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

Imobilização da invertase em resina de troca iônica (tipo Dowex®):
seu uso na modificação da sacarose

Ester Junko Tomotani

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientador:
Prof. Titular Michele Vitolo

SÃO PAULO-SP
2002

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005017

Ficha Catalográfica

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

Tomotani, Ester Junko
T661i Imobilização da invertase em resina de troca iônica (tipo
Dowex³⁰): seu uso na modificação da sacarose / Ester Junko
Tomotani. -- São Paulo, 2002.
161p.

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

1. Invertase : Bioquímica industrial 2. Resina aniônica :
Química orgânica 3. Hidrólise enzimática : Bioquímica
I. T. II. Vitolo, Michele, orientador.

660.63e CDD

Ester Junko Tomotani

IMOBILIZAÇÃO DA INVERTASE EM RESINA DE TROCA IÔNICA
(TIPO DOWEX®): SEU USO NA MODIFICAÇÃO DA SACAROSE

Comissão Julgadora

Dissertação para a obtenção do título de
MESTRE

Prof. Dr. Michele Vitolo

Orientador/Presidente

Prof. Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiroz

1º Examinador

Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes

2º Examinador

São Paulo, 28 de novembro de 2002.

***Cantem ao Senhor um novo cântico,
Pois ele fez coisas maravilhosas;
A sua mão direita e o seu braço santo
Lhe deram a vitória!
Senhor anunciou a sua vitória***

***E revelou a sua justiça às nações.
Ele se lembrou do seu amor leal
E da sua fidelidade para com a casa de
Israel;
Todos os confins da terra viram
a vitória do nosso Deus.***

Salmo 98:1-3

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus filhos, Levi e Lucas, que embora tão pequenos, suportaram todo esse período em oração e compreensão. E ao Hélió, meu esposo, que sempre presente ao meu lado, tem me incentivado com amor e carinho no decorrer de todas as etapas desse projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Michele Vitolo, por sua orientação segura, ensinamentos técnicos, incentivo, por sua presença constante no decorrer deste trabalho e em particular pela preciosa amizade.

À Prof. Dr. Suzana Caetano da Silva Lannes, pelo valioso auxílio disponibilizando o produto, "Bioinvert", imprescindível para a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, Prof. Dr. Theresa Christina Vessoni Penna e Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli, pela atenção, amizade e empréstimo dos equipamentos.

Aos meus pais, que me acompanharam com incentivo para que obtivesse o sucesso desejado.

Aos queridos, Sr. Hirossi, Sra. Sueme e Henzo, pela presença e apoio nos momentos mais críticos.

Aos meus irmãos, Joel e Lydia, que mesmo longe sempre me apoiaram nas suas orações.

Às amigas Gaianê, Margaret, Anésia, Cleide e Fumiyo. A intercessão de vocês foi fundamental.

Aos colegas e funcionários do laboratório, Marina, Luiz Carlos, Ângelo, Irene, Graça e Ricardo, que fizeram com que o trabalho fosse mais produtivo e prazeroso.

Aos colegas e funcionários, Chiu, Nilton, Maristela e Ivani, pela amizade e disponibilidade a mim dedicadas.

Aos funcionários prestativos das secretarias: Juarez, Miriam, Elza, Jorge, Elaine e Benê, que sempre atenderam aos mais variados pedidos da melhor forma possível.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de desenvolver esse trabalho no seu campus.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. Introdução	01
1.1 Sobre a Invertase	01
1.2 Sobre a Imobilização	10
1.2.1 Sobre a Imobilização da Invertase	19
1.2.2 Suportes	24
1.2.3 Resina de troca iônica	29
1.2.4 Sobre a Aplicação de Dowex®	32
2. Objetivos	38
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3. Materiais e Métodos	39
3.1 Materiais	39
3.2 Métodos	39
3.2.1 Descrição do Ensaio-Padrão para a Medida da Atividade da Invertase Solúvel	39
3.2.2 Imobilização da Invertase em Resinas Aniônicas Dowex®	42
3.2.2.1 Estabelecimento das Condições de Imobilização	42
3.2.2.2 Procedimento de Imobilização	44
3.2.2.3 Determinação da Atividade do Complexo Dowex® 1x4-200/Invertase	45
3.2.2.4 Coeficiente de Imobilização (CI)	45
3.2.3 Caracterização da Invertase Solúvel e Imobilizada	46
3.2.3.1 Efeito da Temperatura sobre a Atividade Enzimática	46
3.2.3.2 Efeito da Temperatura sobre a Estabilidade Enzimática	46
3.2.3.3 Efeito do pH sobre a Atividade Enzimática	47
3.2.3.4 Efeito do pH sobre a Estabilidade Enzimática	47
3.2.3.5 Efeito da Concentração de Sacarose sobre a Atividade Enzimática	48
3.2.3.6 Avaliação da Inativação Térmica da Invertase Solúvel e Imobilizada	48
3.2.3.7 Detecção da Atividade transferásica da Invertase Solúvel e Imobilizada	49

3.2.3.8 Hidrólise Descontínua da Sacarose com a invertase imobilizada	49
3.2.3.9 Procedimento de Reutilização do Complexo Dowex®1x4-200/Invertase para a Hidrólise descontínua da Sacarose	51
3.2.3.10 Estudo da Vida de prateleira do Complexo Dowex®1x4-200/Invertase	52
3.2.3.11 Análise Microscópica das resinas Dowex®1x4-200	52
3.2.4 Técnicas Analíticas	53
3.2.4.1 Dosagem de Proteína	53
3.2.4.2 Dosagem de Açúcares Redutores Totais (ART)	55
3.2.4.3 Detecção de Oligossacarídeos por Cromatografia de Camada Delgada (TLC)	56
4. Resultados e Discussão	58
4.1 Estabelecimento das Condições de Imobilização	58
4.2 Fatores que afetam a Interação Dowex®-Invertase	61
4.2.1 Efeito do pH	61
4.2.2 Efeito da Temperatura	67
4.3 Eficiência da Imobilização da Invertase em Diferentes Tipos de Dowex®	76
4.4 Caracterização das Formas Solúvel e Insolúvel da Invertase	80
4.4.1 Atividade Frente à Temperatura	80
4.4.2 Estabilidade Frente à Temperatura	95
4.4.3 Atividade e Estabilidade Frente ao pH	109
4.4.4 Efeito da Concentração de Sacarose	116
4.5 Atividade Transferásica	125
4.6 Hidrólise Descontínua da Sacarose	130
4.7 Reutilização do Complexo Dowex®1x4-200/Invertase	135
4.8 Estabilidade do Complexo Dowex®1x4-200/Invertase com o tempo de estocagem	136
4.9 Análise Microscópica da resina Dowex®1x4-200	137
5. Conclusões	142
5.1 Sobre a Caracterização da Invertase Solúvel (Bioinvert®)	142
5.2 Sobre a Caracterização da Invertase Solúvel (Fluka®)	143
5.3 Sobre a Caracterização da Invertase Imobilizada (Bioinvert®)	144
5.4 Sobre a Caracterização da Invertase Imobilizada (Fluka®)	144
5.5 Imobilização da Invertase	145
5.6 Detecção da Atividade transferásica	146

5.7 Estabilidade Operacional e tempo de Estocagem do Complexo Dowex®1x4- 200/Invertase	146
6. Perspectivas de Continuidade do Trabalho	147
7. Referências Bibliográficas	148
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Produção Nacional de Cana-de-Açúcar (FREIRE LIMA, 1995).	4
Figura 2-	Custo de Produção do Açúcar (FREIRE LIMA, 1995).	4
Figura 3-	Produção Brasileira de Açúcar (COPERSUCAR, 2002).	5
Figura 4a-	Formação de açúcar invertido através da hidrólise ácida da sacarose (BRITISHSUGAR CO., 2002).	6
Figura 4b-	Formação de frutoligossacarídeos	7
Figura 5-	Dados baseados em: Market Trends-Focus on Enzymes, 2002.	9
Figura 6-	Tipos de Imobilização (baseada em CHAPLIN, 2002)	13
Figura 7-	Resina seca do tipo Dowex® 1x4-200 no aumento de 20x.	30
Figura 8-	Formação de açúcares redutores totais em função do tempo.	41
Figura 9-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex-1x8 em água deionizada frente à variação do pH do meio.	62
Figura 10-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em água deionizada frente à variação do pH do meio.	62
Figura 11-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em água deionizada frente à variação do pH do meio.	63
Figura 12-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x8 em tampão acetato frente à variação do pH do meio.	63
Figura 13-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em tampão acetato frente à variação do pH do meio.	64
Figura 14-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em tampão acetato frente à variação do pH do meio.	64
Figura 15-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex®1x8 em água deionizada (pH 4,6) frente à variação da temperatura.	70

Figura 16-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex® 1x8 em tampão acetato 0,1 M (pH 4,6) frente à variação da temperatura.	70
Figura 17-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex® 1x4 em água deionizada (pH 4,6) frente à variação da temperatura.	71
Figura 18-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em tampão acetato 0,1 M (pH 4,6) frente à variação da temperatura.	71
Figura 19-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em água deionizada (pH 4,6) frente à variação da temperatura.	72
Figura 20-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em tampão acetato 0,1 M (pH 4,6) frente à variação da temperatura.	72
Figura 21-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x8 em água deionizada (pH 5,5) frente à variação da temperatura.	73
Figura 22-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x8 em tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) frente à variação da temperatura.	73
Figura 23-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em água deionizada (pH 5,5) frente à variação da temperatura.	74
Figura 24-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em tampão acetato 0,1 M (pH 4,6) frente à variação da temperatura.	74
Figura 25-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em água deionizada (pH 5,5) frente à variação da temperatura.	75
Figura 26-	Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) frente à variação da temperatura.	75
Figura 27-	Índice de adsorção de proteína apresentado por vários tipos de resinas aniônicas Dowex® em condições de imobilização otimizadas.	76

Figura 28-	Coeficientes de imobilização para a invertase (Bioinvert [®]) adsorvida em diferentes tipos de resinas aniônicas Dowex, a saber, (1x2-100)[1], (1x2-200)[2], (1x2-400)[3], (1x4-50)[4], (1x4-100)[5], (1x4-200)[6], (1x4-400)[7], (1x8-50)[8], (1x8-100)[9], (1x8-200)[10] e (1x8-400)[11].	79
Figura 29-	Percentagem de proteína retida na resina após o ensaio, onde (1x2-100)[1], (1x2-200)[2], (1x2-400)[3], (1x4-50)[4], (1x4-100)[5], (1x4-200)[6], (1x4-400)[7], (1x8-50)[8], (1x8-100)[9], (1x8-200)[10] e (1x8-400)[11].	79
Figura 30-	Variação da atividade da invertase solúvel (Bioinvert [®]) com a temperatura.	84
Figura 31-	Variação da atividade do complexo Dowex [®] 1x4-200/invertase (Bioinvert [®]) com a temperatura.	84
Figura 32-	Variação da atividade da invertase solúvel (Fluka [®]) com a temperatura.	85
Figura 33-	Variação da atividade do complexo 1x4-200/invertase (Fluka [®]) com a temperatura.	86
Figura 34-	Gráfico baseado no método de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação da reação catalisada pela invertase solúvel (Bioinvert [®]).	89
Figura 35-	Gráfico baseado no método de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação da reação catalisada pelo complexo Dowex [®] 1x4-200/invertase (Bioinvert [®]).	90
Figura 36-	Gráfico baseado no método de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação da reação catalisada pela invertase solúvel (Fluka [®]).	91
Figura 37-	Gráfico baseado no método de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação da reação catalisada pelo complexo Dowex [®] /Invertase (Fluka [®]).	92
Figura 38-	Estabilidade da invertase solúvel (Bioinvert [®]) frente à temperatura.	98
Figura 39-	Estabilidade da invertase solúvel (Fluka [®]) frente à temperatura.	98
Figura 40-	Estabilidade do complexo Dowex [®] 1x4-200/Invertase (Bioinvert [®]) frente à temperatura.	99
Figura 41-	Estabilidade do complexo Dowex [®] 1x4-200/Invertase (Fluka [®]) frente à temperatura.	99

Figura 42-	Inativação térmica da invertase solúvel (Bioinvert®) às temperaturas de 37°C e 55°C.	100
Figura 43-	Variação do logaritmo da atividade da invertase solúvel (Fluka®) em função do tempo às temperaturas de 40 °C e 50 °C.	101
Figura 44-	Inativação térmica do complexo Dowex®1x4-200/invertase (Bioinvert®) às temperaturas de 30 °C, 37 °C, 45 °C e 55 °C.	104
Figura 45-	Variação do logaritmo da constante de inativação térmica para o complexo Dowex®1x4-200/invertase (Bioinvert®) em função do inverso da temperatura absoluta do meio da reação.	105
Figura 46-	Inativação térmica do complexo Dowex®-1x4-200/Invertase (Fluka®) às temperaturas de 37° C, 40° C, 45° C e 50° C.	106
Figura 47-	Variação do logaritmo da constante de inativação térmica para o complexo Dowex®-1x4-200/Invertase (Fluka®) em função do inverso da temperatura absoluta do meio da reação.	107
Figura 48-	Efeito do pH sobre a atividade da invertase solúvel (Bioinvert®).	112
Figura 49-	Efeito do pH sobre a atividade da invertase solúvel (Fluka®).	113
Figura 50-	Efeito do pH sobre a estabilidade da invertase solúvel (Bioinvert®).	113
Figura 51-	Efeito do pH sobre a estabilidade da invertase solúvel (Fluka®).	114
Figura 52-	Efeito do pH sobre a atividade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Bioinvert®).	114
Figura 53-	Efeito do pH sobre a atividade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Fluka®).	115
Figura 54-	Efeito do pH sobre a estabilidade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Bioinvert®).	115
Figura 55-	Efeito do pH sobre a estabilidade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Fluka®).	116
Figura 56-	Variação da atividade invertásica (Bioinvert®) com a concentração de sacarose.	119
Figura 57-	Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver - Burk para o cálculo das constantes cinéticas da invertase solúvel (Bioinvert®).	119
Figura 58-	Variação da atividade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Bioinvert®) com a concentração de sacarose.	120

Figura 59-	Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver - Burk para o cálculo das constantes cinéticas do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Bioinvert®).	120
Figura 60-	Variação da atividade invertásica (Fluka®) com a concentração de sacarose.	121
Figura 61-	Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver - Burk para o cálculo das constantes cinéticas da invertase solúvel (Bioinvert®).	121
Figura 62-	Variação da atividade do complexo Dowex® 1x4-200/Invertase (Fluka) com a concentração de sacarose.	122
Figura 63-	Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver - Burk para o cálculo das constantes cinéticas do Complexo Dowex-1x4-200/Invertase (Fluka®).	123
Figura 64-	Detecção da atividade transferásica da invertase (Bioinvert®) nas formas solúvel (S) e imobilizada (SI) através da cromatografia de camada delgada após 6 minutos de reação. As manchas indicadas por 1, 2, 3 e 4 corresponderam, respectivamente, às soluções-padrão de sacarose, glicose, frutose e mistura dos três açúcares. As manchas resultantes da ação da invertase solúvel e imobilizada em uma solução de sacarose (250 g.L ⁻¹) (primeiro par SI/S da direita para a esquerda) são indicadas por "a" (mistura de açúcares) e "b" (FOS formados).	128
Figura 65-	Detecção da atividade transferásica da invertase (Bioinvert®) nas formas solúvel (S) e imobilizada (SI) através da cromatografia de camada delgada após 15 minutos de reação. As manchas indicadas por 1, 2, 3 e 4 corresponderam, respectivamente, às soluções-padrão de sacarose, glicose, frutose e mistura dos três açúcares. As manchas resultantes da ação da invertase solúvel e imobilizada em uma solução de sacarose (250 g.L ⁻¹) (primeiro par SI/S da direita para a esquerda) são indicadas por "a" (mistura de açúcares) e "b" (FOS formados).	128
Figura 66-	Hidrólise descontínua da sacarose na concentração de 120g.L ⁻¹ para o complexo Dowex®/Invertase (■) e invertase solúvel (●).	131
Figura 67-	Hidrólise descontínua da sacarose na concentração de 150g.L ⁻¹ para o complexo Dowex®/Invertase (■) e invertase solúvel (●).	132
Figura 68-	Hidrólise descontínua da sacarose na concentração de 250g.L ⁻¹ para o complexo Dowex®/Invertase (■) e invertase solúvel (●).	132
Figura 69-	Atividade relativa do complexo Dowex®/Bioinvert® ao longo de 4 reutilizações.	135
Figura 70-	Resina seca no aumento de 10x.	139

Figura 71-	Resina hidratada corada com solução de azul de metileno no aumento de 10x.	140
Figura 72-	Resina hidratada com a enzima corada com azul de metileno no aumento de 10x.	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variação da concentração de açúcares redutores totais em função do tempo referente à hidrólise da sacarose pela invertase solúvel (Bioinvert®).	41
Tabela 2	Soluções tampão e as respectivas faixas de pH de utilização.	47
Tabela 3	Esquema montado para o estabelecimento da curva-padrão de proteína.	54
Tabela 4.	Esquema montado para o estabelecimento da curva-padrão de glicose (PA-anidra, Synth 32850).	55
Tabela 5	. Índice de Adsorção da proteína usando 100 mg de Dowex®1x8-50.	58
Tabela 6	Índice de Adsorção da proteína em Dowex® 1x8-50, usando-se 10mg de Bioinvert®.	59
Tabela 7	Índice de Adsorção da proteína em Dowex®1x8-50, sendo o volume da suspensão igual a 25 mL e quantidade da resina 100 mg.	59
Tabela 8	Índice de Adsorção da proteína em Dowex® 1x8-50, sendo a quantidade de invertase igual a 10 mg e volume da solução 25mL.	60
Tabela 9.	Índice de Adsorção de proteína (%) em várias resinas aniônicas do tipo Dowex® frente a diferentes valores de pH	61
Tabela 10.	Índice de adsorção (%) em Água deionizada (pH 4,6) frente a várias temperaturas.	68
Tabela 11	Índice de adsorção (%) em Tampão acetato pH 4,6 frente a várias temperaturas.	68
Tabela 12	Índice de adsorção (%) em Água deionizada (pH 5,5) frente a várias temperaturas.	69
Tabela 13	Índice de adsorção (%) em Tampão acetato pH 5,5, frente a várias temperaturas.	69
Tabela 14	Coeficiente de imobilização dos sistemas imobilizados.	77
Tabela 15	Atividade da invertase solúvel (Bioinvert®) em função da temperatura.	80
Tabela 16	Atividade da invertase imobilizada (Bioinvert®) em função da temperatura.	81
Tabela 17	Atividade da invertase solúvel (Fluka®) em função da temperatura.	81

Tabela 18	Atividade da invertase imobilizada (Fluka®) em função da temperatura.	82
Tabela 19	Valores das energias de ativação referentes às formas solúvel e insolúvel do Bioinvert® e da Fluka®.	87
Tabela 20	Valores dos parâmetros Termodinâmicos relacionados às reações catalisadas pelas formas solúvel e insolúvel da invertase (Bioinvert® e Fluka®).	94
Tabela 21.	Estabilidade da invertase solúvel (Bioinvert® e Fluka®) em função da temperatura.	96
Tabela 22	Estabilidade do complexo Dowex®1x4-200/invertase (Bioinvert) em função da temperatura.	97
Tabela 23	Estabilidade do complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Fluka) em função da temperatura.	97
Tabela 24	Logarítmo da atividade residual da invertase solúvel (Bioinvert®)(Log v) às temperaturas de 37°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C.	100
Tabela 25	Logarítmo da atividade residual da invertase solúvel (Fluka®) (Log v) às temperaturas de 40°C e 50°C.	101
Tabela 26	Parâmetros termodinâmicos relacionados à inativação térmica dos complexos Dowex-1x4-200/Invertase (Bioinvert®) e Dowex1x4-200/Invertase (Fluka®).	108
Tabela 27	Valores da atividade da invertase (Bioinvert®) em função da natureza da solução tampão.	109
Tabela 28	Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade da invertase solúvel (Bioinvert®).	111
Tabela 29	Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade da invertase solúvel (Fluka®).	111
Tabela 30	Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade do complexo Dowex®1X4-200/invertase (Bioinvert®) e Dowex®1X4-200/invertase (Fluka®).	112
Tabela 31	Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade da invertase solúvel (Bioinvert®).	117
Tabela 32	Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Bioinvert®).	117
Tabela 33	Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade da invertase solúvel (Fluka®).	118

Tabela 34	Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade do complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Fluka®).	118
Tabela 35	Valores das constantes cinéticas para ambas as formas de Bioinvert® e Fluka®.	124
Tabela 36	Valores das constantes cinéticas de invertases provenientes de fontes diversas.	125
Tabela 37	R _f obtidos em diferentes concentrações de sacarose após 3, 9, 12, 35, 45 e 55 minutos de reação para as formas solúvel e insolúvel de invertase (Bioinvert®).	127
Tabela 38	R _f obtidos em diferentes concentrações de açúcares após 6 e 15 minutos de reação para as ambas formas de invertase.	129
Tabela 39	Comparação das atividades da invertase solúvel e insolúvel na hidrólise descontínua da sacarose.	130
Tabela 40	Quantidade de Resina 1x4-200 e de invertase (Bioinvert®) para a preparação de um complexo Dowex®1x4-200/Invertase com maior atividade hidrolítica.	133
Tabela 41	Quantidade de Resina 1x4-200 e de invertase (Fluka®) para a preparação de um complexo Dowex®1x4-200/Invertase com maior atividade hidrolítica.	134
Tabela 42	Estudo de reutilização do complexo Dowex®/Bioinvert®.	135
Tabela 43	Atividade do complexo Dowex®/Bioinvert® com o tempo de estocagem.	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- * G- energia livre (kJ.mol^{-1})
- * μg - micrograma
- * H- entalpia (kJ.mol^{-1})
- * $(K_m)_{ap}$ - constante de Michaelis-Menten aparente (enzima imobilizada)
- * μ - micra
- * μm - micrometros
- * S- entropia [$\text{kJ}.\text{(mol.K)}^{-1}$]
- * $(V_{max})_{ap}$ - velocidade máxima aparente (enzima imobilizada)
- * [s]- concentração de sacarose
- * Abs- absorbância
- * ART- açúcares redutores totais
- * CCL- *Cajanus cajan*-lecitina
- * CI- coeficiente de imobilização
- * cm- centímetros
- * CMS- "carbon molecular sieves"
- * CMC- carboxi -metil-celulose
- * con-A- concanavalina A
- * DEAE-dietil-amino-etil-celulose
- * DVB- divinil benzeno
- * E_a - energia de ativação (kJ.mol^{-1})
- * E'_a - energia de inativação térmica
- * f- função
- * FOS- frutoligossacarídeos
- * g- grama
- * h- constante de Planck ($3,978 \times 10^{-32} \text{ J.min}$)
- * h- hora
- * IA- índice de adsorção
- * IRA- resina de troca aniônica

- * IRC- resina de troca catiônica
- * J- Joule
- * K- Kelvin
- * k- constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)
- * k'- constante de inativação térmica
- * K_m - constante de Michaelis-Menten (mM)
- * k- quilo
- * k_T - constante de desnaturação térmica
- * LM- largura da malha
- * Log- logaritmo
- * mg- miligramas
- * min- minutos
- * mL- mililitros
- * mm- milímetros
- * mM- milimolar
- * M- molaridade (mol/Litro)
- * MA- ácido metacrílico
- * MR- mistura reativa (mistura de reagentes de Somogyi)
- * nm- nanômetros
- * °C- graus Celsius
- * PA- produto de grau analítico
- * pH- potencial hidrogeniônico
- * pHi ou pI- ponto isoelétrico
- * p- peso
- * PEG- polietileno glicol
- * PP- polipropileno
- * PTA- proteína total adicionada
- * PTS- proteína total no sobrenadante
- * R^2 - coeficiente de correlação referente à regressão linear
- * R- constante universal dos gases [$8,31 \text{ J. (K.mol)}^{-1}$]
- * $R_f = L_i/L_f$ [distância (cm) da linha de início até o centro da zona/
distância(cm) da linha de início até a frente do solvente]

- * rpm- rotação por minuto
- * SDS- duodecil sulfato de sódio
- * S- enzima solúvel
- * SI- enzima imobilizada
- * TLC- "Thin Layer Chromatography" (cromatografia de camada delgada)
- * TP- tamanho da partícula
- * T- temperatura
- * T- temperatura absoluta do meio reacional (K)
- * t- tempo
- * U- unidade de atividade enzimática (quantidade em miligramas de ART formado por mililitros do meio reacional)
- * UV- ultravioleta
- * V_{max} - velocidade máxima ($U \cdot mL^{-1}$)
- * v- velocidade da reação ou atividade enzimática ($U \cdot mL^{-1}$)
- * v- volume

IMOBILIZAÇÃO DA INVERTASE EM RESINA DE TROCA IÔNICA (TIPO DOWEX®): SEU USO NA MODIFICAÇÃO DA SACAROSE

Ester Junko Tomotani

RESUMO

A invertase comercial (Bioinvert®) foi imobilizada por adsorção em resinas aniônicas do tipo Dowex® [1x8:50-400, 1x4:50-400 e 1x2:100-400, todos copolímeros estireno-divinilbenzênicos, porém de granulometria (50-400 mesh) e quantidades de ligações cruzadas diferentes (2-8%)] em meio aquoso. A melhor percentagem de adsorção da invertase nas resinas foi observada em pH 5,5 a 32°C, tendo o complexo Dowex®1x4-200/Invertase apresentado índice de adsorção e coeficiente de imobilização iguais a 100%. Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos foram determinados para a invertase solúvel e insolúvel de Bioinvert® e também para a invertase purificada (Fluka®). O complexo Dowex®1x4-200/Bioinvert® apresentou-se estável durante as reações sem desprendimento da enzima do suporte. Os parâmetros termodinâmicos da forma solúvel e insolúvel da Fluka® foram idênticos aos do Bioinvert®, no entanto, após a imobilização apresentou uma redução de 28% na sua atividade. O estudo da atividade transferásica de ambas as formas de Bioinvert® em diferentes concentrações de sacarose foram analisadas através da cromatografia de camada delgada. A estabilidade operacional e de estocagem foi também determinada para o complexo Dowex®1x4-200/Bioinvert®.

IMMOBILIZATION OF INVERTASE ON ION EXCHANGE RESIN (DOWEX®): ITS APPLICATION IN SUCROSE MODIFICATION

Ester Junko Tomotani

ABSTRACT

The invertase (trademarked as Bioinvert®) solubilized in deionized water was immobilized by adsorption on anion exchange resins, collectively named Dowex®, [1x8:50-400, 1x4:50-400 and 1x2:100-400, styrene-divinylbenzene copolymers, with different granulometry (50-400mesh) and different degrees of cross-linking (2-8%)]. The best percentage of adsorption of invertase on resins was observed in pH 5.5 at 32°C and the complex Dowex®1x4-200/invertase has shown a coupling yield and an immobilization coefficient equal to 100%. The thermodynamic and kinetic parameters for sucrose hydrolysis for both soluble and insoluble enzyme were evaluated to Bioinvert® and purified invertase purchased from Fluka®. The complex Dowex®/Bioinvert® was stable without any desorption of enzyme from the support during the reaction and having the thermodynamic parameters equal to the soluble form. However, the loss of activity for immobilized Fluka® was found to be 28% when compared to the soluble one. The transfructosylating activity of Bioinvert® in both forms in different concentrations of sucrose was investigated through TLC. In regard to insoluble Bioinvert® its storage and operational stability were also determined.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sobre a Invertase

A invertase (EC 3.2.1.26, β -D-frutofuranosídeo-frutoidrolase, β -frutofuranosidase), muito conhecida pelo estudo de Michaelis-Menten, ainda hoje continua sendo explorada quanto à sua atividade hidrolítica e transferásica, uma vez que as suas diferentes isoenzimas se distinguem pela sua origem, localização na célula (intra ou extracitoplasmática), ponto isoelétrico e pH ótimo de atividade, além dos mecanismos regulatórios e de funcionalidade (WEBER e ROITSCH, 2000).

A invertase é uma glicoproteína (possui cerca de 30 cadeias de manana por molécula de proteína) que se localiza na parede celular do *Saccharomyces cerevisiae*, sua principal fonte, tendo massa molar de 270kDa. Além disso, apresenta padrão cinético definido (ARRUDA, 1996), é estável a temperaturas entre 30°C e 50°C e em valores de 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 à concentração de sacarose superiores à 120 g.L⁻¹, como consequência do aumento da viscosidade do meio reacional e/ou diminuição da atividade de água (TREVISAN, 1993; ALMEIDA CUNHA e VITOLO, 1984). E foi verificado por REDDY *et al.* (1992) que a sua atividade catalítica aumenta quando as macromoléculas da enzima, cuja estrutura quaternária possui duas cadeias polipeptídicas, se associam, gerando tetrâmeros, hexâmeros e até octâmeros. Por outro lado, VRÁBEL *et al.* (1997a) analisaram o mecanismo e a cinética da inativação térmica da invertase, utilizando o método de avaliação por multi-temperatura, que consiste no uso do ajuste simultâneo de dados de inativação em várias temperaturas com os modelos cinéticos contendo as taxas de constantes dependentes da temperatura na forma da equação de Arrhenius.

Ela é encontrada em várias espécies de organismos sendo, no entanto, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* as principais fontes em escala industrial (BIGELIS, 1993).

Pode, ainda, ser obtida da levedura residual da indústria sucro-alcooleira (ECHEGARAY *et al.*, 2000). Acha-se plenamente disponível no mercado, tendo sido, inclusive, objeto de patentes (FOURNIER *et al.*, 1995).

Entre as aplicações da invertase cita-se o seu uso como enzima de referência para estudos bioquímicos, também como em biossensores e nos estudos e/ou produção de açúcar invertido e de frutoligossacárides em diferentes tipos de reatores (CHEN, *et al.*, 1999; ABDEL-NABY *et al.*, 1999; CHAUDURI e MODAK, 1998).

O xarope de açúcar invertido que pode ser obtido via hidrólise ácida ou enzimática da sacarose é um produto com significativo valor comercial em países que possuem a cana-de-açúcar ou beterraba como fonte de açúcar (VITOLO e YASSUDA, 1991). Nos últimos dez anos, o Brasil figura entre os dez principais produtores de açúcar, ocupando a primeira colocação no mercado mundial (MAGALHÃES, 2002). Em território nacional, os estados de São Paulo, Alagoas, Pernambuco, Paraná e Minas Gerais lideram a produção de cana-de-açúcar (FREIRE LIMA, 1995). (Figuras 1, 2 e 3).

Através da hidrólise ácida (Figura 4a), o produto final geralmente apresenta compostos oxidados, resultantes da ciclização de hexoses em meio de baixo pH e temperatura elevada que podem influir desfavoravelmente em suas propriedades organolépticas (VITOLO e YASSUDA, 1991; MEJÍAS e PERÉZ, 1996). As consequências da hidrólise ácida podem ser evitadas com o emprego da invertase, porque a sua reação ocorre em condições brandas de temperatura e pH (VITOLO e YASSUDA, 1991), fornecendo um xarope com maior pureza (WISEMAN, 1981).

O açúcar invertido vem sendo empregado como adoçante (possui índice de dulçor 20% a mais em comparação com a sacarose) na produção de geléia devido à baixa cristalização comparado com a sacarose (TUCKER e WOODS, 1995; WISEMAN, 1981; BRITISH SUGAR CO., 2002). Como hidrolase também tem sido utilizada na produção de bombons com centro parcial ou totalmente liquefeito (REED e NAGODAWITHANA, 1995), na manufatura de presuntos e marzipan (WALSH e HEADON, 1994), como

umectante para manter a umidade e impedir o ressecamento em produtos de confeitaria (WALKER, 1995).

No âmbito do uso de biocatalisadores, cujo interesse industrial está em crescimento, a produção de frutose é citada também, no grupo de substâncias de grande importância econômica, na síntese de fármacos intermediários de alta complexidade e de substâncias com efeito terapêutico (ZAKS, 2001).

Figura 1. Produção Nacional de Cana-de-Açúcar (FREIRE LIMA, 1995).

Figura 2. Custo de Produção do Açúcar (FREIRE LIMA, 1995).

Figura 3. Produção Brasileira de Açúcar (COPERSUCAR, 2002).

Figura 4a. Formação de açúcares invertidos através da hidrólise ácida de sacarose. (BRITISHSUGAR CO., 2002).

Figura 4b. Formação de frutoligossacarídeos (FOS) pela ação transferásica da invertase.

Além da atividade hidrolítica, a β -fructofuranosidase exibe uma atividade transferásica, em concentrações acima de 15%, podendo ser ideal para a síntese de oligossacárides (BIELECK e SOMIARI, 1998; CRUZ *et al.*, 1998) (Figura 4b). Devido às propriedades funcionais e por serem também uma alternativa como adoçantes, os frutoligossacárides sintetizados a partir da sacarose têm sido alvo de estudos (YUN, 1996). Conhecido, também, como Fructan[®] as suas propriedades assim como a sua aplicação tecnológica têm sido revisadas (BIGGS e HANCOCK, 2001). As enzimas que têm aplicação em escala industrial provêm dos fungos *Aureobasidium* sp, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus japonicus*. A sua produção contínua pode ser feita pela imobilização da enzima ou de células contendo a invertase (CRUZ *et al.*, 1998; CHIEN *et al.*, 2001).

Os frutoligossacárides, carboidratos não digeríveis, são ingredientes de novos alimentos funcionais que tem melhorado a qualidade de muitos alimentos (VORAGEN, 1999; CRITTENDEN, e PLAYNE, 1996). Além de melhorar o “flavour” do alimento e das suas características físico-químicas, eles têm propriedades benéficas à saúde dos consumidores (nutracêuticos): aliviam a constipação, diminuem o nível de colesterol e lípides no soro, desenvolvem a microflora intestinal (prebióticos) e são adoçantes não cariogênicos de baixa caloria (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996; MURAMATSU e NAKAKUKI, 1995; NGUYEN *et al.* 1999, VACCARI, *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2002). As suas aplicações também estão sendo propostas nas áreas de medicamentos, cosméticos e odontológicos (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996; PALCIC, 1999).

No entanto, YUN (1996) relata que a transfrutossilação é contaminada pela presença da atividade hidrolítica que degrada os frutoligossacárides. Portanto, para contornar a natureza hidrolítica BIELECK e SOMIARI (1998) através do uso de meio bifásico (meio de solvente orgânico-aquoso contendo SDS) melhorou a atividade transferásica, estabilizando a enzima. Por outro lado, HAYASHI *et al.* (1991) verificou a importância do uso do suporte inorgânico (vidro poroso de Shirasu) para a produção contínua e seletiva de frutoligossacárides a partir de 40% (p/v) de sacarose.

Pode-se ressaltar também que o emprego de aditivos alimentares, onde se enquadram tanto a invertase, o açúcar invertido e os frutoligosacarídeos, de acordo com o estudo realizado pelo "Business Communications Company Inc.", vem aumentando ao longo destes últimos anos atingindo aproximadamente 5 bilhões de dólares em 2001 e a previsão indica um aumento para 5,8 bilhões de dólares em 2006 nos EUA. ("Market Trends -Focus on Enzymes", 2002). (Figura 5).

Figura 5. Dados baseados em: "Market Trends-Focus on Enzymes", 2002.

1.2. Sobre a Imobilização

A técnica de imobilização consiste em ligar por meios químicos e/ou físicos a molécula de uma enzima a um suporte inerte com retenção da atividade catalítica, o qual pode ser usado repetida e continuamente (ILLANES, 1994).

Através deste processo, o custo de obtenção do produto de interesse pode ser minimizado por permitir a reutilização e também viabilizar o uso dos biocatalisadores nas áreas analítica e biomédica, ampliando as aplicações e melhorando as suas propriedades (FOGARTY e KELLY, 1990). As indústrias química e químico-farmacêuticas têm adotado a técnica de imobilização com fins de aprimorar a qualidade do produto e aumentar a eficiência do processo, (ZAKZ, 2001).

A aplicação desta técnica tem beneficiado tanto os processos de obtenção de produtos como em relação ao controle ambiental de resíduos orgânicos e inorgânicos (AHMAD *et al.*, 2001). O acesso ao número considerável de suportes e às técnicas de imobilização, as enzimas, quanto à sua aplicação, têm sido direcionadas para esta área (AKGÖL *et al.*, 2001).

As enzimas geralmente são solúveis e instáveis, sobretudo as intracelulares, podendo ser usadas uma única vez num dado processo. As vantagens de usá-las na forma imobilizada seriam, a reutilização, o bloqueio imediato da reação pela facilidade de remoção do catalisador, o aumento da estabilidade do catalisador, por exemplo, frente à temperatura, forças de cisalhamento, após concluída a reação, o meio reacional resultante não estaria contaminado pela enzima utilizada; o aumento da meia-vida da enzima e previsibilidade do decaimento da atividade ao longo do tempo. Considerando os aspectos mencionados, através deste procedimento, as enzimas de alto grau de pureza que são caras e de difícil obtenção em quantidades razoáveis, aumentaria a sua vida útil (RIBEIRO, 1997).

Assim, segundo AHMAD *et al.* (2001) houve nestes últimos anos um grande aumento na imobilização de enzimas. Através desta técnica, os artigos citam vantagens como uma elevada atividade catalítica, alto grau de

especificidade, a produção em grande escala e a sua viabilidade do ponto de vista econômico (AHMAD *et al.*, 2001).

Uma grande variedade de métodos podem ser utilizados para imobilizar a enzima (WALSH e HEADON, 1994). Embora cada técnica de imobilização seja única, não significa que a interação enzima-suporte seja de um só tipo (MESSING, 1985).

As cinco técnicas mais utilizadas neste processo são: por ligação covalente da enzima na superfície do suporte, por ligações cruzadas entre as moléculas da enzima (copolimerização), por aprisionamento da enzima numa matriz, encapsulamento de uma solução de enzima numa estrutura de membrana e por adsorção da enzima na superfície do suporte (Figura 6).

A imobilização por ligação covalente segundo descreve ILLANES (1994) normalmente é feita em duas etapas. Na primeira o suporte é tratado com um reagente capaz de ativar seus grupos funcionais. Após a remoção do excesso de ativador, o suporte e a enzima são postos em contato. A mistura é deixada sob condições brandas de temperatura (no máximo igual à do meio ambiente) por um determinado tempo, a fim de que as ligações covalentes entre o suporte e a enzima se estabeleçam.

O uso da ligação covalente permite uma ligação forte da enzima ao suporte e por conseguinte, a fácil interação enzima/substrato devido à localização superficial do catalisador, o aumento da termoestabilidade em decorrência da forte interação com o suporte, o aumento da estabilidade operacional (por exemplo, a resistência às forças de cisalhamento), e facilita a escolha do reator a ser empregado (ILLANES, 1994).

Entretanto as suas desvantagens também devem ser lembradas, a saber: a suscetibilidade de estruturas ativas da macromolécula aos reagentes utilizados e/ou às tensões conformacionais impostas pela união forçada a um material estranho (suporte); a atividade catalítica pode diminuir devido à forte ligação existente entre o suporte e a enzima, podendo, por exemplo, tolher ao catalisador a capacidade de assumir modificações estruturais adequadas, que favoreçam o encaixe perfeito do substrato em

seu sítio ativo; dificuldade de se estabelecer as melhores condições de imobilização e de se recuperar o suporte com facilidade (ILLANES, 1994).

Figura 6. Tipos de Imobilização (baseada em CHAPLIN, 2002)

A copolimerização, por sua vez, é uma técnica em que as moléculas da enzima são covalentemente ligadas uma às outras por meio de reagentes bifuncionais. Segundo WEETAL (1975) os reagentes de maior interesse, dentre outros, são: glutaraldeído, ácido bis-diazobenzidina-2, 2'-dissulfônico, 4,4'-difluor-3,3'-dinitrodifenilsulfona, diazobenzidina, tolueno-2,4-diisotiocianato e hexametilenodiisocianato.

O reagente bifuncional atua agregando as macromoléculas entre si formando os agregados insolúveis através da ligação covalente. Entretanto, muitas vezes, o seu uso é associado com outros tipos de imobilização, obtendo-se deste modo, um aumento significativo na estabilidade do catalisador (ADERCREUTZ, 1993). Neste caso, o reagente bifuncional estabelece uma ponte de união entre a enzima e o suporte, com os quais forma ligações covalentes análogas. O reativo bifuncional pode ser adicionado tanto à enzima previamente adsorvida no suporte, quanto à enzima livre com posterior adsorção ao suporte. Para este caso, pode-se citar a invertase adsorvida na quitina de camarão em presença de glutaraldeído, que apresentou sua atividade catalítica duas vezes superior ao caso em que o aldeído estava presente (ILLANES *et al.*, 1985).

Por outro lado, através da polimerização de um monômero adequado em presença da enzima tem-se a imobilização por aprisionamento. O catalisador neste caso fica retido entre as malhas do polímero solidificado. É considerado um método simples e aplicável para muitas enzimas, tendo a poliácridamida como o suporte mais utilizado (RIBEIRO, 1997).

De um modo geral, o procedimento consiste na dissolução da enzima em um tampão contendo acrilamida (monômero) e a bisacrilamida (agente formador de ligações cruzadas), sendo a polimerização iniciada por radicais livres gerados pela irradiação ultravioleta na mistura, após a adição de persulfato de amônio ou uma mistura de água oxigenada e sulfato ferroso (ALFANI *et al.*, 1988).

A polimerização pode, no entanto, causar dois riscos à enzima, a saber: primeiro, os monômeros e os radicais livres podem reagir com grupos essenciais para a catálise provocando a inativação da proteína e/ou da

enzima; segundo, a desnaturação pode ser provocada pelo calor gerado durante a reação (ALFANI *et al.*, 1988). O superaquecimento pôde ser contornado, segundo ALFANI *et al.* (1988), executando a polimerização entre duas placas de vidro vedadas com tiras de silicone e mergulhadas em banho de água a 5⁰C e então irradiadas com radiação ultravioleta, sendo a fonte adaptada bem próxima à superfície do banho. Entre outras alternativas, seria conduzir a reação em sistema emulsionado de água em solvente orgânico, sendo este último o responsável pela absorção do calor gerado. Neste caso, o tamanho das gotas de água determinam o tamanho das partículas de gel formadas (ADLERCREUTZ, 1993).

Com relação ao encapsulamento, diversos polissacarídeos naturais, tais como alginato, ágar e k-caragena têm sido empregados sob determinadas condições para aprisionar biocatalisadores em geral (RIBEIRO, 1997).

A título desse exemplo, cita-se a técnica utilizando o alginato de sódio. É um copolímero linear dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico, solúvel em água, que é misturado com uma solução ou suspensão de íon bivalente (Ca^{2+} ou Ba^{2+}). Tão logo, a mistura contendo alginato entra em contato com a solução de íon bivalente e forma-se um gel dentro do qual o biocatalisador fica retido (ARRUDA e VITOLO, 1999).

A imobilização por aprisionamento tem como vantagens principais, a saber: a facilidade de preparação da membrana envolvente semi-permeável; a disponibilidade no mercado dos materiais para confeccionar o suporte; o biocatalisador uma vez envolto pela membrana fica protegido do ataque das hidrolases (sobretudo de proteases) e/ou de inibidores de alto peso molecular; o procedimento de imobilização não afeta seriamente a estrutura macromolecular do biocatalisador. Entretanto, apresenta como principais desvantagens a impossibilidade de se recuperar o suporte e a inviabilidade desta técnica para as enzimas que atuam sobre substratos de alto peso molecular (RIBEIRO, 1997).

Entre as técnicas de imobilização, geralmente, a adsorção é o primeiro método a ser tentado, pois dando bons resultados, passa a ter

preferência frente aos demais métodos, já que é de baixo custo e fácil execução (MESSING, 1975).

A adsorção em vários tipos de interfaces vem sendo estudada ao longo dos tempos. Devido à sua praticidade, tem tido grande aplicação nas áreas tecnológicas, ambientais e biológicas. A compreensão de seus princípios básicos só foi possível após a realização de experimentos extremamente cuidadosos que permitissem resultados reprodutíveis e relevantes. No entanto, a descrição teórica da adsorção está sendo alcançada com o advento de aproximações teóricas formuladas a nível molecular, métodos de simulação em computador e através de novas técnicas que avaliam as camadas superficiais ou regiões interfaciais (DABROWSKY, 2001).

Dependendo do tipo de fases que se encontram em contato, o processo pode ser: líquido-gás, líquido-líquido, sólido-líquido e sólido-gás. Os principais processos de adsorção empregados em escala industrial são do tipo sólido-gás e sólido-líquido, porém a nível laboratorial todos os tipos de interface são aplicados nas técnicas de separação (DABROWSKY, 2001).

O procedimento de adsorção de enzimas nos suportes é simples e de uso amplo que tem capacidade potencial de reter grande quantidade de enzimas (aproximadamente 1g de enzima/ g de matriz). A enzima é colocada juntamente com um suporte apropriado, em condições adequadas de pH e força iônica, em seguida, após um determinado tempo, é feita a lavagem do sistema para remover a enzima livre (não adsorvida) obtendo-se então, o complexo imobilizado. O suporte deve ser escolhido em função da ausência ou mínimo desprendimento da enzima durante o uso. Embora geralmente, a força de atração entre as moléculas de enzima e o suporte sejam fortes, muitos fatores podem afetá-la e dentre elas citam-se o período de contato enzima-suporte, área superficial, porosidade, introdução de substrato, característica de enzima e do suporte, mudanças de pH e força iônica (CHAPLIN, 2002).

Deve-se lembrar que a primeira proposta efetiva de imobilização de uma enzima foi feita por NELSON e GRIFFIN em 1916, através da adsorção da mesma num material inerte. Mais especificamente, a adsorção da invertase no carvão ativo (NELSON e GRIFFIN, 1916 apud MESSING, 1975).

Entre os suportes mais utilizados neste tipo de imobilização, CHAPLIN (2002) cita as matrizes de troca iônica, carbono poroso, argila, óxidos metálicos hidratados, vidros e resinas de polímeros aromáticos. As matrizes de troca iônica, embora sejam mais caras do que os outros suportes, tornam-se mais econômicas devido à facilidade de regeneração quando as enzimas adsorvidas perdem as suas atividades; um processo que envolve a remoção das enzimas com o uso de uma solução concentrada de sais seguida de ressuspensão do suporte numa solução contendo a enzima ativa.

Por outro lado, as quantidades relativas da enzima e suporte para o máximo de adsorção devem ser analisadas. Em princípio, seria razoável supor que quanto maior fosse a quantidade de enzima maior deveria ser a saturação do suporte, se sua quantidade fosse mantida constante. Embora ocorra esta saturação, CHAPLIN (2002) afirma que a partir de uma dada concentração do biocatalisador a atividade do sistema imobilizado se estabiliza, deixando de ser crescente com o aumento da quantidade de enzima adsorvida no suporte. É provável que a redução da eficiência catalítica se deve ao fato de que a quantidade do catalisador disponível para interagir com o substrato dependa da difusão deste até o sítio ativo, já que a reação ocorre preferencialmente com as moléculas de proteína nas camadas superficiais (RIBEIRO, 1997).

Nos estudos de imobilização de células/enzimas, o uso de conhecimentos de química, biofísica, bioanalítica e engenharia química juntamente com a biologia molecular vem sendo aplicado para promover maior eficiência ao biocatalisador, à bio-separação e bioanálise (BUTTERFIELD *et al.*, 2001). Entre estes estudos, FAROOQI *et al.* (1997) e SOSNITZA *et al.* (1998) descreveram uma estratégia para aumentar a

quantidade de glicoproteínas imobilizadas no suporte insolúvel. Para isso, basearam-se na natureza multivalente da concavalina-A e das cadeias múltiplas de oligossacárides das glicoenzimas, aumentando a bioafinidade com o suporte.

Uma das principais causas que impedem o uso desta técnica em grande escala se deve à imprevisibilidade do comportamento do biocatalisador com o tempo nas condições operacionais. As diversas alternativas para modificar a atividade e estabilizar as enzimas estão estabelecidas, e fatores como temperatura, presença de inibidores, força iônica, pH, fluxo do meio reacional e o tipo do solvente estão envolvidos nesse procedimento. Porém, de um modo geral, a investigação desses fenômenos requer um grande empenho laboratorial. Segundo BOY *et al.* (1999) a avaliação de um biocatalisador ligado ao suporte através de um carreador, embora apresente alta atividade, capacidade seletiva e estabilidade, além de ser imprecisa não minimizaria as dificuldades na determinação dessas propriedades.

Para contornar este problema, eles propuseram uma nova metodologia baseada na caracterização *in-situ* da atividade e estabilidade a longo-prazo frente à temperatura. Neste estudo utilizaram a carboxi-ester-hidrolase (Novozyme 388) na forma solúvel e imobilizada em carreador organopolisiloxano hidrofóbico (DELOXAN®), adotando-se a reação hidrolítica de triglicérides em reatores do tipo batelada e contínuo.

A caracterização foi desenvolvida segundo VRABEL *et al.* (1997b), expondo o biocatalisador numa larga faixa de temperatura (0 a 100°C) dentro de um curto espaço de tempo, aumentando continuamente a temperatura do meio reacional durante o experimento. Através dos resultados experimentais obtidos, determinaram o mecanismo de desnaturação e formulou-se o seu modelo matemático correspondente. O emprego das condições a nível industrial permite a detecção dos pontos relevantes que caracterizam o biocatalisador. Esse tipo de conhecimento permite a otimização do processo em escala industrial dentro de um curto espaço de tempo.

1.2.1. Sobre a Imobilização da Invertase

A dimensão prática da transformação enzimática da sacarose em glicose e frutose ou oligossacarídeos pode ser significativamente ampliada pelo uso da invertase na forma imobilizada. Nesta condição, é possível associar as condições reacionais suaves requeridas pela enzima com a sua reutilização e conseqüente possibilidade de conduzir a transformação por processo contínuo.

No contexto da imobilização, a invertase foi o objeto da primeira tentativa deste processo em carvão ativo em 1916 (ADERCREUTZ, 1993). Ela tem sido, desde então, imobilizada em uma ampla variedade de suportes (WISEMAN, 1981).

Existem várias publicações referentes à atividade invertásica e o seu uso na forma imobilizada (ETTALIBI e BARATTI, 2001), porém serão mencionados apenas os mais recentes.

Diferentes técnicas de imobilização de invertase por ligação covalente foram empregadas. Dentre elas citam-se o uso de: poliacrilonitrila (ULBRICHT e PAPRA, 1997), celulose ativada (VRABEL *et al.*, 1997a), polianilina modificada (CHEN *et al.*, 2000); dímero granular de ácido-co-alquil-poliamina ativada com carbodiimida (TÜMTÜRK *et al.*, 2000); microesferas magnéticas de polivinil-álcool tratadas com glutaraldeído (AKGÖL *et al.*, 2001) e extrato de feijão (tipo "Jack bean meal") (MELO e D'SOUZA, 2000).

A enzima imobilizada devido à sua estabilidade tem desencadeado vários estudos. A sua aplicação em biotecnologia, tem como uma das estratégias associar grande quantidade de enzima no suporte. Porém em muitas ocasiões a ineficácia da imobilização de glicoenzimas por ligação covalente, envolvendo as cadeias de aminoácidos com os grupos reativos, deve-se à interferência das cadeias de oligossacarídeos (FAROOQI *et al.*, 1997).

A alternativa seria o uso de biomoléculas e ligantes de afinidade como o anticorpo poli/monoclonal, neste caso, lecitinas para as glicoenzimas. Esta

técnica tem sido empregada, porém o seu preparo demanda um custo elevado, limitando a produção em grande escala. Como alternativa para substituir a lecitina de con-A, AHMAD *et al.* (2001) verificou o uso do suporte *Cajanus cajan*-lecitina-Seralose 4B (CCL). *Cajanus cajan* é um tipo de legume abundante na natureza e a lecitina pôde ser facilmente isolada das sementes. A invertase imobilizada em CCL, apresentou-se estável em altas temperaturas (70°C) e em valores de pH em torno de 6,5. Os autores obtiveram uma atividade acima de 80% em relação à atividade inicial após 60 dias de armazenamento a 4°C.

Por outro lado, considerando também a importância da escolha do suporte na imobilização de biomoléculas, De QUEIROZ *et al.* (2002) modificaram a superfície química de poliolefina, modelando as suas propriedades superficiais. O polipropileno (PP), uma poliolefina, é considerado um dos mais versáteis e de custo acessível aplicado amplamente em biotecnologia. Devido à sua morfologia esférica uniforme, tem sido utilizado nos bioprocessos para conversão de substratos para os produtos comercializáveis. A limitação do PP, no entanto, deve-se à baixa energia superficial e da sua hidrofobicidade. Como é do conhecimento, a presença de componentes hidrofílicos nos grupos reativos para a imobilização de enzimas é fundamental em casos em que o preparado insolúvel e a reação são realizados em meio aquoso.

Assim, através da técnica de radiação simultânea, que permite a introdução de carreadores com partes ativas na superfície de polímeros sintéticos hidrofóbicos, modificaram o PP pelo enxerto do ácido metacrílico (MA), dando-lhe, assim, o caráter hidrofílico. As atividades da invertase imobilizada situou-se na faixa de 80% e 90% e mostrou-se favorável para ser aplicada em um biorreator (De QUEIROZ *et al.*, 2002).

Na técnica de aprisionamento utilizou-se entre outros o copolímero de polisiloxane (VENTON e GUDIPATI, 1995), o filme poroso de poliolefina (TANIOKA, A. *et al.*, 1998) e alginato de cálcio (ARRUDA e VITOLO, 1999; TANRISEVEN e DOGAN, 2001 ; WATANABE *et al.*, 2001).

Um novo método utilizando cápsulas de alginato de sódio foi desenvolvido por TANRISEVEN e DOGAN (2001). O desprendimento da invertase das pérolas de alginato é relatado e processos adicionais se tornam necessários. A substituição de pérolas de alginato pelas suas cápsulas diminuíram o problema de escape da enzima do suporte. Os autores afirmam que o tratamento com o glutaraldeído tenha estabilizado o gel de alginato, prevenindo o problema citado. A invertase nas cápsulas apresentou-se mais estável em altas temperaturas (80°C) retendo 27% da atividade, enquanto a forma solúvel foi praticamente inativada. Ressalta-se que em pH extremo igual a 8, manteve 40% da sua atividade.

Ainda no preparo das pérolas de alginato de cálcio, WATANABE *et al.* (2001) propuseram o uso da técnica de atomização eletrostática ("spray drying"). Pelo gotejamento da solução de alginato em uma solução de CaCl_2 formam-se pérolas com diâmetro na ordem de milímetros, que segundo os citados autores, torna a cinética da reação influenciada pela difusão do substrato e do produto dentro da partícula. Um modo de contornar este problema seria reduzir o tamanho da pérola. Através do método da atomização eletrostática, os autores conseguiram pérolas de no mínimo 100 μm de diâmetro, uma redução de uma ordem de grandeza em relação ao método convencional de gotejamento. O diâmetro das pérolas pôde ser controlado alterando as condições operacionais como a voltagem a ser aplicada e o fluxo volumétrico da solução. A invertase imobilizada nestas pérolas apresentaram maior eficiência comparada com o método convencional de gotejamento.

KIZILYAR *et al.*, (1999) utilizaram por sua vez, uma matriz polimérica de polipirrol/politetrahydrofurano para a obtenção de um eletrodo enzimático. Nesta última técnica a enzima foi incorporada na matriz polimérica em uma única etapa por eletropolimerização. O aprisionamento da invertase nesta matriz apresentou-se estável frente à temperatura (50° e 60°C) e também após 20 dias de estocagem. A imobilização foi realizada aplicando-se um potencial constante de 1,1V em um eletrodo de platina, durante 30 minutos, numa solução contendo 0,01M de pirrol, 0,4mg.mL⁻¹ de invertase e

0,4mg.mL⁻¹ de dodecil sulfato de sódio. Segundo os autores, a técnica pode ser considerada simples, rápida, confiável e acessível do ponto de vista econômico.

Na imobilização por adsorção aplicaram-se os seguintes suportes: alumina (GEANKOPLIS *et al.*, 1987); bentonita (MONSAN e DURAND, 1971); poliacrilonitrila (ULBRICHT e PAPRA, 1997); carbono ativado (CRUEGER, 1989); concanavalina-A/ celulose (VRABEL *et al.*, 1997a; STEFUCA *et al.*, 1997); antineoglicoproteína I e II/ Sepharose 4B (JAFRI e SALEEMUDIN, 1997); resina acrílica/ etileno diamina (MAXIM *et al.*, 1987); DEAE-Sephadex (WOODWARD e WISEMAN, 1978); CM-Sephadex (WOODWARD e WISEMAN, 1978); DEAE-Celulose (ABDELLAH *et al.*, 1992); amberlite IRA-94 (OOSHIMA *et al.*, 1980); amberlite IRC-50 (OOSHIMA *et al.*, 1980).

A atividade invertásica quando imobilizada por adsorção de troca iônica em DEAE-celulose foi aproximadamente de 75% em comparação com a enzima livre (ABDELLAH *et al.*, 1992). No estudo do mesmo método em resinas trocadoras de íons Amberlite IRA-94 (aniônica) e IRC-50 (catiônica) as atividades relativas foram 75% e 8,3%, respectivamente (OOSHIMA *et al.*, 1980). Em resinas DEAE-Sephadex (aniônica) e CM-Sephadex (catiônica) observaram atividades de 41% e 70% respectivamente (WOODWARD e WISEMAN, 1978).

Dentro desta técnica a título de exemplo, VICENTE *et al.* (2001) estudaram um produto natural que denominaram como "bioskin" - composto principalmente de glicosamina e N-acetil-D-glicosamina -, obtido por meio de cultura mista de *Acetobacter xylinum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pombe*.

O "bioskin" é uma matriz de afinidade capaz de reter as glicoproteínas, que podem ser utilizadas tanto no processo de separação como no de imobilização. Segundo os autores, a invertase pôde desenvolver uma reação de afinidade específica em meio de pH adequado com os aminoaçúcares da matriz através de troca iônica. Uma lâmina de "bioskin" (20cm de diâmetro e 0,1mm de espessura) foi incubada durante 90 minutos

em 20mL de tampão acetato (10mM e pH 4,3) contendo $2,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de invertase (Sigma) em temperatura ambiente. A estabilidade quanto à adsorção da enzima foi demonstrada pela ausência de desprendimento na faixa de pH entre 2,5 e 9,1. Os autores demonstraram que o "bioskin" é uma matriz com potencial elevado para o processo de imobilização e de separação devido à sua afinidade, estabilidade ao longo do tempo e permitir a recuperação do suporte. Porém, a substituição para a forma de esferas poderia otimizá-la (VICENTE *et al.*, 2001).

Uma outra aplicação de adesão em suporte natural é relatada por D'SOUZA e MELO (2001) que imobilizaram a levedura em juta tratada com polietilenimina. A juta é um suporte natural lignocelulósico encontrado em países tropicais e subtropicais, fibra com capacidade de retenção de água elevada e pode ser obtida em forma de linhas, tecidos, colcha e capacho. Neste trabalho os autores utilizaram o tecido de juta como suporte lignocelulósico e relataram uma forte adesão em condições extremas de pH (3-10) e de concentração iônica (0,5M de NaCl). Não houve alteração do pH ótimo e da temperatura ótima com a imobilização e também aumentou a termoestabilidade. A levedura no suporte de juta tratada com 2% de polietilenimina foi então aplicada para a obtenção de xarope de frutose num reator tubular de temperatura controlada. A coluna pôde ser operada a 45°C por mais de 45 dias sem reduzir a sua eficiência.

Os outros suportes que estão sendo aplicados são os hidrogéis. Estes apresentam alta capacidade de reter a água e são estruturas poliméricas com ligações cruzadas. A versatilidade do uso de hidrogel em biomedicina e em biotecnologia tem possibilitado a sua aplicação na técnica de imobilização tanto de proteínas, como de enzimas, anticorpos e antígenos. Entre as grandes vantagens na técnica de imobilização citam-se a reutilização, sua possibilidade em operações do tipo descontínuo ou contínuo, controle de formação e fácil separação de produtos (ARSLAN *et al.*, 2000).

Devido à sua relevância e a facilidade de obtenção, cuja reação envolve um ou mais monômeros, ARSLAN *et al.* (2000) verificaram o efeito

da composição do hidrogel de poli(acrilamida/ácido maléico) para a adsorção da invertase. Com o aumento da quantidade de ácido maléico no hidrogel melhorou a estabilidade da invertase imobilizada, a saber, após um mês de armazenamento a 4°C, apresentaram 21% e 50-74% dos valores das atividade iniciais para a enzima solúvel e insolúvel, respectivamente.

O estudo das técnicas de imobilização para a invertase ainda continua e os números de artigos publicados ao longo desses anos mostram um grande interesse do seu uso na produção de açúcar invertido em grande escala.

1.2.2. Suportes

A imobilização permite a estabilidade da enzima protegendo-a da desnaturação, permite a reutilização, reduz o custo operacional além de facilitar a separação e agilizar a recuperação da própria enzima. Essa tecnologia provavelmente tem sido favorecida com o grande número de suportes disponíveis e das diversas técnicas de imobilização (AKGÖL *et al.*, 2001).

As elevadas atividade e estabilidade operacionais apresentadas pela enzima imobilizada devem-se em boa parte à escolha de suporte adequado (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Muitos materiais sólidos ou geleiformes, têm sido aplicados na imobilização de enzimas, porém existem requisitos básicos para a sua escolha (VITOLLO, 1981; SINISTERRA, 1992).

Um suporte adequado deve apresentar as seguintes características (RIBEIRO, 1997):

- As características físicas do suporte devem ser adequadas para o uso no reator selecionado;
- Deve manter a estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais;
- Conter grupos químicos capazes de se ligarem ao biocatalisador;

- O material constituinte do suporte deve permitir a obtenção de partículas com dimensões variadas, a fim de que se possa alcançar um ponto de equilíbrio entre a redução de efeitos difusionais e a operacionalidade do reator, sobretudo quando este for do tipo leito fixo;
- Porosidade compatível com as dimensões do biocatalisador a ser imobilizado;
- Apresentar resistência à contaminação microbiana e termoestabilidade;
- Permitir a regeneração.

A diversidade e as características dos suportes são muito variadas, podendo a origem dos mesmos ser tanto inorgânica quanto orgânica. A grosso modo e de acordo com a morfologia, eles podem ser divididos em suportes porosos e não porosos. Estes últimos, por sua vez, podem ser sólidos de porosidade controlada (poros com diâmetros homogêneos e distribuídos regularmente pela superfície do material) ou porosidade irregular (poros com diâmetros heterogêneos) ou ainda, géis semi-permeáveis (estrutura reticular, película envolvente ou copolímeros).

Em conjunto com a morfologia básica do suporte, pode-se usar uma variedade de configurações, a saber, pós, fibras, membranas, dentre outras.

Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas da enzima, apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com o substrato. No entanto, a sua desvantagem é a área superficial reduzida, dificuldade de remoção das partículas do meio reacional e/ou à limitação do fluxo no reator (RIBEIRO, 1997).

O suporte poroso, por sua vez, possui grande área superficial, desde que a distribuição das moléculas protéicas estejam tanto na face externa quanto interna dos poros. Grupos químicos carregados localizados dentro dos poros poderão facilitar ou dificultar a catálise, dependendo se o substrato é ou não ionizável nas condições de reação. Este fato, pode ser aproveitado através de um planejamento adequado, levando em conta os tipos de enzima e de reator a serem empregados. Deve ser lembrado que os

problemas difusionais podem surgir ao se usar suportes porosos, pois o substrato além de se difundir da solução para a superfície do suporte, deverá difundir-se, também através dos poros, pois boa parte das moléculas do catalisador estão situadas no interior dos mesmos. Aliás, a massa molecular do substrato passa a ser um fator decisivo no rendimento da reação. Entretanto, a localização interna da enzima confere-lhe uma proteção maior frente à eventual turbulência no meio da reação.

Outro ponto a ser considerado, relaciona-se à estabilidade dimensional do material constituinte do suporte, ou seja, se é rígido (inorgânico) ou elástico (orgânico). A estrutura rígida tem como vantagem a não deformação da matriz quando compactada em reatores do tipo coluna, a proteção da enzima contra forças de cisalhamento e colaborar na manutenção da estrutura tridimensional da proteína. O suporte elástico oferece a vantagem de poder ser empregado sob a forma de membranas finas, possuindo grande área superficial e oferecendo baixa resistência difusional. Contudo, devido à sua flexibilidade pode sofrer deformações durante o uso e com isto afetar a estrutura conformacional da enzima (RIBEIRO, 1997).

Entre os inúmeros suportes aplicados na técnica de imobilização serão abordados, de uma forma geral, somente aqueles utilizados para a adsorção.

Os tipos de suportes aplicados na indústria podem ser divididos nos seguintes grupos: carbonáceos (carbono ativo, fibra de carbono ativo, micro pérolas de mesocarbono), minerais (géis de sílica, alumina ativa, metais oxidados, hidróxidos de metais, zeolitos, minerais de argila, argila porosa hetero-estruturada, nanomaterias inorgânicos) e polímeros sintéticos compostos (complexo carbono-minério; X-eletrólito, X=Zn, Ca; suporte misto).

Em diferentes períodos de tempo, o desenvolvimento da técnica de adsorção baseava-se em vários tipos de suportes. Antes da Primeira Guerra Mundial nos adsorventes carbonáceos, durante o período entre a Primeira e a Segunda Guerra em carbonos ativos, géis de sílica e óxidos de alumínio,

mas depois da Segunda Grande Guerra houve um progresso expressivo com a descoberta e aplicação de zeolito sintético. No momento, entre 40 tipos de zeolitos naturais, aproximadamente 120 estruturas sintéticas foram reconhecidas através de cristalografia (DABROWSKY, 2001).

Dentre a maioria de suportes sólidos aplicados na indústria, muitos possuem estrutura porosa, que consiste de poros de diferentes tamanhos e formatos. Se os poros forem do tipo fendas, emprega-se o termo largura, porém se o formato do poro for cilíndrico, neste caso utiliza-se o termo diâmetro. No campo da adsorção, a porosidade é classificada em três grupos: microporosos (menor que 2nm), mesoporosos (entre 2 e 50nm) e macroporosos (acima de 50nm). Essa classificação tem sido bem aceita na literatura referente à adsorção, e a expressão nanoporosos, quando mencionada, pode-se referir tanto aos micro quanto aos mesoporosos.

Os suportes que apresentam porosidade são os ecologicamente recomendáveis para aplicação em processos de um modo geral (DABROWSKY, 2001). Por isso, dar-se-á maior atenção às suas propriedades.

O tamanho dos poros é um dos fatores fundamentais na adsorção. No caso dos microporosos os seus tamanhos são comparados com os das moléculas adsorvidas, lembrando que todos os átomos ou moléculas do suporte podem interagir com as espécies adsorvidas.

A diferença fundamental entre a adsorção em microporosos e em suportes com maior porosidade (meso e macroporosos) é o tipo de interação entre as moléculas do suporte e da espécie adsorvida. Por conseguinte, a adsorção em microporosos é essencialmente um processo que envolve o preenchimento do poro, onde o volume se torna o fator determinante. O parâmetro que caracteriza os microporosos, então, é o seu volume referente à unidade da massa do sólido e o seu tamanho, que por sua vez é expressa em função da distribuição do adsorvido no microporo. A determinação da área superficial específica do suporte, geralmente aceita pelas equações de adsorção é uma característica teórica, sendo muitas vezes enganosa.

Para os mesoporosos, cujas paredes são formadas por uma grande quantidade de átomos ou moléculas adsorventes, observa-se uma propriedade física distinta na interface de ligações e na sua área superficial. Nos macroporosos, a força de adsorção atua próximo às paredes e não no espaço vago do seu volume. Deste modo, para o caso dos mesoporosos observa-se uma adsorção em mono e em multicamada e o seu preenchimento total ocorre de acordo com o mecanismo de condensação capilar do adsorvido (medida calorimétrica da adsorção - isoterma de adsorção). Conforme descrito, a área superficial específica, o volume dos poros e o tamanho dos poros ou a distribuição volumétrica dos poros tornam a ser os parâmetros que caracterizam os mesoporosos. Vale a pena lembrar também, que os mesoporosos e os macroporosos permitem um transporte de moléculas adsorvidas dentro dos seus poros (DABROWSKY, 2001).

A aplicação desses suportes requer caracterização em facetas múltiplas como composição química, estrutura geométrica e cristalográfica, propriedade mecânica e superficial, e a distribuição funcional de energia assim como a distribuição do tamanho e formato dos poros no material. Embora a interpretação física seja um tanto complexa, quando associada às medidas adicionais independentes como a calorimétrica e espectroscópica, permite uma correlação entre a energia de adsorção distribuída e a natureza química. Muitas técnicas possibilitam, atualmente, obter as informações concernentes à propriedade físico-química destes materiais: microscopia eletrônica de varredura, difração de raio-X e espectroscopia de raio-X, ressonância magnética nuclear, etc. Através destas técnicas, os dados de isoterma de adsorção/desorção têm sido ampliado e por conseguinte, dando informações referentes ao comportamento do suporte e do adsorvido (DABROWSKY, 2001).

A adsorção de proteínas presentes em soluções aquosas em diversas interfaces representam uma das propriedades naturais mais exploradas desses suportes, e conforme já mencionado é de grande relevância na área biológica, para a tecnologia moderna e para a proteção ambiental. Essa propriedade, adsorção protéica, vem sendo aplicada na indústria alimentícia

ao longo dos tempos e em outras áreas também tem alcançado êxito, a saber, biotecnologia, farmacologia e medicina.

1.2.3. Resinas de troca iônica

Muitos produtos tanto de origem natural quanto sintética apresentam propriedades de troca iônica. Entre as resinas trocadoras de íons, a mais importante é a do tipo orgânica.

A troca iônica pode ser definida como sendo o intercâmbio reversível de íons entre um sólido e um líquido, durante o qual não ocorre alteração substancial na estrutura da fase sólida.

Uma resina trocadora de íons pode ser visualizada como uma rede hidrocarbônica tridimensional e elástica à qual são ligados grupos químicos ionizáveis responsáveis em última análise pelo seu comportamento químico. A estabilidade química, térmica e mecânica da resina se devem principalmente à estrutura da matriz, ao grau de intercruzamento, à natureza e ao número de grupos ionizáveis.

A natureza da rede hidrocarbônica afeta o comportamento trocador de íons da resina em grau mas não no tipo de íon intercambiado. A rede hidrocarbônica deve ser resistente à oxidação, à redução e à tensão mecânica, bem como ser insolúvel nos solventes orgânicos comuns e ser constituída por partículas esféricas, que favorecem as propriedades hidráulicas do material.

O grau de intercruzamento, por sua vez, determina a largura dos poros da matriz polimérica e em consequência a capacidade de entumescimento ("swelling") e a mobilidade dos contra íons na resina.

O entumescimento ("swelling") é a capacidade de retenção do solvente pelos grupos polares e iônicos constituintes do material do suporte, que se expande até o ponto em que a resistência do material compensa a tendência de expansão, estabelecendo-se, assim, o chamado equilíbrio de "swelling" (HELFFERICH, 1995).

Essa propriedade pode ser favorecida pelos seguintes fatores, a saber, solventes polares, baixo grau de ligações cruzadas na resina, elevada

capacidade de troca iônica da resina, forte tendência de solvatação dos grupos iônicos fixos, forte solvatação de contra íons, baixa valência dos contra íons, dissociação completa na resina e baixa concentração da solução externa.

Quanto ao tipo de grupos ionizáveis, estes determinam o seu comportamento (aniônica ou catiônica), sendo o número destes grupos, o responsável pela capacidade e a seletividade da resina (HELFFERICH, 1995).

Assim, vários tipos de resinas trocadoras de íons podem ser preparadas com propriedades diferentes, variando-se a natureza e o grau de ligações cruzadas, como também a natureza e o número de grupos ionizáveis.

Uma rede com estas características pode ser conseguida através da copolimerização do estireno com o divinilbenzeno que são os componentes básicos das resinas tipo Dowex® (BUNGAY, 1995).

Figura 7. Resina seca do tipo Dowex® 1x4-200 no aumento de 20x.

Dentre as várias propriedades químicas do Dowex®, a seletividade (capacidade da resina em selecionar os íons a serem intercambiados) é uma

das mais importantes, sendo dependente da temperatura, pressão, tipo dos grupos funcionais ligados ao copolímero estireno-divinilbenzeno, valência e natureza dos íons a serem trocados, presença na solução de íons estranhos ao intercambiamento, carga da resina e força iônica total da solução (GUZZO, 2000; BUNGAY, 1995).

As propriedades das resinas Dowex® podem ser alteradas tanto pela variação do tamanho das partículas quanto pelo número de ligações cruzadas na cadeia hidrocarbônica. Em geral, diminuindo o tamanho das partículas aumenta-se a sua estabilidade física, diminui-se o tempo para o estabelecimento do equilíbrio, quando em contato com uma solução, reduz-se os problemas difusionais e aumenta-se a eficiência de troca por unidade de volume ou massa da resina (BUNGAY, 1995).

A variação do grau de ligações cruzadas da resina, conforme mencionado anteriormente, afeta primordialmente a sua intensidade de entumescimento. O grau de intercruzamento de um copolímero estireno-divinilbenzeno é devido exclusivamente à fração de divinilbenzeno presente na estrutura da resina.

Assim, as resinas Dowex® contendo 2% (código 1x2), 4% (código 1x4) e 8% (código 1x8) de ligações cruzadas, são formadas por partículas contendo 2%, 4% e 8% de divinilbenzeno e 98%, 96% e 92% de estireno, respectivamente. O divinilbenzeno é o responsável pela conformação tridimensional da rede polimérica e pela sua insolubilidade em solventes comuns. Quanto maior o grau de intercruzamento menor é a capacidade da resina se expandir em meio aquoso, de tal sorte que resinas contendo intercruzamento acima de 30 % não se prestam ao intercambiamento de íons.

Enfim, o intercruzamento apresentado por uma resina Dowex® deve ser tal a permitir uma expansão adequada do material para acelerar a difusão dos íons em seu seio, levando ao rápido estabelecimento do equilíbrio iônico entre a solução e a resina. Por conseguinte, uma resina com baixo grau de intercruzamento apresenta alta expansibilidade, tornando suas partículas moles e deformáveis. Inversamente, a resina com alto grau de

intercruzamento não se expande e suas partículas são extremamente rígidas.

Há quatro tipos básicos de resinas trocadoras de íons, a saber, resinas de forte ou fraco caráter ácido (catiônicas), e resinas de forte ou fraco caráter básico (aniônicas). As aniônicas, designadas por Dowex[®] 1, são copolímeros estireno-divinilbenzênicos adicionados de grupos amino quaternários, que diferem nos radicais ligados ao átomo de nitrogênio (BUNGAY, 1995).

Neste trabalho foram selecionadas resinas Dowex[®] aniônicas, diferentes, apenas, no grau de intercruzamento e na granulometria, porque na faixa ótima de pH para atividade invertásica solúvel (4.5-5.0) (ARRUDA, 1996), as moléculas da enzima possuem carga efetiva negativa, tendo em vista o pHi da invertase ser igual a 4.0 (DAUTZENBERG *et al.*, 1991).

O Dowex[®] merece uma avaliação mais apurada no que se refere ao seu uso como suporte para imobilização de enzimas, devido as suas qualidades inerentes e comprovadas, a saber, fácil regeneração/recuperação (BUNGAY, 1995), estabilidade e atoxicidade, disponibilidade no mercado, diversidade de aplicações ao longo dos últimos 50 anos (na catálise heterogênea, em operações unitárias industriais de purificação, concentração, fracionamento, dentre outras) (BUNGAY, 1995; GUZZO, 2000), condições operacionais brandas no uso, alta capacidade trocadora de íons e de retenção de macromoléculas protéicas.

1.2.4. Sobre a aplicação do Dowex[®]

As pérolas do tipo poliestireno-divinilbenzeno como no caso das resinas do tipo Dowex[®], têm sido amplamente utilizadas em biotecnologia. A sua estrutura porosa e o tamanho dos respectivos poros têm direcionado à aplicação em diversas áreas. Estas propriedades, devido à tamanha relevância, têm sido objeto de vários estudos.

A sua maior aplicação como polímeros de troca iônica é citado na técnica cromatográfica. Muitos estudos, portanto, quanto à sua propriedade têm sido provenientes desta técnica.

Segundo LI *et al.* (2001), a sua propriedade térmica tem sido negligenciada, embora tenha sido avaliada quanto à estabilidade química durante a decomposição térmica. A estabilidade térmica é de extrema importância em se tratando de adsorção de gases e o seu uso como resinas regeneráveis para a dessalinização.

Comparado com os materiais inorgânicos porosos, geralmente os poliméricos são mais instáveis acima de 200°C. O grau de ligações cruzadas confere à resina a insolubilidade em solventes e a sua termoestabilidade. No entanto, um relato de decomposição de copolímero estireno-divinilbenzênico a elevada temperatura levou os autores como LI *et al.* (2001) analisarem a correlação entre o grau de ligações cruzadas e sua estabilidade térmica, física e química. Neste estudo, através do emprego de termogravimetria e método calorimétrico de varredura diferencial, constataram o que era esperado, a temperatura de decomposição térmica elevou com o aumento do grau de ligações cruzadas nas pérolas.

Por outro lado, CREVECOEUR *et al.* (1999) analisaram a propriedade de entumescimento em função da temperatura, quantidade de agente entumecedor ("blowing agent" - neste caso, utilizaram a água) e do grau de ligações cruzadas. Através deste estudo, verificaram a existência de um ótimo "swelling" para determinada temperatura. A expansibilidade foi alcançada reduzindo-se o grau de difusão externa relativa das pérolas no fluxo de ar quente aumentando a quantidade do agente entumecedor (água/umidade). Esta propriedade, porém, às temperaturas baixas foi insignificante devido à insuficiência da pressão de vapor e porque o agente entumecedor, neste caso, a água é perdida pela secagem.

Entre as outras aplicações, relata-se o uso como extrator de troca iônica na produção contínua de L-cisteína, que é utilizada na área de medicamentos, cosméticos e como aditivo em alimentos (RYU *et al.*, 1996). A baixa produtividade, odor desagradável e problemas residuais levaram ao

emprego de bioconversão utilizando *Pseudomonas* imobilizada e a resina catiônica foi empregada para a recuperação do produto.

Com relação ao seu uso na imobilização de células/enzimas, ainda, tem sido escassa nestes últimos dez anos.

ABDEL-NABY *et al.* tem aplicado o Dowex® imobilizando enzimas ou células: *Bacillus mycoides* (ABDEL-NABY *et al.*, 1998), *Aspergillus niger* NRC 107 xilanase (ABDEL-NABY, 1993) e *Aspergillus niger* NRC 107 β -xilosidase (ABDEL-NABY, 1993) e *Penicillium funiculosum* 258 dextranase (ABDEL-NABY *et al.*, 1999).

ABDEL-NABY *et al.* (1998) estudaram comparativamente a produção de protease através de vários métodos de imobilização de *Bacillus mycoides*, a saber, por adsorção física, por troca iônica, por ligação covalente e por aprisionamento.

A protease é usada em detergentes, no processamento de couro, na fermentação e na indústria alimentícia e farmacêutica. As enzimas proteolíticas aplicadas em escala industrial são geralmente de origem microbiana, existindo, porém, poucas cepas produtoras. Além disso, o aumento da demanda de protease nessas áreas, justifica o estudo de sua produção a partir de outras fontes microbianas e do seu uso na forma imobilizada.

Na imobilização da protease de *Bacillus mycoides* por troca iônica, ABDEL-NABY *et al.* (1998) utilizaram DEAE-Sephadex A 25, Dowex®-50W, Amberlite IR-120, Dowex® 1x4 (Cl), DEAE-Celulose e Eceola-Celulose. Neste estudo, o Amberlite IR-120/protease apresentou a maior atividade por grama de suporte (28,09U/g de suporte).

Na imobilização da dextranase de *Penicillium funiculosum* 258 utilizando os mesmos suportes mencionados para a protease, ABDEL-NABY *et al.* (1999) obtiveram coeficiente de imobilização abaixo de 15% e em particular para os complexos formados pelo Amberlite IR-120 e pelo Dowex-50W não detectaram nenhuma atividade. Segundo os autores, a inibição aparente pode ser devido ao envolvimento dos sítios ativos da enzima no

processo de fixação no suporte. A dextranase, por sua vez, é usada para a preparação de sangue artificial, em dentifrícios, por exemplo.

Entre as outras enzimas, IVANOVA *et al.* (1999) imobilizaram a α -amilase de cepas de *Bacillus liqueniformis* e MUTLU *et al.* (1999), utilizaram também a mesma resina do tipo Dowex® para a imobilização de pectinase.

A pectinase comercial (Pectinex® Ultra SP-L), quando utilizada no processo de produção de sucos, tem aumentado o rendimento e melhorado as propriedades organolépticas do produto (MUTLU *et al.*, 1999). Tendo em vista a aplicação da pectinase, SARIOGLU *et al.* (2001) analisaram a sua imobilização em resina de troca aniônica (Dowex®) utilizando a adsorção eletrostática. Com o intuito de investigar melhor a aplicação da forma imobilizada da pectinase em Dowex®, DEMIR *et al.* (2001), usaram o mesmo procedimento, concluindo que o sistema imobilizado tem um grande potencial no processo de obtenção de sucos.

A propriedade do copolímero estireno-divinilbenzeno também foi útil na preparação de ésteres de ácido graxo e na remoção do excesso de clorofila no óleo de canola. OLIVEIRA *et al.* (2000) obtiveram uma imobilização satisfatória da lipase, aprimorando o seu uso. A lipase imobilizada mostrou um bom desempenho nas reações de esterificação e de hidrólise dependendo do meio reacional empregado. No estudo de termoestabilidade, a desnaturação térmica somente foi observada acima de 50°C, restando 100% da atividade inicial na faixa de temperatura entre 40°C e 50°C durante 60 minutos.

A perspectiva de se empregar condições brandas na imobilização associada à alta capacidade de adsorver proteínas, às escassas informações na literatura sobre o seu uso como suporte de enzimas, sobretudo da invertase, ao processo de fabricação, que propicia o aproveitamento das qualidades catalíticas desta proteína e, ao mesmo tempo, ficar livre dos contaminantes no produto final, constituem-se em fatores estimulantes para o estudo de sua aplicabilidade no campo da imobilização.

Por conseguinte, este projeto procurará avaliar a possibilidade de se combinar dois materiais (invertase e Dowex[®]), já bastante usados em separado, para uso em biotransformações envolvendo a sacarose. Como vantagem adicional, este processo possibilita uma adequada gestão ambiental, por gerar pequena quantidade de resíduos inócuos, por exigir baixo consumo de recursos naturais (energia elétrica e água) e por utilizar matérias-primas de baixo custo (sacarose) ou residuais (melaço).

As poucas publicações referentes ao uso de Dowex[®] na imobilização de biocatalisadores nestes últimos dez anos, justifica a necessidade de maiores estudos nessa área.

1.3. Escolha do binômio enzima/suporte

O emprego desta técnica de imobilização, conforme já discutido, implica na disponibilidade de um binômio biocatalisador/suporte, o qual por sua vez, pode ser formado por uma ampla variedade de materiais.

Neste trabalho foi escolhido o binômio Dowex[®]/Invertase.

A invertase foi selecionada por ser:

- Uma enzima que apresenta padrão cinético definido;
- Muito estudada em eucariotos em geral;
- Disponível no mercado brasileiro e internacional;
- Possível produzi-la no Brasil, dado a alta disponibilidade de levedura residual na indústria sucro-alcooleira;
- Objeto de muitas patentes;
- Empregada como catalisador alternativo à hidrólise ácida para a produção de açúcar invertido;
- Desde 1916 uma das enzimas mais utilizadas na técnica de imobilização, gerando vasta literatura até o momento;
- Uma enzima que apresenta diversas aplicações, dentre outras, em confeitaria, em biossensores, em métodos analíticos como

reagente intermediário para certas determinações, e em reações de síntese de oligossacarídeos.

O suporte, por sua vez, foi escolhido considerando-se que:

- O Dowex[®] por sua diversidade de uso, sobretudo em operações unitárias industriais de purificação, concentração, fracionamento, dentre outras, está amplamente disponível no mercado;
- É uma resina de fácil recuperação;
- É um material usado há pelo menos 50 anos nos mais variados segmentos industriais, tendo-se mostrado inerte e atóxico;
- Permite executar a imobilização da enzima em condições brandas;
- A sua natureza química permite que seja capaz de reter fortemente macromoléculas como a invertase, através de ligações iônicas e eletrostáticas;
- As informações disponíveis na literatura sobre o seu uso para a imobilizar a invertase serem escassas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer as condições de imobilização da invertase em resina aniônica do tipo Dowex® e avaliar o desempenho hidrolítico e transferásico do complexo Dowex®/Invertase em reator descontínuo.

2.2. Objetivos Específicos

Serão avaliadas as seguintes variáveis com a finalidade de comparar as atividades das formas solúvel e imobilizada da invertase:

- ↳ Efeito do pH e da temperatura na adsorção da invertase pela resina;
- ↳ Influência da temperatura sobre a atividade e a estabilidade das formas solúvel e imobilizada;
- ↳ Efeito do pH do meio reacional sobre a enzima solúvel e imobilizada com relação à atividade e estabilidade;
- ↳ Atividade catalítica das formas solúvel e insolúvel da invertase frente a diferentes concentrações de sacarose;
- ↳ Formação de oligossacarídeos por ambas as formas de invertase frente a diferentes concentrações de sacarose.
- ↳ Comparar o desempenho catalítico (nas formas solúvel e imobilizada) de formulações com diferentes graus de pureza em invertase (Fluka® e Bioinvert®).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Foram utilizadas várias resinas aniônicas Dowex[®], a saber, 1x2-100, 1x2-200, 1x2-400, 1x4-50, 1x4-100, 1x4-200, 1x4-400, 1x8-50, 1x8-100, 1x8-200 e 1x8-400, adquiridas da Dow Chemical[®]. Utilizou-se invertase das marcas Quest International (Bioinvert[®]) e da Fluka[®]. Os demais reagentes (grau PA) empregados são de marcas tradicionais.

3.2. Métodos

3.2.1 Descrição do ensaio-padrão para a medida da atividade da invertase solúvel

Um béquer com capacidade de 250mL contendo 108 mL de uma solução tampão acetato 0,010M (pH 5,5) foi colocado em banho-maria a 37^oC. Após 10 minutos foram dissolvidos sob agitação (100rpm) - agitador Fisaton mod.317D - 12g de sacarose (Merck-7651). Após 5 minutos exatos foram adicionados 12mL de solução aquosa de invertase (Bioinvert[®] - Quest International) com diluição de 1:5000 (v/v) ou 12mL da solução aquosa de invertase da Fluka[®] com diluição de 3:1000 (p/v). Logo após a adição da enzima, foi disparado o cronômetro, passando-se a retirar alíquotas de 0,5mL do meio reacional a intervalos de 1 minuto até completar o tempo total de reação de 6 minutos.

Imediatamente antes de adicionar a enzima, tomou-se uma alíquota de 0,5mL da solução de sacarose para medir o teor de açúcares redutores inicialmente presentes (tempo zero).

As alíquotas foram colocadas em tubos de Folin-Wu contendo 0,5mL de água e 1mL da mistura reativa de Somogyi, sendo, em seguida, imersos em banho fervente por 10 minutos exatos. A seguir, foram resfriados em

banho de gelo. Adicionou-se 2,0mL de reagente Somogyi III (solução arseno-molíbdica), agitou-se para expulsar os gases e completou-se o volume até à marca de 25mL com água destilada. Homogeneizou-se bem, e após 20 minutos de repouso leu-se a cor desenvolvida a 540 nm em espectrofotômetro (Beckman® DU 640).

A velocidade da hidrólise da sacarose correspondeu à inclinação do trecho linear da curva obtida do gráfico $ART = f(t)$. A unidade de atividade invertásica (U) foi definida como sendo a quantidade (mg) de ART formado por minuto por mL do meio reacional. A título de exemplo, apresenta-se na Tabela 1 os teores de ART obtidos em função do tempo e na Figura 8 o gráfico correspondente de $ART = f(t)$.

A solução diluída de Bioinvert® e a da Fluka® para a dosagem da atividade invertásica foi acertada experimentalmente, seguindo o procedimento acima até as leituras de absorbância a 540nm caírem na faixa estabelecida para a curva padrão de glicose descrita adiante.

Para estabelecer o erro experimental desta técnica, prepararam-se cinco soluções de invertase (5.000 vezes diluídas em relação ao Bioinvert® original), sendo a atividade de cada uma delas medida conforme o ensaio-padrão descrito. Os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação foram iguais a $0,0062\text{mg.mL}^{-1}$ e 4,35%, respectivamente. A atividade do Bioinvert® e da Fluka® foi de $0,0245\text{U.mL}^{-1}$ e $0,0261\text{U.mL}^{-1}$ respectivamente. Salienta-se que o volume total de amostra retirada foi inferior a 5% do volume do meio reacional.

TABELA 1. Variação da concentração de açúcares redutores totais em função do tempo referente à hidrólise da sacarose pela invertase solúvel (Bioinvert[®]).

Tempo (min)	Abs 540nm	ART (mg.mL ⁻¹)
0	0,0520	9,00x10 ⁻⁴
1	0,124	0,0299
2	0,191	0,0550
3	0,246	0,0730
4	0,309	0,0990
5	0,375	0,123
6	0,441	0,145

FIGURA 8. Formação de açúcares redutores totais em função do tempo.

3.2.2 Imobilização da invertase em resinas aniônicas Dowex®

3.2.2.1 Estabelecimento das condições de imobilização

As resinas aniônicas utilizadas foram previamente lavadas com água deionizada, para a remoção de eventuais impurezas presentes. A lavagem consistiu na suspensão da resina em 25 mL de água deionizada (pH 5,5), a qual foi mantida sob agitação 100 rpm por 24 horas a 32°C. A resina foi separada por centrifugação (4000xg/30min), e a seguir, usada para a imobilização da enzima.

Os testes de imobilização foram iniciados usando-se a resina Dowex® 1x8-50 nas quantidades de 10, 50, 100 ou 200mg, as quais foram misturadas com 25, 50 ou 100mL de água deionizada (pH ajustado a 4,6 com HCl 1,0M) ou de tampão acetato 0,01M (pH 4,6). A suspensão foi deixada sob agitação (100rpm) por 24 horas à temperatura de 32°C. A seguir, adicionou-se 5 ou 10mg de invertase (medida em termos de proteína total e contida em 1,5 ou 3,0mL de Bioinvert®), deixando-se a suspensão até 48 horas sob agitação (100rpm). Findo este período, deixou-se o sistema em repouso à temperatura de 32°C, medindo-se a concentração de proteína total presente no sobrenadante após 4h, 7h e 24h.

A eficiência da imobilização protéica na resina foi expressa em termos de Índice de Adsorção (IA) definido pela equação:

$$IA = \left[\frac{PTA - PTS}{PTA} \right] \times 100$$

onde:

PTA= quantidade total de proteína adicionada (antes da adsorção)

PTS= quantidade total de proteína remanescente no sobrenadante.

Após a determinação da melhor proporção Dowex® 1x8-50/Invertase (p/v), repetiu-se o processo de imobilização com os demais tipos de resina Dowex®, a saber, 1X2-100, 1X2-200, 1X2-400, 1X4-50, 1X4-100, 1X4-200, 1X4-400, 1X8-100, 1X8-200 e 1X8-400.

Foram variados o pH (4,6; 5,0; 5,5 e 6,0) e a temperatura (32°C, 37°C, 45°C e 50°C) de imobilização para todas elas, inclusive para a 1x8-50.

3.2.2.2 PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

A imobilização da invertase em resinas Dowex[®] foi feita conforme o esquema:

3.2.2.3 Determinação da atividade do sistema Dowex®/Invertase

Procedeu-se conforme descrito no item 3.2.1, substituindo-se a invertase solúvel pelo complexo Dowex®/Invertase.

A atividade do complexo Dowex®/Invertase (Bioinvert®) variou com o tipo de resina utilizada, estando os valores encontrados no intervalo entre 0 e 0,0214U.mL⁻¹. No caso do complexo Dowex-1x4-200/Invertase (Fluka®) a atividade foi igual a 0,0450U.mL⁻¹.

3.2.2.4 Coeficiente de imobilização (CI)

O coeficiente de imobilização foi definido como segue:

$$CI = \left[\frac{\text{Atividade}_{\text{(enz.imobilizada)}}}{\text{Atividade}_{\text{(enz.solúvel)}}} \right] \times 100$$

Os valores de CI variaram no intervalo entre 2% e 100% para o Bioinvert® imobilizado. No caso da invertase (Fluka®), que foi imobilizada apenas na resina Dowex 1x4-200, o CI foi igual a 100%.

A estabilidade da união resina-invertase durante a execução do método de dosagem foi acompanhada pela medida do teor de proteína eventualmente solubilizada no meio reacional.

3.2.3 Caracterização da invertase solúvel e imobilizada

3.2.3.1 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A atividade invertásica solúvel ou imobilizada foi determinada conforme descrito no item 3.2.1 frente à temperatura, que foi variada de 5 em 5°C entre 30 e 60°C.

Para cada temperatura foi feito o seu respectivo ensaio em branco, ou seja, mediu-se a auto hidrólise da sacarose durante todo o tempo de reação (tomando amostras nos mesmos instantes do ensaio padrão). Para fins de cálculo da atividade invertásica, subtraiu-se a absorbância da auto hidrólise a cada tempo de amostragem. Em seguida fizeram-se os gráficos de atividade X temperatura e de Log (atividade) X (T^{-1}).

3.2.3.2 Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática

As amostras de invertase solúvel ou imobilizada foram incubadas em tampão acetato 0,010M (pH 5,5) por 12 minutos em temperaturas situadas na faixa entre 30°C e 60°C, sendo variada a intervalos de 5°C. Após o tempo de incubação, tomou-se uma alíquota e procedeu-se ao ensaio padrão.

A quantidade de enzima dissolvida no tampão pH = 5,5 foi calculada de tal modo que ao se tomar a alíquota para o ensaio padrão, a concentração (diluição) da enzima seja aquela já estabelecida ou seja, 5000 vezes diluída em relação ao extrato invertásico original. A invertase da Fluka® foi diluída na proporção de 3:1000 (p/v)

Neste estudo fez-se um só ensaio em branco, para compensar a auto hidrólise da sacarose. Fez-se então, o gráfico: (atividade residual) X (temperatura de incubação). Determinou-se, também, a constante de desnaturação térmica (k_T), destacando-se somente dois valores de temperatura, a saber, 37°C (temperatura do ensaio padrão) e 55°C (por ter causado uma significativa desnaturação da invertase nas condições empregadas).

3.2.3.3 Efeito do pH sobre a atividade enzimática

Determinou-se a atividade invertásica conforme o ensaio padrão, exceto o pH do meio de reação, que foi variado de meia unidade de pH na faixa entre 3,0 e 6,5. Os tampões usados estão indicados na Tabela 2.

Para cada pH foi feito o seu respectivo ensaio em branco, ou seja, mediu-se a auto hidrólise da sacarose durante todo o tempo de reação (tomando amostras nos mesmos instantes do ensaio padrão).

Para fins de cálculo da atividade invertásica real, subtraiu-se a absorbância da auto hidrólise a cada tempo de amostragem. Fez-se o gráfico: atividade X pH.

A natureza do tampão utilizado para obter as faixas de pH indicadas na Tabela 2, não afetou o valor da atividade da invertase quer na forma solúvel quer imobilizada.

TABELA 2: Soluções tampão e as respectivas faixas de pH de utilização.

Faixas de pH	Solução tampão 0,01M
3,0-3,5	Tampão citrato
4,0-5,5	Tampão acetato
6,0-6,5	Tampão fosfato

3.2.3.4 Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática

Nesta determinação procedeu-se à incubação prévia por 12 minutos da invertase solúvel ou imobilizada em solução tampão 0,010M (pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 4,6, 5,0, 5,5, e 6,5) à 37°C. Em seguida foi determinada a atividade enzimática residual para cada pH conforme descrito no ensaio padrão. Os tampões usados são os indicados na Tabela 2.

A quantidade de enzima dissolvida em cada solução tampão foi a mesma calculada para o ensaio padrão: a concentração (diluição) da enzima

foi aquela já estabelecida (ou seja, 5000 vezes diluída em relação ao extrato invertásico original para Bioinvert[®] e na proporção de 3:1000 (p/v) para Fluka[®]).

Neste estudo fez-se um só ensaio em branco, para compensar a auto hidrólise da sacarose. Fez-se então, o gráfico: atividade residual X pH de incubação.

3.2.3.5 Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade enzimática

A atividade da invertase solúvel ou imobilizada foi medida frente às seguintes concentrações de sacarose (mM): 10, 20, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200 e 292 (esta é a concentração fixada para o ensaio padrão).

Excetuando a concentração de sacarose, os demais parâmetros do ensaio padrão foram mantidos.

Para cada concentração de sacarose foi feito o seu respectivo ensaio em branco, ou seja, mediu-se a auto hidrólise da sacarose durante todo o tempo de reação (tomando amostras nos mesmos instantes do ensaio padrão). Para fins de cálculo da atividade invertásica real, subtraiu-se a absorbância da auto hidrólise a cada tempo de amostragem.

Com os resultados, fez-se os gráficos: v (atividade invertásica) X $[S]$ (concentração de sacarose) e $(v^{-1}) \times [S]^{-1}$, sendo as constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ calculadas a partir deste último (método de Lineweaver-Burk).

3.2.3.6 Avaliação da inativação térmica da invertase solúvel e imobilizada

A solução de invertase solúvel ou a suspensão do complexo Dowex[®]/Invertase em tampão acetato 0,01M (pH5,5) foi incubada durante 20, 40, 60, 80 e 120 minutos em cada uma das temperaturas seguintes: 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C. Após o tempo de incubação, procedeu-se conforme o ensaio-padrão, para determinar a atividade enzimática residual.

3.2.3.7 Detecção da atividade transferásica da invertase solúvel e imobilizada Bioinvert[®]

Um béquer com capacidade de 250mL contendo 108 mL de uma solução tampão acetato 0,010M (pH 5,5) foi colocado em banho-maria a 37°C. Após 10 minutos foi dissolvida sob agitação (100rpm) a quantidade de sacarose adequada para alcançar no meio reacional as concentrações de 120g.L⁻¹, 150g.L⁻¹ ou 250g.L⁻¹. Após 5 minutos exatos foi adicionada a invertase solúvel (conforme item 3.2.1) ou 100mg do complexo Dowex[®]-1x4-200/Invertase (preparado conforme item 3.2.2.2), disparando-se um cronômetro em seguida. Alíquotas de 1,0 mL do meio reacional foram retiradas a cada 3 minutos por um período total da reação de 60 minutos. A detecção dos oligossacarídeos formados foi feita através da cromatografia de camada delgada, descrita mais adiante.

3.2.3.8 Hidrólise descontínua da sacarose com a invertase solúvel ou imobilizada

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.2.1, porém utilizando-se as seguintes concentrações de sacarose: 120 g.L⁻¹, 150 g.L⁻¹ ou 250 g.L⁻¹. Nestes ensaios empregou-se somente a enzima comercial Bioinvert[®]. As concentrações de açúcares redutores totais foram determinadas tomando-se amostras (0,5mL) a cada 2 minutos até completar 10 minutos de reação e a partir de então as alíquotas foram retiradas a cada 10 minutos até completar 60 minutos.

Para cada concentração de sacarose foi feito o seu respectivo ensaio em branco, ou seja, mediu-se a auto hidrólise da sacarose durante todo o tempo de reação (tomando amostras nos mesmos instantes do ensaio padrão). Para fins de cálculo da atividade invertásica real, subtraiu-se a absorbância da auto hidrólise a cada tempo de amostragem.

Com os resultados, fez-se o gráfico: [ART] x tempo (min).

A otimização do processo de hidrólise da sacarose (na concentração de 12% (p/v)) que consistiu em minimizar o seu tempo de reação, foi feita

para os complexos formados com o Dowex[®] pela invertase da Fluka[®] e do Bioinvert[®]. Neste estudo variou-se a concentração da enzima e a quantidade da resina, procedendo-se, a seguir, conforme descrito no item 3.2.2.2.

3.2.3.9 Procedimento de reutilização do complexo Dowex[®] 1x4-200/Invertase para a hidrólise descontínua da sacarose

A reutilização do complexo Dowex[®] 1x4-200/Invertase foi feita conforme o esquema:

Após quatro ciclos de reutilização, o complexo Dowex[®]/Invertase foi removido por filtração a vácuo através de membrana Millipore[®] (poros de 0,45 μ) previamente tarada. A membrana contendo o complexo Dowex[®]/Invertase foi colocada em dessecador para desidratação até peso constante. Determinou-se assim, a provável perda do material ao longo do uso da enzima imobilizada.

3.2.3.10 Estudo da vida de prateleira do complexo Dowex[®] 1x4-200/Invertase

Foram preparados 4 complexos Dowex[®]1x4-200/Invertase conforme o esquema 3.2.2.2 e foram mantidos sob refrigeração (5°C). A atividade enzimática conforme o ensaio - padrão foi então determinada após 7, 14, 21 e 28 dias.

3.2.3.11 Análise microscópica das resinas Dowex[®] 1x4-200

Através do microscópio - Olympus[®] System (modelo BX-60) -, observou-se em diferentes aumentos (10x, 20x, e 40x) as resinas nas formas seca, hidratada e com a enzima adsorvida.

A resina seca foi visualizada colocando-se uma quantidade adequada diretamente sobre a lâmina, enquanto que as resinas hidratadas e com a enzima adsorvida foram previamente tratadas com a solução de azul de metileno (0,025% - p/v). O tempo de hidratação da resina e a preparação do complexo Dowex[®] 1x4-200/Invertase estão descritos no item 3.2.2.2.

As amostras para a análise microscópica foram preparadas conforme o esquema abaixo :

3.2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.2.4.1 Dosagem de proteína

Foi utilizado o método da diferença de absorção no UV a 215 e 225nm (SEGEL, 1979). A curva padrão foi feita utilizando-se a albumina bovina (Sigma: A - 2153) como proteína padrão.

Preparou-se uma solução de albumina $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ a partir de 0,010g de albumina que foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100mL. Adicionou-se 20mL de água destilada e 5mL de solução de NaOH (5mM). Agitou-se com cuidado para evitar a formação de espuma. Quando necessário, adicionou-se mais 3 a 4 gotas de solução NaOH (5mM) para a completa dissolução da proteína. Em seguida, completou-se com água destilada até o menisco. A Tabela 3 mostra as alíquotas tomadas para o estabelecimento da curva-padrão.

TABELA 3: Esquema montado para o estabelecimento da curva-padrão de proteína.

Cubetas	Sol. de albumina (mL)	H ₂ O (mL)	µg de proteína	ΔAbs
Branco	-	1.0	-	-
1/1'	0.1	0.9	10	0,0570
2/2'	0.2	0.8	20	0,120
3/3'	0.3	0.7	30	0,180
4/4'	0.4	0.6	40	0,240
5/5'	0.5	0.5	50	0,293
6/6'	0.6	0.4	60	0,360
7/7'	0.7	0.3	70	0,410
8/8'	0.8	0.2	80	0,470
9/9'	0.9	0.1	90	0,540
10/10'	1.0	-	100	0,591

A leitura das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro (Beckman® DU 640). Os volumes indicados na Tabela 3 foram colocados diretamente na cubeta do aparelho. Fez-se o gráfico ΔAbs X µg de proteína, estabelecendo-se a equação linear $\Delta\text{Abs} = a + b.P$, onde a = coeficiente linear, b= coeficiente angular e P = µg de proteína. Considerando os valores de ΔAbs mostrados a título de exemplo na Tabela 3, a equação seria:

$$\Delta\text{Abs} = 5,90 \times 10^{-3}.P - 7,0 \times 10^{-4} \quad (R^2=0,9997)$$

Para estabelecer o erro experimental desta técnica, foram preparadas cinco soluções de albumina bovina com as quais foram obtidas as correspondentes curvas-padrão e equações lineares. A seguir, tomou-se um dado valor de ΔAbs e calculou-se a correspondente quantidade de proteína através de cada uma das cinco equações. Assim, os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação foram iguais a 1,51 µg.mL⁻¹ e 3,48%, respectivamente.

Por este método determinou-se que a concentração de proteína solúvel no Bioinvert[®] era de 3,28mg.mL⁻¹. Sabendo que a atividade do Bioinvert[®] é igual a 0,0245U.mL⁻¹, então a atividade específica é igual a 37,4U.mg⁻¹ de proteína. No caso da Fluka[®] foi 0,19mg de proteína para 1mg de pó e a sua atividade igual a 0,0267U.mL⁻¹, daí a sua atividade específica ser 141 U.mg⁻¹ de proteína.

Sendo a atividade do complexo Dowex[®]1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]) igual a 0,0373 U.mL⁻¹ e do complexo Dowex[®]1x4-200/Invertase (Fluka[®]) 0,0337 U.mL⁻¹, então as atividades específicas são iguais a 1,14 U.mg⁻¹ de proteína e 8,87 U.mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Para este cálculo consideraram-se os fatos experimentais do índice de adsorção ter sido de 100% e da enzima ter permanecido ligada ao suporte durante todo o ensaio.

3.2.4.2 Dosagem de açúcares redutores totais (ART)

A determinação dos açúcares redutores totais foi feita usando-se os reativos de SOMOGYI (1952), conforme preconizado por ARRUDA (1996). Nas curvas padrão de glicose para a padronização dos reagentes de Somogyi, utilizou-se uma solução de glicose (PA) 0,2mg.mL⁻¹. O esquema montado para a padronização do método é apresentado na Tabela 4.

TABELA 4. Esquema montado para o estabelecimento da curva-padrão de glicose (PA-anidra, Synth 32850)

Tubo	Sol. Glicose (mL)	H ₂ O (mL)	MR* (mL)	Somogyi III (mL)	Abs 540 nm
Branco	-	1,0	1,0	2,0	-
1/1'	0,2	0,8	1,0	2,0	0,0840
2/2'	0,4	0,6	1,0	2,0	0,180
3/3'	0,6	0,4	1,0	2,0	0,280
4/4'	0,8	0,2	1,0	2,0	0,370
5/5'	1,0	-	1,0	2,0	0,470

MR* - mistura reativa

Em tubos de Folin-Wu colocou-se os volumes indicados na Tabela 4 para a solução de glicose, água e MR* (mistura reativa, feita pela mistura de 4 partes de Somogyi I e 1 parte do Somogyi II). Em seguida, os tubos foram imersos em banho fervente por 10 minutos exatos. A seguir, foram resfriados em banho de gelo. Adicionou-se 2,0mL de reagente Somogyi III a cada um deles, agitou-se para expulsar os gases e completou-se o volume até à marca de 25 mL com água destilada. Homogeneizou-se bem, deixando-os em repouso por 20 minutos. A cor desenvolvida foi lida à 540nm em espectrofotômetro (Beckman® DU 640).

Obteve-se o gráfico $ART = f(\text{mg glicose.mL}^{-1})$ colocando nas ordenadas a média dos valores das absorbâncias e nas abcissas os valores de glicose em mg (0,04; 0,08; 0,12; 0,16 e 0,20).

Para os valores de absorbância mostrados na Tabela 4, a equação correspondente é:

$$\text{Abs} = 2,38 \times [\text{ART}] - 8,2 \times 10^{-3} \quad (R^2=0,9994)$$

Para estabelecer o erro experimental desta técnica, foram preparadas cinco soluções de D-glicose com as quais foram obtidas as correspondentes curvas-padrão e equações lineares. A seguir, tomou-se um dado valor de Absorbância e calculou-se a correspondente quantidade de glicose através de cada uma das cinco equações. Assim, os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação foram iguais a $3,50 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ e 3,86%, respectivamente.

3.2.4.3 Detecção de oligossacarídeos por cromatografia de camada delgada (TLC).

A detecção de oligossacárideos foi feita por cromatografia em camada delgada segundo VITOLO e YASSUDA (1991) e HANSEN (1975). As placas de vidro (20cmX20cm) foram revestidas com filme de sílica gel G (250µm - Merck).

Aplicou-se 5 μ L da amostra na placa e em seguida, a placa foi colocada num sistema de solvente (isopropanol-acetona-0,1M ácido láctico) na proporção de 2:2:1 preparado antecipadamente. Após o solvente ter migrado 15 cm, a placa foi removida da câmara e colocada em estufa. As placas foram borrifadas com anilina-difenilamina-acetona-H₃PO₄ (85%) [2mL:2g:100mL:15mL] e aquecida numa estufa a 105 °C durante 30 minutos. Foram utilizadas concentrações de 1g.L⁻¹ para cada solução padrão de açúcares (glicose, frutose e sacarose).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento das condições de imobilização

Na tentativa de estabelecer as condições de imobilização mais adequadas, executaram-se vários testes onde foram variadas as quantidades de resina e de invertase, bem como o volume da suspensão. O procedimento está descrito no item 3.2.2.1

TABELA 5: Índice de Adsorção da proteína usando 100 mg de Dowex® 1x8-50.

Bioinvert®(mg)/ solução (mL)	IA(%) após 24horas	IA(%) após 48horas
10/100	66,2	66,4
10/50	73,4	74,2

Pela Tabela 5 observa-se que o índice de adsorção (IA) referente ao binômio 10 mg Bioinvert®/100 mg Dowex® 1x8-50, independe do tempo de contato invertase/Dowex® 1x8-50. No entanto, o IA variou cerca de 10% quando o volume da solução foi reduzido à metade. Portanto, neste ponto decidiu-se fixar o volume em 50 mL e o tempo de contato enzima/resina em 24 h.

Observou-se, também, que após os tempos de contato 24h e 48h a suspensão se tornava turva, constatando-se por análise microscópica a ocorrência de contaminação. Por isso, adotou-se como norma a esterilização (121°C por 15 min) prévia da água deionizada ou solução-tampão, bem como dos frascos a serem usados no processo de imobilização.

A seguir, realizaram-se testes nos quais a quantidade de invertase foi mantida em 10 mg, e as quantidades de Dowex® 1x8-50 iguais a 50 mg e 100 mg. Os volumes das suspensões empregadas foram iguais a 50 mL e 25 mL. Os resultados estão mostrados na Tabela 6.

TABELA 6: Índice de Adsorção da proteína em Dowex® 1x8-50, usando-se 10mg de Bioinvert®

Resina (mg)/ solução (mL)	IA(%) após 24 horas
50/25	67,9
100/25	65,4
50/50	67,0
100/50	65,6

Desta tabela observa-se que o IA após 24h praticamente não variou, quando se empregaram diferentes quantidades de resina, assim como diferentes volumes de suspensão.

Outra bateria de testes foi realizada, sendo 25 mL o volume da suspensão e 100 mg a quantidade de resina, variando-se a quantidade de invertase (5,0 mg ou 10 mg) e o tempo de contato invertase-resina (4h, 7h e 24h).

TABELA 7: Índice de Adsorção da proteína em Dowex®1x8-50, sendo o volume da suspensão igual a 25 mL e quantidade da resina 100 mg.

Bioinvert®(mg)	IA(%) 4horas	IA(%) 7horas	IA(%) 24horas
5,0	63,8	66,3	65,1
10,0	64,3	62,7	65,4

Observa-se claramente da Tabela 7 que o índice de adsorção independeu do tempo de contato e da quantidade da enzima. Por isso, fixou-se em 4h o tempo de contato enzima/resina a ser empregado doravante.

Observa-se da Tabela 8 que o IA, para uma resina em particular (Dowex-1x8-50), não dependeu da quantidade de resina (100 mg ou 200 mg), do tempo de contato enzima/resina (o de 4h continua válido) e do tipo de solvente (água deionizada ou tampão acetato).

TABELA 8: Índice de Adsorção da proteína em Dowex® 1x8-50, sendo a quantidade de invertase igual a 10 mg e volume da solução 25mL.

Resina(mg)/tipo de solução (25mL)	IA(%) após 4horas	IA(%) após 24 horas
200/água deionizada	65,2	65,6
100/tampão acetato	65,3	62,7

Frente ao exposto, as conclusões padronizadas para a imobilização seriam:

- * Temperatura: 32⁰C (parâmetro a ser reavaliado mais adiante);
- * Rotação: 100rpm (baseado na observação de que o padrão de fluxo no interior do recipiente não era turbulento, mas suficiente para manter as partículas de resina em suspensão durante todo o ensaio);
- * Sistema: 10mg de Bioinvert®/100 mg de resina Dowex®/25 mL de solução;
- * 24horas de contato resina-solução (100rpm/32⁰C);
- * 4horas de contato Bioinvert®/resina (100rpm/32⁰C).

4.2 Fatores que afetam a interação Dowex®/Invertase

4.2.1 Efeito do pH

Estabelecidas as condições de imobilização estudou-se os efeitos do pH na adsorção da enzima em todas as demais resinas (Tabela 9). Os estudos foram feitos tanto em água deionizada (pH ajustado a 4,6, 5,0, 5,5 e 6,0) quanto com solução tampão. As soluções tampão utilizadas foram acetato (pH 4,6 a 5,5) e fosfato (pH 6,0).

TABELA 9: Índice de Adsorção de proteína (%) em várias resinas aniônicas do tipo Dowex® frente a diferentes valores de pH

Dowex®	Água deionizada				Solução tampão			
	pH							
	4,6	5,0	5,5	6,0	4,6	5,0	5,5	6,0
1x8-50	67,5	67,8	86,9	67,9	64,4	67,9	69,0	74,8
1x8-100	69,8	69,4	91,8	70,4	68,5	65,6	74,1	72,7
1x8-200	71,7	76,4	88,7	75,9	71,5	76,9	71,7	74,4
1x8-400	76,4	74,8	93,9	82,5	92,4	79,8	77,9	76,0
1x4-50	69,0	69,1	92,2	78,6	66,4	64,1	73,5	67,1
1x4-100	86,9	83,5	93,7	83,7	81,5	79,8	84,5	81,5
1x4-200	75,3	77,3	93,2	77,8	77,9	83,5	79,5	77,2
1x4-400	71,0	73,0	90,6	82,1	90,4	78,7	73,6	74,2
1x2-100	71,1	71,3	89,6	82,7	68,4	65,9	64,7	66,7
1x2-200	72,1	68,7	88,2	68,6	90,9	70,2	71,7	82,6
1x2-400	90,0	94,8	97,5	100	97,1	93,7	100	97,5

Figura 9. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex[®]-1x8 em água deionizada frente à variação do pH do meio.

Figura 10. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em água deionizada frente à variação do pH do meio.

Figura 11. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em água deionizada frente à variação do pH do meio.

Figura 12. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x8 em tampão acetato frente à variação do pH do meio.

Figura 13. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em tampão acetato frente à variação do pH do meio.

Figura 14. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em tampão acetato frente à variação do pH do meio.

Observa-se da Tabela 9 e Figuras 9 a 14 que as resinas aniônicas Dowex® utilizadas, adsorveram mais de 60% da proteína presente na solução. Preliminarmente, pode-se considerar este índice satisfatório frente aos dados da literatura pertinente (BARROS e VITOLO, 1992), embora o coeficiente de imobilização da atividade enzimática, que será avaliado no decorrer do trabalho, indicará o binômio Dowex®/Invertase mais apropriado.

No entanto, os valores de IA constantes desta tabela mostram claramente que as resinas 1x4-100 e 1x2-400 apresentaram $IA \geq 80\%$, independentemente do tipo de solvente (água deionizada ou tampão acetato) e do pH da solução. Acrescenta-se, também, o fato de que em água deionizada e pH 5,5 o IA foi superior a 85% para todos os tipos de Dowex® empregados.

É provável que diferenças na percentagem do copolímero (divinilbenzeno) constituinte da resina e o tamanho dos grânulos influam na capacidade de retenção protéica. Assim, a resina Dowex®1x2-400 (2% de divinilbenzeno e partículas de 400 mesh) por ter as malhas mais largas (LI *et al.*, 2001) e por apresentar maior área interfacial, acomodaria em sua estrutura as moléculas de invertase bem melhor do que as demais resinas. Merece, também, menção a resina Dowex®1x4-100, a qual apresentou $IA \geq 80\%$, apesar de, em média, ter sido inferior ao da 1x2-400.

Parece que um estreitamento da largura da malha (LM) (4% de divinilbenzeno) acoplado a um maior tamanho de partículas (TP) (100 mesh, no caso) confere ao suporte características satisfatórias para a acomodação de macromoléculas. Por conseguinte, conclui-se preliminarmente que o índice de adsorção (IA) está relacionado à relação LM/TP.

Segundo ESMON *et al.* (1987) as moléculas de invertase (um dímero natural) podem se associar originando em solução tetrâmeros, hexâmeros e, até, octâmeros.

Os autores constataram, inclusive, que a atividade hidrolítica da invertase aumentava com o grau de agregação de suas moléculas. Esta capacidade de agregação é favorecida pelo pH da solução (entre 4,5 e 5,0) e/ou presença de certas espécies químicas como o íon cloreto ou o polietilenoglicol (PEG) (REDDY, *et al.*, 1990).

Em nosso sistema a probabilidade de que as moléculas de invertase estejam em seu mais elevado grau de agregação é alta, porque a faixa de pH empregada situa-se entre 4,6 e 6,0 e pela provável presença de estabilizante na solução. Lembra-se que agentes estabilizantes (por exemplo, açúcar, álcool, etilenoglicol polimerizado) são comumente usados em preparados enzimáticos comerciais (GODFREY, WEST, 1996) e o Bioinvert[®], certamente, não fugiria à regra. Por conseguinte, compreende-se o porquê da LM da resina assumir papel importante na retenção da proteína.

Levando em conta que o pH das soluções aquosas da invertase sempre foi superior a 4,5 e que o pHi desta enzima é igual a 4,0 (DAUTZENBERG, *et al.*, 1991), conclui-se que as moléculas protéicas na solução possuam carga elétrica efetiva negativa. Aliás, este fato explicaria a eficiência da adsorção, acima de 60 %, apresentado pelas resinas empregadas. No entanto, observa-se da Tabela 9 e Figuras 9 a 14 que em pH=5,5 (água deionizada) obteve-se IA>85 % em todas as resinas Dowex[®] usadas. Ou seja, neste pH as moléculas da invertase teriam carga negativa máxima, tornando a atração eletrostática entre o suporte e a proteína um fator muito mais significativo do que a relação LM/TP. O fato de não ter sido obtido resultado parecido em solução tampão acetato (pH=5,5), pode ser explicado através da provável competição entre o ânion acetato e as moléculas negativas da invertase pelos sítios de ligação do suporte.

O fato de existir a possibilidade de se adsorver a invertase nos diferentes tipos de Dowex[®], ou seja, executar a imobilização em água deionizada e pH=5,5, pode ser de utilidade prática, sobretudo quando o reator, onde será usado o sistema imobilizado, não aceitar materiais com diâmetro de partículas abaixo de um determinado valor (ILLANES, 1994).

Tendo em vista a complexidade dos fatores englobados pela hipótese (LM/TP)/ agregação supra molecular/ pH da solução/ tipo de solvente, não seria espantoso constatar alguns desvios, onde o IA fosse significativo, também. Da Tabela 9 tem-se os casos da 1x8-400 [água deionizada (pH=6,0):82,5% e tampão acetato (pH=4,6):92,4%], 1x4-200 [tampão acetato(pH=5,0):83,5%], 1x4-400 [água deionizada (pH=6,0):82,1% e

tampão acetato (pH=4,6):90,4%], 1x2-100 [água deionizada (pH=6,0):82,7%] e 1x2-200 [tampão acetato (pH=4,6):90,9% e tampão acetato (pH=6,0):82,6%].

4.2.2 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura no índice de adsorção das diferentes resinas, pode ser analisado pelas Tabelas 10 a 13 e Figuras 15 a 26. Observa-se, de um modo geral, que o aumento da temperatura no processo de imobilização desfavorece a adsorção da invertase na resina. Salienta-se que no intervalo de temperatura empregado as resinas Dowex[®] são inteiramente estáveis, pois segundo LI *et al.* (2001), tais materiais resistem a temperaturas da ordem de 120° C.

Provavelmente, ao se aumentar a temperatura as moléculas do sistema têm suas energias cinéticas aumentadas, o que poderia desfazer e/ou dificultar a interação enzima/suporte. Em outras palavras, estando os componentes do sistema separados a entropia do mesmo certamente seria superior àquela em que partículas do suporte e moléculas da enzima estivessem ligadas. Acrescenta-se, também, que o aumento da temperatura favorece a desagregação das estruturas supramoleculares da invertase (REDDY *et al.*, 1990), o que acaba contribuindo mais ainda com a desorganização do sistema, levando ao aumento da entropia.

TABELA 10: Índice de adsorção (%) em Água deionizada
(pH 4,6) frente a várias temperaturas.

Tipos de Dowex®	32°C	37°C	45°C	50°C
1x8-50	67.5	73.6	68.4	69.5
1x8-100	69.8	73.4	70.0	71.4
1x8-200	71.7	70.8	67.9	66.6
1x8-400	76.4	70.1	67.6	70.6
1x4-50	69.0	74.8	67.9	68.7
1x4-100	86.9	80.3	68.7	69.7
1x4-200	75.3	73.2	70.3	70.3
1x4-400	71.0	79.1	70.9	70.3
1x2-100	71.1	82.9	71.6	71.8
1x2-200	72.1	79.3	74.7	73.6
1x2-400	90.0	88.0	76.9	77.0

TABELA 11. Índice de adsorção (%) em Tampão acetato
pH 4,6 frente a várias temperaturas..

Tipos de Dowex®	32°C	37°C	45°C	50°C
1x8-50	64.4	65.3	69.1	69.0
1x8-100	68.5	71.2	70.9	70.0
1x8-200	71.5	77.6	70.4	69.0
1x8-400	92.4	82.7	68.9	70.3
1x4-50	66.4	71.7	68.8	71.6
1x4-100	81.5	86.4	68.7	71.9
1x4-200	77.9	83.4	69.1	71.2
1x4-400	90.4	72.9	68.8	74.1
1x2-100	68.4	73.5	70.8	72.2
1x2-200	90.9	73.0	69.2	76.2
1x2-400	97.1	92.3	80.6	81.9

TABELA 12. Índice de adsorção (%) em Água deionizada (pH 5,5) frente a várias temperaturas.

Tipos de Dowex®	32°C	37°C	45°C	50°C
1x8-50	86.9	72.7	69.1	69.7
1x8-100	91.8	72.5	71.9	71.4
1x8-200	88.7	69.6	70.9	64.0
1x8-400	93.9	72.0	69.0	74.2
1x4-50	92.2	72.5	72.0	70.9
1x4-100	93.7	81.9	71.4	72.1
1x4-200	93.2	76.4	67.6	71.6
1x4-400	90.6	81.5	70.9	75.8
1x2-100	89.6	78.4	74.0	72.4
1x2-200	88.2	80.4	73.2	75.1
1x2-400	97.5	91.6	79.0	80.7

TABELA 13. Índice de adsorção (%) em Tampão acetato pH 5,5, frente a várias temperaturas.

Tipos de Dowex®	32°C	37°C	45°C	50°C
1x8-50	69.0	66.8	67.3	76.9
1x8-100	74.1	68.0	68.6	74.1
1x8-200	71.7	67.4	71.1	74.9
1x8-400	77.9	83.9	69.3	73.3
1x4-50	73.5	66.8	71.0	76.0
1x4-100	84.5	67.1	71.5	73.5
1x4-200	79.5	70.1	69.4	72.9
1x4-400	73.6	70.7	73.3	77.5
1x2-100	64.7	69.1	74.4	78.4
1x2-200	71.7	72.4	74.5	80.2
1x2-400	100	79.5	83.9	86.8

Figura 15. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex® 1x8 em água deionizada (pH 4,6) frente à variação da temperatura.

Figura 16. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex® 1x8 em tampão acetato 0,1 M (pH 4,6) frente à variação da temperatura.

Figura 17. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex® 1x4 em água deionizada (pH 4,6) frente à variação da temperatura.

Figura 18. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em tampão acetato 0,1 M (pH 4,6) frente à variação da temperatura.

Figura 19. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em água deionizada (pH 4,6) frente à variação da temperatura.

Figura 20. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em tampão acetato 0,1 M (pH 4,6) frente à variação da temperatura.

Figura 21. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x8 em água deionizada (pH 5,5) frente à variação da temperatura.

Figura 22. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x8 em tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) frente à variação da temperatura.

Figura 23. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em água deionizada (pH 5,5) frente à variação da temperatura.

Figura 24. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x4 em tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) frente à variação da temperatura.

Figura 25. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em água deionizada (pH 5,5) frente à variação da temperatura.

Figura 26. Índice de adsorção de proteína apresentado pelas resinas aniônicas tipo Dowex 1x2 em tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) frente à variação da temperatura.

Figura 27. Índice de adsorção de proteína apresentado por vários tipos de resinas aniônicas Dowex® em condições de imobilização otimizadas.

De um modo geral, índices de adsorção superiores a 85% foram obtidos para todos os tipos de resinas aniônicas Dowex®, quando a imobilização foi feita em água deionizada (pH 5,5) além das condições estabelecidas no item 5.1 (Figura 27).

4.3 Eficiência da imobilização da invertase em diferentes tipos de Dowex®

Na tabela 14 são apresentados o índice de adsorção (IA), o coeficiente de imobilização (CI) e a percentagem de proteína retida após a hidrólise da sacarose para todas as resinas aniônicas Dowex® empregadas. Lembra-se que a imobilização foi feita nas seguintes condições otimizadas: 100mg da resina Dowex® foi deixada a 32°C por 24h em 25mL de água deionizada (pH 5,5) sob agitação de 100rpm, adicionando-se a seguir 10mg de Bioinvert®. Após 4h o complexo Dowex®/Invertase foi recuperado por centrifugação, lavado e a atividade invertásica determinada.

Observa-se que o IA da invertase em todas as resinas foi sempre superior a 70%, confirmando a forte atração entre as partículas de resina possuindo grupos químicos com carga positiva e as moléculas de proteína com carga efetiva negativa.

Da mesma tabela, tem-se que as resinas 1x4-50, 1x4-100, 1x4-200, 1x8-50, 1x8-200 e 1x2-200 retiveram totalmente as moléculas de proteína durante o processo hidrolítico. Este aspecto é importante, porque se constitui numa garantia de que a hidrólise da sacarose foi catalisada pela enzima realmente na forma imobilizada. O não desprendimento da enzima do suporte é um fator que contribui para aumentar a meia-vida do sistema imobilizado, quando utilizado em processo contínuo ou descontínuo repetido (VITOLLO, 2001).

TABELA 14: Coeficiente de imobilização dos sistemas imobilizados

DOWEX®	Índice de Adsorção (%)	Atividade (enzima solúvel) U.mL ⁻¹	Atividade (enzima imobilizada) U.mL ⁻¹	Coeficiente de imobilização (%)	Proteína retida na resina após o ensaio (%)
1x2-100	100	0.0214	0.0287	100	86.2
1x2-200	100	0.0214	0.0178	83.2	100
1x2-400	100	0.0214	0.0170	79.4	78.2
1x4-50	92.4	0.0214	0.0136	63.7	100
1x4-100	73.2	0.0214	0.0182	84.9	100
1x4-200	100	0.0214	0.0214	100	100
1x4-400	100	0.0214	0.0153	71.6	67.9
1x8-50	99.5	0.0214	5,00x10 ⁻⁴	2.1	100
1x8-100	98.6	0.0214	0.0108	50.6	99.9
1x8-200	97.0	0.0214	0.0122	56.8	100
1x8-400	81.3	0.0214	0.0291	100	89

Excetuando o Dowex® 1x8-50, todos os complexos Dowex®/Invertase apresentaram CI>50% (Tabela 14 e Figura 28). Coeficientes de imobilização desta magnitude são significativos no campo da imobilização, em particular na imobilização da invertase (BARROS e VITOLO, 1992). Associando este resultado às características físicas, químicas e físico-químicas das resinas aniônicas Dowex®, pode-se prever um grande potencial de uso destes materiais como suporte para a técnica de imobilização.

Da Tabela 14 observa-se que os complexos Dowex®/Invertase, onde as partículas da resina diferiram somente no grau de entrecruzamento (1x2-100, 1x4-100 e 1x8-100, por exemplo), apresentaram CI diferentes. Resinas aniônicas Dowex® com quantidades diferentes de divinilbenzeno, apresentam difusividade não uniformes, para os íons hidrônio (BUNGAY *et al.*, 1995). Por isso, cada tipo de resina pode promover o aparecimento de diferentes gradientes de pH entre a região do complexo resina-invertase e o seio do meio reacional. Ocorrendo isto, ter-se-ia a atividade catalítica do sistema imobilizado afetada e, em consequência, variações nos valores dos coeficientes de imobilização.

Ressalta-se que o Dowex®1x8-50, apesar de ter adsorvido e retido 100% da enzima (Figura 29), apresentou CI da ordem de 2% (Figura 28). Este baixo desempenho catalítico do complexo 1x8-50/invertase poderia ser atribuído à forte compactação das moléculas de invertase com o suporte, tornando o sítio ativo da enzima inacessível ao substrato. Acrescenta-se a isto, o eventual efeito do gradiente de pH gerado conforme referido.

Da Tabela 14 e Figuras 28 e 29 depreende-se que o melhor sistema imobilizado foi o 1x4-200/Invertase porque apresentou valores máximos para todos os índices avaliados.

Por conseguinte, o complexo 1x4-200/Invertase foi escolhido para a realização dos ensaios de caracterização do sistema imobilizado.

Figura 28. Coeficientes de imobilização para a invertase (Bioinvert[®]) adsorvida em diferentes tipos de resinas aniônicas Dowex[®], a saber, (1x2-100)[1], (1x2-200)[2], (1x2-400)[3], (1x4-50)[4], (1x4-100)[5], (1x4-200)[6], (1x4-400)[7], (1x8-50)[8], (1x8-100)[9], (1x8-200)[10] e (1x8-400)[11].

Figura 29. Percentagem de proteína retida na resina após o ensaio, onde (1x2-100)[1], (1x2-200)[2], (1x2-400)[3], (1x4-50)[4], (1x4-100)[5], (1x4-200)[6], (1x4-400)[7], (1x8-50)[8], (1x8-100)[9], (1x8-200)[10] e (1x8-400)[11].

4.4. Caracterização das formas solúvel e insolúvel da invertase (Bioinvert[®] e Fluka[®])

Frente aos resultados já apresentados e discutidos, lembra-se que serão caracterizados os sistemas Dowex[®] -1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]) e Dowex[®] -1x4-200/Invertase (Fluka[®]).

4.4.1 Atividade frente à temperatura

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.2.3.1 de materiais e métodos. Os valores relacionados à atividade da invertase (Bioinvert[®]) estão mostradas nas Tabelas 15 e 16 e Figuras 30 e 31, enquanto que as da invertase (Fluka[®]) são apresentadas nas Tabelas 17 e 18 e Figuras 32 e 33.

TABELA 15. Atividade da invertase solúvel (Bioinvert[®]) em função da temperatura.

T (°C)	T (K)	Atividade (U.mL ⁻¹)	T ⁻¹ (K ⁻¹ ×10 ³)	Log (Atividade)
30	308	0,0191	3,25	-1,72
35	313	0,0239	3,20	-1,62
40	318	0,0297	3,15	-1,53
45	323	0,0377	3,10	-1,42
50	328	0,0460	3,05	-1,34
55	333	0,0569	3,00	-1,25
60	338	0,0520	2,96	-1,28

TABELA 16. Atividade da invertase imobilizada (Bioinvert®) em função da temperatura

T (°C)	T (K)	Índice de adsorção (%)	Atividade (U.mL ⁻¹)	% Proteína retida	T ⁻¹ (K ⁻¹ x10 ³)	Log (Atividade)
30	308	97.1	0,0216	100	3,25	-1,67*
35	313	96.4	0,0351	100	3,20	-1,46*
40	318	96.1	0,0404	100	3,15	-1,39
45	323	100	0,0475	100	3,10	-1,32
50	328	100	0,0559	100	3,05	-1,25
55	333	100	0,0519	100	3,00	-1,29
60	338	100	0,0242	100	2,96	-1,62

*valores desprezados para o estabelecimento da curva Log(atividade)x(T⁻¹)

TABELA 17. Atividade da invertase solúvel (Fluka®) em função da temperatura

T (°C)	T (K)	Atividade (U.mL ⁻¹)	T ⁻¹ (K ⁻¹ x10 ³)	Log (Atividade)
30	308	0,0217	3,25	-1,66
37	313	0,0267	3,20	-1,57
40	318	0,0322	3,15	-1,49
45	323	0,0384	3,10	-1,42
50	328	0,0487	3,05	-1,31
55	333	0,0652	3,00	-1,19
60	338	0,0600	2,96	-1,22*

*valor desprezado para o estabelecimento da curva Log(atividade)x(T⁻¹)

TABELA 18. Atividade da invertase imobilizada (Fluka®) em função da temperatura.

T (°C)	T (K)	Índice de adsorção (%)	Atividade (U.mL ⁻¹)	% Proteína retida	T ⁻¹ (K ⁻¹ ×10 ³)	Log (Atividade)
30	308	88.0	0,0115	100	3,25	-1,94
35	313	89.1	0,0155	100	3,20	-1,81
40	318	90.1	0,0373	100	3,15	-1,43
45	323	90.0	0,0469	100	3,10	-1,33
50	328	91.7	0,0160	100	3,05	-1,80
55	333	91.1	0,00950	100	3,00	-2.02
60	338	91.3	0,00760	100	2,96	-2.12

Das Figuras 30 e 32 observa-se que a maior atividade para a invertase solúvel (0,0570 U.mL⁻¹ e 0,0650 U.mL⁻¹, respectivamente, para o Bioinvert® e Fluka®) foi obtida a 55°C. No entanto, este resultado difere daqueles determinados por ABDELLAH *et al.* (1992) e AKGOL *et al.*, (2001), que encontraram valores iguais a 44°C e 45° C, respectivamente. A discrepância dever-se-ia aos diferentes graus de pureza e da procedência das invertases empregadas.

No caso das invertases imobilizadas, a maior atividade para o Bioinvert® (0,0559 U.mL⁻¹) ocorreu a 50° C (Figura 31), ao passo que para a Fluka® (0,0469 U.mL⁻¹) ocorreu a 45° C.

A diferença na temperatura de maior atividade para as duas formas de Bioinvert® decorre, provavelmente, do modo como as moléculas de enzima se encontram no meio reacional, ou seja, associadas às partículas de Dowex® 1x4-200 ou livres em solução. De outra parte, observa-se que as atividades máximas para ambas as formas do Bioinvert® foram praticamente iguais. Este fato, pode indicar que a associação das moléculas de invertase com as partículas de Dowex® se dá de modo que as estruturas terciária e quaternária da enzima não são perturbadas de modo significativo.

Em linhas gerais, comportamento análogo se observa com a invertase da Fluka[®], exceto na intensidade dos efeitos da temperatura, a saber, o complexo Dowex[®] 1x4-200/Invertase (Fluka[®]) apresentou maior atividade a 45⁰C e a atividade máxima diminui 28% em comparação com a forma solúvel. Acrescenta-se que a 60⁰C a forma imobilizada da Fluka[®] perdeu 87% da atividade que possuía na forma solúvel à mesma temperatura. Está claro, portanto, que para a Fluka[®] a imobilização introduz modificações na estrutura da macromolécula, tornando-a mais termolábil.

Os diferentes comportamentos do Bioinvert[®] e da Fluka[®] frente à temperatura, são provavelmente devido às características distintas de suas formulações. A forma de apresentação e o grau de pureza dos preparados de invertase (o Bioinvert[®] e a Fluka[®] formulados para fins industriais e analíticos, respectivamente) requerem recursos de estabilização distintos (VITOLLO, 1981), sendo os do Bioinvert[®] mais efetivos contra os efeitos da temperatura.

Em termos práticos, a diminuição de 5⁰C (Bioinvert[®]) ou 10⁰C (Fluka[®]) na temperatura de reação para o sistema imobilizado conduziria a uma economia em energia, a qual associada à reutilização do complexo Dowex[®] 1x4-200/Invertase contribuiria para reduzir os custos globais envolvidos no processo contínuo de hidrólise da sacarose.

FIGURA 30. Variação da atividade da invertase solúvel (Bioinvert[®]) com a temperatura

FIGURA 31. Variação da atividade do complexo Dowex[®]1x4-200/invertase (Bioinvert[®]) com a temperatura.

Figura 32. Variação da atividade da invertase solúvel (Fluka[®]) com a temperatura.

Figura 33. Variação da atividade do complexo 1x4-200/invertase (Fluka[®]) com a temperatura.

As Figuras 34 a 37 correspondem às variações do logaritmo (Log) da atividade com o inverso da temperatura absoluta (T^{-1}) do meio reacional, segundo o método convencional de Arrhenius, respectivamente para as formas solúvel e insolúvel da invertase (Bioinvert[®] e Fluka[®]).

A partir das figuras referidas estabeleceram-se as equações:

$$\text{(Forma solúvel-Bioinvert}^{\text{®}}\text{)} \quad \text{Log } v = 4,61 - 1,95 \times 10^3 \cdot (T^{-1}) \quad (R = 0,9998) \quad (\text{Eq.1})$$

$$\text{(Forma insolúvel-Bioinvert}^{\text{®}}\text{)} \quad \text{Log } v = 4,70 - 1,94 \times 10^3 \cdot (T^{-1}) \quad (R = 0,98) \quad (\text{Eq.2})$$

$$\text{(Forma solúvel-Fluka}^{\text{®}}\text{)} \quad \text{Log } v = 4,49 - 1,90 \times 10^3 \cdot (T^{-1}) \quad (R = 0,997) \quad (\text{Eq.3})$$

$$\text{(Forma insolúvel-Fluka}^{\text{®}}\text{)} \quad \text{Log } v = 10,7 - 3,88 \times 10^3 \cdot (T^{-1}) \quad (R = 0,994) \quad (\text{Eq.4})$$

A partir das inclinações das retas representadas pelas Equações 1 a 4, calculou-se a energia de ativação (E_a) para as formas solúvel e insolúvel tanto do Bioinvert[®] quanto da Fluka[®] (Tabela 19).

Tabela 19. Valores das energias de ativação referentes às formas solúvel e insolúvel do Bioinvert[®] e da Fluka[®].

Invertase	Forma	E_a (kJ.mol ⁻¹)
Bioinvert [®]	Solúvel	37,3
	Insolúvel	37,2
Fluka [®]	Solúvel	35,0
	Insolúvel	74,3

A coincidência nos valores das E_a para ambas as formas da invertase (Bioinvert[®]), vai de encontro ao fato já estabelecido, de que ambas as formas de enzima apresentam atividades praticamente iguais. É provável que a formulação particular do preparado invertásico Bioinvert[®], da qual participam seguramente agentes estabilizantes, já que é um preparado para fins industriais (GODFREY e WEST, 1996), tenha contribuído para este resultado.

Por outro lado, o mesmo não sucedeu com a invertase da Fluka[®], cuja Ea dobrou para a forma imobilizada, embora a forma solúvel apresentasse valor próximo ao do Bioinvert[®] (Tabela 19). A interpretação deste resultado poderia recair sobre o modo como as moléculas de invertase adsorvidas se distribuíam nas partículas da resina Dowex[®] 1x4-200. De qualquer modo, o aumento na Ea indicaria a indisponibilidade dos sítios ativos das moléculas de invertase para a interação com as moléculas de sacarose tão logo fossem postas em contato. Em outros termos, as formas tetra, hexa e/ou octaméricas da invertase (REDDY *et al.*, 1990), as quais pela formulação particular do preparado invertásico Fluka[®] seriam bastante favorecidas, imbricar-se-iam intimamente com as partículas da resina, impedindo a interação enzima-substrato em um primeiro momento. Por conseguinte, a energia fornecida ao sistema seria direcionada, primeiro, para desarranjar os agregados supramoleculares da invertase adsorvidos na resina, expondo, assim, os sítios ativos das macromoléculas ao substrato, e, por fim, o restante serviria para impulsionar os componentes do sistema para o estado de transição exigido pela hidrólise da sacarose.

FIGURA 34. Gráfico baseado no método de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação da reação catalisada pela invertase solúvel (Bioinvert[®])

FIGURA 35. Gráfico baseado no método de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação da reação catalisada pelo complexo Dowex®1x4-200/ (Bioinvert®).

FIGURA 36. Gráfico baseado no método de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação da reação catalisada pela invertase solúvel (Fluka®).

FIGURA 37. Gráfico baseado no método de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação da reação catalisada pelo complexo Dowex[®]/Invertase (Fluka[®]).

Os parâmetros termodinâmicos ΔG , ΔH e ΔS foram calculados a partir das seguintes relações (CASTELLAN, 1976; OWUSU, MAKHZOUM, 1992):

$$\Delta G = (R.T/2,303). \text{Log } (v.h/k.T) \quad (\text{Eq.5})$$

$$\Delta H = E_a - R.T \quad (\text{Eq.6})$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (\text{Eq.7})$$

Onde: h (constante de Plank) = $3,978 \times 10^{-32}$ J.min.

k (constante de Boltzman) = $1,38 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹

R (constante universal dos gases) = $8,31$ J.(K.mol)⁻¹

T = temperatura absoluta do meio reacional (K)

v = atividade enzimática

Na equação 4: $\Delta E = E_a$

Os valores dos parâmetros termodinâmicos são apresentados na Tabela 20, tendo sido calculados à temperatura de 310K (37°C), que corresponde à temperatura do ensaio-padrão para a medida da atividade invertásica. A fixação de um valor particular de temperatura é válido, porque em um intervalo discreto de baixas temperaturas (30°C a 55°C, neste trabalho) os valores da energia livre de Gibbs, a entalpia e a entropia variam menos de 4%.

TABELA 20. Valores dos parâmetros termodinâmicos relacionados às reações catalisadas pelas formas solúvel e insolúvel da invertase (Bioinvert[®] e Fluka[®]).

Invertase	Forma da enzima	Ea (kJ.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (kJ.(mol.K) ⁻¹)
Bioinvert [®]	Solúvel	37,3	-14,2	34,5	0,16
	Insolúvel	37,2	-14,0	34,6	0,16
Fluka [®]	Solúvel	35,0	-14,1	55,2	0,22
	Insolúvel	74,3	-14,0	71,7	0,28

Da Tabela 20 nota-se que os parâmetros termodinâmicos do Bioinvert[®] relacionados à reação catalisada pela forma solúvel e imobilizada são praticamente iguais, indicando tratar-se de sistemas termodinamicamente idênticos. Isto poderia resultar do fato de que a distribuição das moléculas da enzima no interior de ambos os sistemas seja muito próxima. Ou seja, quando solubilizadas as moléculas diméricas de invertase se agrupam, formando unidades supramoleculares (hexâmeros e/ou octâmeros) com alta atividade (REDDY, *et al.* 1990), que por sua vez, são mantidas inalteradas após a ligação ao Dowex[®] 1x4-200.

Por outro lado, os parâmetros termodinâmicos relacionados com a invertase da Fluka[®] mostram que a mesma na forma solúvel constituiu um sistema semelhante ao do Bioinvert[®] (em termos de Ea e ΔG), porém na forma insolúvel, a menos da energia livre de Gibbs, todos os demais parâmetros tiveram seus valores aumentados. O aumento de ΔS indicaria que o sistema formado pelo complexo Dowex[®] 1x4-400/Invertase (Fluka[®]) era bem mais organizado do que o do Dowex[®] 1x4-400/Invertase (Bioinvert[®]) e, sem dúvida, mais ainda em relação às formas solúveis. Assim sendo, como a catálise implica na mudança da organização mais rígida do sistema para uma mais flexível, então a exigência energética passa a ser maior, para que os sítios ativos sejam expostos ao substrato e o sistema

alcançar o estado de transição requerido pelo mecanismo da reação catalisada (hidrólise da sacarose em glicose e frutose). O fato do valor de ΔG , da ordem de $-14\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, ter sido igual para os quatro sistemas considerados, indica que a energia global da catálise independeu da origem e do modo como as moléculas de invertase estavam distribuídas pelos sistemas reacionais. Isto poderia corroborar, mesmo que indiretamente, a hipótese de que a energia adicional requerida para o caso da invertase da Fluka[®] imobilizada, seria direcionada para promover os rearranjos internos do sistema, flexibilizando-o para a ocorrência da hidrólise propriamente dita.

4.4.2. Estabilidade frente à temperatura

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.2.3.2 de materiais e métodos. Os valores relacionados à estabilidade da invertase de ambas as procedências (Bioinvert[®] e Fluka[®]) nas formas solúvel e insolúvel estão apresentados nas Tabelas 21 a 23 e nas Figuras 38 a 41.

Da Tabela 21 e Figura 38 observa-se que a invertase (Bioinvert[®]) na forma solúvel permaneceu estável na faixa de temperatura entre 30^oC e 50^oC. Acima de 50^oC a queda da atividade residual é acentuada, sendo de 18% a 55^oC e 55% a 60^oC (Figura 38). Para a Fluka[®] na forma solúvel a faixa de estabilidade situou-se entre 30^oC e 55^oC e a 60^oC ocorreu uma redução de 68,4% (Figura 39). De acordo com De QUEIROZ *et al.* (1996), este comportamento se deve ao fato das moléculas de invertase formarem em solução agregados supramoleculares (tetrâmeros, hexâmeros e octâmeros), os quais tendem a se desagregar à medida que a temperatura aumenta. Como a atividade da invertase solúvel no modo agregado é superior àquela de quando está isolada (um dímero, segundo REDDY *et al.*, 1990), então esta queda seria normalmente esperada. No presente caso, pode-se considerar 50^oC como a temperatura de desagregação das moléculas de invertase do Bioinvert[®] e 55^oC para a da Fluka[®] em solução aquosa.

Da Tabela 22 e Figura 38 nota-se que o complexo Dowex[®]1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]) é estável entre 35^oC e 50^oC. Acima deste valor

observa-se uma diminuição acentuada da atividade residual, sendo de 40% a 55°C e de 88% a 60°C (Figura 40).

Já no caso do complexo Dowex[®] 1x4-200/Invertase (Fluka[®]), observa-se da Tabela 23 e Figura 41 que a atividade residual apresentou uma variação acentuada com o aumento da temperatura. Neste caso, a faixa de estabilidade situou-se entre 35°C e 40°C, observando-se em seguida uma diminuição por etapas da atividade enzimática residual. Uma queda da ordem de 28% ocorre de 40°C a 45°C, outra da ordem de 9,5% entre 45°C e 55°C e, finalmente, uma de 85% a 60°C. O perfil deste comportamento se adequa à hipótese de De QUEIROZ *et al.* (1996), que afirma ocorrer, de início, a separação das formas supramoleculares da invertase, seguida da desnaturação propriamente dita.

TABELA 21. Estabilidade da invertase solúvel (Bioinvert[®] e Fluka[®]) em função da temperatura

T (°C)	Atividade residual (U.mL ⁻¹)	
	Bioinvert [®]	Fluka [®]
30	0,0246	0,0260
37	0,0236	0,0270
40	0,0237	0,0266
45	0,0230	0,0260
50	0,0248	0,0263
55	0,0196	0,0265
60	0,0112	0,0180

TABELA 22. Estabilidade do complexo Dowex®1x4-200/invertase (Bioinvert) em função da temperatura

T (°C)	IA (%)	v(U.mL ⁻¹)	% Proteína *
30	96,1	0,0324	99,5
37	95,8	0,0373	100
40	95,9	0,0362	100
45	96,0	0,0339	100
50	98,3	0,0334	100
55	97,7	0,0199	100
60	97,8	0,00390	100

* -% proteína retida na resina após o ensaio

TABELA 23. Estabilidade do complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Fluka) em função da temperatura.

T (°C)	IA (%)	v(U.mL ⁻¹)	% Proteína *
30	90,7	0,0229	100
37	87,1	0,0530	100
40	88,5	0,0540	100
45	87,8	0,0390	100
50	87,9	0,0350	100
55	87,8	0,0320	100
60	91,2	0,00480	100

* -% proteína retida na resina após o ensaio

FIGURA 38. Estabilidade da invertase solúvel (Bioinvert[®]) frente à temperatura

FIGURA 39. Estabilidade da invertase solúvel (Fluka[®]) frente à temperatura.

FIGURA 40. Estabilidade do complexo Dowex[®]1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]) frente à temperatura.

FIGURA 41. Estabilidade do complexo Dowex[®]1x4-200/Invertase (Fluka[®]) frente à temperatura.

Considerando os dados mostrados nas Tabelas 24 e 25, observa-se que as atividades do Bioinvert[®] e da Fluka[®] se mantêm mesmo à 50° C por até 2h, indicando que estes preparados possuem boa termoestabilidade. Este resultado, no entanto, não é ímpar na literatura relacionada à invertase solúvel, pois AKGOL *et al.* (2001) relataram que a invertase estudada por eles mantinha 92% de sua atividade inicial após 100 min à 50°C.

TABELA 24. Logarítmo da atividade residual da invertase solúvel (Bioinvert[®])(Log v) às temperaturas de 37°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C.

Tempo (min)	Log v (37°C)	Log v (40°C)	Log v (45°C)	Log v (50°C)	Log v (55°C)
20	-1,61	-1,62	-1,59	-1,57	-2,27
40	-1,63	-1,63	-1,62	-1,57	-2,37
60	-1,66	-1,65	-1,58	-1,61	-2,51
80	-1,66	-1,60	-1,60	-1,59	-2,62
120	-1,62	-1,62	-1,59	-1,61	-2,86

FIGURA 42. Inativação térmica da invertase solúvel (Bioinvert[®]) às temperaturas de 37°C e 55°C

TABELA 25. Logarítmo da atividade residual da invertase solúvel (Fluka®) (Log v) às temperaturas de 40°C e 50°C

Tempo (min)	Logv (40°C)	Logv (50°C)
20	-1,56	-1,57
40	-1,56	-1,60
60	-1,56	-1,62
80	-1,56	-1,63
120	-1,57	-1,69

Figura 43. Variação do logarítmo da atividade da invertase solúvel (Fluka®) em função do tempo às temperaturas de 40 °C e 50 °C.

Da Figura 42 e Tabela 24 observa-se que o Log v diminuiu cerca de 21% com o tempo de permanência à 55⁰C. O gráfico da função Log v = f(t) é linear (Figura 35), obedecendo à equação:

$$\text{Log } v = -6,00 \times 10^{-3} \cdot t - 2,14 \quad (R = -0,996) \quad (\text{Eq.8})$$

A inclinação da Eq.8 corresponde à constante de inativação térmica (k') da invertase solúvel (Bioinvert[®]) a 55⁰C, cujo valor é 6,00x10⁻³min⁻¹. A importância desta informação reside no fato de que é possível compensar a perda de atividade (0,6% a cada minuto, neste caso), pela adição de quantidade adequada de invertase na hipótese de que a hidrólise da sacarose deva ser executada a 55⁰C. Tal situação, poderia ocorrer caso se trabalhasse com solução concentrada de sacarose, cuja viscosidade poderia ser diminuída pelo aumento da temperatura do meio reacional.

Não foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos relacionados à inativação térmica do Bioinvert[®] na forma solúvel. No intervalo de temperatura selecionado para avaliação, a enzima só apresentou termolabilidade detectável à 55⁰C, não tendo sido possível obter uma relação entre Log k' e T⁻¹.

Em relação à invertase da Fluka[®] já foi possível observar a diminuição do Logv em função do tempo a 40⁰C e a 50⁰C (Figura 43), cujas equações lineares são:

$$(40^0\text{C}) \text{ Log } v = -2,00 \times 10^{-4} \cdot t - 1,55 \quad (R = -0,996) \quad (\text{Eq.9})$$

$$(50^0\text{C}) \text{ Log } v = -1,10 \times 10^{-3} \cdot t - 1,55 \quad (R = -0,990) \quad (\text{Eq.10})$$

Como se dispõe de dois valores da constante de inativação térmica (k') a duas temperaturas distintas, foi possível estimar a energia de ativação para o processo de inativação térmica (E_a') da invertase (Fluka®) através da forma integrada da equação de Arrhenius (SEGEL, 1979):

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a'}{2,303 \cdot R} \cdot \frac{(T_1 - T_2)}{T_2 \cdot T_1} \quad (\text{Eq.11})$$

Substituindo os termos da Eq.11 pelos seus valores reais, a saber, 323 K(T_2), 313K(T_1), $2,00 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ (k_1) e $1,10 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (k_2), tem-se que E_a' é igual a $143,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Em decorrência foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos relacionados com a inativação térmica da invertase (Fluka®) à temperatura de 313 K, aplicando-se as equações 5-7. Assim, tem-se $\Delta G' = -16,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H' = 141 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta S' = 0,490 \text{ kJ.(mol.K)}^{-1}$.

Na Figura 44 tem-se a variação do logaritmo da atividade residual do complexo Dowex®-1x4-200/Invertase (Bioinvert®) em função do tempo às temperaturas de 30° C, 37° C, 45° C e 55° C. Sendo a relação $\text{Log (atividade residual)} = f(t)$ linear para todas as temperaturas estudadas, então foi possível determinar as correspondentes equações:

$$(30^\circ \text{ C}) \text{ Log } v = -6,00 \times 10^{-4} \cdot t - 1,57 \quad (R=0,96) \quad (\text{Eq.12})$$

$$(37^\circ \text{ C}) \text{ Log } v = -2,30 \times 10^{-2} \cdot t - 1,70 \quad (R=0,93) \quad (\text{Eq.13})$$

$$(45^\circ \text{ C}) \text{ Log } v = -1,09 \times 10^{-2} \cdot t - 2,44 \quad (R=0,90) \quad (\text{Eq.14})$$

$$(55^\circ \text{ C}) \text{ Log } v = -2,92 \times 10^{-2} \cdot t - 2,71 \quad (R=0,997) \quad (\text{Eq.15})$$

FIGURA 44. Inativação térmica do complexo Dowex®1x4-200/invertase (Bioinvert®) às temperaturas de 30 °C, 37 °C, 45 °C e 55 °C.

Sabendo que as inclinações das retas mostradas na Figura 44 correspondem aos valores da constante de inativação térmica (k') nas temperaturas indicadas, torna-se possível calcular a energia de ativação da inativação térmica (E_a') do complexo Dowex-1x4-200/Invertase (Bioinvert®) através do gráfico $\text{Log } k' = f(T^{-1})$ (Figura 45), conforme preconizado por OWUZU et al., (1992).

FIGURA 45. Variação do logaritmo da constante de inativação térmica para o complexo Dowex[®]1x4-200/invertase (Bioinvert[®]) em função do inverso da temperatura absoluta do meio da reação.

Observa-se da Figura 45 que $\log k'$ varia linearmente com T^{-1} , obedecendo à equação:

$$\text{Log } k' = 19,2 - 6,77 \times 10^2 \cdot (T^{-1}) \quad (R^2 = -0,993) \quad (\text{Eq.16})$$

A partir da Eq. 16 e das equações 5-7 foram calculadas E_a' , $\Delta G'$, $\Delta H'$ e $\Delta S'$ para o complexo Dowex[®]-1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]), cujos valores são apresentados na Tabela 26. Os parâmetros termodinâmicos foram calculados para a temperatura de 310 K.

Procedendo-se analogamente com o complexo Dowex1x4-200/invertase (Fluka®), obtém-se a Figura 46, onde se observa que o logaritmo da atividade residual varia linearmente com o tempo em cada temperatura estudada (37° C, 40° C, 45° C e 50° C), sendo as equações:

$$(37^{\circ} \text{ C}) \quad \text{Log } v = -6,70 \times 10^{-3} \cdot t - 1,91 \quad (R = -0,992) \quad (\text{Eq.17})$$

$$(40^{\circ} \text{ C}) \quad \text{Log } v = -6,60 \times 10^{-3} \cdot t - 1,70 \quad (R = -0,994) \quad (\text{Eq.18})$$

$$(45^{\circ} \text{ C}) \quad \text{Log } v = -3,60 \times 10^{-3} \cdot t - 2,44 \quad (R = -0,991) \quad (\text{Eq.19})$$

$$(50^{\circ} \text{ C}) \quad \text{Log } v = -0,760 \cdot t - 1,93 \quad (R = -0,9993) \quad (\text{Eq.20})$$

Figura 46. Inativação térmica do complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Fluka®) às temperaturas de 37° C, 40° C, 45° C e 50° C.

Agora, tomando as inclinações das retas mostradas na Figura 46, constrói-se a Figura 47, da qual se observa que $\log k' = f(T^{-1})$ é linear, obedecendo à equação:

$$\text{Log } k' = 34,9 - 11,8 \times 10^3 \cdot (T^{-1}) \quad (R=-0,992) \quad (\text{Eq.21})$$

A partir da Eq. 21 e das equações 5 a 7 foram calculados os parâmetros termodinâmicos relacionados à inativação térmica do complexo Dowex[®]-1x4-200/Invertase (Fluka[®]), cujos valores são apresentados na Tabela 26. Os parâmetros termodinâmicos foram calculados para a temperatura de 310 K.

Figura 47. Variação do logaritmo da constante de inativação térmica para o complexo Dowex[®]-1x4-200/Invertase (Fluka[®]) em função do inverso da temperatura absoluta do meio da reação.

TABELA 26. Parâmetros termodinâmicos relacionados à inativação térmica dos complexos Dowex-1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]) e Dowex[®]1x4- 200/Invertase (Fluka[®]).

Parâmetros	Bioinvert [®]	Fluka [®]
E'_a (kJ.mol ⁻¹)	129	225
$\Delta G'$ (kJ.mol ⁻¹)	-81,0	-78,4
$\Delta H'$ (kJ.mol ⁻¹)	127	223
$\Delta S'$ (kJ.mol ⁻¹)	0,660	0,970

Tomando os valores de k' dos pares invertase solúvel (Bioinvert[®]) (0,006min⁻¹) e Dowex-1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]) (0,0292 min⁻¹) a 55 °C e invertase solúvel (Fluka[®]) (0,0011 min⁻¹) e Dowex[®]-1x4-200/Invertase (Fluka[®]) (0,76 min⁻¹) a 50°C, observa-se claramente que a taxa de diminuição da atividade catalítica foi sempre maior para a forma imobilizada. O fato da atividade decair mais acentuadamente para o sistema imobilizado, seria o reflexo do modo pelo qual o calor seria transferido no interior do meio reacional. Ou seja, em uma solução a energia seria distribuída de forma homogênea entre as espécies químicas solubilizadas, devido a sua assimilação pelas ligações não covalentes inter e intramoleculares existentes no sistema. No entanto, em uma suspensão parte da energia interagiria com as ligações não covalentes estabelecidas entre os componentes do sistema e parte seria canalizada para as partículas contendo as moléculas de invertase, onde a energia térmica por se achar concentrada teria seu efeito desnaturante intensificado.

Segundo OWUSU et al., (1992) valores de $\Delta H'$ da ordem de 200-300kJ.mol⁻¹ causariam desnaturação da proteína através de desarranjos na sua estrutura terciária e/ou quarternária. Seria, provavelmente, o caso da (Fluka[®]) imobilizada, cujo $\Delta H'$ foi igual a 223 kJ.mol⁻¹ (Tabela 26).

No caso do complexo Dowex[®]-1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]) em que $\Delta H'$ é pelo menos 37% inferior ao indicado acima, a queda de atividade em

função da temperatura poderia ser atribuída em maior grau à desagregação das estruturas supramoleculares da invertase ligada ao suporte do que a perturbações nas estruturas terciária e quaternária da enzima. Neste caso, a queda na atividade deverá ser atribuída à ocorrência simultânea de dois eventos, a saber, desagregação dos arranjos supramoleculares e desnaturação parcial da estrutura terciária e/ou quaternária da macromolécula. Contudo, os valores calculados para E_a' e $\Delta H'$ foram 40% superiores aos calculados por De Queiroz et al. (1996), a saber, $E_a'=79,0$ kJ.mol^{-1} e $\Delta H'=76,3$ kJ.mol^{-1} . Explica-se esta discrepância pelo fato dos referidos autores terem imobilizado a invertase por ligação covalente em pellets de polietileno de baixa densidade, um material muito diferente ao empregado neste trabalho. Enfim, a natureza química do suporte e o tipo de imobilização seriam fatores importantes para a estabilidade térmica da invertase.

4.4.3. Atividade e estabilidade frente ao pH.

Como foram usados diferentes tampões (citrato, acetato e fosfato) para obter os valores de pH situados entre 3,0 e 6,5, decidiu-se verificar se a natureza do tampão influiria na atividade catalítica da enzima. Pelos dados constantes da Tabela 27 concluiu-se que a natureza do tampão não afetou a atividade invertásica.

TABELA 27. Valores da atividade da invertase (Bioinvert[®]) em função da natureza da solução tampão.

Soluções Tampão	Atividade (U.mL^{-1})
*Acetato (pH 3,5)/Citrato (pH 3,5)**	0,0250/0,0230**
*Acetato (pH 4,5)/Citrato (pH 4,5)**	0,0240/0,0260**
*Acetato (pH 5,5)/Citrato (pH 5,5)**	0,0210/0,0210**

*Atividade invertásica em tampão acetato.

**Atividade invertásica em tampão citrato ou fosfato.

Os ensaios de atividade e estabilidade frente ao pH foram realizados conforme descrito nos itens 3.2.3.3 e 3.2.3.4 de materiais e métodos. Os valores relacionados à atividade e estabilidade para ambas as formas de invertase (Bioinvert[®] e Fluka[®]) estão apresentados nas Tabelas 28 a 30 e Figuras 48 a 55.

Das Figuras 48, 49, 50 e 51 depreende-se que o pH ótimo para cada sistema invertásico foi: a) Bioinvert[®] solúvel (pH=4,5) e insolúvel (pH=5,5); b) Fluka[®] solúvel (pH=5,0) e insolúvel (pH=4,6).

O deslocamento do perfil da curva atividade versus pH é de ocorrência comum, quando se empregam suportes carregados eletricamente (VITOLLO, 2001). Como as resinas Dowex[®] empregadas são aniônicas, e, portanto, possuidoras em sua estrutura de grupos com carga positiva, dever-se-ia esperar um deslocamento do perfil da curva para uma faixa mais ácida de pH, porque os íons hidrônio, sendo repelidos pelas partículas do suporte, concentrar-se-iam no seio da solução aquosa. Como o eletrodo de vidro mede o pH do seio da solução, então ele indicaria um valor mais ácido para o pH do sistema, conforme ocorrido com a Fluka[®] imobilizada.

No entanto, no caso do complexo Dowex[®]1x4-200/Invertase (Bioinvert[®]) o deslocamento se deu para o lado menos ácido (Figura 50), aparentemente contradizendo o senso comum já estabelecido. Contudo, este resultado pode ser explicado caso se admita que as partículas do Dowex[®]1x4-200 estejam quase ou totalmente envolvidas pelos agregados supramoleculares de invertase, que por possuírem carga efetiva negativa atrairiam uma fração de íons hidrônio para a região particulada do sistema reacional. Como consequência, o pH do seio da solução detectado pelo eletrodo de vidro seria menos ácido.

Das Figuras 50, 51, 52 e 53 observa-se que a invertase solúvel manteve-se estável na faixa de pH entre 4,0 e 5,0 (Bioinvert[®]) e 4,0 e 4,6 (Fluka[®]), enquanto que para a invertase imobilizada a faixa de pH foi entre 5,0 e 6,0 (Bioinvert[®]) e 4,6 e 5,5 para a Fluka[®] insolúvel. Em ambos os casos, os valores de pH_{ótimo} localizaram-se dentro da faixa de estabilidade.

TABELA 28. Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade da invertase solúvel (Bioinvert®)

pH	*Atividade (U.mL ⁻¹)	**Atividade Residual (U.mL ⁻¹)
3,0	0,0177	0,0182
3,5	0,0288	0,0197
4,0	0,0226	0,0232
4,5	0,0239	0,0236
5,0	0,0213	0,0237
5,5	0,0214	0,0216
6,0	0,0171	0,0233
6,5	0,0155	0,0220

*Dados referentes à atividade x pH.

**Dados referentes à estabilidade x pH.

TABELA 29. Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade da invertase solúvel (Fluka®).

pH	*Atividade (U.mL ⁻¹)	**Atividade Residual (U.mL ⁻¹)
4,0	0,0264	0,0294
4,5	0,0267	0,0290
5,0	0,0276	0,0262
5,5	0,0261	0,0239

*Dados referentes à atividade x pH.

**Dados referentes à estabilidade x pH.

TABELA 30. Efeito do pH sobre a atividade e a estabilidade dos complexos Dowex®1X4-200/invertase (Bioinvert®) e Dowex®1X4-200/invertase (Fluka®).

pH	Dowex-1x4-200/ Invertase (Bioinvert®)		Dowex-1x4-200/ Invertase (Fluka®)	
4,6	*0,0350/	0,0404	0,0491/	0,0533
5,0	0,0359/	0,0524	0,0434/	0,0524
5,5	0,0373/	0,0525	0,0373/	0,0529
6,0	0,0269/	0,0528	0,0313/	0,0130

*O primeiro valor refere-se à atividade e o segundo à atividade residual dos complexos imobilizados (U.mL⁻¹).

FIGURA 48. Efeito do pH sobre a atividade da invertase solúvel (Bioinvert®).

Figura 49. Efeito do pH sobre a atividade da invertase solúvel (Fluka®).

FIGURA 50. Efeito do pH sobre a estabilidade da invertase solúvel (Bioinvert®).

Figura 51. Efeito do pH sobre a estabilidade da invertase solúvel (Fluka®).

FIGURA 52. Efeito do pH sobre a atividade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Bioinvert®).

FIGURA 53. Efeito do pH sobre a atividade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Fluka®).

FIGURA 54. Efeito do pH sobre a estabilidade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Bioinvert®).

FIGURA 55. Efeito do pH sobre a estabilidade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Fluka®).

4.4.4. Efeito da concentração de sacarose

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.2.3.5 de materiais e métodos. Os dados obtidos são apresentados nas Tabelas 31 a 34 e nas Figuras 56 a 63.

Das Figuras 56, 58, 60 e 62 depreende-se que para todas as formas de invertase estudadas a relação $v=f(s)$ obedeceu ao modelo de Michaelis-Menten. A seguir, aplicando-se o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk, obtiveram-se as Figuras 57, 59, 61 e 63, das quais foi possível calcular os valores das correspondentes constantes cinéticas, cujos valores estão mostrados na Tabela 35.

TABELA 31. Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade da invertase solúvel (Bioinvert®)

[sacarose] (mM)	[sacarose] ⁻¹	v(U.mL ⁻¹)	v ⁻¹
10	0,10	0,00650	154
20	0,050	0,00960	104
40	0,025	0,0170	58,8
50	0,020	0,0200	50,0
80	0,0130	0,0214	46,7
100	0,010	0,0216	46,3
120	0,0083	0,0222	45,1
150	0,0067	0,0225	44,4
200	0,0050	0,0231	43,3
292	0,0034	0,0232	43,1

TABELA 32. Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade do complexo Dowex®1X4-200/Invertase (Bioinvert®)

[sacarose] (mM)	[sacarose] ⁻¹	IA(%)	v(U.mL ⁻¹)	v ⁻¹
20	0,050	100	0,0168	59,4
40	0,025	100	0,0238	41,9
50	0,020	100	0,0286	35,0
80	0,013	98,0	0,0347	28,8
100	0,010	97,6	0,0361	27,7
120	0,0083	97,3	0,0385	26,0
292	0,0034	100	0,0404	24,8

TABELA 33. Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade da invertase solúvel (Fluka®).

[sacarose] (mM)	[sacarose] ⁻¹	v(U.mL ⁻¹)	v ⁻¹
20	0,050	0,0131	76,3
40	0,025	0,0170	58,7
50	0,020	0,0181	55,2
80	0,013	0,0200	49,5
100	0,010	0,0207	48,3
120	0,0083	0,0211	47,4
292	0,0034	0,0267	37,5

TABELA 34. Efeito da concentração de sacarose sobre a atividade do complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Fluka®).

[sacarose] (mM)	[sacarose] ⁻¹	v(U.mL ⁻¹)	v ⁻¹
5	0,20	0,0100	100
10	0,10	0,0141	70,4
20	0,050	0,0256	39,1
40	0,025	0,0321	31,2
50	0,020	0,0373	26,8
80	0,013	0,0373	26,8
292	0,0034	0,0337	29,7

FIGURA 56. Variação da atividade invertásica (Bioinvert®) com a concentração de sacarose.

FIGURA 57. Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk para o cálculo das constantes cinéticas da invertase solúvel (Bioinvert®).

FIGURA 58. Variação da atividade do complexo Dowex[®]1X4-200/Invertase (Bioinvert[®]) com a concentração de sacarose.

FIGURA 59. Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk para o cálculo das constantes cinéticas do

complexo Dowex® 1X4-200/Invertase (Bioinvert®).

Figura 60. Variação da atividade invertásica (Fluka®) com a concentração de sacarose.

Figura 61. Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk para o cálculo das constantes cinéticas da invertase solúvel (Fluka®).

Figura 62. Variação da atividade do complexo Dowex[®] 1x4-200/Invertase (Fluka[®]) com a concentração de sacarose.

Figura 63. Gráfico baseado no método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk para o cálculo das constantes cinéticas do Complexo Dowex[®]-1x4-200/Invertase (Fluka[®]).

Tabela 35. Valores das constantes cinéticas para ambas as formas de Bioinvert[®] e Fluka[®].

Constante cinética	Bioinvert [®]	Fluka [®]
K_m (mM)	40,3	17,0
$^*(K_m)_{ap}$ (mM)	38,3	18,3
$V_{m\acute{a}x}$ (U.mL ⁻¹)	0,0320	0,0240
$^*(V_{m\acute{a}x})_{ap}$ (U.mL ⁻¹)	0,0491	0,0450

*O índice "ap" significa que a constante cinética se refere à enzima imobilizada.

É interessante salientar que os valores de K_m para ambas as formas diferiram em apenas 5% (Bioinvert[®]) e 7% (Fluka[®]), e os valores de $V_{m\acute{a}x}$ cerca de 35% (Bioinvert[®]) e 47% (Fluka[®]). A similaridade dos valores de K_m indicaria que a interação enzima-substrato não é substancialmente modificada pela imobilização. No entanto, a pronunciada diferença nos valores de $V_{m\acute{a}x}$ mostra que a imobilização favorece de alguma forma a atividade catalítica da invertase, provavelmente por garantir que as formas supramoleculares hexaméricas e/ou octaméricas predominem durante a reação. De acordo com REDDY *et al.* (1990) estas estruturas conferem maior atividade catalítica para a invertase.

A comparação direta e em termos absolutos dos valores das constantes cinéticas das formas solúvel e insolúvel da invertase com os da literatura é difícil, devido às diferentes condições de medida da atividade, da origem e do grau de pureza da enzima e do tipo de imobilização e de suportes utilizados. A Tabela 36 mostra, a título de exemplo, os diferentes valores das constantes cinéticas para a invertase proveniente de diferentes origens.

TABELA 36. Valores das constantes cinéticas de invertases provenientes de fontes diversas.

Tipos de invertase	$K_M(\text{mM})$	$V_{MAX}(\text{U.mL}^{-1})$	Referências
Invertase (Fluka®)	17,0	0,0240	-
Bioinvert® (Quest)	40,3	0,0320	-
Invertin® (Merck)	12,1	1,25	BREDA <i>et al.</i> (1992)
Invertase (Sigma)	18,5	0,104	RIBEIRO e VITOLO (1997)

BREDA *et al.*(1992): invertase diluída 2500 vezes em água deionizada/37°C/pH 4,6 em tampão acetato 0,010M

RIBEIRO e VITOLO (1997): solução de invertase (2,7mg de pó/mL de água destilada)/37°C/ pH 4,6 em tampão acetato 0,010M

4.5. Atividade Transferásica

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.3.3.7 de materiais e métodos.

Na Tabela 37 são apresentados os valores de R_f , dos açúcares-padrão (glicose, frutose e sacarose), da sacarose e FOS (frutoligossacarídeos) formados pela ação das formas solúvel e insolúvel da invertase (Bioinvert®) sobre soluções de sacarose nas concentrações (p/v) de 12%, 15% e 25% em diferentes tempos. As Figuras 64 e 65 mostram os cromatogramas obtidos, respectivamente, após 6min e 15min da ação da invertase solúvel e insolúvel (Bioinvert®). Os correspondentes valores de R_f são apresentados na Tabela 38.

Dos dados obtidos concluiu-se que o método cromatográfico empregado permitiu uma separação evidente da sacarose, glicose e frutose e que a presença de frutoligossacarídeos no meio reacional foi detectada no intervalo de tempo entre 9 e 35 minutos. A não formação de FOS fora do intervalo de tempo observado, indicaria uma prevalência da atividade hidrolítica da invertase sobre a transferásica. Inclusive segundo YUN (1996) a presença de glicose em alta concentração no meio reacional, fato real em nosso sistema de reação após 35 minutos, inibiria a atividade transferásica

da invertase. Na hipótese de se desejar produzir FOS, seria necessário dificultar de alguma maneira a atividade hidrolítica da invertase, por exemplo, utilizando altas concentrações de sacarose (ALMEIDA CUNHA e VITOLO, 1984).

Nas Figuras 64 e 65 observa-se que as manchas mais intensamente coradas, (correspondentes à mistura de sacarose, glicose e frutose) apresentaram caudas nítidas, sobretudo quando se usou solução de sacarose 25% (p/v), provavelmente relacionadas à presença de FOS, resultante da atividade transferásica da invertase. Segundo HANSEN (1975) os frutoligossacarídeos sofrem menor arraste que a sacarose nas condições de cromatografia em camada delgada utilizadas neste trabalho. Valores de R_f iguais a 0,83 (Tabela 38), obtidos com ambas as formas de invertase (Bioinvert[®]) nos tempos 6min e 15min, e para concentração de sacarose 25% (p/v) concordam com os resultados de YASSUDA e VITOLO (1991), os quais mostraram que a atividade transferásica da invertase aumentava com a concentração de sacarose do meio reacional.

TABELA 37. R_f obtidos em diferentes concentrações de sacarose após 3, 9, 12, 35, 45 e 55 minutos de reação para as formas solúvel e insolúvel de invertase (Bioinvert®).

[Açúcares]	R _f (3 minutos)		R _f (9 minutos)		R _f (12 minutos)	
Sacarose (1% (p/v))		0,87		0,88		0,85
Glicose (1% (p/v))		0,84		0,87		0,84
Frutose (1% (p/v))		0,81		0,84		0,83
	Sacarose	FOS	Sacarose	FOS	Sacarose	FOS
Sacarose (12% (p/v)) [*]	0,87	-	0,88	0,82	0,85	0,78
Sacarose (12% (p/v)) ^{**}	0,87	-	0,88	0,82	0,85	0,78
Sacarose (15% (p/v)) [*]	0,87	-	0,88	0,82	0,85	0,78
Sacarose (15% (p/v)) ^{**}	0,87	-	0,88	0,82	0,85	0,78
Sacarose (25% (p/v)) [*]	0,87	-	0,88	0,79	0,85	0,78
Sacarose (25% (p/v)) ^{**}	0,87	-	0,88	0,79	0,85	0,77

[Açúcares]	R _f (35 minutos)		R _f (45 minutos)		R _f (55 minutos)	
Sacarose (1% (p/v))		0,81		0,86		0,87
Glicose (1% (p/v))		0,79		0,85		0,86
Frutose (1% (p/v))		0,77		0,82		0,83
	Sacarose	FOS	Sacarose	FOS	Sacarose	FOS
Sacarose (12% (p/v)) [*]	0,81	0,73	0,86	-	0,87	-
Sacarose (12% (p/v)) ^{**}	0,81	0,73	0,86	-	0,87	-
Sacarose (15% (p/v)) [*]	0,81	0,73	0,86	-	0,87	-
Sacarose (15% (p/v)) ^{**}	0,81	0,73	0,86	-	0,87	-
Sacarose (25% (p/v)) [*]	0,81	0,69	0,86	-	0,87	-
Sacarose (25% (p/v)) ^{**}	0,81	0,69	0,86	-	0,87	-

*solúvel
**imobilizada

Figura 64. Detecção da atividade transferásica da invertase (Bioinvert®) nas formas solúvel (S) e imobilizada (SI) através da cromatografia de camada delgada após 6 minutos de reação. As manchas indicadas por 1, 2, 3 e 4 corresponderam, respectivamente, às soluções-padrão de sacarose, glicose, frutose e mistura dos três açúcares. As manchas resultantes da ação da invertase solúvel e imobilizada em uma solução de sacarose (250 g.L⁻¹) (primeiro par SI/S da direita para a esquerda) são indicadas por "a" (mistura de açúcares) e "b" (FOS formados).

Figura 65. Detecção da atividade transferásica da invertase (Bioinvert®) nas formas solúvel (S) e imobilizada (SI) através da cromatografia de camada delgada após 15 minutos de reação. As manchas indicadas por 1, 2, 3 e 4 corresponderam, respectivamente, às soluções-padrão de sacarose, glicose, frutose e mistura dos três açúcares. As manchas resultantes da ação da invertase solúvel e imobilizada em uma solução de sacarose (250 g.L⁻¹) (primeiro par SI/S da direita para a esquerda) são indicadas por "a" (mistura de açúcares) e "b" (FOS formados).

TABELA 38. R_f obtidos em diferentes concentrações de açúcares após 6 e 15 minutos de reação para as ambas formas de invertase.

[Açúcares]	R_f (6 minutos)		R_f (15 minutos)	
Sacarose (1% (p/v))	0,94		0,93	
Glicose (1% (p/v))	0,92		0,91	
Frutose (1% (p/v))	0,89		0,87	
	sacarose	FOS	Sacarose	FOS
Sacarose (12% (p/v)) [*]	0,94	0,88	0,93	0,85
Sacarose (12% (p/v)) ^{**}	0,94	0,85	0,93	0,85
Sacarose (15% (p/v)) [*]	0,94	0,86	0,93	0,86
Sacarose (15% (p/v)) ^{**}	0,94	0,86	0,93	0,86
Sacarose (25% (p/v)) [*]	0,94	0,83	0,93	0,83
Sacarose (25% (p/v)) ^{**}	0,94	0,83	0,93	0,83

^{*} Invertase solúvel (Bioinvert[®])

^{**} Complexo Dowex[®]1x4-200/Invertase (Bioinvert[®])

4.6. Hidrólise descontínua da sacarose

Foram estudadas a hidrólise descontínua das duas formas de invertase (Bioinvert[®]) para as seguintes concentrações de sacarose: 120g.L⁻¹, 150g.L⁻¹ e 250g.L⁻¹. Para cada uma dessas concentrações os açúcares redutores totais foram determinados até 60 minutos de reação. Os ensaios foram realizados conforme o item 3.2.3.8.

As atividades de ambas as formas de invertase diminuíram com o aumento da concentração de sacarose conforme pode ser observado na Tabela 39.

Tabela 39. Comparação das atividades da invertase solúvel e insolúvel na hidrólise descontínua da sacarose.

[sacarose] (g.L ⁻¹)	Atividade (U.mL ⁻¹)	
	Solúvel	Insolúvel
120	0,0390	0,0490
150	0,0340	0,0370
250	0,0270	0,0220

O declínio da atividade de ambas as formas de Bioinvert[®] com o aumento da concentração da sacarose de acordo com ALMEIDA CUNHA e VITOLO (1984) deve-se ao aumento da viscosidade do meio de reação.

Nota-se que as atividades da invertase imobilizada são maiores do que as correspondentes da forma solúvel nas concentrações 120g.L⁻¹ e 150g.L⁻¹. No entanto, o aumento da viscosidade e do efeito difusional do meio à concentração de 250g.L⁻¹ levou a uma redução de 18,5% na atividade da enzima imobilizada em relação à solúvel.

As Figuras 66, 67 e 68 mostram o comportamento de ambas as formas de invertase em diferentes concentrações de sacarose.

O salto que pode ser observado no intervalo entre 6 e 15 minutos de reação para ambas as formas de invertase provavelmente se deve à ocorrência da atividade transferásica, conforme detectada através de TLC.

FIGURA 66. Hidrólise descontínua da sacarose na concentração de 120g.L⁻¹ para o complexo Dowex®/Invertase (■) e invertase solúvel (●)

FIGURA 67. Hidrólise descontínua da sacarose na concentração de 150g.L⁻¹ para o complexo Dowex®/Invertase (■) e invertase solúvel (●).

FIGURA 68. Hidrólise descontínua da sacarose na concentração de 250g.L⁻¹ para o complexo Dowex®/Invertase (■) e invertase solúvel (●).

Da Tabela 39 observa-se que o complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Bioinvert®) apresentou atividade hidrolítica igual a 0,0490U.mL⁻¹ ou 0,0490mg de ART/min.mL (conforme definição da unidade (U) de atividade invertásica no item 3.2.1 de Materiais e Métodos), frente à solução de sacarose com concentração inicial de 120 mg.mL⁻¹ (120g.L⁻¹ ou 12%). Caso se desejasse a conversão total da sacarose em açúcar invertido (120mg de ART) usando a atividade invertásica citada, seriam necessários cerca de 3,4 dias, uma duração inconveniente para fins industriais. Por isso, otimizar o tempo da reação hidrolítica é uma atitude necessária na presente situação.

Para alcançar este escopo, aumentaram-se as quantidades de resina e de invertase no processo de imobilização, mantendo-se inalteradas as demais condições da imobilização (temperatura, pH, agitação e tempo total de imobilização), procurando-se obter um complexo Dowex®1x4-200/Invertase com maior atividade hidrolítica. Os dados referentes ao Bioinvert® e à Fluka® estão mostrados nas Tabelas 40 e 41, respectivamente.

Tabela 40. Quantidades de Resina 1x4-200 e de invertase (Bioinvert®) para a preparação de um complexo Dowex®1x4-200/Invertase com maior atividade hidrolítica

Dowex® 1x4-200 (mg)	*Invertase Bioinvert®	IA(%)	Atividade (U.mL ⁻¹)
100	1% (v/v)	100	0,0370
200	5% (v/v)	94,9	0,0370
400	30% (v/v)	96,4	0,0370
100	100%	96,5	0,0370
600	100%	96,7	0,220

*Conforme descrito no item 3.2.2.1 de Materiais e Métodos, a quantidade de resina indicada nesta tabela foi posta em contato com 3mL da solução original de Bioinvert® (100%) ou com 3mL da solução original diluída a 1%, 5% ou 30% (v/v) com água deionizada.

Tabela 41. Quantidades de Resina 1x4-200 e de invertase (Fluka®) para a preparação de um complexo Dowex®1x4-200/Invertase com maior atividade hidrolítica

Dowex®1x4-200 (mg)	Fluka® (em pó - mg)	IA(%)	Atividade (U.mL ⁻¹)
100	0,2	89,4	0,0340
100	0,4	92,0	0,0520
100	20	96,8	0,120
200	20	96,0	0,230

Da Tabela 40 observa-se claramente que a atividade hidrolítica do complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Bioinvert®) aumentou cerca de 6 vezes, quando no processo de imobilização foram usados 600mg de resina 1x4-200 e 3mL de Bioinvert® original (sem diluição, ou seja 100%) em comparação ao caso em que se usou 100mg de resina e 3mL de Bioinvert® original.

Algo semelhante se constata para o caso da Fluka®, logrando-se uma atividade hidrolítica dobrada para o complexo obtido pela mistura de 200mg de resina com 20mg de pó Fluka® em comparação àquele obtido pela mistura de 100mg de resina com 20mg de pó Fluka® (Tabela 41). Lembra-se que neste caso a suspensão foi preparada misturando-se os pós em presença de 25mL de água deionizada (pH5,5).

Provavelmente ao aumentar a quantidade da resina, as formas supramoleculares de invertase se encontrariam melhor distribuídas. Por conseguinte a atividade foi otimizada, reduzindo o tempo de hidrólise para algo em torno de 9h.

4.7. Reutilização do complexo Dowex® 1x4-200/Bioinvert®

A atividade do Bioinvert® imobilizada em Dowex® 1x4-200 foi estudada ao longo de 5 ensaios e procedeu-se conforme descrito no item 3.2.3.9. A variação da atividade hidrolítica relativa pode ser visualizada na Figura 69, sendo os dados mostrados na Tabela 42.

Tabela 42. Estudo de reutilização do complexo Dowex®/Bioinvert®.

Ensaio	Atividade(U.mL ⁻¹)	Proteína retida após o ensaio (%)	Atividade relativa (%)
1 (1º ensaio)	0,0263	100	100
2 (1ª reutilização)	0,0141	100	53,6
3 (2ª reutilização)	0,0121	100	46,0
4 (3ª reutilização)	0,0106	100	40,3
5 (4ª reutilização)	0,00980	100	37,3

FIGURA 69. Atividade relativa do complexo Dowex®/Bioinvert® ao longo de 4 reutilizações.

Os dados apresentados mostram que foi marcante a diminuição da atividade hidrolítica relativa, à medida que o número de reutilizações aumentou. Como não se constatou desprendimento de proteína das partículas após cada ensaio (Tabela 42), concluiu-se que a diminuição da atividade deveu-se a perdas de massa do complexo Dowex®/Invertase (Bioinvert®) durante o procedimento de separação e lavagem do sistema imobilizado entre ensaios consecutivos. De fato, após a quarta reutilização verificou-se que da massa original do complexo Dowex®/Invertase (100mg) restaram cerca de 36mg (em massa seca), ou seja uma perda de material da ordem de 64,2%. Seguramente este problema será eliminado, quando o sistema imobilizado for usado em processo hidrolítico contínuo da sacarose. Ressalta-se que o aspecto mais importante deste experimento, foi constatar o não desprendimento da invertase do suporte, ao longo das várias manipulações às quais o sistema imobilizado foi submetido. Contrariamente, DEMIR *et al.* (2001) constataram que ao reutilizar a pectinase imobilizada em resina aniônica do tipo poliestireno-divinilbenzeno, ocorria um franco desprendimento da mesma do suporte.

4.8. Estabilidade do complexo Dowex®/Bioinvert® com o tempo de estocagem

Os complexos que foram analisados foram todos mantidos a 5°C em repouso na forma de suspensão em pH 5,5 (água deionizada) e em seguida prosseguiu-se conforme descrito no item 3.2.3.10. Conforme TÜMTÜRK *et al.* (2000) a enzima na forma solúvel é geralmente instável durante o armazenamento e a sua atividade diminui gradualmente ao longo do tempo.

Observa-se na Tabela 43 que o complexo Dowex®/Bioinvert® manteve na grande maioria os 100% tanto no índice de adsorção quanto na sua atividade hidrolítica ao longo de 21 dias. Este resultado condiz com o estudo de DEMIR *et al.* (2001) que verificaram a estabilidade da atividade da

pectinase adsorvida eletrostaticamente na resina aniônica (Dowex®) após sete semanas armazenados sob refrigeração a 4°C.

Tabela 43. Atividade do complexo Dowex®/Bioinvert® com o tempo de estocagem

Tempo (dias)	IA (%)	Atividade (U.mL ⁻¹)	CI (%)
1	100	0,0263	100
7	100	0,0325	100
14	100	0,0211	98,6
21	100	0,0246	100
28	100	0,0167	78,0

4.9. Análise microscópica das resinas Dowex®

As resinas foram comparadas conforme o seu grau de entumescimento ("swelling"). As análises das amostras seguiram o procedimento descrito no item 3.2.3.11. Segundo HELFFERICH (1995) as resinas aniônicas absorvem o solvente expandindo-se até um certo limite. Essa propriedade pôde ser avaliada nas seguintes formas da resina Dowex®1x4-200: resina seca (80µm), resina hidratada (106µm) e resina hidratada com a enzima (100µm). (Figuras 70, 71 e 72).

A resina seca de Dowex®1x4-200 originalmente tem seu tamanho médio em torno de 80 µm (200mesh), conforme os dados de "Dow Chemical Company". Quando a resina é hidratada com um solvente polar (neste caso água deionizada), HELFFERICH (1995) afirma que ocorre uma expansão devido a forte interação com os íons e os grupos polares da resina. Em particular a expansão se torna mais efetiva quando os grupos ionogênicos da resina estiverem completamente ionizados e para tanto a resina foi deixada em contato com a água deionizada (pH acertado a 5,5) durante 24 horas e sob agitação a 32°C.

A propriedade de expansão da resina, no entanto, pode ser reduzida com o aumento da concentração da solução. Isso se deve à diferença da pressão osmótica entre as partes interna e externa da resina ou, em termos termodinâmicos, à diferença de energia livre do sistema. Portanto a força de retenção do solvente é menor (HELFFERICH, 1995), como ocorre no caso da resina com a invertase. Além da resina se encontrar num meio de concentração mais elevada neste caso, deve-se lembrar também que existe uma formação e associação de pares de íons (a resina se encontra carregada positivamente e também ligada à enzima com a carga negativa). O mesmo autor relata que a formação de complexos ou a associação de íons da solução com os grupos fixos da resina interfere na sua expansibilidade, obedecendo o mesmo mecanismo descrito para as soluções mais concentradas. Este aspecto poderia justificar o dado experimental de que o diâmetro da partícula de resina com a invertase adsorvida diminuiu cerca de 6%, quando comparado ao diâmetro da partícula na resina, apenas, hidratada (Figura 71).

FIGURA 70. Resina seca no aumento de 10x

FIGURA 71. Resina hidratada corada com solução de azul de metileno no aumento de 10x.

FIGURA 72. Resina hidratada com a enzima corada com azul de metileno no aumento de 10x.

5. CONCLUSÕES

Em linhas gerais, concluiu-se deste trabalho que resinas aniônicas do tipo Dowex® [1x8:50-400, 1x4:50-400 e 1x2:100-400, todos copolímeros estireno-divinilbenzênicos, porém de granulometria (50-400 mesh) e quantidades de ligações cruzadas diferentes (2-8%)] foram adequadas para a imobilização da invertase em meio aquoso (pH 5,5 e temperatura de 32°C). Dentre os sistemas imobilizados estudados, mereceu destaque o complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Bioinvert®) que apresentou alta estabilidade operacional (a enzima não se desprende da resina de modo algum) e de armazenamento (atividade catalítica 100% mantida após 21 dias de estocagem a 5°C), bem como índice de adsorção e coeficiente de imobilização iguais a 100%. No caso particular das atividades transferásicas da invertase solúvel e imobilizada, concluiu-se serem necessários estudos mais aprofundados do trinômio tempo de reação/concentração de sacarose/viscosidade do meio reacional.

Finalmente, os pontos conclusivos notáveis e específicos foram anotados como segue:

5.1. Sobre a Caracterização da invertase (Bioinvert®) solúvel:

- ↳ o pH de atividade ótima do Bioinvert® é 4,5;
- ↳ o pH de estabilidade situa-se na faixa entre 4,0 e 5,0;
- ↳ As constantes cinéticas são: $K_m=40,3$ mM e $V_{m\acute{a}x}=0,0320$ U.mL⁻¹;
- ↳ A constante de inativação térmica à 55° C é igual a 0,006 min⁻¹;
- ↳ A invertase permaneceu estável na faixa de temperatura entre 30°C e 50°C;
- ↳ A temperatura de maior atividade foi 55°C;

- ✎ Os parâmetros termodinâmicos para a invertase solúvel (Bioinvert[®]) são: $E_a = 37,3\text{kJ.mol}^{-1}$; $\Delta G = -14,2\text{kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H = 34,7\text{kJ.mol}^{-1}$; e $\Delta S = 0,16\text{kJ}.\text{(mol.K)}^{-1}$;
- ✎ A atividade específica do Bioinvert[®] foi igual a 37,4 U/mg de proteína.

5.2. Sobre a Caracterização da invertase (Fluka[®]) solúvel:

- ✎ o pH de atividade ótima da Fluka[®] é 5,0;
- ✎ o pH de estabilidade situa-se na faixa entre 4,0 e 4,6;
- ✎ As constantes cinéticas são: $K_m = 17,0\text{ mM}$ e $V_{\text{máx}} = 0,024\text{ U.mL}^{-1}$;
- ✎ A constante de inativação térmica à 55° C é igual a $0,0011\text{ min}^{-1}$;
- ✎ A invertase permaneceu estável na faixa de temperatura entre 30°C e 55°C;
- ✎ A temperatura de maior atividade foi 55°C;
- ✎ Os parâmetros termodinâmicos para a invertase solúvel (Fluka[®]) são: $E_a = 37,4\text{kJ.mol}^{-1}$; $\Delta G = -14,1\text{kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H = 33,8\text{kJ.mol}^{-1}$; e $\Delta S = 0,15\text{kJ}.\text{(mol. K)}^{-1}$;
- ✎ Os parâmetros termodinâmicos relacionados a inativação térmica para a invertase solúvel (Fluka[®]) são: $E_a = 143\text{kJ.mol}^{-1}$; $\Delta G = -16,3\text{kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H = 142\text{kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta S = 0,490\text{kJ}.\text{(mol. K)}^{-1}$;
- ✎ A atividade específica da Fluka[®] foi igual a 141 U/mg de proteína.

5.3. Sobre a caracterização da invertase (Bioinvert®) imobilizada

- ✎ pH de atividade ótima é 5,5;
- ✎ pH de estabilidade situa-se na faixa entre 5,0 e 6,0;
- ✎ Os valores das constantes cinéticas são: $(K_m)_{ap} = 38,2 \text{ mM}$ e $(V_{m\acute{a}x})_{ap} = 0,0489 \text{ U.mL}^{-1}$;
- ✎ A constante de inativação térmica à 55°C é igual a $0,0292 \text{ min}^{-1}$;
- ✎ A invertase insolúvel permaneceu estável na faixa de temperatura entre 30°C e 50°C;
- ✎ A temperatura de maior atividade foi 50°C;
- ✎ Os parâmetros termodinâmicos do complexo Dowex®1x4-200/Invertase são: $E_a = 37,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$; $\Delta G = -14,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H = 34,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$; e $\Delta S = 0,160 \text{ kJ.(mol.K)}^{-1}$;
- ✎ A atividade específica do complexo Dowex® 1x4-200/Invertase foi igual a 1,14 U/mg de proteína.

5.4. Sobre a caracterização da invertase (Fluka®) imobilizada

- ✎ pH de atividade ótima é 4,6;
- ✎ pH de estabilidade situa-se na faixa entre 4,6 e 5,5;
- ✎ Os valores das constantes cinéticas são: $(K_m)_{ap} = 18,3 \text{ mM}$ e $(V_{m\acute{a}x})_{ap} = 0,0450 \text{ U.mL}^{-1}$;
- ✎ A constante de inativação térmica à 55°C é igual a $0,76 \text{ min}^{-1}$;
- ✎ A invertase insolúvel permaneceu estável na faixa de temperatura entre 35°C e 40°C;
- ✎ A temperatura de maior atividade foi 45°C;

- ✎ Os parâmetros termodinâmicos do complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Fluka®) são: $E_a = 74,3\text{kJ.mol}^{-1}$; $\Delta G = -14,0\text{kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H = 71,7\text{kJ.mol}^{-1}$; e $\Delta S = 0,270\text{kJ}.\text{(mol.K)}^{-1}$;
- ✎ Os parâmetros termodinâmicos relacionados à inativação térmica do complexo Dowex®1x4-200/Invertase (Fluka®) são: $E_a = 225\text{kJ.mol}^{-1}$; $\Delta G = -78,4\text{kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H = 223\text{kJ.mol}^{-1}$; e $\Delta S = 0,970\text{kJ}.\text{(mol.K)}^{-1}$.
- ✎ A atividade específica do complexo Dowex® 1x4-200/Invertase (Fluka®) foi igual a 8,87 U/mg de proteína.

5.5. Imobilização da invertase

- ✎ IA diminui à medida que a temperatura aumenta;
- ✎ IA dependeu do tipo de resina Dowex®, do pH da solução e do tipo de solvente (água deionizada ou tampão acetato);
- ✎ As resinas Dowex® tipo 1x4-100 e 1x2-400 apresentaram $IA > 80\%$, independentemente do tipo de solvente e do pH da solução;
- ✎ Em água deionizada e $pH = 5,5$ todos os Dowex® estudados tiveram $IA > 85\%$;
- ✎ A hipótese [(largura da malha/tamanho das partículas)/agregação supramolecular/pH da solução/tipo de solvente] explica satisfatoriamente os resultados obtidos relacionados ao índice de adsorção resina-proteína;
- ✎ As condições para imobilização da invertase presente no Bioinvert® ou Fluka® em resinas aniônicas Dowex® são: Temperatura (32°C), agitação (100 rpm), pH (4,6 ou 5,5), água deionizada, tempo de contato resina-solução (24 h), tempo de contato Invertase/resina (4 h) e composição da mistura (10 mg de Bioinvert® ou 0,20mg de Fluka®/100 mg de resina/25 mL de solução).

5.6. Detecção da atividade transferásica

- ✎ O método cromatográfico (TLC) permitiu a separação evidente da sacarose, glicose, frutose e de oligossacarídeos (FOS). A formação de FOS foi detectada no intervalo de tempo entre 9 e 35 minutos. A atividade transferásica da invertase em ambas as formas solúvel e insolúvel aumentou com a concentração de sacarose do meio reacional.

5.7. Estabilidade operacional e por tempo de estocagem do complexo Dowex®1x4-200/Bioinvert®.

- ✎ Em relação à atividade inicial, o complexo Dowex®1x4-200/Bioinvert® apresentou uma redução de 46,4% na primeira reutilização e nos próximos 3 ensaios manteve em média 41,2% da sua atividade relativa.
- ✎ O complexo Dowex®1x4-200/Bioinvert® permaneceu estável a 5°C durante 21 dias, mantendo os 100% tanto em índice de adsorção quanto em coeficiente de imobilização.

6. PERSPECTIVAS

As perspectivas de continuidade deste trabalho repousam em dois aspectos principais, a saber, utilizar o complexo Dowex® 1x4-200/Invertase (Bioinvert® ou Fluka®) para a hidrólise da sacarose em reator contínuo e definir condições operacionais que favoreçam a atividade transferásica da invertase (solúvel e/ou imobilizada) para a produção de frutoligossacarídeos. Além disso, deve ser acrescentada a caracterização física das resinas usadas como suporte e do sistema imobilizado (Dowex®/Invertase).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NABY, M.A. Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and beta-xylosidas, and properties of the immobilized enzymes. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.38, n.1/2, p.69-81, 1993.

ABDEL-NABY, M.A., ISMAIL, A.-M.S., ABDEL-FATTAH, A.M., ABDEL-FATTAH, A.F. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochem.**, Oxford, v.34, p.391-398, 1999.

ABDEL-NABY, M.A., ISMAIL, A.-M.S., ABDEL-FATTAH, A.M., ABDEL-FATTAH, A.F. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. **Bioresour. Technol.**, Oxford, v.64, p.205-210, 1998.

ABDELLAH, H.A., BAKER, T.M.A, SHEKIB, L.A., EL-IRAQI, S.M. Characteristics of invertase immobilized on three different types of supports. **Food Chem.**, Oxford, v.43, p.369-375, 1992.

ADERCREUTZ, P. Immobilized enzymes. In: NAGODAWITHANA, T., REED, G., eds. **Enzymes in food processing**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1993. p.116. (Food Science and Technology).

AHMAD, S., ANWAR, A, SALEEMUDDIN, M. Immobilization and stabilization of invertase on *Cajanus cajan* lectin support. **Bioresour. Technol.**, Oxford, v.79, p.121-127, 2001.

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

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2002.

- ALFANI, F., CANTARELLA, M., CANTARELLA, L., VITOLO, M. Biological upgrading of wastes from sucrose processing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.542, p.346-350, 1988.
- ALMEIDA CUNHA, B. C., VITOLO, M., Effect of viscosity on sucrose hydrolysis catalysed by invertase obtained from *S. cerevisiae*. **Biotech. Bioeng.**, New York, v.26, p.811-813, 1984.
- ARRUDA, L.M.O. Caracterização cinética da invertase imobilizada por aprisionamento em gel de alginato de cálcio. São Paulo, 1996. 105p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- ARRUDA, L.M.O., VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.81, n.1, p.23-33, 1999.
- ARSLAN, F., TUMTURK, H., ÇAYKARA, T., SEN, M., GUVEN, O. The effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels. **Food Chem.**, Oxford, v.70, p.33-38, 2000.
- BIELECKI, S., SOMIARI, R.I. Oligossacharide synthesis by invertase in organic media containing SDS. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v.20, n.3, p.287-290, 1998.
- BIGELIS, R. Carbohydrases: In: NAGODAWITHANA, T. and REED, G. Eds. *Enzymes in food processing*, 3rd. Ed., New York, Academic Press, 1993, p.121-158.
- BIGGS, D.R., HANCOCK, K.R. Fructan 2000. **Trends Plant Sci.**, Oxford, v.6, n.1, p.8-9, 2001.
- BOY, M., VOSS, D.H. Fast determination of biocatalyst process stability. **Process Biochem.**, Oxford, v.34, p.535-547, 1999.

- BREDA, M., VITOLO, M., DURANTI, M.A., PITOMBO, R.N.M. Effect of freezing-thawing on invertase activity. **Cryobiology**, Orlando, v.29, p.281-290, 1992.
- BRITISH SUGAR CO. 2002. Disponível em: <http://www.britishsugar.co.uk/beweb/sfi/pages/inver.htm>. Acesso em: 16 ago. 2002.
- BUNGAY, H. **Ion exchangers**: term project by Scott Wierzchowski, nov. 1995. Disponível em: <http://www.esb.ucp.pt/~bungah/ionex/biomain.htm>. Acesso em: 08 ago. 2000.
- BURT, H., CAMERON, E.C., ERBER, H., PRICE, J.D.E. Ion exchange resins as potential phosphate-binding agents for renal failure patients: effects of the physicochemical properties of resins on phosphate and bile salt binding. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.76, n.5, p.379-383, 1987.
- BUTTERFIELD, D.A., BHATTACHARYYA, D., DAUNERT, S., BACHAS, L. Catalytic biofunctional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays: review. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.181, p.29-37, 2001.
- CASTELLAN, G.W. **Físico-química**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v.1, p.100-162.
- CHAPLIN, M. **Enzyme technology**. 2002. Disponível em: <http://sbu.ac.uk/biology/enztech/immethhod>. Acesso em: 19 mar. 2002.
- CHAUDURI, B., MODAK, J.M. Optimization of fed-batch bioreactor using neural network model. **Bioprocess Eng.**, Berlin, v.19, p.71-79, 1998.
- CHEETHAM, P.S.J. What makes a good biocatalyst? **J. Biotechnol.**, Oxford, v.66, p.3-10, 1998.

- CHEN, Y.-H., AULL, J.L., BELL, L.N. Invertase storage stability and sucrose hydrolysis in solids as affected by water activity and glass transition. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, p.504-509, 1999.
- CHEN, Y., KANG, E.T., NEOH, K.G., TAN, K.L. Covalent immobilization of invertase onto surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. **Eur. Polym. J.**, Oxford, v.36, p.2095-2103, 2000.
- CHIEN, C.-S., LEE, W.-C., LIN, T.-J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme Microb. Technol.**, Shannon, v.29, p.252-257, 2001.
- COPERSUCAR, 2002. Disponível em: <http://www.copersucar.com.br/producao/acucar.htm>. Acesso em: 22 ago. 2002.
- CREVECOUER, J.J., COOLEGEM, J.F., NELISSEN, L., LEMSTRA, P.J. Water expandable polystyrene (WEPS). Part 3. Expansion behavior. **Polymer**, Oxford, v.40, p.3697-3702, 1999.
- CRITTENDEN, R.G., PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford, v.7, p.353-361, 1996.
- CRUEGER, W., CRUEGER, A. Enzymes. In: BROCK, T.D., ed. **Biotechnology: a textbook of industrial microbiology**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Association; Madison: Science Tech., 1989. p.210-217.
- CRUZ, R., CRUZ, V.D., BELINI, M.Z., BELOTE, J.G., VIEIRA, C.R. Production of oligofructosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. **Bioresour. Technol.**, Oxford, v.65, p.139-143, 1998.

- DABROUWSKI, A. Adsorption-from theory to practice. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amsterdam, v.93, p.135-224, 2001.
- DAUTZENBERG, H., KOETZ, J., PHILIPP, B., ROTHER, G., SCHELLENBERGER, A., MANSFELD, J. Interaction of invertase with polyelectrolytes. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.38, n.9, p.1012-1019, 1991.
- DEMIR, N., ACAR, J., SARIOGLU, K., MUTLU, M. The use of commercial pectinase in the fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **J. Food Eng.**, Oxford, v.47, p.275-280, 2001.
- DeSANTIS, G., JONES, J.B. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v.10, p.324-330, 1999.
- DE QUEIROZ, A.A.A., VITOLO, M., OLIVEIRA, R.C., HIGA, O.Z. Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. **Radiat. Phys. Chem.**, Oxford, v.47, n.6, p.873-880, 1996.
- DE 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. **J. Appl. Polym. Sci.**, New York, v.84, p.767-777, 2002.
- DIWAN, M., PARK, T.G. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. **J. Controlled Release**, Shannon, v.73, p.233-244, 2001.
- D'SOUZA, S.F., MELO, J.S. Immobilization of bakers yeast on jute fabric through adhesion using polyethylenimine: application in an annular column reactor for the inversion of sucrose. **Process Biochem.**, Oxford, v.36, p.677-681, 2001.
- ECHEGARAY, O.F., CARVALHO, J.C.M., FERNANDES, A.N.R., SATO, S., AQUARONE, E., VITOLO, M. Fed-batch culture of *S. cerevisiae* in sugar cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells on

- ethanol fermentation. **Biomass Bioenergy**, Oxford, v.19, n.1, p.39-50, 2000.
- ESMON, P.C., ESMON, B.E., SCHAUER, I.E., TAYLOR, A., SCHEKMAN, R. Structure, assembly and secretion of octameric invertase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.262, n.9, p.4387-4394, 1987.
- ETTALIBI, M., BARATTI, J.C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme Microb. Technol.**, Shannon, v.28, p.596-601, 2001.
- FARINE, S., VERSLUIS, C., BONNICI, P.J., HECK, A., PESCHET, J.L., PUIGSERVER, A., BIAGINI, A. Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.920, p.299-308, 2001.
- FAROOQI, M., SALEEMUDDIN, M., ULBER, R., SOSNITZA, P., SCHEPER, T. Bioaffinity layering: a novel strategy for the immobilization of large quantities of glycoenzymes. **J. Biotechnol.**, Oxford, v.55, p.171-179, 1999.
- FOGARTY, W.M., KELLY, C.T. **Microbial enzymes and biotechnology**. 2.ed. London: Elsevier Applied Science, 1990.
- FOURNIER, R.L., VARANASIS, S., BYERS, J.P. Method of producing products with a bilayer pellet containing a coimmobilized enzyme system that maintains a pH difference. US Patent, US5,397,700, 14 March 1995, 9pp. Apud: **Chem. Abstr.**, Columbus, v.122, abstr.289085b, 1995.
- FREIRE LIMA, J. Setor Sucroalcooleiro: Açúcar. Informe Editorial, Área de Operações Industriais 1-AO1, Gerência Setorial de Agroindústria, 05/10/95, No.4. Disponível em:

<http://www.bndes.gov.br/conhecimento/setorial/gs1-04.pdf> /jan/2003.

Acesso em : 16 jan.2003.

GAFFAR, R., KERMASHA, S., BISAKOWSKI, B. Biocathaysis of immobilized chlorophyllase in a ternary micellar system. **J. Biotechnol.**, Oxford, v.74, p.45-55, 1998.

GEANKOPLIS, C.J., HAERING, E.R., HU, M.C. Reaction kinetics and mass-transfer effects in a fixed-bed biochemical reactor with invertase immobilized on alumina. **Ind. Eng. Chem. Res.**, Columbus, v.26, n.9, p.1810-1817, 1987.

GODFREY, T., WEST, S. **Industrial enzymology**. 2.ed. London: MacMillan, 1996. p.5.

GUZZO, P.R. Albany molecular research: site features: technical reports: v.1, n.5, 2000. Disponível em: <http://www.albmolecular.com/features/tecreps/vol> Acesso em: 18 ago. 2000.

HANSEN, S. A. Thin layer chromatographic method for identification of oligosaccharides in starch hydrolysates. **Journal of Chromatography**, AMSTERDAM, V.105, P.388-390, 1975.

HAYASHI, S., KINOSHITA, J., NONOGUCHI, M., TAGASAKI, Y., IMADA, K. Continuous production of 1-kestose by β -fructofuranosidase immobilized on shirasu porous glass. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v.13, n.6, p.395-398, 1991.

HELFFERICH, F.G. **Ion exchange**. New York: Dover, 1995. p.6-103. (Dover science books).

- HENNIGER, G. Enzymes for food analysis. In: GERHARTZ, W., ed. **Enzymes in industry**: production and applications. Weinheim: VHC, 1990. p.155-184.
- ILLANES, A. **Biotecnologia de enzimas**. Valparaíso: Ediciones Universitarias de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994. p.30.
- ILLANES, A., CHAMY, R., ZUNIGA, M. E. Immobilization of invertase on crosslinked chitin. In: MUZZARELI, R., JENNIAUX, C., GOODAY, G. Chitin in nature and technology, New York, Plenum Press, 1985, p.411-415.
- INADA, Y., FURUKAWA, M., SASAKI, H., KODERA, Y., HIROTO, M., NISHIMURA, H., MATSUSHIMA, A. Biomedical and biotechnological applications of PEG-and PM-modified proteins. **Trends Biotechnol.**, Oxford, v.13, p.86-91, 1995.
- IVANOVA, V., DOBREVA, E., LEGOY, M.D. Characteristics of immobilized thermostable amylases from two *Bacillus licheniformis* strains. **Acta Biotechnol.**, Berlin, v.18, n.4, p.339-351, 1999.
- JAFRI, F., SALEEMUDDIN, M. Immobilization of invertase on Sepharose-linked enzyme glycosyl recognizing polyclonal antibodies. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.56, n.6, p.605-609, 1997.
- KIZILYAR, N., AKBULUT, U., TOPPARE, L., ÖZDEN, M. Y., YAGCI, Y. Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/polytetrahydrofuran graft polymer matrices. **Synth. Met.**, Lausanne, v.104, p.45-50, 1999.
- LI, Y., FAN, Y., MA, J. Thermal, physical and chemical stability of porous polystyrene-type beads with different degrees of crosslinking. **Polym. Degrad. Stab.**, Kidlington, v.73, p.163-167, 2001.

- MAGALHÃES, M. Barreiras tarifárias inibem acesso a novos mercados. *Jornal Cana, Mercado & Cotações*, Outubro de 2002. Disponível em: <http://www.jornalcana.com.br/pdf/106/mercado.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2003.
- MARKET TRENDS. Archive. Focus on enzymes. Disponível em: <http://www.ifi-online.com/trends/index1.html>. Acesso em: 16 ago. 2002.
- MAXIM, S., FLONDOR, A., CARPOV, A. Ionic binding of biologically active proteins on cross-linked acrylic macromolecular supports. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.30, n.5, p.593-597, 1987.
- MEJIAZ, E., PEREZ, O., Obtencion de sirope invertido com el empleo del preparado de invertase. **Alimentaria**, Madri, v.273, p.73-76, 1996.
- MELO, J.S., D'SOUZA, S.F. A simple approach for the simultaneous isolation and immobilization of invertase using crude extracts of yeast and Jack bean meal. **J. Biochem. Biophys. Methods**, Shannon, v.42, p.133-135, 2000.
- MESSING, R.A. Immobilization techniques: enzymes. In: COONEY, C.L., HUMPHREY, A.E., eds. **The principles of biotechnology: engineering considerations**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p.191-201. (Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine, v.2).
- MONSAN, P., DURAND, G. Preparation of insolubilized invertase by adsorption on bentonite. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.16, n.1, p.39-42, 1971.
- MURAMATSU, M., NAKAKUKI, T. Enzymatic synthesis of novel fructosyl and oligofructosyl trehalosies by *Aspergillus sydowi* β -fructofuranosidase. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, Tokyo, v.59, n.2, p.208-212, 1995.

- MUTLU, M., SARIOGLU, K., DEMIR, N., ERCAN, M.T., ACAR, J. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I. Viscosimetric determination of enzyme activity. **J. Food Eng.**, Oxford, v.41, p.147-150, 1999.
- NGUYEN, Q.D., MATTES, F., HOSCHKE, A., REZESSY-SZABÓ, J., BHAT, M.K. Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v.21, p.183-186, 1999.
- OLIVEIRA, N.M. Alimentos probióticos: uma nova tendência em biotecnologia? **Pharm. Technol.: Ed. Bras.**, São Paulo, v.6, n.4, p.54-56, 2002.
- OLIVEIRA, P.C., ALVES, G.M., CASTRO, H.F. Immobilization studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochem. Eng. J.**, Lausanne, v.5, p.63-71, 2000.
- OOSHIMA, H., SAKIMOTO, M., HARANO, Y. Characteristics of immobilized invertase. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.22, p.2155-2167, 1980.
- OWUSU, R.K., MAKHZOUM, J. Heat inactivation of lyase from psychrotrophic *P. fluorescens*. P.38: activation parameters and enzyme stability at low or ultra-high temperatures. **Food Chem.**, Oxford, v.44, p.261-268, 1992.
- PALCIC, M. M. Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.616-624, 1999.
- REDDY, A.V., MACCOLL, R., MALEY, F. Effect of oligosaccharides and chloride on the oligomeric structures of external, internal, and deglycosylated invertase. **Biochemistry**, Columbus, v.29, n.10, p.2482-2487, 1990.

- REED, E., NAGODAWITHANA, T.W., eds. **Enzymes, biomass, food and feed**. 2.ed. Weinheim: VCH, 1995. (Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise, v.9).
- RIBEIRO, R.R. Caracterização cinética da invertase imobilizada em Dowex®-1x8-50. São Paulo, 1997. 62p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- RIBEIRO, R.R., VITOLO, M. Kinetic characterization of invertase immobilized on strongly basic anion exchange resin. In: BIOMASS CONFERENCE OF THE AMERICAS, 3, Montreal, 1997. **Proceedings**. Montreal: Pergamon, 1997. v.2, p.1155-1162.
- RYU, O.H., JU, J.Y., SHIN, C.S. Continuous L-cysteine production using immobilized cell reactors and product extractors. **Process Biochem.**, Oxford, v.32, n.3, p.201-209, 1997.
- SARIOGLU, K., DEMIR, N., ACAR, J., MUTLU, M. The use of commercial pectinase in the fruit juice industry. Part 2. Determination of the kinetic behavior of immobilized commercial pectinase. **J. Food Eng.**, Oxford, v.47, p.271-274, 2001.
- SENGUPTA, S., MODAK, J.M. Optimization of fed-batch bioreactor for immobilized enzyme process. **Chem. Eng. Sci.**, Weinheim, v.56, p.3315-1325, 2001.
- SEGEL, I.H. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1979. p.405.
- SINISTERRA, J.V. Inmovilización de enzimas y células: su utilización industrial. **Afinidad II**, Barcelona, v.439, p.165-178, 1992.
- SOMOGYI, M. Notes in sugar determination. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.195, n.1, p.19-23, 1952.

- SOSNITZA, P., FAROOQI, M., SALEEMUDDIN, R., ULBER, R., SCHEPER, T. Application of reversible immobilization techniques for biosensors. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.368, p.197-203, 1998.
- STEFUCA, V., WELWARDOVÁ, P., GEMEINER, P. Flow microcalorimeter auto-calibration for the analysis of immobilized enzyme kinetics. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.355, p.63-67, 1997.
- TANIOKA, A., YOKOYAMA, Y., MIYASAKA, K. Preparation and properties of enzyme-immobilized porous polypropylene films. **J. Colloid Interface Sci.**, Orlando, v.200, p.185-187, 1998.
- TANRISEVEN, A., DOGAN, S. Immobilization of invertase within alginate gel capsules. **Process Biochem.**, Oxford, v.36, p.1081-1083, 2001.
- TRASAR-CEPEDA, C., LEIRÓS, M.C., GIL-SOTRES, F. Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in na area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): specific parameters. **Soil. Biol. Biochem.**, Oxford, v.32, p.747-755, 2000.
- 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 da UNICAMP).
- TUCKER, G.A., WOODS, L.F.J., eds. **Enzymes in food processing**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p.257.
- TÜMTÜRK, A., ARSLAN, F., DISLI, A., TUFAN, Y. Immobilization of invertase attached to a granular dimer acid-co-alkyl polyamine. **Food Chem.**, Oxford, v.69, p.5-9, 2000.

- ULBRICHT, M., PAPRA, A. Polyacrylonitrile enzyme ultrafiltration membranes prepared by adsorption, cross-linking, and covalent bindings. **Enzyme Microb. Technol.**, Shannon, v.20 p.61-68, 1997.
- VENTON, D.L., GUDIPATI, E. Entrapment of enzymes using organo-functionalized polysiloxane copolymers. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1250, p.117-125, 1995.
- VICENTE, C., SEBASTIÁN, B., FONTANIELLA, B., MÁRQUEZ, A., XAVIER FILHO, L., LEGAZ, M.-E. Bioskin as an affinity matrix for the separation of glycoproteins. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.917, p.55-61, 2001.
- VITOLO, M. Reatores com enzimas imobilizadas. In: SCHIMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. V.2, São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda., cap.17, p.373-396, 2001.
- VITOLO, M. **Tópicos de enzimologia industrial**. São Paulo: s.n., 1981. p.9.
- VITOLO, M., BARROS, D.P. Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on chitin. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, London, v.25, n.3, p.240-243, 1992.
- VITOLO, M., YASSUDA, M.T. Effect of sucrose concentration on the invertase activity of intact yeast cells (*S. cerevisiae*). **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v.13, n.1, p.53-56, 1991.
- VORAGEN, A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford, v.9, p.328-335, 1999.
- VRÁBEL, P., POLAKOVIC, M., GODÓ, S., BÁLES, V., DOCOLOMANSKY, P., GEMEINER, P. Influence of immobilization on the thermal inactivation of yeast invertase. **Enzyme Microb. Technol.**, Shannon, v.21 p.196-202, 1997.

- VRÁBEL, P., POLAKOVIC, M., STEFUCA, V., BÁLES, V. Analysis of mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes, evaluation of multitemperature data applied to inactivation of yeast invertase. **Enzyme Microb. Technol.**, Shannon, v.20, p.348-354, 1997.
- WALKER, J.M., COX, M. **The language of biotechnology**: a dictionary of terms. 2.ed. Washington: ACS, 1995. p.296.
- WALSH, G., HEADON, D.R. **Protein Biotechnology**. Chichester: John Wiley, 1994. p.20.
- WATANABE, H., MATSUYAMA, T., YAMAMOTO, H. Preparation of immobilized enzyme gel particles using an electrostatic atomization technique. **Biochem. Eng. J.**, Lausanne, v.8, p.171-174, 2001.
- WEBER, H., ROITSCH, T. Invertases and life beyond sucrose cleavage. **Trends Plant Sci.**, Oxford, v.5, n.92, p.47-48, 2000.
- WEETALL, H. H. Immobilization by covalent attachment and by entrapment. In: MESSING, R. A. Ed. Immobilized enzymes for industrial reactors. Academic Press, New York, 1975, p.118.
- WISEMAN, A. New and modified invertases, and their applications. In: WISEMAN, A., ed. **Topics in enzyme and fermentation biotechnology**. Chichester: Ellis Horwood, 1981. p.265-288.
- WOODWARD, J., WISEMAN, A. The involvement of salts links in the stabilization of baker's yeast invertase / Evidence from immobilization and chemical modification studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, U.K., v.527, p.8-16, 1978.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.19, p.107-117, 1996.
- ZAKS, A. Industrial biocatalysis. **Curr.Op.Chem.Biol.**, v.5, p.130-136, 2001.

ANEXO

1- PREPARO DAS SOLUÇÕES - TAMPÃO COM DIFERENTES VALORES DE pH:

➤ Tampão citrato 0,01M

Preparar solução A e B:

A- solução de ácido cítrico: dissolver 4,202g de ácido cítrico em 200 mL de água deionizada.

B- Solução de citrato de sódio: dissolver 1,471g de citrato de sódio dihidratado em 50mL de água deionizada.

pH= 3,0: misturar 93mL da solução A com 7,0mL de solução B. Homogeneizar bem. Adicionar 800mL de água deionizada. Ajustar o pH a 3,0. Completar a 1000mL com água deionizada.

pH= 3,5: misturar 80mL da solução A com 20,0mL de solução B. Homogeneizar bem. Adicionar 800mL de água deionizada. Ajustar o pH a 3,5. Completar a 1000mL com água deionizada.

➤ Tampão acetato 0,01 M

Preparar solução A e B:

A-solução de ácido acético: misturar 11,55mL de ácido acético glacial em 1000mL de água deionizada.

B-Solução de acetato de sódio: dissolver 5,44g de acetato de sódio trihidratado em 200mL de água deionizada.

pH= 4,0: misturar 41,0mL da solução A com 9,0mL de solução B. Homogeneizar bem. Adicionar 900mL de água deionizada. Ajustar o pH a 4,0. Completar a 1000mL com água deionizada.

pH= 4,5: misturar 28,0mL da solução A com 22,0mL de solução B. Homogeneizar bem. Adicionar 900mL de água deionizada. Ajustar o pH a 4,5. Completar a 1000mL com água deionizada.

pH= 5,0: misturar 14,8mL da solução A com 35,2mL de solução B. Homogeneizar bem. Adicionar 900mL de água deionizada. Ajustar o pH a 5,0. Completar a 1000mL com água deionizada.

pH= 5,5: misturar 7,9mL da solução A com 42,1mL de solução B. Homogeneizar bem. Adicionar 900mL de água deionizada. Ajustar o pH a 5,5. Completar a 1000mL com água deionizada.

➤ Tampão fosfato 0,01M

Preparar solução A e B:

A-solução de fosfato de sódio monobásico: dissolver 2,78g em 100mL de água deionizada.

B-Solução de fosfato de sódio dibásico: dissolver 5,37g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou 7,17g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em 100mL de água deionizada.

pH= 6,0: misturar 43,9mL da solução A com 6,1mL de solução B. Homogeneizar bem. Adicionar 900mL de água deionizada. Ajustar o pH a 6,0. Completar a 1000mL com água deionizada.

pH= 6,5: misturar 34,3mL da solução A com 15,7mL de solução B. Homogeneizar bem. Adicionar 900mL de água deionizada. Ajustar o pH a 6,5. Completar a 1000mL com água deionizada.

2- PREPARAÇÃO DOS REAGENTES DE SOMOGYI

➤ SOLUÇÃO ALCALINA (Somogyi I):

NaHCO_3	20,0g
$\text{NaKC}_2\text{H}_4\text{O}_6$	15,0g
Na_2CO_3	30,0g
Na_2SO_4	180,0g
H_2O qsp	1000mL

Cada sal foi dissolvido em separado em porções de água, cuja soma dos volumes não excedesse 1000mL. Uma vez dissolvidos as soluções foram misturadas.

➤ SOLUÇÃO ALCALINO-CÚPRICA (Somogyi II)

Dissolver 46,0g de Na_2SO_4 em 100mL de uma solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de concentração igual a 40,0g/L. uma vez concluída a dissolução completar o volume a 200mL com água destilada.

➤ SOLUÇÃO ARSENO-MOLÍBDICA (Somogyi III)

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25,0g
H_2SO_4 (d = 1,84)	21,0g
$\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0g
H_2O qsp	475mL

Dissolver o molibdato de amônio em 400 mL de água destilada e o arseniato de sódio em 25mL de água destilada. A seguir, adicionar o ácido sulfúrico à solução de molibdato de amônio e, finalmente, a solução de arseniato. Completar com água destilada o volume a 475mL.

Observação: Os reagentes devem ser preparados pelo menos 50 horas antes do uso e devem ser armazenados obrigatoriamente em frascos âmbar. No período de frio os reagentes devem ser deixados, preferencialmente, em estufa à 30-32°C.