do frutonato de cálcio para separação. Este envolve a mistura de hidróxido de cálcio com soluções de açúcar invertido, tratamento com dióxido de carbono e separação do carbonato de cálcio, seguido de evaporação à vácuo e cristalização fracionada do frutonato de cálcio. A partir de 1964 a frutose passou a ser produzida em escala industrial, usando resinas de troca iônica para sua separação do açúcar invertido (CRUEGER & CRUEGER, 1984). A frutose, também, pode ser produzida por isomerização da glicose, utilizando-se a enzima glicose-isomerase e produzindo-se xaropes com elevada concentração de frutose.

O açúcar invertido (mistura equimolar de glicose e frutose) obtido a partir da hidrólise da sacarose apresenta vantagens como a ausência de coloração podendo ser empregada em diversos setores da indústria de alimentos e bebidas (BAYRAMOGLU *et al.*, 2003). Os xaropes de frutose, que são uma mistura de frutose e glicose de elevada viscosidade, são muito parecidos ao mel e a principal fonte de dextrose industrial são os hidrolisados de milho (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985a). A introdução do processo de isomerização da glicose pela glicose-isomerase imobilizada revolucionou o mercado de adoçantes em países não produtores de cana-de-açúcar, como EUA e Canadá, a tal ponto que já em 1984 o xarope de frutose correspondia a 34% do mercado de adoçantes nestes dois países, lembrando-se que o processo começou a ser operado em escala industrial em 1977/1978 (COKER e VENKATASUBRAMANIAN, 1985b). Neste processo, o hidrolisado amiláceo contendo 94 a 96% em peso de glicose é introduzido em reatores contínuos de leito fixo, sendo o tempo de residência da ordem de 4h. Como a reação catalisada pela glicose-isomerase leva a um equilíbrio em partes iguais de glicose e frutose ($K_{eq} = 1$), e como este equilíbrio leva muito tempo para ser alcançado, prefere-se obter um xarope com 42% de conversão. Antes de ser concentrado, o xarope contendo a mistura frutose (42% p/p) e glicose (53% p/p) é tratado sucessivamente com carvão ativo e resina de troca iônica. Como os xaropes com teor em frutose superior a 42% possuem alta demanda de mercado, então o xarope resultante do isomerizador é passado por colunas cromatográficas, valendo-se da característica da frutose ser adsorvida por grupos catiônicos com maior intensidade do que a glicose (PEPPLER & REED, 1987; KNORR, 1987). Pode-se obter xarope com até 90% de frutose. Um arranjo promissor para produzir frutose a partir do hidrolisado de sacarose (açúcar invertido) foi proposto por AZEVEDO & RODRIGUES (2001). A proposta consiste basicamente na execução simultânea da reação e da separação dos produtos, utilizando-se uma série de doze colunas interligadas e dispostas em um circuito fechado, sendo cada uma delas carregada com uma resina que adsorve preferencialmente uma das

hexoses. As soluções de invertase e de sacarose seriam introduzidas no sistema em contracorrente e o efluente enriquecido em frutose recolhido em pontos estrategicamente dispostos ao longo do circuito. Apesar do aumento constante na importância dos xaropes de frutose altamente concentrados (HFCS), o processo de isomerização da glicose resulta em uma baixa conversão (42%) e no uso de um complexo e custoso esquema de purificação (ROCHA *et al.*, 2006), restringindo sua comercialização no mercado mundial.

Três HFCS são comercializados hoje em dia e contém 42, 55 e 90% de frutose e sua mais importante aplicação é como adoçante. O HFCS42 é muito utilizado na maior parte dos produtos alimentícios que fazem uso de adoçantes líquidos, mas o desenvolvimento de uma segunda geração apresentando níveis muito superiores de frutose na composição ampliou mais ainda a possibilidade de aplicação. Temos como exemplo a utilização de HFCS55 (55% de Frutose) para adoçar refrigerantes e sucos prontos em substituição à sacarose.

O HFCS90 (90% de Frutose) encontra ainda certa limitação quanto à aplicação, porém, tem importante aplicação na obtenção de produtos alimentícios específicos, especialmente como um adoçante para alimentos de baixo teor calórico (KNORR, 1987).

A técnica de isomerização foi desenvolvida inicialmente no Japão e depois nos EUA, e este processo ganhou destaque com o avanço na tecnologia de imobilização de enzimas em suportes insolúveis, o que permitiu o uso de processos contínuos com menor custo do biocatalisador. A evolução da tecnologia para a produção de adoçantes a partir do milho foi um dos passos mais significativos da biotecnologia.

A composição dos carboidratos nos diferentes produtos hidrolisados determina as propriedades funcionais, como grau de polimerização e irão influenciar na aplicação do mesmo. Existe adoçante que apresentam desde baixos níveis de monossarídeos até os de alto teor dos mesmos, cada qual com uma diversidade de aplicação característica na indústria, o que reforça a importância no uso de processos de obtenção flexíveis como os reatores

de membrana em processo contínuo, onde o tempo de residência pode conduzir a um maior ou menor grau de conversão do dissacarídeo.

No caso de se utilizar o sistema sacarose / invertase / GO, como proposto neste projeto, a obtenção da frutose deverá envolver as etapas, a saber, dissolução da sacarose, conversão enzimática em frutose e ácido glicônico, tratamento do efluente com sal de cálcio, centrifugação ou filtração (separação do gliconato de cálcio) e concentração do sobrenadante ou filtrado até alcançar o teor desejado de frutose no xarope final. Pode-se chegar até à cristalização da frutose. Este processo quando comparado ao da isomerização é mais simples e, por conseguinte, poderá ser mais econômico.

3.3.2. Ácido Glicônico

O ácido glicônico e seus derivados apresentam grande aplicação nos campos das indústrias farmacêuticas, alimentícia e química.

A produção em larga escala deste composto químico se iniciou na década de trinta e, atualmente, ele é obtido, principalmente, através de processos bioquímicos. Além da via de obtenção bioquímica, o ácido glicônico pode ser obtido através de catálise homogênea e heterogênea (BAO *et al.*, 2001a).

Figura 3.5: Estrutura molecular do ácido glicônico

O processo bioquímico tradicional é o fermentativo, através do cultivo de *Aspergillus niger*, *Gluconobacter suboxydans* ou *Acetobacter methanolicus* (ERZINGER, 2000; VOGELBUSCH GmbH., 2000). O processo fermentativo

utilizando o *A.niger* 67, obtido por seleção de cepas, como agente de transformação permite obter ácido glicônico com rendimento de 95% para concentrações entre 150 e 200 g/L em cultivos de 24 horas. Além desta, outras cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* alcançam rendimentos superiores a 90% para cultivos entre 48 e 80 horas (BELTRAME *et al.*, 2004).

O ácido glicônico também pode ser obtido juntamente com o sorbitol a partir de uma solução eqüimolar de glicose e frutose em presença da bactéria *Zymomonas mobilis*, que possui na membrana plasmática a enzima glicose-frutose oxidoreductase, responsável direta pela biotransformação (ERZINGER *et al.*, 1996; ERZINGER, 2000). De acordo com PAL *et al.* (2002) o ácido glicônico poderia ser obtido a partir da maltose, utilizando-se uma combinação de alfa-glicosidase e glicoseoxidase inseridas no interior de micelas presentes em uma emulsão do tipo água / óleo / água.

A primeira patente relacionada à produção deste ácido por via fermentativa data de 1932 e foi obtida por BERNHAUER & SCHULHOF (ROHR & KUBICEK, 1981 apud ERZINGER, 2000).

O processo químico através de catálises homogêneas e heterogêneas, quando comparado ao biotecnológico, apresenta como desvantagens o baixo rendimento, a formação de subprodutos indesejáveis, a poluição ambiental causada pelos agentes oxidantes e o alto grau de pureza da glicose a ser convertida (ERZINGER, 1999).

BIELLA *et al.* (2002) e WENKIN *et al.* (2002) recentemente postularam a retomada da via química, utilizando catalisadores constituídos por metais (bismuto, paládio, platina e / ou ouro) imobilizados em carvão ativo, afirmando obter rendimentos da ordem de 99% para a oxidação da glicose em ácido glicônico. Admitem como única desvantagem deste processo frente ao biotecnológico (fermentativo) o fato de se obter o gliconato e não o ácido livre. Concluem que, uma vez resolvida esta dificuldade, a via química passará a ter vantagens frente a biotecnológica, por esta apresentar problemas intrínsecos como a separação das células, a formação de produtos colaterais e o descarte do líquido fermentado e das células microbianas formadas.

A fim de reduzir a contaminação ambiental gerada pela emissão de efluentes contendo nutrientes residuais e subprodutos das reações químicas e bioquímicas dos processos descritos anteriormente, processos bioquímicos utilizando reações enzimáticas em reatores com membrana mostram-se interessantes para a produção de ácido glicônico. Além dos problemas ambientais, o processo fermentativo ainda apresenta como desvantagem a própria condição operacional, bem mais complexa que os demais processos de obtenção.

A otimização dos processos enzimáticos de forma a buscar um prolongamento da atividade catalítica e produtividade levam para a imobilização da enzima em diferentes métodos e suportes (BELTRAME et al., 2004) sendo assim, sistemas de aprisionamento da enzima glicose-oxidase entre membranas de ultrafiltração mostra-se uma interessante alternativa para os processos enzimáticos.

BAO *et al.*, 2001 descrevem a obtenção do ácido glicônico a partir da oxidação da glicose catalisada pela enzima glicose-oxidase imobilizada. Segundo os autores, este processo se torna atrativo e merecedor de atenção desde a pesquisa e desenvolvimento dos vários procedimentos de imobilização da enzima glicose-oxidase, bem como sua utilização em diversos processos em biorreatores nas últimas duas décadas.

A característica marcante do ácido glicônico é sua alta capacidade quelante de íons metálicos, sobretudo em meio alcalino (por ex., 1g do ácido quela 325 mg de CaCO_3 em solução de soda a 3%). Acrescenta-se, também, que este ácido e seus derivados têm como propriedades a baixa toxidez e corrosividade, capacidade de formar complexos hidrossolúveis com diferentes íons metálicos (VOGELBUSCH CO, 2000). O ácido glicônico é estável mesmo sob fervura em solução de NaOH 15%, além de biodegradável e de cristalizar a temperaturas inferiores a 10° C (JUNGBUNGLAUER CO, 2000).

O ácido glicônico e seus sais de cálcio, potássio, ferro e zinco são muito usados nas áreas alimentícia (acidulantes em formulações de sorvetes, balas, xaropes e refrescos; aditivos em produtos cárneos; removedores de

sedimentos como calcário e metais na fabricação de bebidas) e farmacêutica (os sais de cálcio e ferro são usados na terapia de reposição destes íons e o de magnésio usado como padrão na dosagem deste íon no soro) (ERZINGER, 2000). Na área química encontram aplicação o ácido glicônico e o gliconato de sódio (na forma de solução a 60% de partes iguais do ácido e do sal sódico), sobretudo na limpeza de superfícies metálicas para remover óxidos, hidróxidos e carbonatos de cátions polivalentes. Na indústria textil são usados como branqueadores.

A produção do ácido glicônico via oxidação da glicose pela GO (enzima disponível no mercado, conforme já referido) poderia ser executada com o substrato proveniente tanto da hidrólise da sacarose (neste caso acoplado à invertase) quanto da hidrólise do amido. Dado a natureza da reação, são vantagens inerentes deste processo a geração de efluentes inofensivos ao meio ambiente, baixo consumo de energia e obtenção de um produto final com baixa percentagem ou, até mesmo, ausência de contaminantes.

O gliconato de cálcio é um dos mais importantes sais derivados do ácido glicônico e apresenta aspecto de pó fino e esbranquiçado, pouco solúvel em água, especialmente, se comparado com gliconatos alcalinos. Este sal derivado encontra aplicação em diversas áreas da indústria farmacêutica, alimentícia e química em geral (BAO *et al.*, 2003a). Recentemente, BAO *et al.* (2001a,b) e BAO *et al.* (2003b) descreveram um processo constituído por dois reatores de leito fluidizado ("air lift") ligados em série, onde um funcionava como biorreator (a bioconversão glicose/ácido glicônico catalisada pela GOD imobilizada em alginato de cálcio) e o outro como cristalizador. Após a separação do sal, o liquor-mãe era reciclado para o reator enzimático, tendo-se assim acoplados em um sistema contínuo a formação e cristalização do ácido glicônico.

BAO *et al.* (2001a) obtiveram o gliconato de cálcio a partir da cristalização de uma solução aquosa concentrada deste sal. A solução de gliconato de cálcio foi obtida através de uma reação de neutralização do ácido glicônico com carbonato de cálcio, seguindo-se a uma operação de evaporação. A neutralização do ácido glicônico também pode ser feita com a

utilização do hidróxido de cálcio (BAO *et al.*, 2001b). Segundo os autores, é possível se obter este sal a partir do acoplamento de um reator enzimático, onde ocorreria a oxidação da glicose pela enzima glicose-oxidase, com um cristalizador (BAO *et al.*, 2001a e 2001b). A melhor condição operacional obtida para a cristalização do gliconato de cálcio seria em pH 7.0, 10°C e com uma concentração de gliconato de cálcio em 47 g/L.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Enzimas

4.1.1.1. *Invertase*

Foi empregada solução de Invertase (EC. 3.2.1.26) marca *BIOINVERT*[®] (Código 5B0011 - *Deltagen Pty Ltda*) contendo estabilizadores. A solução enzimática apresenta atividade catalítica nominal superior a 11600 U/mL, sendo uma unidade (U) de atividade a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de sacarose por minuto a 55° C e pH= 4,5 (informações da *Deltagen Pty Ltda*). A atividade específica da Bioinvert[®] equivale a 37.4 U/mg de proteína segundo trabalho anterior com esta enzima (TOMOTANI & VITOLO, 2004).

4.1.1.2. *Glicoseoxidase*

Foi empregada a glicose oxidase (EC.1.1.3.4) de *Aspergillus niger* adquirida da SIGMA[®] (código G 6766). Um grama do sólido contém entre 2000 e 10000 U, sendo uma unidade (U) de atividade a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de β -D-glicose a ácido glicônico e água oxigenada por min a 35° C e pH 5,0.

4.1.1.3. *Catalase*

Foi empregada a catalase (EC.1.11.1.6) de células de tecido bovino adquirida da SIGMA[®] (código C 9322). Um miligrama do sólido contém 2350 U, sendo uma unidade (U) de atividade a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de H₂O₂ por min a 25° C e pH 7,0, enquanto a concentração de peróxido de hidrogênio cai de 10,3 mM para 9,2 mM.

4.1.2. Reagentes e Vidraria

Todos os reagentes empregados eram de grau PA. Foi utilizada vidraria comum de laboratório.

4.1.3. Membranas

As membranas usadas nos ensaios em biorreator foram da marca *MILLIPORE*^(R), modelo PLHK07610 (membrana de ultrafiltração de celulose regenerada com corte molecular de 100 kDa).

4.2. Equipamentos

4.2.1. Biorreator

Foi utilizado o reator enzimático com membrana da *Bioengineering*^(R) (EMRB). O EMRB é um biorreator de 10 mL de capacidade operacional, autoclavável, opera à pressão de até 6 bar, tendo como acessórios uma bomba doseadora de alta precisão (vazão entre 1 e 500 mL/h com variação de $\pm 0,5$ mL/h), dispositivo para medir a pressão interna do sistema, dispositivo para aprisionar bolhas e pré-filtro esterilizante.

4.2.2. Outros

Foram utilizados os seguintes equipamentos de apoio principais: espectrofotômetro *Beckman-Coulter* (mod. DU 640), agitador de tubos Marconi (mod. MA-162), bomba dosadora *Pharmacia*^(R) (mod. PD 5101), banho termostatizado *Polystat* (mod. CC3), banho termostatizado *Fisaton* (mod. 597), balanças *Marte* (mods. AS 2000C e AS 1000C), desmineralizador de água *Fisaton* (mod. 670), balança analítica *Mettler Toledo* (mod. AG 285).

Figura 4.1. Esquema Experimental dos ensaios em reator com membrana *Bioengineering*® de 10 mL (volume útil).

Figura 4.2. Imagem do sistema operacional para a execução dos testes no Reator com membrana *Bioengineering*® de 10 mL (volume útil) em operação durante experimento.

Figura 4.3. Imagem do Reator com membrana *Bioengineering*[®] de 10 mL (volume útil).

4.3. Métodos

4.3.1. Determinação da atividade da Bioinvert[®]:

De acordo com SEGEL (1979), a concentração de enzima em uma preparação impura deve ser expressa em unidades por mililitro. A unidade de atividade invertásica (U) fica definida como sendo a quantidade de AR formado (μmol) por minuto (Eq. 4.1). A determinação da atividade enzimática da invertase (v), expressa em U/mL, é efetuada segundo metodologia definida por TOMOTANI (2002). Uma unidade de atividade enzimática da invertase (U_{INV}) é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de um micromol de açúcares redutores (mistura equimolar de glicose e frutose) por minuto, sob condições padronizadas:

$$1U_{INV} = \frac{[ART]_F}{t} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde:

U_{INV} : unidade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

$[ART]_F$: concentração de açúcares redutores totais presentes na amostra (μmol).

t: tempo de reação (min)

A solução de *Bioinvert*[®] apresenta atividade de 0,0245 U/mL. Esta metodologia apresenta um desvio-padrão de 0,0062 mg/mL e coeficiente de variação na ordem de 4,35%.

4.3.2. Determinação da atividade da glicose-oxidase:

Em uma cubeta de capacidade 1,2 mL foram adicionados 0,2 mL da solução de glicose oxidase (4 mg/mL), 0,5 mL da solução de glicose (0,8 mg/mL) e 0,3mL de solução tampão acetato (pH 5,5 / 0,01M). Após a homogeneização da mistura, determinou-se a atividade enzimática através da formação de água oxigenada em comprimento de onda de 240nm (Figura 4.4; BERGMEYER, 1984). O espectrofotômetro foi programado para registrar um tempo total de reação de 315 segundos, sendo as leituras correspondentes à formação da H₂O₂ tomadas a cada 45 segundos. A temperatura foi mantida a 25°C. As soluções de tampão e de glicose foram borbulhadas com o oxigênio durante 15 minutos antes de serem adicionadas na cubeta.

Figura 4.4. Formação de H₂O₂ pela ação da glicose oxidase sobre a glicose em função do tempo (Leitura feita em $\lambda = 240\text{nm}$).

O ponto zero do aparelho foi ajustado com uma solução constituída por 0,2mL de solução da enzima e 0,8mL de tampão acetato.

A unidade de atividade (U_{GO}) de glicose oxidase foi expressa em mg H_2O_2 formada por minuto. Os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação foram iguais a $3,04 \times 10^{-4}$ mg/mL. min e 4,03% respectivamente

4.3.3. Descrição de um ensaio típico no biorreator com membrana:

Em todos os experimentos realizados, mediu-se a vazão volumétrica (mL/min) na saída do reator para os cálculos da velocidade de reação (r) e da vazão específica (D). Para tanto, dispôs-se um coletor de amostras (capacidade para 96 tubos - Figura 4.2) após a saída do biorreator (Figura 4.3). A coleta era iniciada quando do início do gotejamento no tubo da solução que saía do reator. Os tempos de coleta foram estabelecidos de acordo com a vazão utilizada. Depois de concluído o tempo de coleta, automaticamente, iniciava-se a coleta no próximo tubo. O volume de amostra coletado dividido pelo tempo de coleta fornecia a vazão resultante. As amostras, então, eram processadas para as análises necessárias.

O reator contendo 10 mL de uma solução enzimática tamponada (*Bioinvert*^(R) ou glicose-oxidase / catalase) e munido de membrana de ultrafiltração (material constituinte: celulose regenerada) com corte molecular de 100 kDa foi alimentado com solução de substrato (sacarose ou glicose) a vazão constante de modo a caracterizar um sistema contínuo do tipo CSTR. O pH do meio reacional foi mantido ao longo do ensaio, usando-se tampão acetato 10 mM, sendo a temperatura da reação mantida através da recirculação de água vinda de um banho munido de aquecedor com termostato e recirculador de água. A temperatura do banho foi monitorada durante todo o ensaio para que se pudesse assegurar a constância da temperatura do processo. Nestes casos, as condições operacionais foram indicadas na descrição específica de cada um dos ensaios efetuados.

4.3.4. Separação dos Produtos:

A separação do ácido glicônico e frutose foi avaliada através da variação dos parâmetros de cristalização. Assim, definiram-se condições da neutralização do ácido glicônico a partir da adição de gliconato de cálcio e, em seguida, as condições para a cristalização deste sal.

A neutralização do ácido glicônico foi avaliada a fim de se obter a condição mínima para a obtenção dos cristais de gliconato de cálcio. Para tanto, verificou-se a mínima concentração de ácido glicônico (AG) necessária. Para tanto, foram efetuados ensaios utilizando 0,1M, 0,25 M, 0,5 M e 1,0 M de ácido glicônico. Em balão volumétrico de 50 mL foram adicionados, respectivamente, os volumes 1,99 mL, 3,92 mL, 7,85 mL e 15,69 mL do frasco original de ácido glicônico *Fluka*[®], cuja concentração é 3,2 M. Após a diluição do ácido glicônico, este foi transferido para béquer apropriado, onde foi mantido em banho a 30°C. A temperatura de neutralização foi estabelecida por BAO *et al* (2003).

A neutralização foi efetuada a partir da adição controlada de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) até pH 7,0, mantendo-se o sistema sob agitação e na temperatura de 30°C durante toda a neutralização. O pH estabelecido como ponto final da neutralização foi definido segundo NAKAO *et al* (2003), onde foi verificado que valores de pH acima de 6,0 favorecem a cristalização do gliconato de cálcio. A massa de hidróxido de cálcio consumido pela reação de neutralização foi anotada e a solução foi mantida sob agitação até a completa dissolução do hidróxido de cálcio. Em seguida, deu-se início à etapa de cristalização, efetuada a 10°C e em um intervalo de 24 horas sem agitação do sistema.

A variação da massa de hidróxido de cálcio adicionada para a neutralização do ácido glicônico foi definida em função do pH final obtido após a dissolução completa do hidróxido na solução de ácido glicônico 1M.

Em balão volumétrico de 50 mL foi adicionado 15,69 mL de ácido glicônico (3,2M – frasco original *Fluka*[®]), completando-se o volume do balão com água deionizada. Após a diluição, transferiu-se a solução para béquer apropriado e manteve-se o sistema a 30°C (temperatura de neutralização). A neutralização foi efetuada a partir da adição controlada de hidróxido de

cálcio até o pH desejado, mantendo-se o sistema sob agitação até a dissolução completa do sal. O pH foi variado em 5,0, 6,0, 7,0 e 10,0. Após a neutralização seguiu-se a etapa de cristalização, onde a solução de gliconato de cálcio foi mantida à 10°C (temperatura de cristalização) por 24 horas sem agitação.

A cristalização constou da manutenção em repouso de béquer de 250 mL contendo 50 mL de solução de Gliconato de Cálcio (1000 mM) e Frutose (1000 mM) a 10°C. Tal solução foi previamente preparada segundo o procedimento de neutralização a seguir. Em béquer de 250 mL foi adicionado 50 mL de ácido glicônico na concentração de 1000 mM. A solução de ácido glicônico foi obtido a partir da adição em balão volumétrico de 50 mL de 15,69 mL de ácido glicônico Fluka® cujo volume foi completado com tampão acetato (pH 5,5). O frasco original de ácido glicônico apresenta concentração de 3,2 M. Ao mesmo béquer, adicionou-se 9,0 g de Frutose de forma a obtermos uma solução de ácido glicônico (1000 mM) e frutose (1000 mM). A solução foi mantida a 30°C e sob agitação durante a neutralização. Adicionaram-se, de forma controlada, cristais de hidróxido de cálcio até pH 6,0. A seguir, procederam-se os estudos visando estabelecer as melhores condições de cristalização do gliconato de cálcio.

Verificou-se a cristalização do gliconato de cálcio em meio contendo frutose em duas condições de temperaturas, a saber, 8°C e 30°C, durante 24 e 48 horas de cristalização. Após o tempo de cristalização estabelecido procedia-se à filtração em papel adequado (previamente pesado) para a retenção dos cristais formados.

Os cristais eram, em seguida, levados à estufa a 80°C para secagem por 24 horas e acondicionados em dessecador contendo sílica gel até a temperatura ambiente. Após pesagem da massa de cristais se obtinha o rendimento (η) em gliconato de cálcio (Eq. 4.11), definido como a relação entre a massa de cristais (m_{real}) obtidos e a massa teórica ($m_{\text{teórica}}$) de cristais:

$$\eta = \frac{m_{\text{Real}}}{m_{\text{Teórica}}} \times 100 \text{ (Eq. 4.2)}$$

Após a filtração e separação dos cristais formados, procedia-se à coleta de amostra da água-mãe (filtrado) para posterior dosagem da quantidade de cálcio restante por titulação complexométrica de íons cálcio (Ca^{++}) através do método descrito por OHLWEILER (1968).

Efetuiu-se o estudo do tempo de cristalização necessário para que se obtenha o maior rendimento em cristais de gliconato de cálcio a partir de solução contendo este sal em presença de frutose. Para o estudo, estabeleceram-se os seguintes tempos de cristalização: 0, 8, 12, 16 e 24 horas. Após cada período de cristalização, efetuou-se uma filtração em papel de filtro adequado para separar os cristais obtidos da água-mãe. Após a filtração, efetuou-se a lavagem dos cristais obtidos. A lavagem foi realizada a partir da adição de 50 mL de água destilada sobre os cristais contidos em papel de filtro. Após a lavagem, os cristais foram levados para a estufa de secagem. A quantidade de frutose presente na água-mãe foi obtida através da determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) presente na água-mãe através do método descrito por SOMOGYI (1944).

4.4. Determinações Analíticas

4.4.1. Determinação da concentração de açúcares redutores totais:

A medida da concentração de glicose e frutose (açúcares redutores totais) nas amostras foi obtida a partir do método descrito por SOMOGYI (1944). De acordo com o método, obtém-se uma relação entre a absorbância ($\lambda = 540 \text{ nm}$) e a concentração de ART, resultando em uma curva de calibração $\text{ABS} = f([\text{ART}])$, colocando-se nas coordenadas a média dos valores das absorbâncias e nas abcissas os valores de ART (padronizado pela glicose) em mg/mL (Eq. 4.3):

$$\text{Abs} = 2,32 \cdot [\text{ART}] - 9,90 \times 10^{-3} \quad (R^2 = 0,997) \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação estabelecidos para esta metodologia foram: $3,50 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$ e 3,86%, respectivamente.

4.4.2. Determinação da concentração de glicose:

Para a determinação da concentração de glicose presente nas amostras coletadas utilizou-se o kit enzimático *BioSystem*[®] de acordo com procedimento experimental efetuado por ROSSI *et al.* (2003). O método consiste na análise espectrofotométrica de soluções contendo 10µL de amostra e 1mL do reativo enzimático GOD/POD (glicose-oxidase e peroxidase). A solução é mantida a 37°C, por 10 minutos e, em seguida, mantida em repouso por 60 minutos sendo as absorbâncias lidas em $\lambda = 500\text{nm}$. Estabeleceu-se uma curva de calibração que correlacionasse absorbância com a concentração de glicose entre 0,04 e 0,20 mg/mL utilizando glicose P.A. MERCK[®] como padrão (Eq. 4.4)

$$\text{Abs} = 0,1684 \times [\text{G}] + 0,1523 \quad (r^2 = 0.998) \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Através da análise de cinco amostras da mesma concentração de glicose (0,72 mg/mL) obtiveram-se os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação, respectivamente, 0,1005 mg/mL e 4,49%.

4.4.3. Determinação da concentração de proteínas totais:

A dosagem de proteína foi utilizada para verificar eventuais problemas de rompimento da membrana de ultrafiltração durante os ensaios em biorreator, porque neste evento ter-se-ia a presença de proteína no efluente. Utilizou-se o método da diferença de absorção no UV a 215 e 225 nm (SEGEL, 1979). Estabeleceu-se uma curva de calibração a partir da dosagem da concentração de proteínas totais presentes em amostras contendo entre 10 e 100 µg/mL de albumina bovina SIGMA[®] (A-2153) como padrão. Foram efetuadas leituras diretas de 0,5 mL de amostra a 215 e 225 nm (UV). Através da diferença entre as leituras de absorbância estabeleceram-se os valores de ΔABS . Obteve-se uma curva padrão $\Delta\text{ABS} \times [\text{Prot}]$ como a apresentada na equação 4.5, a seguir:

$$\Delta\text{ABS} = 0,663 \times [\text{Prot}] + 0,0133 \quad (r = 0,996) \quad (\text{Eq. 4.5})$$

Através da análise de cinco amostras da mesma concentração de proteína (50 µg/mL) obtiveram-se os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação, respectivamente, 51 µg/mL e 3,48%.

4.4.4. Determinação da concentração de ácido glicônico:

A concentração de ácido glicônico foi determinada por polarimetria e baseada na teoria descrita por WEST *et al.* (1966), onde uma substância opticamente ativa apresenta uma rotação definida para um dado comprimento de onda e esta rotação será proporcional à concentração da substância opticamente ativa e à espessura da solução através da qual a luz atravessa.

As amostras coletadas a partir dos ensaios em biorreator com membrana foram diluídas e, em seguida, efetuada a análise polarimétrica. O equipamento utilizado foi um polarímetro de bancada marca Optech Modelo PL I. Através da determinação do desvio óptico (α_{obs}) de diferentes combinações de misturas de sacarose, frutose, glicose e ácido glicônico foi possível estabelecer uma tabela que relacionasse a concentração de ácido glicônico presente na amostra ao desvio óptico apresentado pela mesma ao se efetuar a análise polarimétrica (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Valores de $[\alpha]_{obs}$ obtidos para a misturas de sacarose, frutose, glicose e ácido glicônico.

Combinação	m _{Glicose} (g/100 mL)	m _{Frutose} (g/100 mL)	m _{Sacarose} (g/100 mL)	m Ácido Glicônico (g/100 mL)	α_{obs}
1	0	0	2	0	0,80
2	0,5	0,5	1	0	0,20
3	0,25	0,5	1	0,25	0,15
4	0	0,5	1	0,5	0,00
5	1	1	0	0	-0,25
6	0,5	1	0	0,5	-0,55
7	0,25	1	0	0,75	-0,60
8	0	1	0	0	-0,70

4.4.5. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio:

A concentração da água oxigenada foi determinada através do método de leitura da absorção no UV a 240nm (BERGMEYER, 1984). A curva-padrão foi estabelecida para concentrações de H_2O_2 entre 0,006 e 0,6 mg/mL, utilizando-se como padrão uma solução de H_2O_2 10 V (grau farmacêutico). A Figura 4.5 mostra o gráfico correspondente de $\text{Abs}_{240\text{nm}} = f([\text{H}_2\text{O}_2])$.

Figura 4.5: Variação da Absorbância (240nm) em função da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

A leitura das absorbâncias foi efetuada em espectrofotômetro (Beckman DU 640®) resultando em uma equação linear (Eq. 4.6) obtida a partir da curva de calibração:

$$\text{Abs} = 1,21 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] - 7,54 \times 10^{-4} \quad (r = 0,9994) \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação foram, respectivamente, $2,92 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 0,334%.

4.4.6. Determinação da concentração de oxigênio dissolvido:

O oxigênio dissolvido foi medido utilizando-se o oxímetro Digimed (mod. DM-4).

4.4.7. Titulação Complexométrica de íons cálcio (Ca^{++}):

O método de titulação adotado está descrito em (OHLWEILER, 1968). Tal método utiliza como indicador uma mistura de murexide e cloreto de sódio. A titulação foi realizada a partir da diluição 1:100 das amostras para reduzir o consumo de titulante. Coletou-se 40 mL desta amostra diluída e transferiu-se para erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 50 mL de água destilada, 5 mL de hidróxido de sódio 2M (NaOH) e o indicador de murexide resultando em uma tonalidade avermelhada. A amostra foi titulada com solução padrão de EDTA (0,1M) até que se verificasse o ponto de viragem (mudança na coloração de avermelhada para violeta intenso). O cálculo da massa de íons cálcio presentes na amostra é obtido a partir da relação onde 1 mL EDTA (0,1 M) representa 4,008 mg de Ca^{++} .

4.5. Análise dos Resultados

4.5.1. Cálculo das constantes cinéticas das enzimas:

As constantes cinéticas (K_M e $V_{\max}$) de ambas as enzimas foram calculadas através do método gráfico convencional de Lineweaver-Burk.

4.5.2. Cálculo dos parâmetros termodinâmicos:

Os parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) relacionados com a glicose-oxidase foram determinados através das equações 4.7, 4.8 e 4.9 (CASTELLAN, 1986):

$$\Delta G = (R.T/2,303).\text{Log}(v.h/k.T) \quad (\text{Eq. 4.7})$$

$$\Delta H = E_a - R.T \quad (\text{Eq. 4.8})$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (\text{Eq. 4.9})$$

Sendo: v a velocidade da reação enzimática (U/mL), E_a a energia de ativação (J/K.mol), C a constante de Arrhenius ou fator de frequência, R a constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ J/K.mol}$) e T a temperatura absoluta em graus Kelvin (K), h a constante de Planck ($3,978.10^{-32} \text{ J/min}$) e k

constante de Boltzman ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K), ΔG a energia livre de Gibbs, ΔH a entalpia e ΔS a entropia.

4.5.3. Cálculos dos resultados obtidos nos biorreatores:

Para os cálculos foram utilizadas planilhas de cálculos no Microsoft Excel.

4.5.4. Cálculo da concentração de frutose formada:

A partir da determinação analítica de glicose (método Somogyi ou método enzimático), feita em duplicata para cada amostra coletada, era possível calcular uma absorbância média (Abs) e, por meio da curva de calibração, era possível calcular a concentração de açúcares redutores ([AR]) ou de glicose ([G]) formada durante a reação (Eq. 4.10). No caso da amostra ter sido diluída, esse valor era multiplicado por sua respectiva diluição para a obtenção do valor real da concentração.

$$Abs = a \times [ART] + b \quad \text{ou} \quad Abs = a \times [G] + b \quad (\text{Eq. 4.10})$$

Sendo: a = coeficiente angular da curva de calibração, b = coeficiente linear da curva de calibração, Abs = absorbância média, [ART] = concentração de açúcares redutores (mg/mL) e [G] = concentração de glicose (mg/mL).

Lembrando que a hidrólise da sacarose segue a reação:

Desconsiderando a molécula de água envolvida na hidrólise, cada mol de sacarose fornece dois moles de açúcares redutores (mistura equimolar de glicose e frutose) ou 1 mol de glicose. Ao levar-se em conta a molécula de água adicionada, deve-se recalcular esta proporção estequiométrica. Pode-se concluir que a concentração de frutose ([F]) equivale à concentração de glicose ou à metade da concentração de açúcares redutores na amostra multiplicada por um fator ($f = 0,95$), correspondente à molécula de água proveniente da hidrólise (Eq. 4.11).

Logo, tem-se a relação:

$$[F] = [G] = \frac{[ART]}{2} \times 0.95 \quad (\text{Eq. 4.11})$$

Onde:

[F]: concentração de frutose (mg/mL)

[G]: concentração de glicose (mg/mL)

[ART]: concentração de açúcares redutores (mg/mL)

A conversão da unidade de concentração de frutose (de mg/mL para mM) foi feita através da equação 4.12:

$$[F](mM) = \frac{[F](mg/mL) \times 1000}{180} \quad (\text{Eq. 4.12})$$

sendo: [F] corresponde à concentração de frutose produzida.

4.5.5. Cálculo da concentração de sacarose consumida:

A concentração de sacarose consumida corresponde à concentração de frutose ou glicose produzida, de acordo com a estequiometria da reação (Eq.4.13). Ou seja:

$$[S]_{consumida} = [F] = [G] = \frac{[AR]}{2} \times 0.95 \quad (\text{Eq. 4.13})$$

Onde:

[S]_{consumida}: concentração de sacarose consumida na reação (mg/mL).

Portanto a concentração de sacarose na saída do reator equivale à diferença entre a concentração de sacarose na entrada do reator ([S]₀) e a concentração de sacarose consumida ([S]_{consumida}). Ou seja:

$$[S]_{saída} = [S]_0 - [S]_{consumida} \quad (\text{Eq. 4.14})$$

Onde:

[S]₀: concentração inicial de sacarose (mg/mL).

4.5.6. Cálculo do grau de conversão da reação de hidrólise da sacarose:

Calcula-se o grau de Conversão (X) através da equação 4.15:

$$X(\%) = \frac{[S]_{consumida}}{[S]_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.15})$$

Sendo: $[S]_{\text{consumida}}$ a concentração de sacarose consumida na reação e $[S]_0$ a concentração de sacarose na alimentação do reator.

4.5.7. Cálculo da água oxigenada formada, glicose consumida e ácido glicônico formado para ensaios sem adição de catalase:

A partir da determinação analítica da H_2O_2 (método da leitura no UV a 240 nm) feita em duplicata para cada amostra coletada, foi possível calcular uma absorbância média (Abs) e, por meio da curva de calibração (Figura 4.5), a concentração de H_2O_2 formada durante a reação. No caso da amostra ter sido diluída, esse valor foi multiplicado por sua respectiva diluição para a obtenção do valor real da concentração.

Lembrando que a oxidação da glicose segue a reação:

Então, cada mol de glicose fornece um mol de ácido glicônico e 1 mol de H_2O_2 . Logo, tem-se que a concentração de glicose ($[G]$) consumida e a concentração de ácido glicônico ($[AG]$) formado são iguais à da água oxigenada formada ($[H_2O_2]$). Por conseguinte tem-se a Eq. 4.16, a seguir:

$$[H_2O_2] = [G]_{\text{consumida}} = [AG]_{\text{formada}} \quad (\text{Eq. 4.16})$$

A conversão da unidade de concentração de H_2O_2 (de mg/mL para mM) é feita através da equação 4.17:

$$[H_2O_2] \text{ (mM)} = [H_2O_2] \text{ (mg/mL)} \times 29,4 \quad (\text{Eq. 4.17})$$

Quando se introduz a enzima catalase no processo enzimático, a mesma proporção estequiométrica deixa de existir, uma vez que esta enzima será responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio formado, através da seguinte reação:

4.5.8. Cálculo da concentração de glicose na saída do biorreator para ensaios com adição de catalase:

A partir da determinação analítica (método da glicoseoxidase-enzimático) ou polarimétrica da mistura coletada do reator, feita em duplicata para cada amostra, é possível calcular uma absorbância média (Abs) ou o desvio polarimétrico (α) e, por meio das curvas de calibração destes métodos, obter a concentração de glicose ([G]) residual e concentração de ácido glicônico ([AG]) após a reação de oxidação no interior do biorreator (Eq. 4.18). No caso da amostra ter sido diluída, esse valor era multiplicado por sua respectiva diluição para a obtenção do valor real da concentração.

$$Abs = a \times [G] + b \quad (\text{Eq. 4.18})$$

Sendo: a = coeficiente angular da curva de calibração, b = coeficiente linear da curva de calibração, Abs = absorbância média e [G] = concentração de glicose (mg/mL).

A conversão da unidade de concentração de glicose (de mg/mL para mM) foi feita através da equação 4.19:

$$[G]_{\text{Saída}}(\text{mM}) = \frac{[G]_{\text{Saída}}(\text{mg/mL}) * 1000}{180} \quad (\text{Eq. 4.19})$$

Sendo: $[G]_{\text{Saída}}$ corresponde à concentração de glicose contida nas amostras coletadas na saída do biorreator.

4.5.9. Cálculo do ácido glicônico formado para ensaios com adição de catalase:

Lembrando que a oxidação da glicose segue a reação:

Então, cada mol de glicose fornece 1 mol de ácido glicônico (AG) e mais 1 mol de água oxigenada (H_2O_2).

Logo, tem-se a relação demonstrada pela Eq. 4.20:

$$[AG] = [G]_{consumida} \quad (\text{Eq. 4.20})$$

Por sua vez, a glicose consumida será obtida através da relação entre a quantidade de glicose inicial e a quantidade de glicose contida nas amostras (Eq. 4.21), aqui chamada de glicose na saída do biorreator:

$$[AG] = [G]_{consumida} = [G]_{Inicial} - [G]_{Saída} \quad (\text{Eq. 4.21})$$

4.5.10. Cálculo da quantidade de peróxido de hidrogênio residual (H_2O_2) para ensaios com adição de catalase:

A partir da determinação analítica da H_2O_2 (método da leitura no UV a 240 nm) feita em duplicata para cada amostra coletada, foi possível calcular uma absorbância média (Abs) e, por meio da curva de calibração (Figura 4.5), foi possível calcular a concentração de H_2O_2 residual presente na saída do reator.

4.5.11. Cálculo do grau de conversão da reação de oxidação da glicose (Y) para ensaios com adição de catalase:

Calcula-se o grau de conversão (Y) através da equação 4.22:

$$Y (\%) = ([G]_{consumida} / [G]_{Inicial}) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 4.22})$$

Sendo: $[G]_{consumida}$ a concentração de glicose consumida na reação e $[G]_{Inicial}$ a concentração de glicose na alimentação do reator.

4.5.12. Cálculo da velocidade específica de reação ou produtividade para a glicose-oxidase:

A taxa ou velocidade específica de reação (r) equivale à quantidade de produto formado produzida por unidade enzimática e por tempo. A unidade a ser utilizada para a taxa de específica de reação é (mmol_{produto}/h.U_{enzima}). Calcula-se de acordo com a equação 4.23:

$$r = (\phi \times 60 \times [\text{produto}]) / 1000 \times U_{enzima} \quad (\text{Eq. 4.23})$$

sendo: [produto] a concentração de ácido glicônico ou frutose formada na

reação, Q a vazão volumétrica na saída do reator (mL/min) e UE a unidade enzimática (glicose-oxidase ou invertase) adicionada no reator.

As velocidades específicas de reação (r) apresentadas em Resultados e Discussão foram calculadas levando-se em conta uma vazão constante e igual à média experimental.

4.5.13. Cálculo da velocidade específica de reação ou produtividade para a catalase:

A taxa ou velocidade específica de reação (r) equivale à quantidade de produto formado produzida por unidade enzimática e por tempo. A unidade a ser utilizada para a taxa de específica de reação é (mmol_{produto}/h.UE_{enzima}). Calcula-se de acordo com a equação 4.24:

$$r = (\phi \times 60 \times [\text{produto}]) / 1000 \times \text{UE} \quad (\text{Eq. 4.24})$$

Sendo: [produto] a concentração de peróxido de hidrogênio consumido na reação, Q a vazão volumétrica na saída do reator (mL/min) e UE_{enzima} a unidade enzimática (catalase) adicionada no reator.

Onde: [produto] = [H₂O₂]_{consumido} = [AG] – [H₂O₂]_{residual} (Eq. 4.25)

[H₂O₂]_{consumido}: concentração de peróxido consumido (mmol/L)

[AG]: concentração de ácido glicônico na saída do reator (mmol/L)

[H₂O₂]_{residual}: concentração de peróxido residual na saída do reator (mmol/L).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Hidrólise da Sacarose em Reator com Membrana:

Definiram-se as condições operacionais (vazão específica, temperatura, pH, concentração de sacarose e concentração de oxigênio dissolvido), parâmetros cinéticos e parâmetros termodinâmicos do processo enzimático de hidrólise da sacarose empregando a enzima comercial *Bioinvert*[®].

5.1.1. Efeito das condições operacionais:

As condições operacionais para a etapa de hidrólise da sacarose foram avaliadas de forma a definirem-se a concentração de enzima ([I]), concentração de sacarose alimentada ([S]) e vazão específica (D) a serem empregadas no biorreator com membrana (RM). Para tanto, efetuaram-se os testes descritos na tabela 5.1:

Tabela 5.1: Testes para definição das condições operacionais de hidrólise da sacarose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima *Bioinvert*[®].

Teste	[S] (mM)	[I] (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
1	100	3,0	1.0	35	5.5	100	24
2	100	3,0	2.0	35	5.5	100	24
3	100	3,0	3.0	35	5.5	100	24
4	100	6,0	1.0	35	5.5	100	24
5	100	6,0	1.5	35	5.5	100	24
6	100	6,0	2.0	35	5.5	100	24
7	100	6,0	3.0	35	5.5	100	24
8	100	12	1.0	35	5.5	100	24
9	100	12	1.5	35	5.5	100	24
10	100	12	2.0	35	5.5	100	24
11	100	24	1.5	35	5.5	100	24
12	100	24	2.0	35	5.5	100	24
13	100	24	3.0	35	5.5	100	24
14	100	3,0	2.0	35	5.5	100	48
15	50	3,0	2.0	35	5.5	100	48
16	25	3,0	2.0	35	5.5	100	48
17	10	3,0	2.0	35	5.5	100	48
18	5	3,0	2.0	35	5.5	100	48

5.1.1.1. Efeito da vazão específica:

O efeito da vazão específica sobre a hidrólise da sacarose em reatores com membrana foi avaliado para o intervalo entre $1,0 \text{ h}^{-1}$ e $3,0 \text{ h}^{-1}$. Mantiveram-se constantes os valores de temperatura (35°C), pH (5,5 – tampão acetato 10 mM) e concentração de sacarose (100 mM).

Ao empregar-se uma vazão específica (D) igual a $1,0 \text{ h}^{-1}$ alcançou-se a conversão completa da sacarose ($X=100\%$) no reator com membrana a partir da concentração de enzima ([I]) igual a $3,0 \text{ U/mL}$. Entretanto, ao empregarem-se concentrações inferiores a $6,0 \text{ U/mL}$ de enzima ocorreu uma queda na conversão (X) após 17 horas de processo. Estes resultados estão expostos na figura 5.1A, onde se nota a sobreposição das curvas de taxa de conversão enzimática (X) ao empregar-se $6,0 \text{ U/mL}$ ($\square$) e 12 U/mL (Δ) de enzima resultando na conversão completa da sacarose em hidrólise e frutose ($X=100\%$).

A figura 5.1B apresenta a variação do logaritmo da velocidade específica de reação (r) durante o processo. De acordo com os perfis gráficos apresentados, afetou-se a estabilidade enzimática ao se empregar concentrações de enzima entre $3,0 \text{ U/mL}$ e $6,0 \text{ U/mL}$.

A figura 5.2A e 5.2B apresentam os resultados referentes a bioconversão utilizando vazão específica (D) de $1,5 \text{ h}^{-1}$. Diante deste valor de D, as concentrações de enzima avaliadas mantiveram o regime permanente durante todo o tempo de ensaio, não ocorrendo perda da estabilidade enzimática, como ocorrido para vazão específica de $1,0 \text{ h}^{-1}$. Entretanto, se apresentou pela primeira vez uma queda na taxa de conversão enzimática (X) estabelecida no regime permanente.

A redução do tempo de residência em 20 minutos reduziu a taxa de conversão para 95% ao se empregar $6,0 \text{ U/mL}$ de *Bioinvert*[®]. Este resultado pode indicar que o tempo de contato entre a enzima e o substrato (sacarose) deixou de ser suficiente para o estabelecimento da conversão completa.

(A)

(B)

Figura 5.1: Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade específica de reação r (Fig. B) para os testes variando a concentração de enzima em 3,0 U/mL ($\diamond$), 4,5 U/mL ($\circ$), 6,0 U/mL ($\square$) e 12 U/mL (Δ) e sob as condições: $[S]=100$ mM, $D = 1,0 \text{ h}^{-1}$, $Q = 30 \text{ mL/h}$ e pH 5,5.

(A)

(B)

Figura 5.2: Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r_i (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em 6,0 U/mL (Δ), 12 U/mL ($\diamond$) e 24 U/mL ($\circ$) e sob as condições: $[S]=100$ mM, $D = 1,5$ h⁻¹, $Q = 15$ mL/h e pH 5,5.

As figuras 5.3 e 5.4 apresentam os resultados ao se empregarem, respectivamente, valores de D iguais a $2,0 \text{ h}^{-1}$ e $3,0 \text{ h}^{-1}$. Diante deste intervalo de D a hidrólise completa da sacarose só ocorreu diante da adição de 20 U/mL de invertase, ocorrendo perda da estabilidade enzimática durante o tempo de processo para concentrações enzimáticas inferiores.

(A)

(B)

Figura 5.3: Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em $3,0 \text{ U/mL}$ ($\diamond$), $6,0 \text{ U/mL}$ ($\square$), 12 U/mL ($\triangle$) e 24 U/mL ($\circ$) e sob as condições: $[S]=100 \text{ mM}$, $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$, $Q = 20 \text{ mL/h}$ e $\text{pH } 5,5$.

(A)

(B)

Figura 5.4. Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em 3,0 EU/mL (Δ), 6,0 EU/mL ($\square$) e 20,0 EU/mL ($\circ$) e sob as condições: $[S]=100$ mM, $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$, $Q = 30 \text{ mL/h}$ e pH 5,5.

De acordo com os resultados apresentados, a vazão específica interfere diretamente no grau de conversão obtido. Assim, as melhores condições de vazão específica e concentração de invertase deverão estabelecer uma taxa de conversão adequada através do ajuste no tempo de residência do substrato no interior do reator.

5.1.1.2. Efeito da concentração de invertase:

O efeito da concentração de invertase sobre a hidrólise da sacarose em reatores com membrana foi avaliado para 6,0 U/mL e 24 U/mL. Mantiveram-se constantes os valores de temperatura (35°C), pH (5,5 – tampão acetato 10 mM) e concentração de sacarose (100 mM).

A figura 5.5 apresenta os resultados da hidrólise da sacarose empregando 6,0 U/mL de invertase sob diferentes vazões específicas (D). Observou-se taxa de conversão (X) de 100% para a hidrólise da sacarose ao se adotar valores de D igual ou inferior a 1,5 h⁻¹. Entretanto, para valores de D superiores a 1,5 h⁻¹ o regime permanente foi desfeito após certo intervalo de tempo. Assim, para D igual a 2,0 h⁻¹, o tempo de regime permanente se reduziu para apenas 13 horas e chegando a 3 horas quando empregando D igual a 3,0 h⁻¹.

Ao quadruplicar-se a concentração de enzima presente no reator com membrana ([I] = 24 U/mL) observa-se a manutenção do regime permanente durante todo o tempo de processo e independente da vazão específica utilizada indicando estar a mesma em excesso, reduzindo assim os efeitos observados nos estudos anteriores (Figura 5.6).

Estes resultados comprovam a importância do ajuste da concentração de enzima e da vazão específica para estabelecer um processo de conversão enzimática contínuo. Notadamente, para o caso da invertase comercial *Bioinvert*[®], ocorreram quedas na atividade enzimática diante de determinadas condições de processo. A hipótese que pode ser levantada, para tais resultados, envolve a composição estrutural da molécula de invertase, cujas macromoléculas podem se associar formando estruturas moleculares maiores e de maior poder catalítico.

(A)

(B)

Figura 5.5: Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em $1,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ), $1,5 \text{ h}^{-1}$ ($\diamond$), $2,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ ($\circ$) e sob as condições: $[S]=100 \text{ mM}$, $[I]=6,0 \text{ U/mL}$, $T=35^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 5,5$.

(A)

(B)

Figura 5.6: Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de enzima em $3,0 \text{ h}^{-1}$ ($\diamond$), $2,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$) e $1,5 \text{ h}^{-1}$ ($\circ$) e sob as condições: $[S]=100 \text{ mM}$, $[I]=24 \text{ U/mL}$, $T=35^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 5,5$.

De acordo com REDDY *et al* (1992), a atividade catalítica da invertase aumenta quando as macromoléculas da enzima se associam formando tetrâmeros, hexâmeros e octâmeros. Além disso, ESMON *et al.* (1987) comentam sobre a influência do PEG (polietilenoglicol) sobre o equilíbrio oligomérico da invertase. Segundo os autores, a adição de PEG promove a associação das subunidades de invertase externas, o que significa um deslocamento no sentido da formação de formas tetrâmeras, hexâmeras e octâmeras, de maior atividade enzimática.

De acordo com a DELTAGEN Pty Ltda., comercializadora da *Bionvert*[®], a solução enzimática empregada apresenta estabilizantes na sua composição. Sendo o PEG empregado como estabilizante em diversos produtos de origem alimentícia é possível que este esteja presente na solução de enzima comercializada. A presença de maior quantidade de PEG, juntamente com a enzima, no seio do reator, implicaria num favorecimento da manutenção da enzima em sua forma de maior atividade enzimática.

Ao reduzir-se a concentração de enzima, se estará acrescentando menos PEG ao sistema reacional e, com isso, o sistema pode tender à formação de monômeros, de atividade enzimática bem mais reduzida em relação às demais formas oligoméricas.

A redução da atividade enzimática no processo contínuo pode ser proveniente, portanto, da desagregação das macromoléculas, gerando formas oligoméricas de menor atividade enzimática (monômeros e dímeros) e que, inicialmente, estariam associadas nas formas de maior atividade (tetrâmeros, hexâmeros e octâmeros). Tem-se, portanto, que fatores como a concentração de estabilizantes (PEG) e efeitos reológicos decorrentes da vazão aplicada irão colaborar para a dissociação das cadeias polipeptídicas (macromoléculas) impedindo a manutenção do regime permanente obtido no início do processo.

Como descrito por REDDY *et al* (1990), o aumento da temperatura também afeta o equilíbrio das formas oligoméricas da invertase. Com isso, pode-se criar uma situação de quebra das ligações químicas entre as subunidades das formas oligoméricas após um tempo de exposição de 17

horas à temperatura de 35°C. A presença de maior concentração de PEG juntamente com a enzima aumentaria a estabilidade das formas oligoméricas de maior atividade enzimática frente à temperatura de 35°C.

Quando comparam-se os resultados de conversão enzimática (X) e taxa específica de reação (r) para as diferentes concentrações de enzima e vazões específicas avaliadas é possível observar uma variação entre a queda observada para a conversão enzimática (X) e a queda observada para a velocidade específica de reação (r) (r diminui mais acentuadamente que X), considerando o estado de agregação das moléculas de invertase. Lembra-se que a sacarose é hidrolisada por qualquer um dos agregados de invertase (inclusive na forma de dímero) e, por isso, a conversão pode diminuir menos do que a taxa de reação (r) que, estaria na dependência das quantidades relativas dos agregados presentes no meio reacional.

Para que a vazão não interfira no equilíbrio oligomérico da *Bioinvert*®, deslocando o mesmo para a predominância nas formas de monômeros e dímeros mostra-se necessário aumentar a concentração de enzima no interior de reator. Portanto, o aumento da vazão específica (D) implica no aumento da quantidade de enzima necessária para a hidrólise de forma a evitar a quebra do regime permanente

Sugere-se que ao aumentar a quantidade de enzima, o equilíbrio entre as formas agregadas tende a se deslocar no sentido de formar octômeros, alcançando-se uma maior atividade hidrolítica. Assim sendo, quando se varia o D, o equilíbrio dos agregados seria o fator principal para a queda na conversão enzimática em um processo contínuo.

Para comprovar a influência sugerida efetuou-se um teste utilizando a concentração de 6,0 U/mL de *Bioinvert*® sob duas vazões específicas (2,0 e 1,0 h⁻¹) distintas. A figura 5.7 apresenta os resultados do experimento mantendo vazão específica constante em 2,0 h⁻¹ durante as primeiras 27 horas e, seguindo-se a uma redução 1,0 h⁻¹.

Sabe-se, de acordo com a figura 5.2, que para a concentração de enzima de 6,0 U/mL e sob vazão específica de 1,0 h⁻¹ a conversão alcançada deveria ser de 100%. Porém, ao analisar-se a figura 5.8, ao

reduzir-se a vazão específica para $1,0 \text{ h}^{-1}$, a conversão deixou de ser completa para esta condição operacional. Tal comportamento reforça a sugestão de que a queda na atividade enzimática e, conseqüentemente, na conversão estaria relacionado com o equilíbrio oligomérico da invertase, que será afetado pelas condições operacionais no reator, no caso, a vazão específica (D).

Figura 5.7: Perfil do grau de conversão X no ensaio de verificação da perda de atividade enzimática nas vazões específicas de $2,0 \text{ h}^{-1}$ (◇) e $1,0 \text{ h}^{-1}$ (■) e sob as condições: $[S]=100 \text{ mM}$, $[I] = 6,0 \text{ U/mL}$ e pH 5,5.

5.1.1.3. Efeito da concentração de substrato ([S]):

Os efeitos da concentração de substrato (S) sobre a hidrólise da sacarose foram analisados através de experimentos em diferentes concentrações (5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM) conforme indicado pelos testes 14 a 18 e sob as condições descritas na tabela 5.1 (p. 60). A faixa de concentração avaliada refere-se às concentrações de substrato utilizadas em trabalhos anteriores para a oxidação da glicose utilizando a enzima glicose-oxidase (NAKAO *et al*, 1997; DONEVA *et al*, 1999; BAO *et al*, 2000; BAO *et al*, 2001a; BAO *et al*, 2001b; LIU *et al*, 2004). Sendo a oxidação da glicose a segunda etapa para o processo mostra-se interessante avaliar a concentração de sacarose no primeiro reator já dentro da faixa de concentração de glicose (produto do primeiro reator) que se trabalhará no segundo reator.

De acordo com a figura 5.8, a concentração de substrato mostra ser outro parâmetro interferente sobre a atividade enzimática. Assim, para a faixa de concentração até 50 mM de sacarose o aumento da concentração de substrato reduz o tempo de regime permanente (48 horas para 5 mM e de 12 horas para 50 mM). Entretanto, para a faixa entre 50 mM e 100 mM, aparentemente, ocorre uma inversão desta condição, onde o tempo de regime permanente aumenta com o aumento da concentração de substrato, atingindo 40 horas para a concentração de 100 mM.

Como justificativa para essa variação no tempo de regime permanente e, conseqüentemente, na manutenção da atividade enzimática, tem-se que o equilíbrio oligomérico pode ser afetado pela concentração de substrato. Assim, ocorreria deslocamento no sentido da dissociação das cadeias polipeptídicas ao empregarem-se baixas concentrações de sacarose (2,5 mM a 50 mM). Entretanto, concentrações de sacarose superiores a 50 mM estabilizariam este equilíbrio oligomérico, deixando de existir tal interferência sobre a atividade enzimática no reator com membrana.

(A)

(B)

Figura 5.8: Perfil do grau de conversão X (Fig. A) e do logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) para os ensaios variando a concentração de sacarose em 5,0 mM (*), 10 mM (Δ), 25 mM ($\blacktriangle$), 50 mM ($\blacksquare$) e 100 mM ($\blacklozenge$) sob as condições: $[S]=100$ mM, $[I]=6,0$ U/mL, $T=35^{\circ}\text{C}$ e pH 5,5.

5.1.1.4. Estudo da estabilidade enzimática frente à temperatura:

A estabilidade enzimática frente à temperatura pode ser avaliada em função da manutenção de sua atividade catalítica. Portanto, quando tal atividade sofre uma redução diante de alterações na temperatura de reação temos uma inativação térmica. A cinética da desativação térmica pode ser expressa como um processo irreversível de primeira ordem, conforme indicado na Eq. 5.1:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_d \times [E] \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Onde:

K_d : constante de inativação térmica.

$[E]$: concentração de enzima ativa durante o tempo de processo.

$[E_0]$: concentração inicial de enzima ativa.

Para $t = 0$, tem-se que $[E] = [E_0]$ e sendo K_d função da temperatura do sistema, a equação pode ser arranjada como indicado em Eq. 5.2:

$$k_d = A_d \times e^{\frac{-E_d}{R \times T}} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Pode-se escrever a equação cinética integrada como indicado em Eq. 5.3:

$$[E] = [E_0] \times e^{-k_d \times t} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

Onde:

$[E_0]$: concentração inicial de enzima ativa

k_d : constante de desnaturação

Através da cinética de Michaelis-Menten sabe-se que a velocidade de reação é dada pela equação 5.4:

$$v = \frac{k_3 \times [E] \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 5.4})$$

Para condições de saturação:

$$[S] \gg K_m$$

e,

$$v = k_3 \times [E] \quad (\text{Eq. 5.5})$$

Em condições de saturação e sob uma temperatura constante, k_3 não sofre alteração e, portanto, a velocidade de reação será diretamente proporcional à concentração de enzima ativa instantânea. Assim, a obtenção de uma curva semi log (v) Vs. t indica o valor do k_d para a temperatura estudada. Para se efetuar este estudo, foi necessário a execução de ensaios preliminares visando ajustar as condições de concentração de enzima e conversão enzimática resultante. A partir do valor de k_d é possível se obter o parâmetro tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$) como descrito na equação 5.6 a seguir:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \text{ (Eq. 5.6)}$$

Para diversas enzimas, a velocidade de desativação depende não só da temperatura, mas também da concentração de substrato e de enzima presentes. A presença de uma concentração de substrato e enzima elevados pode reduzir drasticamente a taxa de desativação da enzima e, conseqüentemente, provoca um aumento no tempo de meia vida (GALLIFUOCO *et al*, 1999). Tem-se que, em um reator enzimático com membranas operando em CSTR, é possível se manter as condições operacionais necessárias para que os efeitos de substrato e enzima sejam minimizados e se obtenha uma avaliação adequada da estabilidade enzimática. Para que as equações estabelecidas para a desativação térmica sejam válidas é necessário manter-se uma condição de reator diferencial ($[S] = [S_0]$ sendo $[S] \gg K_m$).

TOMOTANI (2002) efetuou ensaios de hidrólise da sacarose em regime descontínuo utilizando *Bioinvert*[®] e concluiu que a enzima mantinha-se estável na faixa de temperatura entre 30°C e 50°C, tendo em 55°C a temperatura de maior atividade enzimática. Entretanto, ao se operar um processo contínuo se faz necessário o estudo da estabilidade da enzima neste regime de forma a otimizar-se a temperatura de reação e avaliar-se a estabilidade enzimática no decorrer do processo.

Efetuaram-se sete testes para ajustar as condições operacionais para o estudo da estabilidade da *Bioinvert*^(R) no reator enzimático com membrana. Optou-se por uma concentração de sacarose de 100 mM para mantermos

uma condição de $[S] \gg K_m$, uma vez que segundo TOMOTANI (2002) o valor da constante K_m seria de 40 mM para a reação com *Bioinvert*[®] em operação descontínua.

Tabela 5.2. Ensaios preliminares de ajuste das condições operacionais dos ensaios para estudo da estabilidade frente a temperatura da hidrólise da sacarose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima *Bioinvert*[®].

Teste	[S] (mM)	[I] (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
A1	100	6,13	0,8	30	5,5	100	24
A2	100	0,0000613	0,8	30	5,5	100	24
A3	100	0,0000613	1,6	30	5,5	100	24
A4	100	0,000123	3,2	30	5,5	100	24
A5	100	0,000123	0,8	30	5,5	100	24
A6	100	0,15	0,5	30	5,5	100	24
A7	100	0,15	1,0	30	5,5	100	24

A partir do ajuste das condições experimentais foram efetuados experimentos visando avaliar a estabilidade frente à temperatura para a hidrólise da sacarose em biorreator com membrana.

Tabela 5.3. Ensaios para o estudo da estabilidade frente à temperatura da hidrólise da sacarose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima *Bioinvert*[®].

Teste	[S] (mM)	[I] (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	Agitação (rpm)	T _{ensaio} (h)
T1	100	0,15	3,0	30	5,5	100	48
T2	100	0,15	3,0	35	5,5	100	48
T3	100	0,15	3,0	40	5,5	100	48
T4	100	0,15	3,0	50	5,5	100	48

Tabela 5.4: Resultados obtidos para os testes de ajuste da conversão da sacarose. Descrição da concentração de sacarose ([S]), concentração de *Bioinvert*[®] ([I]), velocidade específica (D) e conversão média (X).

Ensaio	[S] (mM)	[I] (U/mL)	D (h ⁻¹)	X (%)
A1	100	6,13	0,8	96,4
A2	100	0,0000613	0,8	2,7
A3	100	0,0000613	1,6	1,3
A4	100	0,000123	3,2	0,9
A5	100	0,000123	0,8	6,6
A6	100	0,15	0,5	3,9
A7	100	0,15	2,0	2,2

As temperaturas (30°C, 35°C, 40°C e 50°C) foram variadas em testes sob as seguintes condições:

- Concentração de substrato [S]: 100 mM
- Concentração de enzima [I]: 0,15 U/mL
- Vazão Específica (D): 2,0 h⁻¹
- pH: 5,5 (Tampão Acetato 10 mM)

Figura 5.9: Perfil do logaritmo da velocidade de reação r em função do tempo para o ensaio a 30°C na hidrólise da sacarose.

A equação exponencial obtida no gráfico Log (r) Vs t para 30°C foi:

$$\text{Log}(r) = 0,0046 \times e^{-0,0109 \times t} \quad (\text{Eq. 5.7})$$

O valor de k_d para 30°C foi 0,0109 h⁻¹ e o $\tau_{1/2}$ igual a 63,6 horas.

Figura 5.10: Perfil do logaritmo da velocidade de reação r para o ensaio a 35°C na hidrólise da sacarose.

A equação exponencial obtida no gráfico $\text{Log}(r)$ Vs t para $T = 35^\circ\text{C}$ foi:

$$\text{Log}(r) = 0,0083 \times e^{-0,0113 \times t} \quad (\text{Eq. 5.8})$$

O valor de k_d para 35°C foi de $0,0113 \text{ h}^{-1}$ e $\tau_{1/2}$ igual a 61,4 horas.

Figura 5.11: Perfil do logaritmo da velocidade de reação r para o ensaio a 40°C na hidrólise da sacarose.

A equação exponencial obtida no gráfico $\text{Log}(r)$ Vs t para $T = 40^\circ\text{C}$ foi:

$$\text{Log}(r) = 0,0055 \times e^{-0,0135 \times t} \quad (\text{Eq. 5.9})$$

O valor de k_d para 40°C foi de $0,0135 \text{ h}^{-1}$ e $\tau_{1/2}$ igual a 51,3 horas.

Figura 5.12: Logaritmo da velocidade de reação r para o ensaio a 50°C na hidrólise da sacarose.

A equação exponencial obtida no gráfico Log (r) Vs t para $T = 50^\circ\text{C}$ foi:

$$\text{Log}(r) = 0,1233 \times e^{-0,0782 \times t} \quad (\text{Eq. 5.10})$$

O valor de k_d para 50°C foi de $0,0782 \text{ h}^{-1}$ e $\tau_{1/2}$ igual a 8,86 horas.

Observa-se que até 35°C a temperatura não interfere na estabilidade da enzima, uma vez que os valores de k_d e $\tau_{1/2}$ foram bastante próximos. Assim, pode-se considerar a temperatura de 35°C como a melhor para a hidrólise da sacarose no reator com membrana e em sistema contínuo.

Seguiu-se o estudo com a análise da variação da constante de inativação térmica. A constante de inativação térmica (k_d) Vs T ($^\circ\text{C}$) define o trecho de estabilidade para o processo, melhor visualizada pela figura 5.13.

De acordo com o gráfico apresentando na figura 5.13, a enzima mantém-se estável até, aproximadamente, 35°C e a partir desta temperatura começa a perder estabilidade.

Figura 5.13: Constante de inativação térmica (k_d) como função da temperatura (T) durante o regime permanente para os ensaios variando a temperatura na hidrólise da sacarose.

5.1.2. Determinação dos parâmetros cinéticos:

Os parâmetros cinéticos foram calculados a partir do método de *Lineweaver-Burk*. Os parâmetros cinéticos K_m (constante de Michaelis-Mentem) e V_{max} (velocidade enzimática máxima) foram obtidos a partir do cálculo das velocidades de reação (v) resultantes de testes utilizando 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM de sacarose. Os testes tiveram duração de 48 horas e, com os resultados, fez-se o gráfico (v^{-1}) Vs. $[S]^{-1}$, sendo as constantes cinéticas K_m e V_{max} calculadas utilizando o método de *Lineweaver-Burk*. A partir da determinação das constantes cinéticas, estabeleceu-se a equação do processo para o primeiro reator, responsável pela hidrólise da sacarose, através da equação 5.11:

$$\frac{V_{max}}{\phi} = X \times S_0 + K_m \times \frac{X}{(1-X)} \quad (\text{Eq. 5.11})$$

Onde:

V_{max} : Velocidade máxima de reação (mmol/h)

ϕ : Vazão (L/h)

X : Grau de conversão para a oxidação enzimática (%)

S_0 : Concentração inicial de glicose (mmol/L)

K_m : Constante de *Michaelis - Mentem* (mmol/L)

Figura 5.14: Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk para o cálculo das constantes cinéticas da

Bioinvert^(R) presente em um reator com membrana CSTR e sob as condições: $[I] = 6,0 \text{ U/mL}$, $D = 1,5 \text{ h}^{-1}$, $T = 35^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 5,5$.

Os parâmetros foram obtidos a partir do cálculo do coeficiente angular da equação de reta obtida ao se estabelecer um gráfico $(1/v) = f(1/[S])$, conforme indicado na Figura 5.14. Ao definir-se a equação de reta correspondente (Eq. 5.11) foi possível definir os parâmetros cinéticos relacionados a este processo enzimático contínuo (Tabela 5.3):

$$\frac{1}{v} = 57,465 \times \left(\frac{1}{S} \right) + 1,0314 \quad (r^2 : 0,947) \quad (\text{Eq. 5.12})$$

Tabela 5.5: Parâmetros cinéticos obtidos para a *Bioinvert*[®] quando utilizada em processo contínuo (CSTR) em reator com membrana.

$K_{m_{ap}} \text{ (mM)}$	55,7
$v_{max} \text{ (mmol/h)}$	0,97

A equação de processo para a hidrólise da sacarose no primeiro reator ficou sendo:

$$\frac{0,97}{\phi} = X \times S_0 + 55,7 \times \frac{X}{(1-X)} \quad (\text{Eq. 5.13})$$

5.1.3. Determinação dos parâmetros termodinâmicos:

Partindo-se da equação de Arrhenius obtida pelo gráfico relacionando $\text{Log } K_d = f(T)$ é possível se determinar a energia de ativação do sistema enzimático utilizando a invertase em processo contínuo:

$$\text{Log } k_d = \text{Log } A_d + \left(\frac{-E_a}{R} \right) \times \frac{1}{T} \quad (\text{Eq. 5.14})$$

Através da figura 5.15 obtida a partir da análise da equação 5.14 temos que a equação da reta obtida será:

$$\text{Ln}(K_d) = -2632,1 \times \left(\frac{1}{T} \right) + 4,0358 \quad (\text{Eq. 5.15})$$

Sendo:

$$\frac{-E_a}{R} = -2632,1 \quad (\text{Eq. 5.16})$$

Para R (constante universal dos gases) igual a 8,31 [J/mol.K] ou 1,987 [cal/mol.K] mostra-se possível calcular o valor de E_a .

Figura 5.15: Logaritmo da constante de inativação (k_d) em função do inverso da temperatura de processo ($1/T$). Estudo da energia de ativação térmica para os ensaios de hidrólise de sacarose.

A partir da determinação de E_d é possível determinar os valores dos parâmetros termodinâmicos relacionados com a inativação térmica à temperatura de 308 K (35°C). Segundo TOMOTANI (2002) a energia de

ativação (E_a) obtida para a *Bioinvert*[®] em catálise descontínua ficou em 37,3 kJ/mol.K, valor 40% superior ao obtido para a mesma enzima quando mantida na catálise contínua em reator com membrana. Obtiveram-se os seguintes resultados: $\Delta G' = -15,88$ kJ/mol, $\Delta H' = 19,11$ kJ/mol e $\Delta S' = 0,107$ kJ/mol.K.

Tabela 5.6: Dados da velocidade específica de reação inicial (r_0), constante de inativação térmica (k_d) e da energia de ativação térmica (E_a) para a *Bioinvert*^(R) em ensaios de hidrólise da sacarose.

T (K)	1/T (K ⁻¹)	r_0 (mmol/h.mg)	K_d	Ln K_d	E_a (kJ/mol.K)
306	0,00327	0,0038	0,0109	-4,5190	21,9
311	0,00322	0,0075	0,0113	-4,4830	E_a (kcal/mol.K)
316	0,00316	0,0052	0,0135	-4,3051	5,23
326	0,00307	0,0133	0,0180	-4,0174	

A análise dos aspectos termodinâmicos e cinéticos da hidrólise da sacarose no reator com membrana utilizando a invertase solúvel se faz necessária por se tratarem dos dois pontos fundamentais da teoria de reações, notadamente, das enzimáticas. A termodinâmica nos indica quão longe pode chegar a reação, uma vez que esta está limitada pelo chamado equilíbrio termodinâmico.

As propriedades termodinâmicas são relacionadas através da constante de equilíbrio (k) e, para reações endotérmicas, como neste caso, esta constante aumenta de valor com o aumento da temperatura de processo. Como no caso da hidrólise da sacarose o valor de $\Delta G'$ é negativo, teremos uma constante de equilíbrio também com valor elevado e, com isso, a hidrólise enzimática é considerada uma reação irreversível.

Todos os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para o processo contínuo foram inferiores aos valores obtidos por TOMOTANI (2002) em processo descontínuo.

Segundo OWUSU *et al.* (1992) valores de $\Delta H'$ entre 200 e 300 kJ/mol causam desnaturação da enzima devido a desarranjos na estrutura terciária e quaternária, porém, observa-se que para a hidrólise da sacarose em processo contínuo no reator com membrana isso não deverá ocorrer, uma vez que estamos com valor bem abaixo desta faixa. Tem-se, portanto, que a provável causa da desnaturação enzimática nesta temperatura não estará relacionada apenas com a desnaturação parcial da macromolécula, mas em maior escala pela dissociação dos arranjos oligoméricos.

5.2. Oxidação da Glicose em Reator com Membrana:

Definiram-se as condições operacionais (concentração de glicose oxidase (GO), catalase (C), vazão específica (D), oxigênio dissolvido ($[O_2]$) e concentração de glicose (G)), parâmetros cinéticos e parâmetros termodinâmicos do processo enzimático de oxidação da glicose empregando um complexo enzimático GO-catalase.

O mecanismo de ação enzimática da glicose-oxidase já é conhecido desde a década de sessenta. Os estudos cinéticos apresentados por BRIGHT & GIBSON (1966) mostraram-se satisfatórios a um acomodamento no seguinte mecanismo:

Onde P_1 seria D-glucono- δ -lactona e o P_2 o peróxido de hidrogênio formado. O termo G seria a D-glicose. NAKAMURA & OGURA (1967) também estudaram a cinética da glicose-oxidase e propuseram que a dissociação da glicono-lactona precede a reação entre a forma reduzida da enzima e o oxigênio. Além disso, foi observada a não existência de complexo enzima-substrato quando a enzima encontra-se na forma reduzida ou formação de complexos ternários do tipo enzima-substrato-oxigênio. Considera-se como etapa mais lenta no mecanismo da reação a etapa de redução do FAD (presente na estrutura molecular da enzima) causado pela formação do complexo enzima-substrato e que, por consequência, formará o produto ligado à enzima (complexo enzima-produto) sob ação da constante de velocidade k_2 . Apesar da existência de uma reação de equilíbrio, sabe-se que a constante k_{-1} seria de um valor muito pequeno e em uma situação onde $k_2 \gg k_1$, o deslocamento seria sempre no sentido da formação do complexo enzima-substrato. Para concluir este apanhado geral sobre o mecanismo da enzima utilizada no processo, temos que NAKAMURA & OGURA (1967) identificaram a não influência da concentração da glicose

sobre a reação da enzima reduzida com o oxigênio molecular (k_4), desde que o gás esteja na concentração de saturação.

Uma vez que a concentração de glicose não influencia na velocidade de reação, pode-se concluir que não deverá ocorrer inibição por substrato na oxidação enzimática da glicose. A concentração do substrato, portanto, não interferiria no resultado final da conversão, como em outros casos de conversão enzimática. Entretanto, a mesma situação não se repete para a etapa inicial de hidrólise da sacarose. Para a invertase, conforme preconizado por TREVISAN (1993), sabe-se que a velocidade de reação diminui frente à concentração de sacarose superior a 120 g/L, aproximadamente, 330 mM. Levando em conta esta limitação ao processo, optou-se por buscar uma otimização dentro da faixa não-limitante para as duas etapas de conversão.

TOMOTANI *et al.* (2005) efetuaram um estudo preliminar da oxidação da glicose utilizando a enzima glicose-oxidase. Para tanto, o efeito da vazão específica (D), concentração de glicose (G) e concentração de glicose-oxidase (GO) foram avaliados em experimentos realizados em reator com membrana (MBR) *Bioengineering*[®]. Atingiu-se uma conversão enzimática de 75% ao se utilizar 1,0 mg/mL de GO convertendo 2,5 mM de glicose em um processo contínuo CSTR utilizando D igual a 0,15 min⁻¹. Partindo de tais resultados preliminares, optou-se por iniciar o estudo da oxidação da glicose utilizando as mesmas condições estabelecidas no artigo.

5.2.1. Efeito das condições operacionais:

As condições operacionais para a etapa de oxidação da glicose foram avaliadas de forma a definirem-se a concentração de enzimas (GO e C), concentração de glicose e oxigênio alimentados (G e O₂) e vazão específica (D) a serem empregadas no biorreator com membrana (RM). Para tanto, efetuaram-se os testes descritos na tabela 5.7:

5.2.1.1. Efeito da concentração de oxigênio dissolvido:

O efeito da concentração de oxigênio sobre a oxidação da glicose em reatores com membrana foi avaliado para o intervalo de D entre 1,0 h⁻¹ e 6,0 h⁻¹ através de testes sem adição de O₂ (5,0 mg/L) e saturando em O₂ (8,0 mg/L). Mantiveram-se constantes os valores de temperatura (30°C), pH (5,5 – tampão acetato 10 mM), concentração de GO (10 U/mL) e concentração de sacarose (100 mM).

Tabela 5.7: Testes variando a concentração de oxigênio dissolvido das condições operacionais de oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose-oxidase *Sigmat*[®].

Ensaio	G (mM)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	[O ₂] (mg/L)	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
1	2,5	10	-	1,0	30	5,5	6,0	100	24
2	2,5	10	-	3,0	30	5,5	6,0	100	24
3	2,5	10	-	6,0	30	5,5	6,0	100	24
4	2,5	10	-	1,0	30	5,5	8,0	100	24
5	2,5	10	-	3,0	30	5,5	8,0	100	24
6	2,5	10	-	6,0	30	5,5	8,0	100	24

De acordo com o perfil da curva indicado pela figura 5.16B as conversões obtidas foram sempre inferiores aos resultados observados em TOMOTANI *et al.* (2005) ao atingirem o regime permanente (75%). Entretanto, observam-se períodos de conversão completa da glicose nas três condições de vazão específica avaliadas e, independente, da concentração de oxigênio no meio reacional.

Ao se empregar 6,0 mg/L de oxigênio (Figura 5.16), o regime permanente sempre se estabeleceu diante de valores de conversão entre 20 % e 30 %.

(A)

(B)

Figura 5.16: Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a vazão específica em $1,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$), $3,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ) e $6,0 \text{ h}^{-1}$ ($\diamond$). Mantiveram-se constantes a temperatura (30°C), pH (5,5), concentração de glicose (2,5 mM), concentração de oxigênio (6,0 mg/L) e concentração de glicose oxidase (10 U/mL).

(A)

(B)

Figura 5.17: Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a vazão específica em $1,0 \text{ h}^{-1}$ (□), $3,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ) e $6,0 \text{ h}^{-1}$ (◇). Mantiveram-se constantes a temperatura (30°C), pH (5,5), concentração de glicose (2,5 mM), concentração de oxigênio (8,0 mg/L) e concentração de glicose oxidase (10 U/mL).

Ao aumentar-se a concentração de oxigênio para 8,0 mg/L (Figura 5.17), se observa a manutenção da conversão completa da glicose ($Y=100\%$), ao se empregar vazão específica de $1,0 \text{ h}^{-1}$. Dentre as possíveis justificativas relacionadas a este comportamento tem-se a relação entre o grau de conversão e a redução do FADH_2 .

Ao analisar-se o mecanismo de ação da glicose-oxidase, se observa que a presença de oxigênio no meio reacional é necessária para que a enzima passe da forma reduzida para a oxidada. KEPPLER (1966) avaliou que a ausência de oxigênio desvia o equilíbrio entre a forma oxidada (FADH^+) e reduzida (FADH_2) na direção da segunda. BRIGHT & GIBSON (1967) concluíram que não ocorre formação de complexo enzima-substrato quando a enzima está sob a forma reduzida. Portanto, se a enzima não estiver presente em um meio contendo quantidade suficiente do agente oxidante (O_2), permanecerá em sua forma reduzida e se tornará inativa para a reação de oxidação da glicose. A queda da atividade enzimática pode ser vista, então, como uma consequência do desequilíbrio entre as duas formas enzimáticas (reduzida e oxidada) no meio reacional e que serão afetadas pela concentração de oxigênio utilizada.

Outra justificativa para o comportamento da atividade enzimática seria um efeito inibitório causado pela glicose quando a concentração de oxigênio é limitante. Este fenômeno foi descrito por NICOL & DUKE (1966), no mesmo período onde o mecanismo de ação da glicose-oxidase estava sendo observado. Os experimentos reportados por este trabalho mostraram que, diante de concentrações limitantes de oxigênio, a glicose também inibirá a reação da glicose-oxidase. Ao efetuarem-se experimentos em diferentes concentrações de glicose e oxigênio observaram que o efeito inibitório da glicose estava relacionado com a concentração de oxigênio no meio reacional. Portanto, para elevadas concentrações de oxigênio, a inibição pela glicose desaparece, mas torna-se clara diante de concentrações de oxigênio por volta de 2% da concentração de saturação. A inibição por substrato (glicose) estaria, portanto, relacionada com a redução e oxidação da flavina. Para o mecanismo enzimático da glicose-oxidase, a redução da flavina é muito rápida e a segunda forma reduzida é formada mais lentamente. Ocorre que, para elevadas concentrações de oxigênio, a reação que gera a segunda forma reduzida não irá competir pelo oxigênio com a primeira forma reduzida. Entretanto, para concentrações reduzidas de oxigênio, a reação da primeira forma reduzida se torna importante para a

seqüência do mecanismo. Posteriormente, estes resultados foram confirmados por TSE & GOYGH (1987).

5.2.1.2. Efeito da vazão específica (D):

Através dos resultados obtidos para 2,5 mM de glicose, concluiu-se que a melhor condição para a oxidação nesta concentração seria utilizando vazão específica de $1,0 \text{ h}^{-1}$, após se definir a necessidade de saturar o meio reacional com oxigênio (8,0 mg/L). Entretanto, ao dobrar-se a concentração de substrato, a conversão enzimática média (Y), em regime permanente, sofreu uma queda em relação à obtida para 2,5 mM. Assim, é possível observar uma influência da concentração de substrato sobre a catálise enzimática.

Para estabelecer as condições operacionais em 5,0 mM de glicose, estudou-se a influência da velocidade específica (D) [$1,0 \text{ h}^{-1}$, $3,0 \text{ h}^{-1}$ e $6,0 \text{ h}^{-1}$] para diferentes concentrações de glicose-oxidase (GO) [2,5 U/mL, 5,0 U/mL, 10 U/mL, 20 U/mL e 40 U/mL].

Tabela 5.8: Testes para estudo da influência da vazão específica sobre a oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose-oxidase *Sigmat*[®].

Teste	G (mM)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	[O ₂] (mg/L)	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
1	5	2,5	-	1,0	30	5,5	8,0	100	24
2	5	2,5	-	3,0	30	5,5	8,0	100	24
3	5	5	-	1,0	30	5,5	8,0	100	24
4	5	5	-	2,0	30	5,5	8,0	100	24
5	5	5	-	3,0	30	5,5	8,0	100	24
6	5	10	-	0,5	30	5,5	8,0	100	24
7	5	10	-	1,0	30	5,5	8,0	100	24
8	5	10	-	3,0	30	5,5	8,0	100	24
9	5	20	-	1,0	30	5,5	8,0	100	24
10	5	20	-	3,0	30	5,5	8,0	100	24

Ao empregar-se 2,5 U/mL de glicose-oxidase (Figura 5.18) observou-se a manutenção na conversão total de glicose em ácido glicônico em uma vazão específica (D) de $1,0 \text{ h}^{-1}$. Entretanto, esta conversão completa (Y = 100%) se manteve apenas nas primeiras quatro horas de processo, seguindo-se de uma perda na atividade enzimática da GO e a, conseqüente, queda na

conversão (Y). Assim, a conversão média para esta condição foi de 43% no novo regime permanente estabelecido após 9 horas de ensaio.

Ao aumentar-se a vazão específica (D) para $3,0 \text{ h}^{-1}$, a perda da atividade enzimática ocorreu já na primeira hora de experimento, atingindo uma conversão média (Y) de 44%.

(A)

(B)

Figura 5.18: Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose empregando $2,5 \text{ U/mL}$ de glicose-oxidase e variando a vazão específica em $1,0 \text{ h}^{-1}$ (□) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ).

A figura 5.19 apresenta os resultados da conversão enzimática no reator com membrana utilizando $5,0 \text{ U/mL}$ de glicose-oxidase. De acordo com a figura 5.19 (B) ocorreu conversão total (Y) da glicose em ácido glicônico durante as primeiras quatro horas de processo para as vazões específicas

de $1,0 \text{ h}^{-1}$ e $2,0 \text{ h}^{-1}$. Após este período, ocorreu queda na atividade enzimática sendo estabelecido um novo patamar de regime permanente com conversões médias de 43% e 25%, respectivamente, para $D = 1,0 \text{ h}^{-1}$ e $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$. Entretanto, o regime permanente só foi mantido para $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$, ocorrendo uma queda brusca na conversão enzimática quando utilizando $D = 1,0 \text{ h}^{-1}$ após 15 horas de experimento. Para $D = 1,0 \text{ h}^{-1}$, nota-se a formação de regime permanente após 18 horas de experimento, porém, atingindo conversões médias inferiores às obtidas para as demais vazões específicas avaliadas.

(A)

(B)

Figura 5.19: Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose empregando $5,0 \text{ U/mL}$ de glicose-oxidase e variando a vazão específica em $1,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$), $2,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ ($\diamond$).

De acordo com a figura 5.19 (A), a estabilidade enzimática foi mantida para as vazões específicas de $2,0 \text{ h}^{-1}$ e $3,0 \text{ h}^{-1}$ de forma a obterem-se conversões enzimáticas semelhantes (respectivamente, 32 % e 30 %). Estando estes valores dentro do limite de erro porcentual da metodologia de análise, pode-se dizer que ao utilizarmos esta concentração de enzima ($5,0 \text{ U/mL}$), tempos de residência na faixa entre 20 e 30 minutos não promovem alterações na conversão da glicose presente no meio reacional. Entretanto, quanto maior a vazão específica utilizada, maior será a taxa específica de reação. Desta forma, a vazão específica de $3,0 \text{ h}^{-1}$ torna-se a mais indicada para estas condições de processo.

A figura 5.20 apresenta os resultados do processo de conversão enzimática empregando 10 U/mL de glicose-oxidase. Através do gráfico A observa-se a conversão total da glicose para as três condições avaliadas de vazão específica. Entretanto, ocorreu perda da atividade enzimática durante o tempo de processo e o estabelecimento de um novo patamar de conversão (Y) entre 25% e 30%. Assim, ao utilizar-se $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$ ocorreu conversão total (Y = 100%) durante as quatro primeiras horas do processo, e para $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$, este intervalo foi de 14 horas, seguido por uma queda na atividade enzimática da glicose-oxidase.

Durante as 24 horas de experimento, apenas a vazão específica de $0,5 \text{ h}^{-1}$ não atingiu regime permanente, porém, o mesmo deve ser alcançado após 24 horas, de acordo com a própria tendência da curva. Para as demais condições, o regime permanente foi alcançado após 12 h e 17h de ensaio, respectivamente, para $3,0 \text{ h}^{-1}$ e $1,0 \text{ h}^{-1}$.

Pode-se concluir que o regime permanente do processo contínuo será afetado pela vazão específica empregada, de forma que, quanto maior a vazão utilizada, menor o tempo de regime transiente estabelecido no processo. Levando-se em conta a taxa específica de reação (r), indicada na figura 5.20-B, podemos concluir que a vazão mais indicada é a correspondente a $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$, pois fornece a maior e mais estável velocidade específica de reação, após $t = 10 \text{ h}$.

(A)

(B)

Figura 5.20: Perfil da velocidade de reação r (A) e grau de conversão Y (B) para os ensaios de oxidação da glicose empregando 10 U/mL de glicose-oxidase e variando a vazão específica em $0,5 \text{ h}^{-1}$ ($\diamond$), $1,0 \text{ h}^{-1}$ ($\square$) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ).

De acordo com a figura 5.21 (B), para a vazão específica de $1,0 \text{ h}^{-1}$ existiu um prolongamento no período de conversão total da glicose em ácido glicônico por um período de 14 horas. Para a vazão específica de $3,0 \text{ h}^{-1}$, este intervalo foi reduzido para as 8 primeiras horas de experimento. Durante as 24 horas de processo, a vazão específica de $1,0 \text{ h}^{-1}$ não atingiu regime permanente, porém, o mesmo deve ser alcançado após as 24 horas, de acordo com a própria tendência da curva. Para a outra condição experimental, o regime permanente foi alcançado após 21 h de ensaio.

Levando-se em conta a taxa específica de reação (r), indicada na figura 5.22 (A), podemos concluir que a vazão mais indicada é a correspondente a $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$, pois fornece a maior taxa de reação.

(A)

(B)

Figura 5.21: Perfil da velocidade de reação r (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose empregando 20 U/mL de glicose-oxidase e variando a vazão específica em $1,0 \text{ h}^{-1}$ (□) e $3,0 \text{ h}^{-1}$ (Δ).

5.2.1.3. Efeito da concentração de glicose-oxidase (GO):

Ao variar-se a concentração de glicose-oxidase (GO) em diferentes vazões específicas (D), utilizando as condições indicadas na tabela 5.8, demonstrou-se que o aumento da concentração de enzima no meio reacional desfavorece a conversão enzimática. Assim, diante de vazões específicas menores ($D = 1,0 \text{ h}^{-1}$) o grau de conversão (Y) da oxidação da glicose em ácido glicônico chega a 43% diante de concentrações reduzidas de GO (2,5 U/mL), diminuindo sistematicamente até não se atingir mais um regime permanente ao empregar-se concentrações de 20 U/mL (Figura 5.22).

Figura 5.22: Variação do grau de conversão - Y (□) e taxa específica de reação - r_{GO} (◇) em função da concentração de glicose-oxidase (GO).

Entretanto, ao empregar-se vazão específica mais elevada ($D = 3,0 \text{ h}^{-1}$ – Fig. 5.23) o aumento da concentração de GO para 20 U/mL promoveu um aumento no grau de conversão no regime permanente, alcançando 50% após 19 h de processo. Este valor foi 32% superior aos até então registrados, indicando uma sensível melhora no processo ao utilizarmos tal condição.

Figura 5.23: Variação do grau de conversão - Y (□) e taxa específica de reação - r_{GO} (◇) em função da concentração de glicose-oxidase (GO).

Uma possível justificativa para esta diferença entre os resultados obtidos para $1,0 \text{ h}^{-1}$ e $3,0 \text{ h}^{-1}$ está no tempo de contato entre enzima-substrato e enzima-inibidor. Sendo assim, uma vazão específica menor representa um tempo de contato enzima-substrato maior, e isso tende a um aumento da conversão enzimática. Entretanto, este aumento no tempo de residência também influencia no contato entre enzima e o inibidor, no caso, o peróxido de hidrogênio. De acordo com a literatura, encontram-se diversos efeitos inibitórios relacionados à atividade enzimática da GO. MIRON *et al.* (2004) comentam que na cinética da glicose-oxidase (GO), especialmente, ao se trabalharem com grande quantidade de substrato, é possível detectar um complexo grupo de efeitos inibitórios devido ao substrato (glicose) e produto (ácido glicônico).

Dentre os diversos mecanismos inibitórios envolvendo a glicose-oxidase tem-se o promovido pelo próprio produto principal da reação (ácido glicônico). Esta inibição seria de caráter competitivo a estrutura química do ácido glicônico ser similar à da glicose. NAKAMURA & OGURA (1962) descreveram esta inibição como sendo realizada pelo precursor do ácido glicônico, ou seja, a gliconolactona. Eles descreveram a ação inibitória como sendo a ligação entre a molécula do ácido glicônico e o sítio ativo da enzima.

Entretanto, outros autores (TSE *et al.*, 1987) não encontraram o mesmo resultado.

Um dos mais importantes efeitos inibitórios relacionados com a atividade enzimática da glicose-oxidase se deve à presença de peróxido de hidrogênio, subproduto da reação de oxidação da glicose. Diversos trabalhos foram publicados citando o efeito inibitório do peróxido de hidrogênio (MIRÓN *et al.*, 2004; BAO *et al.*, 2003; BAO *et al.*, 2001a, BAO *et al.*, 2001b, KLEPPE, 1966) tendo sido seu mecanismo de ação descrito por KLEPPE (1966). Devido a uma proximidade obtida para os valores de K_i e K_m aparentes, é sugerido que a forma reduzida da glicose-oxidase tem a mesma afinidade pelo peróxido de hidrogênio como tem para o oxigênio., passando a existir uma competição entre as duas moléculas para se ligar à estrutura da enzima.

O Peróxido de Hidrogênio tem a propriedade de alterar determinados resíduos de aminoácidos presentes nas estruturas das proteínas. Por exemplo, a metionina é, facilmente, oxidada em pH ácido, enquanto a estrutura do triptofano é destruída pelo peróxido de hidrogênio em pH básico.

As flavoenzimas, como a glicose-oxidase, são aceptores naturais de hidrogênio e, com o contato com as moléculas de oxigênio presentes no meio reacional, irão formar o peróxido de hidrogênio. A seguir, temos o mecanismo da reação de oxidação da glicose e a, conseqüente, formação de peróxido de hidrogênio.

A glicose-oxidase possui dois grupos FAD por molécula localizados no sítio ativo da enzima, que serão alvos da ação do peróxido de hidrogênio sobre a estrutura da proteína. Segundo KLEPPER (1966), o peróxido de hidrogênio afeta severamente a atividade enzimática da GO, sendo a forma reduzida a mais sensível à sua ação. Com isso, caso a enzima permaneça

em sua forma reduzida, esta estará sujeita a inativação muito mais rapidamente que em sua forma oxidada. Esta discussão defendida por KEPPLER (1966) vem de encontro aos resultados obtidos em relação à concentração de oxigênio para 2,5 mM de glicose. A atividade da glicose-oxidase sofre alterações na presença de peróxido de hidrogênio, de forma que, quanto maior a concentração deste subproduto no meio reacional, menor será a atividade enzimática da GO. Ocorre que, diante de maiores concentrações de enzima tem-se, no início do processo, uma concentração maior de seus produtos de reação, notadamente, o peróxido de hidrogênio, que uma vez formado, inibirá a enzima GO presente no meio reacional. Para vazões maiores ($D = 3,0 \text{ h}^{-1}$), o arraste do peróxido de hidrogênio será um pouco mais acentuado de forma a reduzir a quantidade de enzima inativa no meio reacional. Esta hipótese poderia, então, comprovar o resultado obtido ao empregar-se 20 U/mL e $3,0 \text{ h}^{-1}$, onde a conversão (Y) no regime permanente alcançou 50%.

Diante da necessidade de controlar a concentração de peróxido de hidrogênio residual, as duas alternativas possíveis seriam alterar a vazão específica, de forma a promover um maior arraste deste subproduto da catálise, ou eliminar parte do peróxido de hidrogênio formado. Diante das limitações geradas com o aumento da vazão em um reator com membrana, a opção mais interessante passa a ser a eliminação do subproduto inibidor.

5.2.1.4. Efeito da concentração de catalase (C):

Diante da necessidade de remover o agente inibidor do interior do reator enzimático, a adição da catalase mostrou-se uma alternativa interessante para que se atingissem maiores concentrações de produto e elevado grau de conversão para a catálise enzimática.

O uso da catalase como agente controlador do inibidor no meio reacional já é objeto de estudo por muito tempo. BOUIN *et al.* (1976) já estudavam a imobilização de glicose-oxidase e catalase por adsorção. Tal método resultou em um sistema enzimático estável. Através deste trabalho, eles sugeriram que a enzima catalase, aparentemente, agia como um estabilizador e ativador da ação enzimática da glicose-oxidase.

Tabela 5.9: Testes para estudo da influência da concentração de catase sobre a oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose-oxidase *Sigmat[®]*.

Teste	G (mM)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h-1)	T (°C)	pH	[O ₂] (mg/L)	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
1	5	10	100	3,0	30	5,5	8,0	100	24
2	5	10	200	3,0	30	5,5	8,0	100	24
3	5	10	300	3,0	30	5,5	8,0	100	24
4	20	10	400	3,0	30	5,5	8,0	100	24
5	20	20	200	3,0	30	5,5	8,0	100	24
6	20	20	600	3,0	30	5,5	8,0	100	24
7	20	20	400	3,0	30	5,5	8,0	100	24

KLEPPE (1966) estudou o efeito da concentração de glicose entre 5,0 e 400 mM, mantendo fixa a concentração de peróxido de hidrogênio (20 mM). Os resultados obtidos demonstraram que a velocidade de inativação da GO não era afetada pelo aumento da concentração de substrato (glicose) no meio reacional. Desta forma, a concentração de glicose não se torna um fator limitante no processo, quanto à atividade enzimática, podendo ser alcançadas as concentrações desejadas. A ação inibitória do peróxido de hidrogênio se dará, portanto, através de modificações em determinados grupos, provavelmente, localizados próximos ao sítio ativo da enzima. Sendo assim, ficam excluídas as hipóteses de que a ação inibitória se dê sob a

estrutura do complexo enzima-substrato, ou mesmo por uma ligação entre o peróxido e a molécula de glicose. Sabendo-se que a ação inibitória se dará quando a enzima estiver desacoplada do substrato, ou seja, quando não existir a formação do complexo enzima-substrato, pode-se concluir que o aumento da concentração da glicose tende a proteger a enzima do agente inibidor.

(A)

(B)

Figura 5.24: Perfil da velocidade de reação r_{GO} (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para testes variando a concentração de catalase em 100 (U/mL) ($\diamond$), 200 U/mL ($\blacksquare$) e 300 U/mL ($\triangle$). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, GO = 10 U/mL, $[G] = 5,0$ mM, $O_2 = 8,0$ mg/L e $D = 3,0$ h⁻¹.

(A)

(B)

Figura 5.25: Perfil da velocidade de reação da catalase r_{cat} (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio na saída do reator (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose variando a concentração de catalase em 100 U/mL ($\diamond$), 200 U/mL ($\blacksquare$) e 300 U/mL ($\triangle$). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, GO = 10 EU/mL, $[G] = 5,0$ mM saturado em O_2 e $D = 3,0$ h $^{-1}$.

A adição de catalase ao meio reacional contendo 10 U/mL de GO e operando na vazão específica de 3,0 h $^{-1}$ aumentou o grau de conversão da glicose. Comparativamente, ao adicionar 100 U/mL de catalase a conversão enzimática alcança 68%, evidenciando a importância de se controlar a

concentração residual de peróxido de hidrogênio no meio reacional (Figura 5.24A). Além disso, a estabilidade enzimática da GO também é favorecida pela presença da catalase no meio reacional (Figura 5.24B).

Assim, calculando-se através de curva relacionando $\text{Log } r_{\text{GO}}$ com o tempo de processo (Figura 5.24B), obtém-se a constante de inativação (k_d) para os experimentos com adição e ausência de catalase. (Tabela 5.10).

Tabela 5.10: Conversão (Y), constante de inativação (K_d) e tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$) para a enzima GO no regime permanente em experimentos com presença (100 U/mL) e ausência de catalase no meio reacional contendo 10 eU/mL de GO e 5,0 mM de glicose em reator enzimático com membrana operando em CSTR a vazão de $3,0 \text{ h}^{-1}$.

Catalase	Y (%)	K_d (h^{-1})	$\tau_{1/2}$ (h)
sem	27	0,0167	60
com	85	0,0028	357

Verifica-se uma queda no valor de k_d quando da presença de catalase, estando o fenômeno relacionado com a redução na concentração de peróxido residual no meio reacional, uma vez que este será degradado pela catalase presente. A queda na concentração de peróxido favorece a estabilidade enzimática, uma vez, que a inativação enzimática pelo efeito inibitório será reduzida.

Figura 5.26: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da glicose-oxidase r_{GO} para os ensaios de oxidação da glicose com presença (100 U/mL) (■) e ausência de catalase (Δ). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, GO = 10 U/mL, [G] = 5,0 mM, [O₂] = 8,0 mg/L e [D] = 3,0 h⁻¹.

Através da figura 5.24 (A), observa-se que a variação na quantidade de catalase adicionada não promove grandes alterações na conversão enzimática pela GO. Entretanto, ao variar-se a concentração de catalase, a concentração de peróxido residual sofre alteração (Fig. 5.25 B).

Ao se comparar os resultados de conversões médias obtidas no regime permanente, para as três concentrações de catalase estudadas, observa-se que a concentração inicial de peróxido de hidrogênio foi diminuindo com o aumento da concentração de catalase, indo de 8,5 mM para 6,0 mM ao triplicar a concentração de catalase no meio reacional. Entretanto, mesmo reduzindo a concentração do agente inibitório em 29,4 %, o mesmo não ocorreu com o aumento da conversão enzimática da glicose, que não sofreu aumentos significativos.

Variou-se a proporção entre as enzimas glicose-oxidase e catalase (1:10, 1:20, 1:30 e 1:40). Para tanto, efetuaram-se 4 testes conforme indicado na tabela 5.9 onde mantiveram-se constantes o pH (5.5), temperatura (30°C),

vazão específica (3.0 h^{-1}), $[\text{O}_2] = 8,0 \text{ mg/L}$ e $[\text{G}] = 20 \text{ mM}$. Para atingir-se as proporções estudadas empregou-se a seguinte relação entre as enzimas: 10 U/mL de GO : 200 U/mL de catalase (1:20), 10 U/mL de GO : 400 U/mL de catalase (1:40), 20 U/mL de GO : 200 U/mL de catalase (1:10) e 20 U/mL de GO : 600 U/mL de catalase (1:30).

(A)

(B)

Figura 5.27: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GOD r_{GOD} (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a proporção entre glicose oxidase e catalase em 1:10 (Δ), 1:20 ($\diamond$), 1:30 ($\circ$) e 1:40 ($\blacksquare$). Os experimentos foram efetuados a 30°C , pH 5,5, $[\text{O}_2] = 8,0 \text{ mg/L}$ e $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$.

(A)

(B)

Figura 5.28: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase r_{Cat} (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a proporção entre glicose oxidase e catalase em 1:10 (Δ), 1:20 ($\blacklozenge$), 1:30 ($\circ$) e 1:40 ($\blacksquare$). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, $[\text{O}_2] = 8,0 \text{ mg/L}$ e $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$.

Através da figura 5.27 observa-se que a conversão média para a oxidação da glicose aumenta com o aumento na proporção entre glicose-oxidase e catalase adicionados no reator enzimático. Para tanto, o melhor resultado foi obtido ao utilizar-se a proporção 1:40 entre a quantidade de GO e catalase, que correspondeu, respectivamente, às concentrações de 10 U/mL e 400 U/mL.

Uma possível justificativa estaria na concentração de peróxido de hidrogênio residual. Assim, de acordo com a Figura 5.28 (B) observa-se que o aumento na conversão (Y) acompanhou a redução na quantidade de peróxido de hidrogênio residual presente. Para a proporção 1:10 verificou-se a presença de 3,5 mM na saída do reator enquanto que para a proporção 1:40 esta concentração residual foi de apenas 1,0 mM. A presença de menos peróxido de hidrogênio no meio reacional diminui a competição desta molécula com oxigênio que deve entrar em contato com a molécula da glicose-oxidase para promover a regeneração da mesma (passagem da fase reduzida para a fase oxidada e ativa na catálise).

Estudou-se, também, o efeito das concentrações das enzimas glicose-oxidase e catalase sobre a bioconversão da glicose em reator com membrana. Assim, variaram-se as concentrações de glicose-oxidase (10, 20 e 40 U/mL) e catalase (200, 400 e 800 U/mL) de forma a manter-se constante a proporção enzimática 1:20, e mantendo-se constantes o pH (5.5), temperatura (30°C), vazão específica (3.0 h⁻¹), [O₂] = 8,0 mg/L e [G] = 20 mM.

De acordo com as figuras 5.29 e 5.30 observa-se que o aumento na concentração de enzimas, desde que mantida a proporção enzimática, favorece a catálise no interior do reator. Assim, tem-se que a maior conversão enzimática foi alcançada com 40 U/mL de GO e 800 U/mL de catalase no meio reacional (Figura 5.29 B). Para esta condição, obteve-se conversão média para o regime permanente de 91%. Entretanto, o aumento na concentração das enzimas não favorece a estabilidade da atividade catalítica no meio reacional. (Figura 5.29 A e 5.30 A).

A concentração de peróxido de hidrogênio no meio reacional não apresentou alterações significativas no regime permanente (Figura 5.30 B). Entretanto, o mesmo não ocorre com relação à concentração inicial deste subproduto. Comparando-se, através da figura 5.30 (B), as concentrações iniciais de peróxido de hidrogênio, o menor valor foi encontrado utilizando-se a menor quantidade de enzimas no reator. Supõe-se que a presença do agente inibidor em concentração maior no início do processo irá degradar

em maior quantidade a enzima catalase, que apesar de ser a responsável pelo controle da concentração de peróxido de hidrogênio, pode sofrer degradação de sua estrutura quaternária pelo seu próprio substrato, assim como a glicose-oxidase.

(A)

(B)

Figura 5.29: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GOD r_{GOD} (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a concentração de glicose oxidase e catalase em 10:200 (♦), 20:400 (*) e 40:800 (■). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, $[O_2] = 8,0$ mg/L e $D = 3,0$ h⁻¹.

(A)

(B)

Figura 5.30: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase r_{Cat} (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a concentração de glicose oxidase e catalase em 10:200 ($\diamond$), 20:400 ($*$) e 40:800 ($\blacksquare$). Os experimentos foram efetuados a 30°C, pH 5,5, $[\text{O}_2] = 8,0 \text{ mg/L}$ e $[D] = 3,0 \text{ h}^{-1}$.

Segundo BAO *et al.* (2001), a maior produtividade é alcançada quando se utilizam as menores concentrações de glicose oxidase no sistema, gerando também as menores perdas de atividade no sistema. Estes autores já citavam o acúmulo de peróxido de hidrogênio como fator limitante ao processo, uma vez que implicará em uma inativação da enzima.

Os resultados obtidos neste trabalho vão de acordo com os efetuados em batelada e discutidos por BOUIN *et al.* (1976). Segundo estes autores, o peróxido de hidrogênio produzido pela oxidação enzimática da glicose será convertido para oxigênio e água pela catalase. Desta forma, definem o sistema enzimático GO/Catalase como sendo uma reação sequencial e cíclica, uma vez que, $\frac{1}{2}$ de molécula de oxigênio é consumida pela reação da GO, que é regenerada durante a degradação do peróxido pela catalase.

Ao efetuarem experimentos utilizando a mesma proporção entre as enzimas GO e catalase, BOUIN *et al.* (1976) verificaram que o aumento na quantidade de enzimas no meio reacional, aumentará a eficiência da catálise uma vez quanto mais moléculas tivermos no meio reacional, maiores as chances de contato entre a enzima e o seu substrato.

Diante da adição de catalase no sistema reacional para oxidação da glicose fez-se necessário avaliar o efeito da vazão específica (D) sobre a reação enzimática envolvendo o peróxido de hidrogênio.

A Tabela 5.11 apresenta os três testes efetuados para avaliar a influência do valor de D sobre a conversão utilizando catalase para controlar a inibição pelo peróxido de hidrogênio.

Tabela 5.11: Testes para estudo do efeito da vazão específica (D) sobre os sistema multienzimático GO/Catalase mantido na proporção 1:20 em reator com membrana operando em CSTR

Teste	G (mM)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	[O ₂] (mg/L)	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
1	20	10	200	2,0	30	5,5	8,0	100	24
2	20	10	200	3,0	30	5,5	8,0	100	24
3	20	10	200	6,0	30	5,5	8,0	100	24

Através dos perfis de curvas apresentados na figura 5.30 (B), observa-se que o aumento da vazão específica implica em uma redução na conversão enzimática. Assim, ao se variar-se o tempo de residência entre 10 e 40 minutos, ocorreu queda na conversão de 12%. Entretanto, observa-se

através da figura 5.31 (B) que o aumento da vazão, implica em um arraste maior do peróxido de hidrogênio formado, de forma a reduzir a quantidade deste inibidor presente no meio reacional, que foi de, aproximadamente, 3,0 mM ($D=2,0 \text{ h}^{-1}$) para 0,3 mM ($D = 6,0 \text{ h}^{-1}$).

(A)

(B)

Figura 5.31: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GOD r_{GOD} (Fig. A) e grau de conversão Y (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a vazão específica – D em $2,0 \text{ h}^{-1}$ (*), $3,0 \text{ h}^{-1}$ (♦) e $6,0 \text{ h}^{-1}$ (■). Os experimentos foram efetuados a 30°C , pH 5,5, $[\text{O}_2] = 8,0 \text{ mg/L}$ e utilizando 10 U/mL de GO e 200 U/mL de catalase.

(A)

(B)

Figura 5.32: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação da glicose (20 mM), variando a vazão específica – D em $2,0 \text{ h}^{-1}$ (*), $3,0 \text{ h}^{-1}$ (◆) e $6,0 \text{ h}^{-1}$ (■). Os experimentos foram efetuados a 30°C , pH 5,5, saturado em O_2 e utilizando 10 EU/mL de GO e 200 EU/mL de catalase.

Sabe-se que um maior tempo de residência aumenta a concentração de peróxido de hidrogênio, aumentando a taxa de enzima inativa devido à sua ação inibitória. Entretanto, a literatura estabelece dois mecanismos inibitórios distintos para o peróxido de hidrogênio sobre a glicose oxidase.

TOMOTANI *et al.* (2005) descrevem a inibição por peróxido de hidrogênio como uma competição não competitiva reversível, pois, sua presença

afetaria a carga do íon ferro presente na estrutura da enzima. A presença do Fe^{+2} estaria, porém, localizada em uma região fora do sítio ativo da enzima e a presença do peróxido promoveria a seguinte reação:

Determinou-se também o valor da constante de inibição para a oxidação da glicose em presença de peróxido de hidrogênio e o valor observado foi de 1,22 mM. Comparando os resultados apresentados por TOMOTANI *et al.* (2005) com os obtidos ao variar-se a proporção entre as enzimas glicose-oxidase e catalase tem-se que apenas no experimento utilizando a proporção 1:40 atingiu-se concentração abaixo da constante de inibição e, portanto, o efeito inibitório estaria minimizado nesta condição.

Entretanto, BAO *et al.* (2003) discute um outro efeito de inibição pelo peróxido de hidrogênio, desta vez competitivo entre a molécula de peróxido de hidrogênio e a de oxigênio pelo contato com o FADH^+ , presente na estrutura da molécula de glicose-oxidase. Segundo os autores, o mecanismo para a oxidação da glicose catalisada pela glicose-oxidase inibida, competitivamente, pelo peróxido de hidrogênio seguiria as seguintes etapas:

De acordo com o mecanismo estabelecido, a forma reduzida seria a FAD.H_2 , a forma oxidada seria a FAD e o complexo de enzima inativa seria $\text{FAD.H}_2.\text{H}_2\text{O}_2$. A reversibilidade para esta inibição também foi verificada e, desta maneira, a ação do peróxido de hidrogênio para os dois tipos de inibição detectados, respectivamente, por BAO *et al.* (2003) e TOMOTANI *et al.* (2005) alteram a estrutura química sem destruir a estrutura quaternária da enzima. Conclui-se que mesmo ocorrendo a presença de uma quantidade residual de peróxido de hidrogênio na saída do reator enzimático, este peróxido não reduzirá a capacidade catalítica da glicose-oxidase contida no reator no decorrer do processo contínuo, uma vez que em nenhum tipo de inibição detectado ocorre destruição desta estrutura molecular.

5.2.1.5. Efeito da concentração de glicose (G):

O efeito da concentração de glicose foi avaliado através de dez testes variando a concentração de D-glicose entre 5 mM e 1000 mM e sob as condições descritas na Tabela 5.12.

Tabela 5.12: Testes variando concentração de glicose para a oxidação e em biorreator enzimático com membrana utilizando as enzimas glicose-oxidase e catalase *Sigma*[®].

Teste	G (mM)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	[O ₂] (mg/L)	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
1	20	40	800	2,0	30	5,5	8,0	100	24
2	50	40	800	2,0	30	5,5	8,0	100	24
3	100	40	800	2,0	30	5,5	8,0	100	24
4	200	40	800	2,0	30	5,5	8,0	100	24
5	500	40	800	2,0	30	5,5	8,0	100	24
6	1000	40	800	2,0	30	5,5	8,0	100	24
7	5	10	200	3,0	30	5,5	8,0	100	24
8	10	10	200	3,0	30	5,5	8,0	100	24
9	20	10	200	3,0	30	5,5	8,0	100	24
10	40	10	200	3,0	30	5,5	8,0	100	24

Os resultados estão apresentados nas figuras 5.32 e 5.33. Verifica-se que o aumento na concentração de substrato de 20 mM para 50 mM em diante faz com que a conversão média, até então na faixa de 90% caia a níveis em torno de 20 % a 30 %. Analisando-se o perfil das curvas obtidas para a variação da concentração de peróxido de hidrogênio ao longo do tempo de processo (figura 5.33 B), observa-se que o aumento da concentração de glicose, implicará em um aumento na concentração de

peróxido residual no meio reacional. Este aumento, para níveis bem superiores ao do K_i (1,22 mM) tendem a aumentar a concentração de enzima inativa pela ação deste inibidor e, com isso, reduz-se a possibilidade de converter substrato em produto.

(A)

(B)

Figura 5.33: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GO (r_{GO} - Fig. A) e grau de conversão (Y - Fig. B) para os ensaios de oxidação, variando a concentração de glicose em 20 mM (◇), 50 mM (□), 100 mM (▲), 200 mM (■), 500 mM (*) e 1000 mM (◆).

(A)

(B)

Figura 5.34: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação, variando a concentração de glicose em 20 mM (◇), 50 mM (□), 100 mM (▲), 200 mM (■), 500 mM (Δ) e 1000 mM (◆).

De acordo com a figura 5.34 (B), ao utilizar $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$, a conversão enzimática (Y) para 20 mM de substrato foi reduzida de 90%, ao empregarse $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$, para 70% quando utilizando $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$. Para aumentar-se o grau de conversão diante de concentrações de glicose superiores a 20 mM se faz necessário estabelecer novas condições operacionais, notadamente a vazão específica, de forma a reajustar as concentrações de peróxido de

hidrogênio e limitar os eventuais efeitos inibitórios ,já discutidos, e que estão ligados à concentração de glicose, ácido glicônico e peróxido de hidrogênio no interior do reator com membrana.

(A)

(B)

Figura 5.35: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da GO (r_{GO} - Fig. A) e grau de conversão (Y - Fig. B) para os ensaios de oxidação, variando a concentração de glicose em 5 mM (◇), 10 mM (□), 20 mM (▲) e 40 mM (■).

(A)

(B)

Figura 5.36: Perfil do logaritmo da velocidade de reação da catalase (Fig. A) e concentração de peróxido de hidrogênio (Fig. B) para os ensaios de oxidação, variando a concentração de glicose em 5 mM (◇), 10 mM (□), 20 mM (▲) e 40 mM (■).

5.2.1.6. Efeito da temperatura:

Afim de avaliar a influência da temperatura de processo sobre a manutenção da estabilidade e velocidades específicas de reação obtidos dentro do reator *Bioengineering*[®] foram efetuados testes à 30°C, 35°C, 40°C e 50°C. Optou-se por uma concentração de glicose de 100 mM para manter-se condição de $[S] \gg K_m$.

Foram efetuados quatro ensaios de ajuste das condições operacionais de forma a obtermos taxas de conversão enzimática inferiores a 5%.

Tabela 5.13. Ensaios preliminares de ajuste das condições operacionais dos ensaios para estudo da estabilidade frente à temperatura da oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose-oxidase *Sigma*[®].

Teste	G (mM)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
A1	100	15.3	6100	2.0	30	5.5	100	24
A2	100	0.2	0.4	2.0	30	5.5	100	24
A3	100	0.1	0.01	2.0	30	5.5	100	24
A4	100	0.001	0.6	2.0	30	5.5	100	24

Tabela 5.14: Resultados obtidos para os ensaios de ajuste da conversão da glicose. Descrição da concentração de glicose ([G]), concentração de glicose-oxidase *Sigma*[®] (GO), catalase *Sigma*[®] (C) e conversão média (Y).

Teste (N°)	[GO] (U/mL)	[C] (U/mL)	Y (%)
1	15,3	6110	26,0
2	0,20	0,40	27,0
3	0,0153	0,612	24,0
4	0,00153	0,0612	24,0
5	0,10	0,01	22,0
6	0,10	0,01	22,0
7	0,001	0,01	9,6

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.14 optou-se pela condição utilizada no teste 7 (GO = 0,001 U/mL e C = 0,01). A partir do ajuste das condições experimentais foram efetuados experimentos visando avaliar a atividade e estabilidade da glicose-oxidase frente à variação de temperatura.

Tabela 5.15. Ensaio para o estudo da estabilidade frente à temperatura da oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose-oxidase *Sigma*[®].

Teste	G (mM)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
T1	100	0.001	0.6	2.0	30	5.5	100	48
T2	100	0.001	0.6	2.0	35	5.5	100	48
T3	100	0.001	0.6	2.0	40	5.5	100	48
T4	100	0.001	0.6	2.0	50	5.5	100	48

Figura 5.37: Perfil do logaritmo da velocidade de reação (r) para o ensaio a 30°C.

A equação exponencial obtida no gráfico $\text{Log}(r)$ Vs t para 30°C foi:

$$\text{Log}(r) = 44,447 \times e^{-0,0006 \times t} \quad (\text{Eq. 5.17})$$

O valor de k_d para 30°C será 0,0,0006 h⁻¹ e o $\tau_{1/2}$ é de 1155 horas.

Figura 5.38: Perfil do logaritmo da velocidade de reação (r) para o ensaio a 35°C.

A equação exponencial obtida no gráfico $\text{Log}(r)$ Vs t para $T = 35^\circ\text{C}$ foi:

$$\text{Log}(r) = 27,455 \times e^{-0,0016 \times t} \quad (\text{Eq. 5.18})$$

O valor de k_d para 35°C será $0,0016 \text{ h}^{-1}$ e $\tau_{1/2}$ de 433,2 horas.

Figura 5.40: Perfil do logaritmo da velocidade de reação r para o ensaio a 40°C.

A equação exponencial obtida no gráfico $\text{Log}(r)$ Vs t para $T = 40^\circ\text{C}$ foi:

$$\text{Log}(r) = 48,485 \times e^{-0,0055 \times t} \quad (\text{Eq. 5.19})$$

O valor de k_d para 40°C será $0,0055 \text{ h}^{-1}$ e $\tau_{1/2}$ de 126,03 horas.

Figura 5.41: Perfil do logaritmo da velocidade de reação (r) para o ensaio a 50°C.

A equação exponencial obtida no gráfico Log (r) Vs t para $T = 50^\circ\text{C}$ foi:

$$\text{Log}(r) = 36,583 \times e^{-0,1256 \times t} \quad (\text{Eq. 5.20})$$

O valor de k_d para 50°C será $0,1256 \text{ h}^{-1}$ e $\tau_{1/2}$ de 5,52 horas.

Para a análise da estabilidade enzimática foram comparados os dados referentes à constante de inativação térmica (k_d), calculado para cada temperatura. A constante de inativação térmica (k_d) Vs T ($^\circ\text{C}$) define o trecho de estabilidade para o processo, melhor visualizada pela figura 5.42

Figura 5.42: Perfil da constante de inativação térmica (k_d) como função da temperatura (T) durante o regime permanente para os ensaios variando a temperatura.

De acordo com a figura 5.42, a faixa entre 30°C e 35°C mostra-se adequada em relação à estabilidade do sistema enzimático. Entretanto, apesar do sistema ser estável até 35°C, esta temperatura não representou melhora na velocidade específica de reação ($r_{\text{médio}}$) sendo, portanto, 30°C a temperatura mais adequada para se utilizar na etapa de oxidação da glicose.

5.2.1.7. Efeito do pH:

Foram efetuados três experimentos visando avaliar a atividade e estabilidade da glicose-oxidase frente à variação de pH.

Tabela 5.16. Ensaios para o estudo da estabilidade frente ao pH da oxidação da glicose em biorreator enzimático com membrana utilizando a enzima glicose-oxidase *Sigma*[®].

Teste	G (mM)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	Agitação (rpm)	t _{ensaio} (h)
1	100	0.001	0.6	3.0	30	4.5	100	48
2	100	0.001	0.6	3.0	30	5.5	100	48
3	100	0.001	0.6	3.0	30	6.5	100	48

Figura 5.43: Perfil da taxa de reação (r) para a glicose-oxidase (◇) e catalase (■) como função do pH durante o regime permanente em reator com membrana operando em CSTR.

Segundo BOUIN *et al.* (1976), o pH ótimo para a enzima catalase seria 7,0, porém, BAO *et al.* (2001) indicaram o pH 5,5 como ótimo para a enzima glicose oxidase. Para determinar o valor de pH mais indicado para o sistema multi-enzimático GO/catalase utilizados em processo contínuo (CSTR) foi necessário efetuar experimentos na faixa considerada ótima para as duas enzimas. A figura 5.43 mostra que o pH 5,5 é o mais indicado tanto

para a enzima glicose oxidase, quanto para a enzima catalase quando utilizadas no reator com membrana e em processo contínuo.

Segundo BOUIN *et al.* (1976), a força iônica para este pH é suficientemente elevada para minimizar eventuais interações iônicas entre substrato e outras partículas presentes no meio reacional. Deve-se considerar, também, que a catalase só irá catalisar peróxido que tenha sido formado na reação da oxidação anterior. Como dito anteriormente, trata-se uma reação em série e cíclica, de forma que a eficiência de uma enzima dependerá da eficiência da outra. Assim, caso a enzima glicose-oxidase esteja submetida a um meio reacional em pH desfavorável à catálise, isto será refletido na sua capacidade de conversão de substrato em produto. O peróxido de hidrogênio é o produto desta reação de oxidação e, quanto menor a quantidade de peróxido formado, menor será a atividade da catalase, uma vez que esta terá menos substrato disponível para converter. Tem-se, então, um excesso de enzima catalase presente no meio reacional e, como reflexo disso, teremos uma redução na velocidade específica de reação.

5.2.2. Determinação dos parâmetros cinéticos:

Os parâmetros cinéticos foram calculados a partir do método de *Lineweaver-Burk* segundo o cálculo do coeficiente angular da equação de reta obtida ao se estabelecer um gráfico $(1/r) = f(1/[S])$. Mantiveram-se constantes pH (5.5), temperatura (30°C), D (3,0 h⁻¹), [O₂] = 8,0 mg/L, GO (10 U/mL) e C (200 U/mL).

Figura 5.44. Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk para o cálculo das constantes cinéticas da glicose-oxidase SIGMA[®] presente em um reator com membrana CSTR.

Obteve-se a seguinte equação de reta:

$$[1/v_{GO}] = 29,13 \times [1/G] + 0,891 \text{ (Eq. 5.21)}$$

$$(r^2 = 0,984)$$

Tabela 5.17 Parâmetros cinéticos obtidos para a glicose-oxidase^(R) quando utilizada em processo contínuo (CSTR) em reator com membrana.

K_m (mM)	33,0
v_{max} (mmol/h)	1,123

A equação de processo no intervalo de 2,5 mM a 40 mM de substrato para a oxidação da glicose no segundo reator ficou sendo:

$$\frac{1,123}{\phi} = Y \times S_0 + 33 \times \frac{Y}{(1-Y)} \quad (\text{Eq. 5.22})$$

Onde:

Y = grau de conversão da glicose em ácido glicônico (%)

S₀ = concentração inicial de glicose (substrato alimentado) (mmol/L)

ϕ = vazão de alimentação (L/h)

5.2.3. Determinação dos parâmetros termodinâmicos:

A determinação seguiu o modelo de cálculo já efetuado para a etapa de hidrólise da sacarose (5.1.3). Através da figura 5.45 temos que a equação da reta obtida será:

$$\text{Ln} k_d = -25708 \times \left(\frac{1}{T} \right) + 76,375 \quad (\text{Eq. 5.23})$$

,com um $r^2 = 0,9968$.

Sendo:

$$\frac{-E_d}{R} = -25708 \quad (\text{Eq. 5.24})$$

Figura 5.45: Perfil do logaritmo da constante de inativação (k_d) em função do inverso da temperatura de processo ($1/T$). Estudo da energia de desativação térmica para os ensaios de oxidação da glicose.

Tabela 5.18: Dados da velocidade específica de reação inicial (r_0), constante de inativação térmica (k_d) e da energia de desativação térmica (E_d) para a glicose-oxidase *SIGMA*[®].

T (K)	1/T (K ⁻¹)	K _d	Ln K _d	Ea (KJ/mol)
306	0,00327	0,0006	-7,4186	219,53
311	0,00322	0,0016	-6,4378	Ea (Kcal/mol) 13,59
316	0,00316	0,0055	-5,2030	
326	0,00307	0,1256	-2,0747	

Os parâmetros termodinâmicos $\Delta G'$, $\Delta H'$ e $\Delta S'$ foram calculados a partir das relações estabelecidas em CASTELLAN (1976). Obtivemos os seguintes resultados: $\Delta G' = -12,70 \text{ J/mol}$, $\Delta H' = 216,99 \text{ kJ/mol}$ e $\Delta S' = 0,751 \text{ kJ/mol.K}$. Por apresentar $\Delta G'$ negativo, tem-se que a oxidação da glicose é uma catálise irreversível. Segundo OWUSU *et al.* (1992) valores de $\Delta H'$ entre 200 e 300 kJ/mol causam desnaturação da enzima devido a desarranjos na estrutura terciária e quaternária. Observa-se que para a oxidação da glicose em processo contínuo no reator com membrana $\Delta H'$ está dentro da faixa especificada, sendo então, a temperatura a principal causa da desnaturação parcial da macromolécula.

5.3. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em etapa única (multienzimático):

Diante da caracterização das duas etapas de conversão enzimática para a obtenção de frutose e ácido glicônico, a citar, hidrólise da sacarose e oxidação da glicose formada, buscou-se avaliar a bioconversão em processo multienzimático onde todas as etapas reacionais ocorrem no mesmo equipamento. De acordo com este arranjo operacional, a bioconversão se dá em etapa única no biorreator com membrana. A sacarose P.A. (MERCK®), substrato adicionado continuamente ao reator, foi hidrolizada pela ação da enzima *Bioinvert*®. Como produto desta primeira reação tinha-se uma mistura equimolar de frutose e glicose, e esta última foi, então, oxidada pela ação da enzima glicose oxidase. Como produto desta segunda reação tem-se uma mistura de frutose e ácido glicônico.

5.3.1. Multienzimático sem reciclo:

A avaliação da bioconversão enzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico em processo multienzimático sem reciclo foi efetuada através da análise de dez diferentes arranjos operacionais, conforme indicado na Tabela 5.19.

Tabela 5.19: Testes para definição das condições operacionais de bioconversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico empregando as enzimas invertase, glicose oxidase e catalase em reator com membrana operando em CSTR

Teste	[S] (mM)	I (U/mL)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	Agitação (rpm)
1	50	6	10	200	2,0	30	5.5	100
2	50	12	10	200	2,0	30	5.5	100
3	50	12	1,0	940	2,0	30	5.5	100
4	50	12	1,0	940	6,0	30	5.5	100
5	50	24	1,0	940	6,0	30	5.5	100
6	50	24	1,0	2350	6,0	30	5.5	100
7	50	24	2,5	2350	6,0	30	5.5	100
8	50	24	0,5	470	6,0	30	5.5	100
9	100	24	0,5	470	6,0	30	5.5	100
10	100	24	0,25	235	6,0	30	5.5	100

De acordo com a figura 5.46, é possível se empregar um único reator com membrana na bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico, o que representa uma redução de custos com equipamentos e processo. Além disso, obtém-se os mesmos resultados de conversão que ao operar em reatores distintos (100% para a hidrólise da sacarose e de 70% para a oxidação da glicose).

Figura 5.46: Variação da concentração de frutose [F] (Δ) e ácido glicônico [HG] ($\blacksquare$) no decorrer do tempo para o processo multienzimático de hidrólise da sacarose (20 mM) e oxidação da glicose formada em reator com membrana operando em CSTR.

Ao se aumentar a concentração de substrato de 20 mM para 50 mM mostra-se necessário avaliar a concentração de invertase para a promoção da hidrólise no interior do reator. Para tanto, estudaram-se três concentrações de *Bioinvert*[®] (6,0, 12 e 24 U/mL) para uma vazão específica de 2,0 h⁻¹. De acordo com a figura 5.47 a conversão completa da sacarose (50 mM) só é possível ao se empregar 12 U/mL de invertase no reator multienzimático, ocorrendo redução do grau de conversão após 10 horas de processo para 6,0 U/mL de enzima. Entretanto, a hidrólise completa da sacarose não foi acompanhada pela conversão da glicose em ácido glicônico, e que seria a segunda reação enzimática (oxidação da glicose)

glicônico, e que seria a segunda reação enzimática (oxidação da glicose) envolvida no processo. Assim, partindo-se de conversões de glicose (Y) entre 10% e 20% para as primeiras horas de processo, alcança-se a inativação completa da enzima glicose-oxidase após 7 horas, fato verificado graficamente através da conversão nula (0%).

A inativação enzimática da invertase e glicose oxidase pode ser avaliada ao calcular-se o logaritmo da velocidade específica de reação (r) no decorrer do tempo de processo (t). Como discutido anteriormente, a inativação enzimática em diferentes condições operacionais pode ser comparada através dos valores da constante de inativação (k_d).

A figura 5.47 confirma a perda de atividade enzimática ocorrida para 6,0 U/mL de invertase após 10 horas de processo. Para esta condição, se obtém uma constante de inativação (k) igual a $0,305 \text{ h}^{-1}$, indicando um tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$) de 3,3 horas.

Figura 5.47. Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (X) ao variar-se a concentração de invertase em 6,0 U/mL (◆) e 12 U/mL (■) e taxa de conversão para a oxidação da glicose resultante (Y) ao variar-se a concentração de invertase em 6,0 U/mL (◇) e 12 U/mL (□) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se pH 5,5, 30°C, $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$.

Como discutido anteriormente, a perda da atividade enzimática pode estar relacionada à desagregação das estruturas oligoméricas em que a enzima comercial se encontra e que apresentam uma maior atividade enzimática em relação às formas não agregadas (REDDY *et al.*, 1990).

Com relação à inativação da glicose oxidase, se teria relação com a concentração de peróxido de hidrogênio presente no interior do reator com membrana. Ao operar-se o reator com membrana em uma vazão específica de $2,0 \text{ h}^{-1}$, a concentração de peróxido de hidrogênio para uma hora de operação será de 22,1 mM e 35,7 mM, respectivamente, para 6,0 U/mL e 12 U/mL (Figura 5.47). Concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio inibem a ação catalítica da glicose oxidase sendo necessário controlar sua presença no interior do reator com membrana. Entre as possibilidades de controle dos níveis de H_2O_2 durante o processo enzimático tem-se a alteração das concentrações de enzimas (glicose oxidase e catalase) ou da vazão específica empregada.

Figura 5.48: Logaritmo da velocidade específica de reação para a invertase ($\text{Ln } r_i$) em função do tempo de processo ao empregar-se 6,0 U/mL (◆) e 12 U/mL (■) desta enzima e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C, 100 rpm, glicose oxidase (10 U/mL) e catalase (200 U/mL).

Comprova-se, através da figura 5.48, que ocorre perda da atividade enzimática da glicose oxidase nas duas condições avaliadas de concentração de invertase. Entretanto, a constante de inativação (k) apresentou maior valor ao se utilizar 12 U/mL de invertase ($k = 0,630 \text{ h}^{-1}$) em relação ao teste empregando 6,0 U/mL ($k = 0,368 \text{ h}^{-1}$). Ao compararem-se os diferentes valores de k obtidos com a concentração inicial de peróxido de hidrogênio na mesma condição operacional (Figura 5.49) nota-se uma relação direta entre o aumento da concentração de invertase (para $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$) e o aumento na concentração de glicose disponível para a ação da glicose oxidase. Assim, por se tratar de uma proporção eqüimolar, a maior presença de glicose no meio reacional implicará numa maior concentração de peróxido de hidrogênio sendo formado e que, por sua vez, terá ação inibitória sobre a própria glicose oxidase.

Figura 5.49: Concentração de peróxido de hidrogênio ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) presente no interior do reator com membrana operando em CSTR para o processo multi-enzimático de bioconversão da sacarose (50 mM) em frutose e ácido glicônico ao utilizar-se 6,0 U/mL (◆) e 12 U/mL (■) e mantendo-se pH 5,5, 30°C, 100 rpm, glicose oxidase (10 U/mL) e catalase (200 U/mL).

Figura 5.50: Logaritmo da velocidade específica de reação para a glicose oxidase ($\ln r_{GO}$) em função do tempo de processo ao empregar-se 6,0 U/mL (◆) e 12 U/mL (■) de invertase e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C, 100 rpm, glicose oxidase (10 U/mL) e catalase (200 U/mL).

O aumento da vazão específica (D), em um reator com membrana, passa a ser limitado pela presença da unidade ultrafiltrante, que pode ser rompida diante de pressões muito elevadas. No caso específico do reator com membrana *Bioengineering*®, o limite para a vazão estará relacionado à capacidade operacional da bomba empregada (responsável pela alimentação do reator). No caso, de acordo com o manual do equipamento, a bomba doseadora *Pharmacia*® (mod. PD 5101) e o próprio sistema *Bioengineering*® não podem operar em condições de pressão superiores a 5,0 bar. Testes iniciais apontaram que valores de D acima de 6,0 h⁻¹ resultavam em pressões acima de 5,0 bar sendo, portanto, impraticáveis nas condições laboratoriais empregadas neste trabalho.

Ao empregar-se vazão específica de 6,0 h⁻¹ altera-se a vazão de alimentação no reator com membrana de forma que o tempo de residência do substrato no meio reacional será afetado. Como forma de readequar a concentração de enzima invertase a este novo tempo de residência

efetuaram-se testes utilizando 6,0 U/mL, 12 U/mL e 24 U/mL de *Bioinvert*[®]. De acordo com a figura 5.49 é necessário trabalhar com uma concentração maior de invertase no reator com membrana para que se alcance a hidrólise completa da sacarose (50 mM). Entretanto, ao analisarem-se os resultados alcançados referentes à oxidação da glicose presente no reator mostra-se que mesmo diante do aumento da vazão específica maior, esta reação enzimática não foi otimizada.

Figura 5.51: Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (X) ao variar-se a concentração de invertase em 6,0 U/mL (◆), 12 U/mL (▲) e 24 U/mL (■) e taxa de conversão para a oxidação da glicose resultante (Y) ao variar-se a concentração de invertase em 6,0 U/mL (◇), 12 U/mL (Δ) e 24 U/mL (□) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

A figura 5.52 indica a atividade enzimática da invertase no decorrer do processo através do logaritmo neperiano da velocidade específica de reação (r_i) no decorrer do tempo de processo. Os resultados apresentados indicam que ao utilizar 6,0 U/mL e 12 U/mL a constante de inativação enzimática (k) apresenta valores próximos sendo, respectivamente, $0,226 \text{ h}^{-1}$ e $0,218 \text{ h}^{-1}$.

Este resultado demonstra que o tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$) para a invertase no reator com membrana será semelhante (entre 4,4 h e 4,6 h), independente da concentração utilizada, quando ocorre a desagregação das formas oligoméricas em que a estrutura enzimática se apresenta inicialmente. Apenas a concentração correspondente a 24 U/mL garante a manutenção das formas oligoméricas agregadas e, com isso, a maior atividade enzimática.

Figura 5.52: Logaritmo da velocidade específica de reação para a invertase ($\ln r_i$) em função do tempo de processo ao empregar-se 6,0 U/mL (◆), 12 U/mL (▲) e 24 U/mL (■) desta enzima e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C, 100 rpm, glicose oxidase (10 U/mL) e catalase (200 U/mL).

Conclui-se, portanto, que se faz necessário utilizar 24 U/mL de invertase para otimizar a hidrólise da sacarose no reator multi-enzimático operando em vazão específica de 6,0 h⁻¹. Diante da necessidade de otimizar a oxidação da glicose para o processo multi-enzimático, se buscou analisar a influência da concentração de glicose oxidase e catalase no meio reacional como forma de aumentar o grau de conversão (Y).

Avaliaram-se três condições de variação da concentração de enzimas glicose oxidase e catalase, mantendo-se a proporção 1:940. Assim, utilizaram-se 0,5 U/mL, 1,0 U/mL e 2,5 U/mL de glicose oxidase adicionado ao reator com membrana acrescidos de, respectivamente, 470 U/mL, 940 U/mL e 2350 U/mL de catalase. De acordo com a figura 5.53 apenas diante da proporção 0,5 U/mL de GO e 470 U/mL de catalase se atinge a oxidação completa da glicose presente no reator com membrana.

Figura 5.53: Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (X - ◆) e taxa de conversão para a oxidação da glicose resultante (Y) ao variar-se a concentração de glicose oxidase e catalase, respectivamente, em 0,5 U/mL / 470 U/mL (◇), 1,0 U/mL / 940 U/mL (□) e 2,5 U/mL / 2350 U/mL (Δ) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), pH 5,5, 30°C, D = 6,0 h⁻¹.

Os resultados apresentados na figura 5.53 indicam que o aumento na concentração de glicose-oxidase desfavorece a própria reação por ela catalisada. Tal resultado já foi discutido durante o estudo da etapa de oxidação da glicose sendo tal característica citada em outro trabalho recente (BAO et al., 2003a,b). Através da figura 5.53 é possível observar uma relação entre a concentração de peróxido de hidrogênio nas primeiras horas

de processo e o grau de conversão alcançado (Y - Figura 5.52). Assim, quanto maior a concentração de peróxido de hidrogênio no meio reacional menor o grau de conversão (Y) alcançado. Assim, para o teste realizado com 2,5 U/mL de glicose oxidase e 2350 U/mL de catalase a concentração de peróxido de hidrogênio, com uma hora de processo, estava em 33,3 mM. Este valor cai para 18,2 mM ao utilizarem-se 1,0 U/mL de glicose oxidase e 940 U/mL de catalase e na melhor condição operacional (0,5 U/mL de glicose oxidase e 470 U/mL de catalase) esta concentração inicial cai para 13,9 mM. A produção de peróxido de hidrogênio é aumentada no primeiro caso (2,5 U/mL / 2350 U/mL) devido à maior presença de enzima no reator com membrana.

Figura 5.54: Concentração de peróxido de hidrogênio ($[H_2O_2]$) na saída do reator com membrana ao variar-se a concentração de glicose oxidase e catalase, respectivamente, em 0,5 U/mL / 470 U/mL ($\square$), 1,0 U/mL / 940 U/mL ($\diamond$) e 2,5 U/mL / 2350 U/mL (Δ) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

Conclui-se que para controlar a inibição por peróxido de hidrogênio é necessário otimizar o processo através da definição das condições

operacionais (vazão específica, concentração de GO e concentração de catalase). Para 50 mM de glicose, esta condição operacional deve ser $6,0 \text{ h}^{-1}$, $0,5 \text{ U/mL}$ de GO e 470 U/mL de catalase.

Avaliaram-se três condições de variação da concentração de glicose oxidase, mantendo-se a concentração de catalase em 2350 U/mL . Assim, utilizaram-se $0,25 \text{ U/mL}$, $1,0 \text{ U/mL}$ e $2,5 \text{ U/mL}$ de glicose oxidase adicionado ao reator com membrana contendo 2350 U/mL de catalase.

Os resultados apresentados na figura 5.55 confirmam a influência da concentração de glicose oxidase sobre a atividade enzimática e, conseqüentemente, o grau de conversão resultante para a oxidação da glicose. Assim, mesmo diante de concentrações superiores de catalase, a menor concentração de glicose oxidase (GO) favoreceu a reação enzimática através do maior controle da inibição pelo peróxido de hidrogênio. Ao compararem-se os resultados utilizando a proporção 1:940 (Figuras 5.53 e 5.54) com os apresentando proporção 1:2350 (Figuras 5.55 e 5.56) é possível observar que o aumento na concentração de catalase teve efeito favorável sobre a concentração de peróxido de hidrogênio no início do processo, que teve seu valor reduzido de $18,2 \text{ mM}$ para $15,5 \text{ mM}$.

Conclui-se que para que se tenha a bioconversão completa de 50 mM de sacarose através de processo multienzimático se faz necessário estabelecer as seguintes condições operacionais: $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$, $GO = 0,5 \text{ U/mL}$, $Catalase = 470 \text{ U/mL}$ e $Invertase = 24 \text{ U/mL}$.

Figura 5.55: Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (X - $\blacklozenge$) e taxa de conversão para a oxidação da glicose resultante (Y) ao variar-se a concentração de glicose oxidase, respectivamente, em 0,25 U/mL (Δ), 1,0 U/mL ($\square$) e 2,5 U/mL ($\diamond$) para o processo multienzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), concentração de catalase (2350 U/mL), pH 5,5, 30°C e $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

Figura 5.56: Concentração de peróxido de hidrogênio ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) na saída do reator com membrana ao variar-se a concentração de glicose oxidase e catalase, respectivamente, em 0,25 U/mL ($\diamond$), 1,0 U/mL (Δ) e 2,5 U/mL ($\square$) para o processo multi-

enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), concentração de catalase (2350 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

Avaliou-se, por fim, a bioconversão da sacarose 100 mM em frutose e ácido glicônico utilizando o processo multi-enzimático em reator com membrana. Para tanto, repetiram-se as melhores condições observadas para o estudo utilizando 50 mM de sacarose. Assim, se efetuaram dois testes utilizando, respectivamente, 0,5 U/mL de GO e 470 U/mL de catalase e 0,25 U/mL de GO e 235 U/mL de catalase.

Figura 5.57: Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (S) (X - ♦) e taxa de conversão para a oxidação da glicose (G) resultante (Y) ao variar-se a concentração de glicose oxidase (GO) e catalase (C), respectivamente, em 0,5 U/mL / 470 U/mL (◇) e 0,25 U/mL / 235 U/mL (□) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 50 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (I) (24 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

Ao dobrar-se a concentração de sacarose alimentada, a conversão enzimática efetuada pela invertase (hidrólise da sacarose) não foi afetada, como indicam os resultados apresentados na figura 5.57. Entretanto, a presença de maior concentração de glicose no meio reacional (produto da reação de hidrólise e substrato para a glicose oxidase) promoveu uma queda na conversão enzimática efetuada pela glicose oxidase. Assim, ao utilizarem-se as mesmas condições, previamente otimizadas para a concentração de 50 mM de sacarose ($GO = 0,5 \text{ U/mL}$, $C = 470 \text{ U/mL}$, $I = 24 \text{ U/mL}$, $6,0 \text{ h}^{-1}$, pH 5,5, 30°C e 100 rpm), a oxidação da glicose teve sua conversão reduzida para uma média 57% após o estabelecimento do regime permanente.

Figura 5.58: Logaritmo da velocidade específica de reação para a invertase ($\text{Ln } r_I$) (◆), logaritmo da velocidade específica de reação para a glicose oxidase ($\text{Ln } r_{GO}$) (■) e logaritmo da velocidade específica de reação para a catalase ($\text{Ln } r_C$) (▲) em função do tempo de processo ao empregar-se, respectivamente, 24 U/mL, 0,5 U/mL e 470 U/mL destas enzimas e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C e 100 rpm.

A figura 5.58 apresenta os dados referentes à velocidade específica de reação para as três enzimas empregadas no processo multi-enzimático (invertase, glicose oxidase e catalase) quando utilizando as condições otimizadas. Os resultados indicam que não ocorre perda de atividade enzimática no decorrer do processo para nenhuma das enzimas utilizadas, sendo que, para a glicose oxidase a velocidade específica de reação (r_{GO}) manteve-se constante ao atingir o regime permanente (12 horas de processo). Entre as alternativas para tentar estabelecer a conversão completa da glicose em ácido glicônico tem-se a variação da concentração das enzimas glicose oxidase e catalase ou da vazão específica empregada. Diante da limitação no aumento da vazão específica, devido o aumento da pressão interna do sistema *Bioengineering*®, a única alternativa passa a ser avaliar a possibilidade de reduzir a quantidade de enzima presente no reator com membrana para ampliar o valor alcançado para a conversão da glicose.

Figura 5.59: Logaritmo da velocidade específica de reação para a invertase ($\text{Log } r_i$) (◆), logaritmo da velocidade específica de reação para a glicose oxidase ($\text{Log } r_{GO}$) (■) e logaritmo da velocidade específica de reação para a catalase ($\text{Log } r_C$) (▲) em função do tempo de processo ao empregar-se, respectivamente, 24 U/mL, 0,25 U/mL e 235 U/mL destas enzimas e mantendo-se sacarose (50 mM), pH 5,5, 30°C e 100 rpm.

De acordo com a figura 5.59 não ocorre perda da atividade para nenhuma das três enzimas durante o tempo de processo. Entretanto, o regime permanente para a oxidação da glicose pela ação da glicose oxidase só foi alcançado após 17 horas de processo e com valores inferiores à alcançada no teste utilizando, respectivamente, 0,5 U/mL e 470 U/mL de glicose oxidase e catalase.

Ao relacionar-se o grau de conversão estabelecido para os dois testes empregando 100 mM de sacarose com a concentração de peróxido de hidrogênio formada durante o tempo de processo (Figura 5.60) observam-se os mesmos valores de concentração inicial ao utilizar-se 0,5 U/mL (24,2 mM) e 0,25 U/mL (21,1 mM) de glicose oxidase. Entretanto, a concentração média durante o regime permanente foi maior ao empregar-se 0,25 U/mL (2,2 mM) em relação ao teste empregando 0,5 U/mL (1,6 mM). Assim, para vazão específica de $6,0 \text{ h}^{-1}$, o limite na concentração de glicose oxidase parece ser 0,5 U/mL.

Sabendo-se que concentrações de peróxido de hidrogênio superiores a 1,22 mM durante o regime permanente são consideradas inibitórias à conversão enzimática pela glicose oxidase (TOMOTANI *et al.*, 2005) é possível concluir que, para ambas as condições, existirá tal efeito sobre a catálise enzimática. Assim, para reestabelecer a conversão completa da glicose, quando utilizando 100 mM de substrato, se faz necessário um aumento da vazão específica, além de se buscar uma nova concentração de enzimas a serem adicionadas no reator com membrana.

Figura 5.60: Concentração de peróxido de hidrogênio ($[H_2O_2]$) na saída do reator com membrana ao variar-se a concentração de glicose oxidase e catalase, respectivamente, em 0,25 U/mL / 235 U/mL (■) e 0,5 U/mL / 470 U/mL (◊) para o processo multi-enzimático em reator com membrana empregando-se 100 mM de sacarose e mantendo-se concentração de invertase (24 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

Como forma de se reduzir o custo do processo de bioconversão enzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico foi avaliado o uso de substrato de menor grau de pureza. Para tanto, se empregou açúcar mascavo, cuja concentração de sacarose foi previamente calculada e a solução preparada para que se mantivesse a mesma condição otimizada ao utilizar sacarose pura.

De acordo com a figura 5.61 se pode observar que a presença de impurezas afetou o grau de conversão para a oxidação da glicose. Assim, ao empregar açúcar impuro o regime permanente é estabelecido com um grau de conversão em torno de 60%, tendo sido obtido concentrações de ácido glicônico entre 25 mM e 30 mM. Ao analisarem-se a curva referentes à concentração de peróxido de hidrogênio residual, se observa um aumento na quantidade deste subproduto quando utilizando o açúcar impuro. Assim, para a sacarose PA atingem-se concentrações residuais no regime

permanente em torno de 1,2 mM enquanto para o açúcar mascavo a concentração residual no se estabeleceu em torno de 2,4 mM. Assim, a inibição prevista pela presença de peróxido de hidrogênio ($K_i = 1,22$ mM, TOMOTANI *et al.*, 2005) se tornará preponderante na conversão do açúcar mascavo em frutose e ácido glicônico. Assim, para substituir a sacarose P.A. por algum outro substrato de menor grau de pureza é necessário estabelecer novas condições operacionais devido à presença de maior quantidade de peróxido de hidrogênio residual no sistema enzimático.

Figura 5.61: Concentração de Frutose ([F] - ◆), ácido glicônico ([HG] - ■) e peróxido de hidrogênio ([H₂O₂] - ▲) resultante durante o processo multi-enzimático de bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico utilizando açúcar mascavo (impuro) e mantendo-se as seguintes condições operacionais: S = 50 mM, I = 24 U/mL, GO = 0,5 U/mL, C = 470 U/mL, D = 6,0 h⁻¹, pH 5,5, 30°C e 100 rpm.

5.3.2. Multienzimático com reciclo:

Foi avaliada a possibilidade do uso de biorreatores com membrana e reciclo para a bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico utilizando as enzimas invertase, glicose oxidase e catalase. Para tanto, foram efetuados dois testes visando o reciclo em um único reator ou a passagem por dois reatores com membrana em série.

Tabela 5.20: Condições operacionais dos testes de bioconversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico em biorreator com membrana operando em CSTR.

Teste	G (mM)	I (U/mL)	GO (U/mL)	C (U/mL)	D (h ⁻¹)	T (°C)	pH	Agitação (rpm)	Reciclo
1	100	24	1,0	940	6,0	30	5,5	100	Único Reator
2	100	24	1,0	940	6,0	30	5,5	100	Dois Reatores

Diante das limitações de aplicação de reatores com membrana em único estágio de bioconversão, se avaliou a utilização do reciclo para otimizar a bioconversão de sacarose empregando as enzimas invertase, glicose oxidase e catalase. Existem, basicamente, duas configurações de reciclo para os reatores com membrana (CHERYAN, 1998). Assim, se pode trabalhar com reciclo em apenas um estágio (reator) ou em reatores em série para os chamados processos multienzimáticos. O principal interesse no emprego do reciclo estaria no aumento da conversão enzimática, limitada pela inibição por peróxido de hidrogênio.

A figura 5.62 apresenta os resultados da primeira e segunda (reciclo) passagens por um reator com membrana (*Bioengineering*[®]). Para tanto, ao se utilizar 1,0 U/mL de glicose oxidase, condição onde a inibição por peróxido de hidrogênio está presente, o grau de conversão sofre um incremento de 30 % após a segunda passagem pelo reator com membrana.

Figura 5.62: Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (S) (X - ◆) e taxa de conversão para a oxidação da glicose (G) resultante (Y) para a primeira (■) e segunda (reciclo) (▲) passagens pelo reator com membrana operando em processo multi-enzimático empregando-se 50 mM de sacarose, concentração de invertase (I) (24 U/mL), concentração de glicose oxidase (1,0 U/mL), concentração de catalase (940 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

Através da figura 5.63 se observa que o reciclo aumenta a concentração de peróxido de hidrogênio no meio reacional que salta da média de 1,6 mM para 10 a 11 mM ao final do reciclo (segunda passagem). Este aumento na concentração residual pode indicar a desnaturação da catalase adicionada no reator com membrana e que, portanto, acaba por restringir o aumento na conversão da glicose no processo. Sabe-se que a catalase, apesar de utilizar o peróxido de hidrogênio como substrato, se desnatura na presença do mesmo (KLEPPE, 1966). Assim, sua ação catalítica fica restrita diante de processos com reciclo de produto.

Figura 5.63: Concentração de peróxido de hidrogênio ($[H_2O_2]$) na saída do reator com membrana para a primeira (■) e segunda (reciclo) (▲) passagens pelo reator com membrana operando em processo multi-enzimático empregando-se 50 mM de sacarose, concentração de invertase (I) (24 U/mL), concentração de glicose oxidase (1,0 U/mL), concentração de catalase (940 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

A avaliação do uso de reatores com membrana em série como alternativa para aumentar o grau de conversão no processo de bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico foi avaliado com a passagem de sacarose 50 mM em reator com membrana tendo seu produto sido recolhido e utilizado como substrato em uma segunda passagem por um reator com membrana, ambos, sob as mesmas condições operacionais (24 U/mL invertase, 1,0 U/mL de GO, 940 U/mL catalase, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$, pH 5,5, 30°C e 100 rpm).

Figura 5.64: Taxa de conversão para a hidrólise da sacarose (S) (X - ◆) e taxa de conversão para a oxidação da glicose (G) resultante (Y) para a passagem pelo primeiro (■) e segundo (▲) reator com membrana operando em processo multi-enzimático empregando-se 50 mM de sacarose, concentração de invertase (I) (24 U/mL), concentração de glicose oxidase (1,0 U/mL), concentração de catalase (940 U/mL), pH 5,5, 30°C, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$.

De acordo com a figura 5.64, a passagem em reatores com membrana em série favorece a bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico. Assim, após a passagem pelo segundo reator, a conversão aumenta em 50%, atingindo 65% de conversão após atingir o regime permanente (16 h). O melhor resultado, quando comparado ao grau de conversão resultante do reciclo em apenas um reator com membrana pode ser justificado pela inativação de maior quantidade de glicose oxidase no primeiro caso, onde parte da enzima já estava inativa desde a primeira passagem do substrato. Como, ao trabalhar-se com reator em série tem-se o conteúdo enzimático adicionado no segundo reator totalmente ativo, menor quantidade de enzima estará inativa neste reator.

Conclui-se que o reciclo de produto favorece a bioconversão enzimática para o processo estudado sendo uma alternativa a ser avaliada quando da necessidade de se aumentar o grau de conversão. Assim, de acordo com os

dados aqui descritos, para se otimizar o processo de bioconversão da sacarose empregando invertase, glicose oxidase e catalase solúveis em reator com membrana é necessário estabelecer uma proporção adequada para as enzimas (invertase/glicose oxidase/catalase), ajustar-se a vazão específica (D) e, quando necessário, estabelecer o reciclo de produto através da passagem por reatores com membrana operando em série e CSTR.

5.4. Separação dos produtos:

Como produtos da bioconversão da sacarose utilizando as enzimas invertase e glicose-oxidase tem-se uma mistura, no caso de conversão total, de frutose e ácido glicônico. Para que o processo estudado se torne viável é necessário se estabelecer um método de separação eficiente para estes produtos.

O método de separação mais utilizado na produção de ácido glicônico e gliconato de cálcio por via fermentativa é por cristalização de soluções supersaturadas abaixo de 30°C (PENNA, 2001). Por se tratar de um método de separação relativamente simples, de baixo custo e já empregado em outros processos de obtenção para o ácido glicônico e seus derivados, mostrou-se interessante avaliar a separação do ácido glicônico e frutose por cristalização.

A separação do ácido glicônico (HGI) se deu através de sua neutralização utilizando hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), conforme a reação a seguir:

A reação de neutralização tem como produto o gliconato de cálcio (CaGI) que cristaliza e precipita quando em saturação no meio. Estabeleceram-se as condições de cristalização do gliconato de cálcio em meio com presença de frutose.

Os testes consistiram de duas etapas distintas, a citar-se a primeira etapa como sendo a neutralização do ácido glicônico e a segunda etapa como sendo a cristalização fracionada do gliconato de cálcio na presença de hidróxido de cálcio.

5.4.1. Neutralização do Ácido Glicônico (1000 mM) em presença de Frutose:

Foram efetuadas as neutralizações de soluções de ácido glicônico nas concentrações de 0,10, 0,25, 0,50 e 1,00 M com a adição de hidróxido de

cálcio até a água-mãe atingir o pH 7,0. Definiu-se a concentração igual a 1,0 M como a mais indicada para a neutralização do ácido glicônico resultando em um rendimento, na cristalização, da ordem de 84% após 24 horas mantido em 10°C.

Tabela 5.21: Variação da concentração de ácido glicônico neutralizado até pH 7,0 e sob 30°C e rendimento obtido durante cristalização de 24 horas a 10°C.

Teste	[AG] (M)	m _{Gliconato} (g)	η (%)	Δ Ca(OH) ₂ (g)	pH	T (°C)
N1	0,10	0,006	0,6	1,86	7,0	30
N2	0,25	0,035	1,4	1,74	7,0	30
N3	0,50	0,028	0,6	1,83	7,0	30
N4	1,00	6,273	88,7	1,69	7,0	30

Buscando avaliar o efeito da quantidade de de hidróxido de cálcio adicionado para a neutralização, efetuaram-se quatro testes adicionando o sal à água-mãe até atingirem-se os valores de pH 5,0, 6,0, 7,0 e 10. O tempo de cristalização utilizado foi de 24 horas na temperatura de 10°C e os resultados estão expressos na Tabela 5.22.

Tabela 5.22: Variação da concentração de hidróxido de cálcio utilizado na neutralização e sob 30°C e rendimento obtido (η).

Ensaio	pH	[AG] (M)	m _{Gliconato} (g)	η (%)
N9	5,0	1,0	8,43	85,9
N10	6,0	1,0	10,41	100,0
N11	7,0	1,0	6,68	68,1
N12	10,0	1,0	1,88	19,2

Observa-se através da tabela 5.22 que a cristalização será favorecida pela adição de hidróxido de cálcio até que a água-mãe atinja pH 6,0.

5.4.2. Cristalização do Gliconato de Cálcio em presença de Frutose:

Os dois principais parâmetros a serem avaliados para que se obtenha uma cristalização adequada são o tempo e temperatura em que a mesma é efetuada.

A massa de hidróxido de cálcio teórico corresponde ao que foi adicionado durante a neutralização enquanto a massa de cálcio real corresponde à quantidade existente na água-mãe após a cristalização do gliconato. Para a cristalização em meio não tamponado a 8°C, a massa total de cristais obtidos ficou em 19,26g após 48 horas de tempo de cristalização. A massa de Frutose somada com a de Ácido Glicônico adicionados dissolvidos em água destilada foi de 18,816g (9,008 g de frutose e 9,808g de ácido glicônico). Com a reação de neutralização, teremos na solução cerca de 9,86g de gliconato de cálcio. Tendo-se uma massa de cristais de, aproximadamente, 19g pode-se concluir que também ocorreu a cristalização da frutose sob a forma de "frutonato de cálcio".

O frutonato de cálcio não é descrito como produto comercial no *Merck Index* e, em realidade, se trata de um complexo que se forma entre as moléculas de frutose e os íons cálcio contidos na água-mãe. A lavagem dos cristais após cristalização deverá minimizar o arraste de frutose.

Tabela 5.23: Relação entre a massa teórica (m^T_{cristais}) e real (m^R_{cristais}) de cristais e o rendimento em cristais (η) obtidos para a separação do gliconato de cálcio na presença de frutose efetuados a 8°C e 30°C por 48 horas e sem lavagem de cristais.

T (°C)	m^T_{cristais} (g)	m^R_{cristais} (g)	η (%)
8	8,5	19,26	227
30	7,6	18,92	249

De acordo com os resultados apresentados pela figura 5.65, faz-se necessário um tempo de cristalização de 48 horas para que o máximo de

cristais de gliconato de cálcio seja obtido, atingindo um rendimento em cristais na ordem de 57%.

Figura 5.65: Rendimento de cristais (η) em função do tempo para a cristalização do gliconato de cálcio a partir de uma solução 1 M de ácido glicônico em meio tamponado e com etapa de lavagem de cristais após a separação. Cristais obtidos após manter-se pelo tempo estudado à 8°C.

6. CONCLUSÕES:

- Para a hidrólise da sacarose em reator com membrana e empregando a enzima comercial *Bioinvert*[®] se definiu como a melhor condição a utilização de $[S] = 100 \text{ mM}$, $[I] = 6,0 \text{ U/mL}$, $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$, 35°C e $\text{pH } 5,5$. Estas condições geram uma conversão média (X) de 97% e uma velocidade de reação (r) de $13,0 \text{ mmol/U.h}$. Devido ao efeito de desagregação das formas oligoméricas, ao aumentar-se a vazão específica (D) se fez necessário aumentar a concentração enzimática no interior do reator.
- Para a oxidação da glicose em reator com membrana se definiu como a melhor condição a utilização de $[G] = 20 \text{ mM}$, $[GO] = 10 \text{ U/mL}$, $[C] = 200 \text{ U/mL}$, $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$, 30°C e $\text{pH } 5,5$. Estas condições geram uma conversão média (Y) de 90% a uma taxa de reação para a glicose-oxidase (r_{GO}) de $0,0036 \text{ mmol/U.h}$ e para a catalase (r_C) de $0,00015 \text{ mmol/U.h}$. Devido ao efeito inibitório pela presença do peróxido de hidrogênio (subproduto da catálise enzimática) se faz necessário estabelecer um balanço adequado entre a concentração de glicose oxidase, catalase e vazão específica (D) empregados de forma a minimizar tal efeito sobre a inativação da enzima GO.
- Para a bioconversão multienzimática da sacarose definiram-se as seguintes condições operacionais para o reator com membrana: $[G] = 50 \text{ mM}$, $[GO] = 0,5 \text{ U/mL}$, $[C] = 470 \text{ U/mL}$, $D = 6,0 \text{ h}^{-1}$, 30°C e $\text{pH } 5,5$. Estas condições geram a conversão completa da sacarose ($X = 100 \%$) e da glicose resultante ($Y = 100\%$) após 15 horas de processo e a uma velocidade específica de reação para a invertase (r_I), glicose-oxidase (r_{GO}) e catalase (r_C) de, respectivamente, $4,20 \text{ mmol/U.h}$, $0,600 \text{ mmol/U.h}$ e $0,00062 \text{ mmol/U.h}$.

- Sobre a separação dos produtos foi comprovado a viabilidade da cristalização na separação da frutose e gliconato de cálcio obtido a partir da neutralização do ácido glicônico utilizando hidróxido de cálcio. Ao se utilizarem concentração de ácido glicônico (AG) igual a 1 M, adicionando hidróxido de sódio (NaOH) até pH final 6,0 a 30°C e 100 rpm de agitação, seguido de cristalização (8°C, 48 h) obtém-se rendimento de 57% em cristais de gliconato de cálcio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO-NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL NETTO, W., LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; coords. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.3, 411p.

ALFANI, F.; CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; VITOLO, M. Biocatalyst operational stability: a review of investigation methods in ultrafiltration membrane reactors. **Revista de Farmácia e Química**, v.32, n.4, p.17-23, 1999.

ALFANI, F.; CANTARELLA, M.; SPERA, A.; VIPARELLI, P. Operational stability of *Brevibacterium imperialis* CBS 489-74 nitrile hydratase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, p.687-697, 2001.

ALMEIDA CUNHA, B.C.; VITOLO, M. Effect of viscosity on sucrose hydrolysis catalized by invertase obtained from *S. cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p.811-813, 1984.

ALVISE, N.P.; LAMBERT, C.L.; BAZUS, A.F.; FERTIN, B.; DHULSTER, P.; GUILLOCHON, D. Continuous enzymatic solubilization of alfafa proteins in an ultrafiltration reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.380-391, 2004.

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

AZEVEDO, D.C.S.; RODRIGUES, A.E. Design methodology and operation of a simulated moving bed reactor for the inversion of sucrose and glucose-fructose separation. **Chemical Engineering Journal**, v.82, p.95-107, 2001.

BAHAR, T.; TUNCEL, A. Immobilization of invertase onto crosslinked poly(p-chloromethylstyrene) beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v.83, p.1268-1279, 2002.

BAO, J.; FURUMOTO, K.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucoseoxidase for production of calcium gluconate. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p.91-102, 2001.

BAO, J.; FURUMOTO, K.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Average and local oxygen transfer properties in bubble column with axial distribution of immobilized glucose oxidase gel beads. **Chemical Engineering Science**, v.55, p.5405-5414, 2000.

BAO, J.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.69-72, 2003.

BAO, J.; KOUMATSU, K.; ARIMATSU, Y.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on crystallization of calcium gluconate in external loop airlift column and stirred tank for an immobilized glucose oxidase reaction with crystallization. **Biochemical Engineering Journal**, v.15, p.177-184, 2003.

BAO, J.; KOUMATSU, K.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Optimal operation of an integrated bioreaction-crystallization process for continuous production of calcium gluconate using external loop airlift columns. **Chemical Engineering Science**, v.56, p.6165-6170, 2001.

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

BARCENA, J.M.B.; LUCCA, M.E.; SENERIZ, F.; RAMON, D. pH regulation of enzyme production in *Aspergillus niger* growing in aerobic batch fermenter. **Biotechnology Letters**, v.245, p.567-572, 2002.

BARLIKOVA, A.; MIERTUS, S. Hybrid biosensor for the determination of sucrose. **Analytica Chimica Acta**, v.247, p.83-87, 1991.

BARMAN, T.E. **Enzyme handbook**. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1969. v.1, p.112-113.

BAYRAMOGLU, G.; AKGOL, S.; BULUT, A.; DENIZLI, A.; YAKUP ARICA, M. Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, n.2, p.117-126, 2003.

BELAFI-BAKO, KB; KOUTINAS, A; NEMESTOTHY, N; GUBICZA, L; WEBB, C. Continuous enzymatic cellulose hydrolysis in a tubular membrane bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.155-161, 2006.

BELFORT, G. Membranes and bioreactors: a technical challenge in biotechnology. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, p.1047-1066, 1989.

BELHOCINE, D.; MOKRANE, H.; GRIB, H.; LOUNICI, H.; PAUSS, A.; MAMERI, N. Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v.76, p.189-196, 2000.

BELHOCINE, D; MOKRANE, H; GRIB, H; LOUNICI, H; PAUSS, A, MAMERI, N. Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v.76, n.3, p.189-196, 2000.

BELTRAME, P., ZURETTI, G. Kinetics of the reaction of naphthalene with benzyl alcohol over a Nafion-silica composite, as a function of temperature. **Applied Catalysis A – General**, v.268, n.1-2, p. 169-174, 2004.

BERGMAYER, H.U.; BERGMAYER, J.; GRASSL, M., eds. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, 1984. v.2, 539p.

BIELLA, S.; PRATI, L.; ROSSI, M. Selective oxidation of D-glucose on gold catalyst. **Journal of Catalysis**, v.206, n.2, p.242-247, 2002.

BODALO, A.; GOMEZ, J.L.; GOMES, E.; MAXIMO, M.F.; MONTIEL, M.C. Study of L-aminoacylase deactivation in an ultrafiltration membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.261-266, 2004.

BOMMARIUS, A. Biotransformations and enzyme reactors. In: REHM, H.J.; REED, G.; PUHLER, A.; STADLER, P.; STEPHANOPOULOS, G., eds. **Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise**. 2.ed. Weinheim, New York: VCH, 1993. p.427-466. [Bioprocessing, v.3].

BOONTAWAN, D; STUCKEY, C. A membrane bioreactor for the biotransformation of α -pirene oxide to isonovalal by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. **Biotechnological Products and Process Engineering**, v.69, p.649-649, 2006.

BOSHOF, A.; BURTON, M.H.; BURTON, S.G. Optimization of catechol production by membrane-immobilized polyphenol oxidase: a modeling approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v.83, n.1, p.1-7, 2003.

BOUIN, J.C.; ATALLAH, M.T.; HULTIN, H.O. The glucose oxidase–catalase system. **Methods in Enzymology**, v.44, p.478-488, 1976.

BOUIN, J.C.; DUDGEON, P.H.; HULTIN, H.O. Effect of enzyme ratio and pH on the efficiency of an immobilized dual catalyst of glucose oxidase and catalase. **Journal of Food Science**, v.41, p.886-890, 1976.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley, 1978. 653p. (Wiley series in probability and mathematical statistics).

BRAHIM, S.; NARINESING, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Kinetics of glucoseoxidase immobilized in p(HEMA)-hydrogel microspheres in a packed-bed bioreactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.18, n.1/3, p.69-80, 2002.

BREDA, M.; VITOLO, M.; DURANTI, M.A.; PITOMBO, R.N.M. Effect of freezing-thawing on invertase activity. **Cryobiology**, v.29, p.281-290, 1992.

BRIGHT, H. The oxidation of l-deuterated glucose by glucose oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.5, p.994-1003, 1967.

BYHLIN, H.; JONSSON, A.S. Influence of adsorption and concentration polarization on membrane performance during ultrafiltration of a non-ionic surfactant. **Desalination**, v.151, p.21-31, 2002.

CALABRÓ, V.; CURCIO, S.; IORIO, G. A theoretical analysis of transport phenomena in a hollow fiber membrane bioreactor with immobilized biocatalyst. **Journal of Membrane Science**, v.206, p.217-241, 2002.

CANTARELLA, M.; SPERA, A.; CANTARELLA, L.; ALFANI, F. Acrylamide production in an ultrafiltration membrane bioreactor using cells of *Brevibacterium imperialis* CBS 489-74. **Journal of Membrane Science**, v.147, p.279-290, 1998.

CASTELLAN, G.W. **Fundamentos de físico-química**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1986. 527p.

CATALDI, T.R.I.; CAMPA, C.; CASELLA, I.G. Study of sugar acids separation by high performance anion-exchange chromatography – pulsed amperometric detection using alkaline eluents spiked with Ba^{+2} , Sr^{2+} or Ca^{2+} as acetate or nitrate salts. **Journal of Chromatography, A**, v.848, p.71-81, 1999.

CHERYAN, M. Biotechnology applications. In: _____. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. 527p.

CHIANG, W.D.; SHIH, C.J.; CHU, Y.H. Functional properties of soy hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. **Food Chemistry**, v.65, p.189-194, 1999.

COKER, L.E.; VENKATASUBRAMANIAN, K. Corn sweeteners. In: KNORR, D., ed. **Food biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987. 613p. (Food science and technology, 21).

COKER, L.E.; VENKATASUBRAMANIAN, K. High fructose corn syrup. In: CHEREMISINOFF, P.N.; QUELLETTE, R.P., eds. **Biotechnology: applications and research**. Lancaster: Technomic Publishing, 1985a. 699p.

COKER, L.E.; VENKATASUBRAMANIAN, K. Starch conversion processes. In: MOO-YOUNG, M.; DREW, S.; WANG, D.I.C.; BLANCH, W.H.W., eds. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications, and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford, New York: Pergamon Press, 1985b. [The practice of biotechnology: bulk commodity products, v.3].

COLE-HAMILTON, D.J. Homogeneous catalysis: new approaches to catalyst separation, recovery and recycling. **Science**, v.299, n.5613, p.1702-1706, 2003.

CRABB, W.D.; BOLIN, J. Protein technologies and commercial enzymes. **Biotechnology**, v.10, p.321-323, 1999.

CRUEGER, A.; CRUEGER, W. Carbohydrates. In: REHM, H.J.; REED, G.; KIESLICH, K., ed. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes**. Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, 1984. [Biotransformations, v.6a].

CRUEGER, A.; CRUEGER, W. Glucose transforming enzymes. In: FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T., eds. **Microbial enzymes and biotechnology**. 2.ed. London, New York: Elsevier Applied Science, 1990. p.178-226. (Elsevier Applied biotechnology series).

CURCIO, S.; CALABRÓ, V.; IORIO, G. An experimental analysis of membrane bioreactor performances with immobilized chymosin. **Journal of Membrane Science**, v.173, p.247-261, 2000.

CURCIO, S.; CALABRÓ, V.; IORIO, G. Monitoring and control of TMP and feed flow rate pulsatile operations during ultrafiltration in a membrane module. **Desalination**, v.146, p.217-222, 2002.

DENG, H; XU, Z; DAI, Z; WU, J; SETA, P. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on polypropylene microfiltration membrane modified by glycopolymer:

DÍAZ, EG; CATANA, R; FERREIRA, BS; LUQUE, S; FERNANDES, P; CABRAL, JMS. Towards the development of a membrane reactor for enzymatic inulin hydrolysis. **Journal of Membrane Science**, v.273, p.152-158, 2006.

DOELLE, M.B.; DOELLE, H.W. High fructose formation from sugarcane syrup and molasses using *Zymomonas mobilis* mutants. **Biotechnology Letters**, v.13, n.12, p.875-878, 1991.

DONEVA, T.; VASSILIEFF, C.; DONEV, R. Catalytic and biocatalytic oxidation of glucose to gluconic acid in a modified three-phase reactor. **Biotechnology Letters**, v.21, p.1107-1111, 1999.

ERZINGER, G.S. **Produção biotecnológica de sorbitol e ácido glicônico por *Z. mobilis* ATCC 29191**: estudo da estabilidade da enzima glicose-frutose oxidoreductase. São Paulo, 2000. 141p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ERZINGER, G.S.; SILVEIRA, M.M.; VITOLO, M.; JONAS, R. Determination of glucose-fructose oxidoreductase activity in whole cells of *Z. mobilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, n.1, p.22-24, 1996.

ESMON, PC; ESMON, BE; SCHAUER, IE; TAYLOR, A; SCHEKMAN, R. Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.9, p.4387-4394, 1987.

FANE, A.; CHANG, S. Membrane bioreactors: design & operational options. **Filtration & Separation**, p.26-29, 2002. Disponível em: www.filtsep.com. Acesso em: 20/10/2006.

FANG, M.; GRANT, P.S.; McSHANE, M.J.; SUKHORUKOV, G.B.; GOLUB, V.O.; LVOV, Y.M. Magnetic bio/nanoreactor with multilayer shells of glucose oxidase and inorganic nanoparticles. **Langmuir**, v.18, n.16, p.6338-6344, 2002.

FARINE, S.; VERSLUIS, C.; BONNICI, P.J.; HECK, A.; PESCHET, J.L.; PUIGSERVER, A. Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography, A**, v.920, p.299-308, 2001.

FERNANDES, FAN; SOARES, AB. Modeling of methane steam reforming in a palladium membrane reactor. **Latin American Applied Research**, v.36, n.3, p.155-161, 2006.

FILHO, U.C.; HORI, C.E.; RIBEIRO, E.J. Influence of the reaction products in the inversion of sucrose by invertase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.16, n.2, p.1-7, 1999.

FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T., eds. **Microbial enzymes and biotechnology**. 2.ed. London, New York: Elsevier Applied Science, 1990. 472p. (Elsevier Applied biotechnology series).

GALLIFUOCO, A.; ALFANI, F.; CANTARELLA, M.; SPAGNA, G.; PIFFERI, P.G. Immobilize β -glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. **Process Biochemistry**, v.35, p.179-185, 1999.

GAN, Q.; ALLEN, SJ; TAYLOR, G. Analysis of process integration and intensification of enzymatic cellulose hydrolysis in a membrane bioreactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.80, p. 688-698, 2005.

GIORNO, L.; DRIOLI, E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v.18, n.8, p.339-349, 2000.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2.ed. London: Macmillan, 1996. 609p.

GORDON, L.; VARGA, M.G.; DOMINGUEZ, E.; EMNÉUS, J. Analysis of mono-, oligo- and polysaccharides by enzyme reaction detection. In: LAM, S.; MALIKIN, G., eds. **Analytical applications of immobilized enzyme**

reactors. London, Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1994. p.51-130.

GOVENDER, S.; JACOBS, E.P.; LEUKES, W.D.; PILLAY, V.L. A scalable membrane gradostat reactor for enzyme production using *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, v.25, n.2, p.127-131, 2003.

GUISEPPI-ELIE, A.; SHEPPARD, N.F.; BRAHIM, S. Enzyme microgels in packed-bed bioreactors with downstream amperometric detection using microfabricated interdigitated microsensor electrode assays. **Biotechnology and Bioengineering**, v.75, n.4, p.475-484, 2001.

GUJRAL, H.S.; ROSELL, C.M. Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. **Food Research International**, v.37, p.75-81, 2004.

HOSSEINKHANI, S.; RANJBAR, B.; NADERI-MANESH, H.; NEMAT-GORGANI, M. Chemical modification of glucose oxidase: possible formation of molten globule-like intermediate structure. **FEBS Letters**, v.561, p.213-216, 2004.

hydrolysis of olive oil in biphasic bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.996-1002, 2006.

ILLANES, A. **Biotecnologia de enzimas**. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.

ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. **European Polymer Journal**, v.39, p.2375-2381, 2003.

IWAN, P.; GOETZ, G.; SCHMITZ, S.; HAUER, B.; BREUER, M.; POHL, M. Studies on the continuous production of (R)-(-)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, p.387-396, 2001.

JIANG, T.; KENNEDY, M.D.; van der MEER, W.G.J.; VANROLLEGHEM, P.A.; SCHIPPERS, J.C. The role of blocking and cake filtration in MBR fouling. **Desalination**, v.157, n.1/3, p.335-343, 2003.

JUNGBUNZLAUER. Products & Applications. Products. Gluconic Acid. Disponível em: <http://www.jungbunzlauer.com/products-applications/products/gluconates.html>. Acesso em: 20/10/2003.

KANG, I.J.; LEE, C.H.; KIM, K.J. Characteristics of microfiltration membranes in a membrane coupled sequencing batch reactor system. **Water Research**, v.37, p.1192-1197, 2003.

KAPAT, A.; JUNG, J.; PARK, Y. Enhancement of extracellular glucose oxidase production in pH-stat feed back controlled fed-batch culture of

recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v.20, n.7, p.683-686, 1997.

KAPAT, A.; JUNG, J.; PARK, Y. Improvement of extracellular recombinant glucose oxidase production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: effect of different feeding strategies. **Biotechnology Letters**, v.20, n.3, p.319-323, 1998.

KLEPPE, K. The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biochemistry**, v.5, n.1, p.139-143, 1966.

KNORR, D. Food Biotechnology. In: **Food Science and Technology**, New York: M. Dekker, 1987. v.21, p.613

KOTER, I.; CEYNOWA, J. Kinetic resolution of chiral alcohols in bifunctional membrane exhibiting enzyme activity and enantioselective permeation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.24/25, p.17-26, 2003.

LIU, X.; NEOH, K.G.; CEN, L.; KANG, E.T. Enzymatic activity of glucose oxidase covalently wired via viologen to electrically conductive polypyrrole films. **Biosensors & Bioelectronics**, v.19, n.8, p.823-834, 2004.

LUBBERT, A.; JORGENSEN, S.B. Bioreactor performance: a more scientific for practice. **Journal of Biotechnology**, v.85, p.187-212, 2001.

Mac NALLY. Dispensing information: Calcium Gluconate. In: UNITED States Pharmacopeia. 23.ed. Local: US Pharmacopeial Convention, 1995. v.3.

MANSFELD, J.; SCHELLENBERGER, A. Invertase immobilized on macroporous polystyrene: properties and kinetic characterization. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, p.72-78, 1987.

MAROUF, B.A.; ZEKI, L. Isolation and characterization of invertase from Iraqi date fruit. **Journal of Food Science**, v.47, p.678-679, 1982.

MASUDA, M.; KAWASE, Y.; KAWASE, M. Continuous production of sialyllactose from colominic acid using a membrane reactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, n.2, p.119-125, 2000.

MIRON, J.; GONZALEZ, P.; VASQUEZ, J.A.; PASTRANA, L.; MURADO, M.A. A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivation and diffusional effects, and their interactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.513-522, 2004.

MORRIS, J.G. **A biologist's physical chemistry**. London: Edward Arnold, 1972. 350p.

NAKAJIMA, M.; JIMBO, N.; NISHIKAWA, K.; NABETANI, H.; WATANABE, A. Conversion of sucrose by immobilized invertase in an assymetric membrane reactor. **Process Biochemistry**, v.23, n.2, p.32-35, 1988.

NAKAJIMA, M.; JIMBO, N.; NISHIKAWA, K.; NAKAO, S. Forced-flow bioreactor for sucrose inversion using ceramic membrane activated by salinization. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, p.856-861, 1989.

NAKAJIMA, M.; NISHIZAWA, K.; NABETANI, H. A forced flow membrane enzyme reactor for sucrose inversion using molasses. **Bioprocess Engineering**, v.9, n.1, p.31-35, 1993.

NAKAJIMA, M.; WATANABE, A.; NABETANI, H.; HORIKITA, H.; NAKAO, S. New enzyme reactor with forced flow of the substrate through an enzyme immobilized ceramic membrane. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52, n.2, p.357-365, 1988.

NAKAJIMA, S.; OGURA, Y. Action mechanism of glucose oxidase of *Aspergillus niger*. **Journal of Biochemistry**, v.63, n.3, p.308-316, 1968.

NAKAMURA, T.; OGURA, Y. Kinetic studies on the action of glucose oxidase. **Journal of Biochemistry**, v.52, n.3, p.214-220.

NAKAO, K.; KIEFNER, A.; FURUMOTO, K.; HARADA, T. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. **Chemical Engineering Science**, v.52, n.21/22, p.4127-4133, 1997.

NICOL, M.J.; DUKE, F.R. Substrate inhibition with glucose oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.241, n.18, p.4292-4293, 1966.

NOVALIC, S.; KONGBANGKARD, T.; KULBE, K.D. Separation of gluconate with conventional and bipolar electrodialysis. **Desalination**, v.114, p.45-50, 1997.

OHLWEILER, O.A. **Teoria e prática da análise quantitativa inorgânica**. Brasília: Universidade de Brasília, 1968. v.1, p.61.

ONYEZILLI, F.N. Glutaraldehyde activation step in enzyme immobilization on nylon. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, p.399-402, 1987.

OWUSU, RK; MAKHZOUM, A. Heat inactivation of lipase from psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* P38: activation parameters and enzyme stability at low or ultra-high temperatures. **Food Chemistry**, v.44, p.261-266, 1992.

PAL, P.; DATTA, S.; BHATTACHARYA, P. Multi-enzyme immobilization in eco-friendly emulsion liquid membrane reactor: a new approach to membrane formulation. **Separation and Purification Technology**, v.27, p.145-154, 2002.

PANDEY, PC; PANDEY, V. Urease purification from the seeds of cajanus-cajan and its application in a biosensor construction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.31, n.3, p.247-251, 1991.

PAOLUCCI-JENJEAN, D.; BELLEVILLE, M.P.; RIOS, G.M.; ZAKHIA, N. Kinetics of continuous starch hydrolysis in a membrane reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p.233-238, 2000.

PAOLUCCI-JENJEAN, D.; BELLEVILLE, M.P.; ZAKHIA, N. The effect of enzyme concentration and space time on the performance of a continuous recycle membrane reactor for one-step starch hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v.5, p.17-22, 2000.

PAZUR, J.H. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Methods in Enzymology**, v.9, p.82-87, 1966.

PEPPLER, H.J.; REED, G. Enzymes in food and feed processing. In: REHM, H.J.; REED, G.; KENNEDY, J.F., eds. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes**. Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, 1987. [Enzyme technology, v.7a].

PESSOA Jr., A.; KILILIAN, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL Netto, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E., coords. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, p.493-522.

PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.738-749, 1994.

QIAN, JW; CHEN, HL; ZHANG, L; QIN, SH; WANG, M. Effect of compatibility of cellulose acetate/poly(vinyl butyral) blends on pervaporation behavior of their membranes for methanol/methyl tert-butyl ether mixture. **Journal of Applied Polymer Science**, v.83, n.11, p.2434-2439, 2002.

QUEIROZ, A.A.A.; VARGAS, R.R.; HIGA, O.Z.; RIBEIRO, R.R.; VITOLO, M. Lactam-amide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization. **Journal of Applied Polymer Science**, v.84, p.767-777, 2002.

QUEIROZ, A.A.A.; VITOLO, M.; OLIVEIRA, R.C.; HIGA, Z.O. Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. **Radiation Physics and Chemistry**, v.47, n.6, p.873-880, 1996.

RABA, J.; MOTTOLA, H.A. Glucose oxidase as an analytical reagent. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.25, n.1, p.1-42, 1995.

RASIAH, I.A.; SUTTON, K.H.; LOW, F.L.; LIN, H.M.; GERRARD, J.A. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. **Food Chemistry**, v.89, n.3, p.325-332, 2004.

REDDY, A.V.; MacCOLL, R.; MALEY, F. Effect of oligosaccharides and chloride on the oligomeric structures of external, internal and deglycosylated invertase. **Biochemistry**, v.29, p.2482-2487, 1990.

REDDY, V.A.; MALEY, F. Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity, labeling and site-directed mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.19, p.10817-10820, 1990.

RIOS, G.M.; BELLEVILLE, M.P.; PAOLUCCI, D.; SANCHEZ, J. Progress in enzymatic membrane reactors: a review. **Journal of Membrane Science**, v.242, n.1/2, p.189-196, 2004.

ROBINSON, D.S. Peroxidases and catalases in foods. In: ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A.M., eds. **Oxidative enzymes in foods**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1991. 314p.

ROCHA FILHO, J.A.; VITOLO, M. **Enzimas no contexto da síntese orgânica**. São Paulo: Autores, 1998. p.43.

SAHMETLIOGLU, E.; YURUK, H.; TOPPARE, L.; CIANGA, I.; YAGCI, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting copolymers of thiophene functionalized poly(vinyl alcohol) with pyrrole. **Reactive and Functional Polymers**, v.66, p.365-371, 2006.

SALINAS, E.; MORCILLO, P.; SANZ, M.I.; RABA, J. Continuous-flow/stopped-flow system incorporating a rotating bioreactor based on a double redox catalytic cycle and electron transfer mediated by osmium complexes: application in the determination of extremely low levels of glucose. **Instrumentation Science & Technology**, v.30, n.3, p.281-293, 2002. (alterei a ordem dos autores no artigo, de acordo com o SciFinder)

SANKPAL, N.V.; CHEEMA, J.J.S.; KULKARNI, B.D. An artificial intelligence tool for bioprocess monitoring: application to continuous production of gluconic acid by immobilized *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v.23, p.911-916, 2001.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL NETTO, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E., coords. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, p.179.

SCHOEMAKER, H.E.; MINK, D.; WUBBOLTS, M.G. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. **Science**, v.299, p.1694-1697, 2003.

SEGEL, I.H. **Bioquímica: teoria e problemas**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1979. 527p.

SENGUPTA, S.; MODAK, J.M. Optimization of fed-batch bioreactor for immobilized enzyme processes. **Chemical Engineering Science**, v.56, p.3315-3325, 2001.

SHEU, D.C.; DUAN, K.J.; CHENG, C.Y.; BI, J.L.; CHEN, J.Y. Continuous production of high-content fructooligosaccharides by a complex cell system. **Biotechnology Progress**, v.18, n.6, p.1282-1286, 2002.

SHEU, D.C.; LIO, P.J.; CHEN, S.T.; LIN, C.T.; DUAN, K.J. Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of β -fructofuranosidase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1499-1503, 2001.

SHIN, H.S.; KANG, S.T. Characteristics and fates of soluble microbial products in ceramic membrane bioreactor at various sludge retention times. **Water Research**, v.37, n.1, p.121-127, 2003.

SIMIONESCU, C.; POPA, M.I.; DUMITRIU, S. Bioactive polymers. XXX. Immobilization of invertase on the diazonium salt of 4-aminobenzoycellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, n.3, p.361-365, 1987.

SLOMINSKA, L.; SZOSTEK, A.; GRZESKOWIAK, A. Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane bioreactor. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p.423-428, 2002.

SMITH, J.E. **Biotechnology**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 236p.

SMOLENSKY, D.C.; RAYMOND, W.R.; HASEGAWA, S.; MAIER, V.P. Enzymic improvement of date quality. Use of invertase to improve texture and appearance of "Sugar Wall" dates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.26, n.10, p.1523-1528, 1975.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, n.1, p.19-23, 1952.

STARACE, C.; BARFOED, H.C. Enzymes immobilized. In: Encyclopedia of chemical technology. 3.ed. New York: John Wiley, 1970. v.9.

SWOBODA, B.E.P.; MASSEY, V. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biological Chemistry**, v.240, n.5, p.2209-2214, 1965.

TOMOTANI, E.J. **Imobilização da invertase em resina de troca iônica (tipo Dowex): seu uso na modificação da sacarose**. São Paulo, 2002. 161p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

TOMOTANI, E.J. Screening of Dowex® anion-exchange resins for invertase immobilization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113, n.1/3, p.145-160, 2004.

TOMOTANI, E.J.; NEVES, L.C.M.; VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase in membrane bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, n.1/3, p.149-162, 2005.

TRAU, D.; RENNEBERG, R. Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v.1, p.1-9, 2003.

TREVISAN, H.C. **Desenvolvimento de um método de produção de sílica de porosidade controlada e sua utilização na imobilização de proteínas**. Campinas, 1993. 205p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas.

TSE, PHS; GOUGH, DA. Time-dependent inactivation of immobilized glucose-oxidase and catalase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, n.6, p.705-713, 1987.

VASILEVA, N.; GODJEVARGOVA, T. Study of the effect of some organic solvents on the activity and stability of glucose oxidase. **Materials Science & Engineering, C: Biomimetic and Supramolecular Systems**, v.C25, n.1, p.17-21, 2005.

VIDAL, M.P.; BOUHALLAB, S.; HENRY, G.; AIMAR, P. Na experimental study of caseinomacropeptide hydrolysis by trypsin in a continuous membrane reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p.195-202, 2001.

VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972. p.29.

VITOLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*)**. São Paulo, 1979. 136p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

VITOLO, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Invertase activity of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugar cane molasses. I. Steady-state continuous culture tests. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, n.8, p.1229-1235, 1985.

VOGELBUSCH. Technology. 2000. Disponível em: <http://www.vogelbusch.com/technology.htm>. Acesso em: 20/10/2003.

VORAGEN, A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.328-335, 1998.

WANG, S.; ARIMATSU, Y.; KOUMATSU, K.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Gas holdup, liquid circulating velocity and mass transfer properties in a mini-scale external loop airlift bubble column. **Chemical Engineering Science**, v.58, p.3353-3360, 2003.

WANG, S.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Optimal covalent immobilization of glucose oxidase-containing liposomes for highly stable

biocatalyst in bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.83, n.4, p.444-453, 2003.

WENKIN, M.; RUIZ, P.; DELMON, B.; DEVILLERS, M. The role of bismuth as promoter in Pd-Bi catalysts for the selective oxidation of glucose to gluconate. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.180, n.1/2, p.141-159, 2002.

WEST, E; BOYD, JH; ERWIN, AR; WALKER, WD. Pion-pion interactions in π -p reactions at 2.1 BeV/c*. **Physical Review**, v.149, n.4, p.1089-1113, 1966.

WILLNER, I. Biomaterials for sensors, fuel cells, and circuitry. **Science**, v.298, p.2407-2408, 2002.

WINTGENS, T.; ROSEN, J.; MELIN, T.; BREPOLS, C.; DRENSLA, K.; ENGELHARDT, N. Modelling of a membrane bioreactor system for municipal wastewater treatment. **Journal of Membrane Science**, v.216, n.1/2, p.55-65, 2003.

WOLTINGER, J.; DRAUZ, K.; BOMMARIUS, A.S. The membrane reactor in the fine chemicals industry. **Applied Catalysis, A: General**, v.221, p.171-185, 2001.

WOODWARD, J.; ORR, M. Enzymatic conversion of sucrose to hydrogen. **Biotechnology Progress**, v.14, p.897-902, 1998.

YILDIZ, HB; KIRALP, S; TOPPARE, L; YAGCI, Y. Immobilization of glucose oxidase in conducting graft copolymers and determination of glucose amount in orange juices with enzyme electrodes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.37, p.174-178, 2005.

YOSHIMOTO, M.; WANG, S.; FUKUNAGA, K.; WALDE, P.; KUBOI, R.; NAKAO, K. Preparation and characterization of reactive and stable glucose oxidase-containing liposomes modulated with detergent. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.6, p.695-704, 2003.

ZHAO, H.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; LI, Z. Use of the glucose oxidase system for estimation of oxygen transfer rate in a solid-state bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, n.7, p.843-846, 2002.

ZHAO, YJ; ZHONG, J; LI, H; XU, NP; SHI, J. Fouling and regeneration of ceramic microfiltration membranes in processing acid wastewater containing fine TiO₂ particles. **Journal of Membrane Science**, v.208, n.1-2, p.331-341, 2002.

ANEXO A

DECLARAÇÃO DE DISPENSA DE ANÁLISE EM COMITÊ DE ÉTICA

São Paulo, 10 de agosto de 2006.

Aos membros da Banca Examinadora,

Eu, **Luiz Carlos Martins das Neves**, matriculado sob o número **3448102/2** no programa de pós-graduação de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em concordância com meu orientador, **Professor Titular Doutor Michele Vitolo**, declaramos, para os devidos fins, que o projeto de doutorado sob título "Emprego de Reator com Membrana na obtenção de Frutose e Ácido Glicônico a partir da Sacarose" dispensou análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou do Comitê de Ética em Experimentação Animal desta instituição.

Luiz Carlos Martins das Neves

Michele Vitolo

ANEXO B**CURRICULUM VITAE**

Maio/2006

DADOS PESSOAIS

Nome Luiz Carlos Martins das Neves

Filiação Wilson Antônio das Neves e Anailde Martins das Neves

Nascimento 20/11/1976 - São Paulo/SP - Brasil

Carteira de Identidade 258279345 SSP - SP - 24/03/1998

CPF 27393722801

Endereço residencial Rua Belém, 7

Jardim Thelma - São Bernardo do Campo

09853-670, SP - Brasil

Telefone: 011 43582781

Endereço profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 16 - Unidade Semi-Industrial,
laboratório de Enzimologia

Cidade Universitária - São Paulo

05508-000, SP - Brasil

Telefone: 011 30913694

Endereço eletrônico

e-mail para contato : lucaneves@usp.br

e-mail alternativo : lcarlosneves@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2003 Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Emprego de reator com membrana na obtenção de
frutose e ácido glicônico a partir da sacarose
Orientador: Michele Vitolo

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2001 - 2003 Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir
de *S.cerevisiae* W303-181, Ano de obtenção: 2003
Orientador: Michele Vitolo

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico

1995 - 2000 Graduação em Engenharia Química.

Centro Universitário da FEI, FEI, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

ÁREAS DE ATUAÇÃO

1	Engenharia Química
2	Processos Bioquímicos
3	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
4	Tecnologia de Fermentações

IDIOMAS

Compreende	Inglês (Bem) , Espanhol (Bem)
Fala	Inglês (Bem) , Espanhol (Bem)
Lê	Inglês (Bem) , Espanhol (Bem)
Escreve	Inglês (Bem) , Espanhol (Bem)

PRÊMIOS E TÍTULOS

2005 Melhor trabalho na área de Fármaco e Medicamentos - XX Seminário de Pós-Graduação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

PRODUÇÃO EM C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. NEVES, L. C. M., OLIVEIRA, K. S., KOBAYASHI, M. J., PENNA, T. C. V., CONVERTI, A.
Biofiltration Methods for the removal of Phenolic Residues. Applied Biochemistry and Biotechnology. , v.129-13, p.130 - 152, 2006.
2. TOMOTANI, E. J., NEVES, L. C. M., VITOLO, M.
Oxidation of Glucose to Gluconic Acid by glucose oxidase in a membrane bioreactor. Applied Biochemistry and Biotechnology. , v.121-12, p.149 - 162, 2005.
3. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., VITOLO, M.
Production of glucose-6-phosphate dehydrogenase from genetically modified Saccharomyces cerevisiae grown by batch fermentation process. Biotechnology Progress. , v.21, p.1136 - 1139, 2005.

4. NEVES, L. C. M., VITOLO, M., PESSOA JUNIOR, A.
Comparação entre métodos mecânicos para romper células de levedura.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas São Paulo. , v.39, p.160 - 163,
2003.

5. MIGUEL, A. S. M., NEVES, L. C. M., VITOLO, M., PESSOA JUNIOR, A.
Effect of Flow Rate Pattern on glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
synthesis in Fed-Batch Culture of Recombinant *Saccharomices cerevisiae*.
Biotechnology Progress. , v.19, p.320 - 324, 2003.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (completo)

1. NEVES, L. C. M., MIYAMURA, T., MORAES, D. A., PENNA, T. C. V.,
CONVERTI, A.
Phenolic Compounds degradation by biofiltration techniques In: V Congresso
Brasileiro de Pesquisas Ambientas e Saúde, 2005, Santos.
V Congresso Brasileiro de Pesquisas Ambientas e Saúde. Santos:
Núcleo Brasileiro de Pesquisas Ambientais e Saúde, 2005.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. NEVES, L. C. M., OLIVEIRA, K. S., KOBAYASHI, M. J., PENNA, T. C. V.,
CONVERTI, A.
Biosurfactants production by *Bacillus atrophaeus* ATCC9372 and *Bacillus subtilis* W strains in TSB (Tryptone Soya Broth) culture media enriched:
Influence of glucose, soy flour and casein digested In: 28th Symposium on
Biotechnology for fuels and chemicals, 2006, Nashville.
**Program and Abstracts - 28th Symposium on Biotechnology for fuels
and chemicals.** , 2006.

2. NEVES, L. C. M., VITOLO, M.
Membrane Bioreactor used for the conversion of Sucrose in Fructose and
Gluconic Acid In: 28th Symposium on biotechnology for fuels and chemicals,
2006, Nashville.
**Program and Abstracts - 28th Symposium on biotechnology for fuels
and chemicals.** , 2006. p.107 -

3. NEVES, L. C. M., OLIVEIRA, K. S., KOBAYASHI, M. J., CHOLEWA, O.,
PENNA, T. C. V.
Optimization of culture media composition to produce biosurfactants by
Bacillus atrophaeus ATCC9372 and *Bacillus subtilis* W In: 106th General
Meeting of American Society for Microbiology, 2006, Orlando.
106th General Meeting of American Society for Microbiology. , 2006.

4. NEVES, L. C. M., VITOLO, M.

Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* as source of glucose-6-phosphate dehydrogenase In: 28th Symposium on biotechnology for fuels and chemicals, 2006, Nashville.

Program and Abstracts - 28th Symposium on biotechnology for fuels and chemicals. , 2006. p.178 -

5. NEVES, L. C. M., VITOLO, M.

Use of glucose oxidase in a membrane reactor for the gluconic acid production In: 28th Symposium on biotechnology for fuels and chemicals, 2006, Nashville.

Program and Abstracts -28th Symposium on biotechnology for fuels and chemicals. , 2006. p.105 -

6. NEVES, L. C. M., MIYAMURA, T., MORAES, D. A., PENNA, T. C. V., CONVERTI, A.

Avaliação da Produção de Biossurfactantes a partir do cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC9372 e *Bacillus subtilis* W (GFP) em meio TSB (Tryptone Soy Broth) In: VIII Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Biomass, 2005, Maringá.

VIII Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Biomass - Program and abstracts. Maringá: Fundação Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Engenharia Química, 2005. p.109 -

7. NEVES, L. C. M., PENNA, T. C. V., MIYAMURA, T., MORAES, D. A., CONVERTI, A.

Biofiltration Methods for Biological Removal of Phenolic Residues In: 27th Symposium on Biotechnology for fuels and chemicals, 2005, Denver.

Symposium on Biotechnology for fuels and chemicals - Program & Abstracts. , 2005. p.47 - 47

8. NEVES, L. C. M., MIYAMURA, T., MORAES, D. A., PENNA, T. C. V., CONVERTI, A.

Biofiltration Methods for biological removal of phenolic residues In: VIII Symposium of Enzymatic Hydrolysis of Biomass, 2005, Maringá.

VIII Symposium on enzymatic hydrolysis of Biomass - Program and Abstracts. Maringá: Fundação Universidade Estadual de Maringá, 2005. p.208 -

9. NEVES, L. C. M., MIYAMURA, T., MORAES, D. A., PENNA, T. C. V., CONVERTI, A.

Biofiltration Methods for the Removal of Phenolic Residues In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.

Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Santos: , 2005.

10. NEVES, L. C. M., MIYAMURA, T., MORAES, D. A., PENNA, T. C. V., CONVERTI, A.

Biofiltration Methods for the removal of phenolic residues In: XX Seminário

de Pós-Graduação - X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2005, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: , 2005.

11. NEVES, L. C. M., VITOLO, M., PESSOA JUNIOR, A.
Effect of substrate Feeding Strategies on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase synthesis in Fed-Batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* In: 27th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2005, Denver.

27th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals - Program & Abstracts. , 2005. p.149 - 149

12. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., VITOLO, M.
Effect of substrate feeding strategies on glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis in fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* In: XX Seminário de Pós-graduação - X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2005, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: , 2005.

13. NEVES, L. C. M., VITOLO, M.
Obtenção de Frutose e Ácido Glicônico a partir da conversão multi-enzimática da sacarose em reator com membrana In: VIII Symposium on enzymatic hydrolysis of Biomass, 2005, Maringá.

VIII Symposium on enzymatic hydrolysis of Biomass - Program and Abstracts. Maringá: Fundação Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Engenharia Química, 2005. p.53 -

14. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., VITOLO, M.
Uso de Reator com Membrana na conversão enzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico In: XX Seminário de Pós-Graduação - X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2005, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: , 2005.

15. NEVES, L. C. M., VITOLO, M.
Uso de Reator com Membrana na conversão enzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico In: 57° Reunião Anual da SBPC, 2005, Fortaleza.

57° Reunião Anual da SBPC - Do sertão olhando o mar. , 2005. p.60 -

16. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., VITOLO, M.
Formation of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 grown by batch fermentation process In: 26th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2004, Chattanooga.

26th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. , 2004.

17. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., VITOLO, M.
Formation of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 grown by batch fermentation process In: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2004, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2004.

18. NEVES, L. C. M., VITOLO, M.

Obtenção de gliconato de cálcio a partir da oxidação da glicose pela ação da glicoseoxidase em reator com membrana In: 1º Fórum e Salão do Alimento Inteligente - Espaço para trabalhos e pesquisas científicas, 2004, São paulo.

1º Fórum e Salão do Alimento Inteligente - Espaço para trabalhos e pesquisas científicas. , 2004.

19. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., VITOLO, M.

Oxidation of glucose to gluconic acid by glucoseoxidase in membrane bioreactor In: 26th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2004, Chattanooga.

26th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. , 2004.

20. NEVES, L. C. M., TOMOTANI, E. J., VITOLO, M.

Oxidation of glucose to gluconic acid by glucoseoxidase in membrane bioreactor In: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2004, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2004.

21. NEVES, L. C. M., VITOLO, M.

Uso do reator com membrana na conversão em duas etapas da sacarose em frutose e ácido glicônico In: 1º Fórum e Salão do Alimento Inteligente - Espaço para trabalhos e pesquisas científicas, São Paulo.

1º Fórum e Salão do Alimento Inteligente - Espaço para trabalhos e pesquisas científicas. , 2004.

22. NEVES, L. C. M., MIGUEL, A. S. M., VITOLO, M., PESSOA JUNIOR, A.

Influência da constante de tempo (K) na síntese de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) por processo descontínuo-alimentado usando *Saccharomices cerevisiae* recombinante In: XIV Simósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, 2003, Florianópolis.

XIV Simósio Nacional de Fermentações - SINAFERM. , 2003.

23. NEVES, L. C. M., VITOLO, M., PESSOA JUNIOR, A.

Influência do pH e da aeração no cultivo descontínuo de *S.cerevisiae* geneticamente modificado visando a obtenção de G6PDH In: Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP 8, 2003, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2003. v.39. p.93 -

24. NEVES, L. C. M., VITOLO, M., TOMOTANI, E. J.

Obtenção de ácido glicônico a partir da glicose por processo contínuo em reator com membrana - estudo da vazão específica (D) e concentração de enzima In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos 5, 2003, Campinas.

Resumos Campinas : UNICAMP, 2003. , 2003.

25. NEVES, L. C. M., VITOLO, M., TOMOTANI, E. J.

Obtenção de ácido glicônico e frutose a partir da sacarose por processo contínuo em reator com membrana - estudo da concentração de substrato In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos 5, 2003, Campinas. **Resumos Campinas : UNICAMP, 2003.** , 2003.

26. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., MIGUEL, A. S. M., FERREIRA, D. H., DANESI, E. D. G.

Avaliação da Influência do Meio de Cultura composto de Glicose e Extrato de Levedura no cultivo de *S.cerevisiae* W303-181 para a produção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase In: VII Semana Farmacêutica De Ciência e Tecnologia, 2002, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2002.

27. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., MIGUEL, A. S. M., ROSSI, F. G., VITOLO, M.

Estudo do preparo do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* W 301-181 para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) por processo fermentativo In: Congresso de Farmácia e Análises Clínicas de Ponta Grossa, 4, 2002, Ponta Grossa.

Caderno de Resumos Ponta Grossa : Associação Pontagrossense de Farmacêuticos, 2002. , 2002.

28. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., MIGUEL, A. S. M., VITOLO, M., ROSSI, F. G.

Estudo do preparo do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* W 301-181 para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) por processo fermentativo In: Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 7/Seminário de Pós-Graduação, 17/Reunião de Iniciação Científica, 10/Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 37, 2002, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2002. v.38. p.46 -

29. NEVES, L. C. M., PESSOA JUNIOR, A., MIGUEL, A. S. M., FERREIRA, D. H., DANESI, E. D. G.

Estudos Preliminares de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 para obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase comparando a medida da concentração celular pelos métodos de densidade ótica e massa seca In: VII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2002, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2002.

30. NEVES, L. C. M., VITOLO, M., PESSOA JUNIOR, A.

Influência da Aeração no cultivo de *S.cerevisiae* Geneticamente Modificada visando a obtenção de G6PDH In: VII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2002, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2002. v.38. p.111 -

31. NEVES, L. C. M., VITOLO, M., PESSOA JUNIOR, A.

Métodos mecânicos de rompimento celular de microrganismos In: VI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2001, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2001. v.37. p.70 -

32. NEVES, L. C. M., LUCCARINI, A. C.

Bioconversão Enzimática da Sacarose em Glicose e Frutose: Estudo da Concentração de Sacarose In: XVII CICTE, 2000, São Carlos.

XVII CICTE. , 2000.

33. NEVES, L. C. M., LUCCARINI, A. C., BORGES, F. J., GOMES, M. R., PESSOA JUNIOR, A.

Cinética Enzimática da Invertase: Influência da temperatura, tempo de reação, concentração de substrato e concentração de enzima In: XVIII SIICUSP, 2000, São Carlos.

XVIII SIICUSP. , 2000.

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. NEVES, L. C. M., TORRES, B. B., TOMOTANI, E. J.

DNA-Técnicas e aplicações, 2002. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Eventos

Participação em eventos

1. NEVES, L. C. M.

VIII Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Biomass, 2005.

(Participações em eventos/Simpósio)

2. NEVES, L. C. M.

XX Seminário de Pós-Graduação - X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2005. (Participações em eventos/Seminário)

3. NEVES, L. C. M.

57º Reunião da SBPC - Do sertão olhando o mar, 2005. (Participações em eventos/Congresso)

4. NEVES, L. C. M.

XIX Seminário de Pós Graduação, 2004. (Participações em eventos/Seminário)

5. NEVES, L. C. M.

Espaço para Trabalhos e Pesquisas Científicas do 1º Fórum e Salão do Alimento Inteligente, 2004. (Participações em eventos/Encontro)

6. NEVES, L. C. M.

XVIII Seminário de Pós-Graduação, 2003. (Participações em eventos/Seminário)

7. NEVES, L. C. M., TOMOTANI, E. J.

5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2003. (Participações em eventos/Simpósio)

8. NEVES, L. C. M.

XVII Seminário de Pós Graduação, 2002. (Participações em eventos/Seminário)

9. NEVES, L. C. M.

XVI Seminário de Pós Graduação, 2001. (Participações em eventos/Seminário)

10. NEVES, L. C. M., LUCCARINI, A. C., PESSOA JUNIOR, A., VITOLO, M.
VXII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo- SIICUSP, 2000. (Participações em eventos/Simpósio)

INDICADORES DE PRODUÇÃO

Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico.....

Comunicações em anais de congressos e periódicos (proceedings e suplementos).....

Eventos

Participações em eventos (congresso).....

Participações em eventos (seminário).....

Participações em eventos (simpósio).....

Participações em eventos (encontro).....

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 06/10/2006 às 12:12:13.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas****Secretaria de Pós-Graduação****ANEXO C****Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profª. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO D**AUTORIZAÇÃO**

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Luiz Carlos Martins das Neves

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 16, Cidade Universitária, S.Paulo/SP

E-mail: lucaneves@usp.br