

## 1. INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos vêm permitindo cada vez mais a aplicação de catalisadores em processos industriais. A catálise enzimática apresenta vantagem sobre a catálise química tradicional por apresentar características como a realização em condições brandas de pH e temperatura, facilitando a manipulação de substâncias sensíveis a condições extremas de processo, a alta seletividade (do ponto de vista químico, da regioseletividade e enantioseletividade), a formação de subprodutos menos tóxicos e facilmente tratáveis e a possibilidade de se executarem reações simultâneas (BOMMARIUS, 1993; GORDON, et al., 1994; GOULAS et al., 2004) e com reciclo (CURCIO et al., 2002). Estas vantagens fazem dos processos enzimáticos uma importante alternativa para setores como a obtenção de produtos químicos orgânicos, produtos alimentícios e farmacêuticos, hormônios, vitaminas e outros produtos de origem bioquímica.

A disponibilidade de biocatalisadores tem aumentado devido aos avanços biotecnológicos (novas técnicas de cultivo celular, isolamento e manipulação genética: cruzamentos, mutações, DNA recombinante, hibridoma), resultando em um aumento do número de aplicações em processos industriais, entre os quais destacam-se alguns como a produção de aspartame, acrilamida, inulina, penicilinas semi-sintéticas, hidrólise da celulose, oligodextranas (SMITH, 1996; ABRAHÃO-NETO et al., 2001; ROCHA-FILHO e VITOLLO, 1998; GAN et al., 2005; DÍAZ et al., 2006). Um outro aspecto a destacar, é a competição vantajosa da biocatálise, quando possível de ser aplicada, frente aos processos tradicionais de extração (fortemente dependente da disponibilidade da matéria-prima e baixo rendimento em produto final), fermentação (econômica apenas em grandes volumes) e de síntese química (mais poluente, maior consumo de energia e menor enantioseletividade).

Dentro desse contexto, uma aplicação bastante estudada para o uso de biocatalisadores, e motivo desse projeto, é a conversão da sacarose em produtos de maior valor agregado como: frutose e ácido glicônico, importados pelo país e amplamente utilizados nos segmentos industriais, como: farmacêutico, químico e de alimentos (NEVES, 2006; TOMOTANI, 2006).

O grande interesse nessa conversão vem do fato de que o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, possuindo uma área plantada de 7 milhões de hectares e uma safra anual de aproximadamente 32,8 milhões de toneladas (MAPA,

2009). Seu derivado, o açúcar (sacarose), teve produção em 2003/2004 de 24,8 milhões de toneladas (Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dados 2007) e na safra de 2008/2009 serão produzidas cerca de 30,4 milhões de toneladas de açúcar (Fonte: Datagro, 2008).

Este processo de bioconversão, portanto, colaborará na diversificação de produtos oriundos do setor sucro-alcooleiro nacional, sendo muito útil na situação de baixa demanda mundial pelo açúcar, evitando o armazenamento por longos períodos – indesejável por ocupar espaço dos armazéns, além dos custos envolvidos, e causando deterioração do produto, já que o mesmo é muito higroscópico - e/ou o prejuízo advindo da sua eventual conversão em etanol combustível.

A conversão, por via enzimática, dar-se-á pela utilização simultânea das enzimas invertase, glicose oxidase e catalase (todas na forma solúvel) em um sistema descontínuo-alimentado, no qual o substrato (sacarose) será adicionado paulatinamente, no intuito de se controlar a quantidade de peróxido de hidrogênio formada quando da transformação da glicose em ácido glicônico.

## **1.1. Enzimas**

### **1.1.1. Invertase**

A invertase (EC.3.2.1.26,  $\beta$ -fructofuranosídeo fructohidrolase) é uma enzima que catalisa a hidrólise da sacarose, originando uma mistura em quantidades iguais de frutose e glicose. A mistura de monossacarídeos recebe o nome de açúcar invertido, por apresentar a propriedade de desviar a luz plano polarizada no sentido anti-horário (levógiro), em contraposição à solução aquosa da sacarose de partida para a ação da invertase, que desvia a luz plano polarizada no sentido horário (dextrógiro). Ressalta-se que os componentes desta mistura não cristalizam e possui índice de dulçor superior ao da sacarose (NEVES, 2006).

A invertase é uma glicoproteína de 270 kDa de massa molar e possui cerca de 30 cadeias de manana por molécula de proteína. Sua principal fonte é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo encontrada na parede celular – mais precisamente no espaço periplásmico - deste microrganismo. Na levedura a invertase é achada tanto na forma não-glicosilada (citossol) quanto glicosilada (parede celular), sendo esta última a forma comercial da enzima (VITOLLO, 2004).

A invertase possui estrutura quaternária formada por duas cadeias peptídicas, mas que podem se aglutinar formando agregados supra moleculares tetra, hexa e/ou

octaméricos apresentando atividade catalítica e termoestabilidade crescentes. É estável a temperaturas entre 30 e 50°C e pH 3,5 – 5,5, sendo o pH ótimo igual a 4,6. A velocidade de reação da invertase diminui em concentrações de sacarose acima de 120g/L, devido ao aumento da viscosidade e/ou à diminuição da atividade de água (VITOLLO, 2004).

A hidrólise enzimática da sacarose – executada em condições brandas de temperatura (37-40°C) e pH (4,5 – 5,0) - serve de contraponto à hidrólise ácida – feita em reator contínuo operado em contracorrente à temperatura da ordem de 80°C e pH em torno de 2,0 -, porque gera um xarope livre de produtos colaterais tóxicos (furfural, hidroximetilfurfural, por exemplo), prescindindo de purificação posterior. A hidrólise enzimática para deslocar em definitivo a hidrólise ácida do contexto industrial deve ser realizada de modo contínuo e de forma a recuperar a enzima no final do processo. Isto pode ser conseguido quer imobilizando a enzima em suportes inertes insolúveis quer usando a enzima na forma solúvel, porém confinada em um reator com membrana (TOMOTANI e VITOLLO, 2007).

Segundo VITOLLO (2004), além de permitir a obtenção do açúcar invertido, a invertase encontra aplicação em confeitaria, na preparação do HTM (“High Test Molasses”, melaço no qual a sacarose não cristaliza), em biossensores, como enzima-modelo em testes de liofilização e congelamento/descongelamento. Ressalta-se o seu uso na avaliação da aplicabilidade de novos suportes inertes para a imobilização de enzimas (De QUEIROZ, et al., 2002).

### **1.1.2. Glicose oxidase (GOD)**

A glicose oxidase (EC.1.1.3.4;  $\beta$ -D-glicose 1-oxidorreductase), usualmente obtida de *Aspergillus niger*, é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glicose com consumo de oxigênio formando gliconolactona (D-glicono  $\delta$ -lactona) e peróxido de hidrogênio. Esta enzima tem  $\text{pH}_{\text{ótimo}} = 5,6$ ,  $\text{pI} = 4,2$ , estabilidade frente ao pH entre 4,0 e 6,0, mantendo cerca de 50% de sua atividade inicial em pH entre 3,5 e 7,0. Atua bem em temperaturas entre 30 a 40°C, tornando-se instável acima de 50°C.

A ação da GOD se dá efetivamente em duas fases. Na primeira, que consiste na redução do grupo prostético FAD para  $\text{FADH}_2$ , dois átomos de hidrogênio são transferidos da glicose para o grupo prostético FAD formando-se a  $\delta$ -gliconolactona ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$ ). Na segunda, que consiste na oxidação do  $\text{FADH}_2$ , a enzima transfere os dois átomos de hidrogênio diretamente para o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) originando a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A  $\delta$ -gliconolactona reage com a água, espontaneamente, ou por ação da enzima

gliconolactonase, formando o ácido glicônico ( $C_6H_{12}O_7$ ). O peróxido de hidrogênio, devido ao seu potencial redox elevado, interfere na ação da GOD em alguma extensão, já que o mecanismo da enzima envolve a alternância entre os estados oxidado e reduzido de seu grupo prostético (WHITAKER, et al., 2002). Segundo TOMOTANI et al. (2005), a água oxigenada em concentração acima de 1,22 mM causa inibição reversível não competitiva da GOD, provavelmente por interferir no grau de oxidação do átomo de ferro existente em cada uma de suas cadeias peptídicas. A atividade da GOD é favorecida, quando os átomos de ferro da molécula encontram-se em seu menor grau de oxidação ( $Fe^{+2}$ ). Por isso, torna-se importante o uso da catalase para hidrolisar o  $H_2O_2$  à água ( $H_2O$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). Ressalta-se que a GOD comercial já vem “contaminada” com catalase, porém em quantidade insuficiente para decompor a água oxigenada formada durante a oxidação da glicose, sendo necessária a sua adição no processo.

A glicose oxidase pode ser usada tanto na forma solúvel quanto na forma imobilizada devido à sua alta especificidade pela glicose. Apresenta importância comercial considerável na indústria de alimentos, usada em associação com a catalase para a desglicosação de ovos e como agente estabilizador das propriedades organolépticas de alimentos em geral (PERALTA, 2004). Entre outras aplicações, é usada em associação com a peroxidase em kits enzimáticos para dosagem de glicose em solução e na presença de ortodiansidina como indicador colorimétrico (WOODWARD, SPOKANE, 1996; VASILEVA, GODJEVARGOVA, 2004); em medicamentos anticancerígenos, para produzir o radical peróxido ( $HOO\bullet$ ) de forma a auxiliar na morte de células tumorais (RABA e MOTTOLA, 1995; SANTOS, 2001); em biossensores: na forma não associada (CRUEGER e CRUEGER, 1990) e na forma associada a outras enzimas, a complexos inorgânicos ou complexos orgânicos (VOJIVONIC, et al., 2005; LIU, et al., 2004; TRAU e RENNENBERG, 2003; FANG, et al., 2002); na remoção de oxigênio em refrigerantes e enlatados (ISIK et al., 2003); na estimativa da transferência do oxigênio em processo fermentativo semi-sólido (ZHAO et al., 2002), na panificação para produção de pães com melhor textura e maior volume da massa (Rasiah et al. 2005).

### 1.1.3. Catalase

A catalase (hidrogênio-peróxido oxidorreductase, EC 1.11.1.6) é extensamente distribuída na natureza. Encontrada em vários microrganismos aeróbicos e em todas as células vegetais e animais. A reação da catalase em células de mamíferos varia, mas sua maior atividade é no fígado e nos rins. Desta forma, a catalase utilizada comercialmente é retirada de fígado bovino. O pH ótimo é próximo de 7,0 (neutro) e a temperatura é de 37 °C.

Na indústria de laticínios, a atividade da catalase aponta contaminação do leite por neutrófilos e granulócitos, além de ser usada para remover peróxido de hidrogênio do leite e de outros alimentos. Em menor escala, é utilizada na indústria têxtil para certificar que o material é isento de radicais livres, na limpeza de lentes de contato e em produtos estéticos para diminuir a oxidação celular da epiderme (WHITAKER, et al., 2002).

Neste trabalho, a catalase foi utilizada como enzima auxiliar para decompor a água oxigenada, evitando seu efeito inibitório sobre a GOD. Além disso, o oxigênio gerado pode servir de substrato para a GOD, reduzindo ou até mesmo eliminando a necessidade de se insuflar ar no meio de reação. O fato de o oxigênio ser gerado no centro do meio reacional, faz com que o movimento de suas bolhas auxilie a manter o sistema sob agitação, levando à economia de energia (menor potência de agitação mecânica) e à redução da turbulência interna do sistema, que resulta na formação de pouca espuma e na redução da intensidade das forças de cisalhamento, geralmente associadas ao fluxo fluídico turbulento. Lembra-se, que a presença de proteínas no meio reacional – sobretudo devido às enzimas utilizadas – diminui a tensão superficial, gerando a espuma. É fato sobejamente conhecido que o excesso de espuma pode causar extravasamento do conteúdo do reator e, por conseguinte, perda significativa de material, além de causar a inativação de enzimas.

## 1.2. Produtos

O produto da reação da glicose oxidase sobre a glicose, o ácido glicônico, é obtido através de processo fermentativo ou através da catálise química homogênea e/ou heterogênea. O processo fermentativo tradicional é realizado usando o *Aspergillus niger* (mais comum em escala industrial), *Gluconobacter suboxydans* ou *Acetobacter methanolicus* (NEVES, 2006). ERZINGER e VITOLO (2006) demonstraram a

capacidade biocatalítica da bactéria *Zymomonas mobilis* – através da ação da glicose-frutose-oxidoredutase, enzima localizada na parede celular do microrganismo – em transformar a glicose em ácido glicônico.

Os processos químicos de catálise homogênea e heterogênea possuem desvantagens em relação à produção biotecnológica, pois o rendimento é baixo, formam-se subprodutos indesejáveis, além de poluir o meio ambiente com agentes oxidantes e devido ao alto grau de pureza da glicose para ser convertida (ERZINGER, 1996). BIELLA et al. (2002) e WENKIN et al. (2002) postularam uma via química de obtenção do ácido glicônico através da imobilização de metais em carvão ativo. Porém, no final da reação não obtiveram o ácido glicônico livre – tal como ocorre na via enzimática - mas na forma de sal, que tem como desvantagem a necessidade de se incluir uma operação unitária adicional, qual seja a neutralização do produto final.

O ácido glicônico tem alta capacidade quelante de íons metálicos. Este ácido e seus sais de cálcio, potássio, ferro e zinco são muito utilizados na indústria alimentícia, na produção de: acidulantes para sorvetes, balas, refrescos, xaropes; aditivos para carnes; removedores de metais e calcário na fabricação de bebidas. Na indústria farmacêutica, os sais de cálcio e ferro são usados na terapia de reposição destes íons, além do sal de magnésio servir como padrão na dosagem deste íon no soro. Na indústria têxtil são usados como branqueadores e, na indústria química, tanto o ácido como o gliconato de sódio, são usados para limpar superfícies metálicas, removendo óxidos, hidróxidos e carbonatos de cátions polivalentes (NEVES, 2006).

A frutose é uma ceto-hexose que ocorre no mel e em frutos, por isso sua denominação, e unida à glicose dá origem à sacarose. É sempre encontrada na forma D-frutose e é levógira. Até a década de setenta, era produzida a partir do açúcar invertido e separada na forma de frutonato de cálcio. Depois deste período, passou a ser produzida em escala industrial a partir do açúcar invertido, passando a matéria prima por colunas cromatográficas empacotadas com resinas de troca iônica (CRUEGER e CRUEGER, 1984). Também pode ser produzida pela isomerização da glicose (proveniente da hidrólise do amido), usando a enzima glicoseisomerase. O produto final é um xarope constituído por quantidades quase iguais de frutose e glicose, e que se submetido a um procedimento cromatográfico, resulta um xarope contendo um percentual de frutose entre 55% e 80% (BENTLEY e WILLIAMS, 1996).

Um xarope que possui até 90% de frutose é possível de ser obtido. Uma combinação para produzir frutose oriunda de hidrolisado de sacarose (açúcar invertido)

foi proposta por AZEVEDO, RODRIGUES (2001). Essa proposta consiste primordialmente na execução simultânea da reação e da separação dos produtos, utilizando-se uma série de doze colunas interligadas e dispostas em um circuito fechado, onde cada uma delas é carregada com uma resina que adsorve preferencialmente uma das hexoses. As soluções de invertase e de sacarose seriam introduzidas no sistema em contracorrente e o efluente enriquecido em frutose recolhido em pontos estrategicamente dispostos ao longo do circuito.

Os xaropes de frutose, mistura de frutose e glicose, são muito utilizados na indústria alimentícia por serem parecidos com o mel e produzidos a partir de hidrolisados de amido do milho. A sacarose é geralmente substituída por este tipo de xarope por ter menor poder adoçante e pela frutose apresentar melhores propriedades funcionais, o que confere aspecto e estabilidade mais adequados ao produto final (FERNANDES e SOARES, 2006; NEVES, 2006). Neste projeto, a frutose resultará como produto da hidrólise da sacarose, possibilitando a obtenção de um xarope com alto teor em frutose, após a separação do ácido glicônico formado pela oxidação da glicose catalisada pela GOD (NEVES, 2006).

### **1.3. Bioconversão**

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

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

O biorreator descontínuo é o mais comum para esta aplicação onde, na maioria das vezes, as enzimas são utilizadas em soluções solúveis, ou “livres”. Porém, apesar da sua praticidade, este tipo de processo apresenta limitações de uso como baixa produtividade, elevado custo final de processo, variações na composição final dos lotes (efeito “batch to batch”), a necessidade de inativar a enzima ao final da reação, a necessidade de uma nova carga de enzima a cada processo iniciado e o longo período necessário para se completar a reação (devido principalmente à inibição por substrato e por produto). Este tipo de biorreator acaba sendo o preferido quando o biocatalisador é barato, não requer cofator ou tem meia-vida curta (SCHIMIDELL e FACCIOTTI,

2001). No caso de biocatalisador solúvel é preciso adaptar na linha de saída uma unidade de ultrafiltração, a qual permitiria recuperá-lo e reciclá-lo no processo (CURCIO et al., 2002). Por outro lado, se o biocatalisador é suscetível à inibição por substrato, torna-se recomendável o emprego do processo descontínuo-alimentado, porque ao se adicionar o substrato paulatinamente, tem-se a possibilidade de manter sua concentração abaixo do limite inibitório (SENGUPTA e MODAK, 2001). Além disso, este processo acopla o enchimento do reator com a ocorrência da reação, que se bem acoplados, levam à coincidência do enchimento total do reator com o final da reação. Este procedimento elimina o “tempo morto” do processo, correspondente ao período durante o qual o reator está sendo carregado com o meio reacional. O tempo morto poderá ser significativo no caso em que o biorreator for de grande capacidade.

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

Apesar das vantagens, a imobilização de enzimas tem algumas desvantagens relevantes como a perda de atividade devido ao tipo de imobilização empregado, com prejuízos entre 10 e 90% da atividade da enzima livre. A imobilização também pode afetar a especificidade, devido a mudanças na orientação enzima-substrato, gerando problemas de restrições difusionais ou efeito estérico (CHERYAN, 1998).

O biorreator contínuo surgiu como um prolongamento do uso da técnica de imobilização de biocatalisadores, introduzida efetivamente no início da década de setenta. Com o biocatalisador imobilizado, ligado por método físico ou químico em matrizes inertes e insolúveis, foi possível operar biorreatores contínuos com diferentes configurações, a saber, colunas com o material imobilizado empacotado (reator de leito fixo) ou mantido suspenso em meio líquido através da alimentação da solução substrato sob pressão gerada por bomba peristáltica ou pistonada (reator de leito fluidizado).

Uma variante para manter o biocatalisador imobilizado em suspensão é o biorreator contínuo de tanque agitado (CSTR), cuja configuração básica seria a de um reator descontínuo, ao qual se adaptou um sistema contínuo de introdução e de retirada de material (PÉREZ-TERRAZAS, et al., 2008). Os biorreatores dos tipos leito



fluidizado e contínuo de tanque agitado não possuem problemas relacionados ao estabelecimento de gradientes radiais ou axiais de pH, temperatura e concentrações de substrato e produto (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Em geral, o biorreator contínuo e com agitação (CSTR) acaba sendo a primeira escolha para o desenvolvimento de um novo processo, porque possui grande flexibilidade operacional e de utilização.

No caso da utilização da GOD (glicose oxidase) para a conversão da glicose em ácido glicônico, dispõe-se de reatores de dimensões reduzidas para fins apenas analíticos (dosagem de glicose “on line”; acoplados a aparelhos analíticos ou diretamente ao reator principal) ou de maior porte. Dentre estes últimos, percebe-se na literatura que os reatores usados são do tipo leito fixo em sua maioria, porém, quando claramente do tipo reator com membrana, a GOD acha-se unida à membrana (BRAHIM, et al., 2002; GIORNO e DRIOLI, 2000). Reatores do tipo leito fluidizado são também usados na conversão glicose/ácido glicônico, estando a GOD aprisionada dentro de polímeros (NAKAO et al., 1997) ou dentro de lipossomas ligados covalentemente à quitosana (YOSHIMOTO, et al., 2003).

Recentemente NEVES e VITOLO (2007) descreveram a oxidação da glicose em ácido glicônico pela GOD solubilizada no meio reacional, usando um reator com membrana unimodular, ao qual foi acoplada em sua base uma membrana de ultrafiltração de caráter hidrofílico e composta por celulose regenerada. Esta mesma reação foi executada usando-se a GOD imobilizada em resina trocadora de íons, a qual foi mantida em suspensão no meio reacional. Neste caso, o reator com membrana unimodular foi acoplado a uma membrana de microfiltração, permitindo realizar a reação de modo contínuo e em regime permanente com tempo de residência menor (TOMOTANI e VITOLO, 2007a).

#### **1.4. Sistema multienzimático**

A busca por novos sistemas de biotransformação viabiliza métodos nos quais, em apenas um procedimento, podem ocorrer uma seqüência de conversões enzimáticas interligadas, formadas pela ação em cascata de diferentes enzimas. Esse tipo de sistema recebe o nome de multienzimático, e propicia desta forma uma simplificação do procedimento em questão, evitando a realização de muitas etapas separadas para uma determinada síntese orgânica. (PANKE, 2005).

SHEU e colaboradores (2001) desenvolveram um sistema utilizando mais de uma enzima no mesmo meio reacional ( $\beta$ -fructofuranidase, glicose oxidase e catalase) e em presença de sacarose, produzindo desta forma e com alto rendimento, frutooligosacarídeos (FOS) e ácido glicônico (esse precipitado em sal pela adição de  $\text{CaCO}_3$  na reação). Esse resultado é de grande importância para a indústria alimentícia.

Outro exemplo de sistemas que utilizam mais de uma enzima ao mesmo tempo são os denominados biossensores. Reações enzimáticas podem ser utilizadas para determinação de sacarose através de um biossensor constituído de enzimas imobilizadas (glicose oxidase, invertase e mutarotase- conversão de  $\alpha$ -D-glicose para  $\beta$ -D-glicose), sendo que este sensor é acoplado a um eletrodo de oxigênio. Pela análise do consumo de oxigênio pode-se determinar a concentração de glicose no meio. (KENNEDY et al, 2007).

Dado a abundância e o baixo custo da sacarose no Brasil, a procura por derivados de maior valor agregado - frutose e ácido glicônico, neste trabalho – pode contribuir para aumentar a lucratividade de empresas do ramo sucro-alcooleiro. O uso do processo multienzimático para esse fim, pode se constituir em uma promissora via alternativa. Inclusive, o processo seria ambientalmente correto, uma vez que seu potencial poluente é praticamente nulo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Viabilizar em reatores descontínuo-alimentado e contínuo com membrana a conversão direta da sacarose em frutose e ácido glicônico pela ação conjunta das enzimas invertase, glicose oxidase e catalase.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- a) Caracterização cinética da invertase;
- b) Caracterização cinética da glicose oxidase;
- c) Analisar qual a melhor lei de alimentação para hidrólise da sacarose em frutose e glicose, através de processo descontínuo-alimentado;
- d) Analisar qual a melhor lei de alimentação para conversão de glicose em ácido glicônico, através de processo descontínuo-alimentado;
- e) Otimizar a quantidade de glicose oxidase e catalase;

- f) Determinar o menor tempo para a conversão sacarose/(frutose + ácido glicônico), visando fixar o tempo de residência inicial para operar o BM-unimodular;
- g) Avaliar o emprego do reator contínuo com membrana (BM-unimodular) na conversão multienzimática da sacarose.

### **2.3. Atividade experimental.**

- Determinação do erro experimental da técnica de dosagem de glicose (Somogyi-Nelson);
- Determinação do erro experimental da técnica de dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- Determinação do erro experimental da técnica de dosagem proteína (albumina);
- Quantificação de proteína na solução original de invertase;
- Quantificação de proteína na glicose oxidase;
- Caracterização da invertase (determinação da atividade enzimática frente ao pH e temperatura, determinação da Entalpia ( $\Delta H$ ) e da Energia de Ativação; testes para definição de Km e V<sub>máx</sub>, em função da concentração de sacarose; efeito do pH e temperatura na estabilidade da Invertase);
- Testes de bioconversão em reator descontínuo-alimentado, utilizando a invertase para a conversão total da sacarose em açúcar invertido (glicose e frutose), com diferentes tipos de alimentação do reator;
- Caracterização da Glicose Oxidase (determinação da atividade enzimática frente ao pH e temperatura, determinação da Entalpia ( $\Delta H$ ) e da Energia de Ativação; testes para definição de Km e V<sub>máx</sub>, em função da concentração de glicose; testes para conversão total de glicose em ácido glicônico; efeito do pH e temperatura na estabilidade da GOD);
- Testes de bioconversão em reator descontínuo-alimentado, utilizando as enzimas Glicose Oxidase e Catalase para conversão total de glicose em ácido glicônico, com diferentes tipos de alimentação do reator.
- Teste de bioconversão em reator descontínuo-alimentado, utilizando as enzimas Invertase, Glicose Oxidase e Catalase para conversão total de sacarose em frutose e ácido glicônico.
- Teste de bioconversão em reator contínuo com membrana, utilizando as enzimas Invertase, Glicose Oxidase e Catalase para conversão total de sacarose em frutose e ácido glicônico.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Enzimas**

- Invertase (EC.3.2.1.26) de *Saccharomyces cerevisiae* (Invertin® da MERCK®, lote: K31583338);
- Glicose Oxidase (EC.1.1.3.4) de *Aspergillus niger* (SIGMA®); [ 1g = 5600U; 1U = 1µmol de β-D-glicose em D-gluconolactona e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min].
- Catalase (EC 1.11.1.6) de fígado bovino (SIGMA®); [1mg = 2950U; 1U = 1µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min].

##### **3.1.2. Substratos**

- Sacarose MERCK®, lote: K29959887 218;
- D-glucose anidra P.A., marca SYNTH®, lote n° 10941;
- Água Oxigenada (grau farmacêutico);
- Albumina bovina (SIGMA®).

##### **3.1.3. Reagentes e Vidraria**

Todos os reagentes empregados nas análises desse projeto eram de grau pA. Foi utilizada vidraria comum de laboratório.

##### **3.1.4. Biorreator Contínuo e Membrana**

Os testes contínuos foram realizados em Reator CSTR (BM-unimodular, célula de ultrafiltração da Millipore®) e com membrana de celulose regenerada de corte molecular 100kDa (Millipore®).

#### **3.2. Equipamentos**

- Agitador Fisaton (Modelo 713D);
- Balança Analítica Shimadzu (Modelo AUW220D);
- Banho Termoestabilizado Fanem (Modelo 145);
- Espectrofotômetro Beckman-Coulter (Modelo DU 640);
- Freezer Eletrolux (Modelo FFE 24);
- Oxímetro Digimed (Modelo DM-4)
- pHmetro Tecnal (Modelo Tech 3MP);
- Refrigerador Brastemp (Modelo B/X/PRF36).

### **3.3. Métodos**

Os métodos analíticos utilizados neste trabalho, a saber: padronização, preparação, estabelecimento da curva padrão e erro experimental referente aos reagentes de Somogyi-Nelson; determinação da dosagem e da curva padrão de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); determinação da proteína solúvel (curva-padrão e quantificação de proteína nas soluções originais das enzimas invertase e glicose oxidase); estão descritos no Anexo I.

#### **3.3.1. Caracterização da Invertase.**

Colocou-se em um béquer, com capacidade de 250mL, 108mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH 5,0) em banho-maria a 37°C. Após 10 minutos, dissolveu-se sob agitação ( $\approx$ 100rpm) 12g (292 mM) de sacarose. Após 5 minutos exatos, adicionou-se 12mL de solução aquosa de invertase (diluída 5000 vezes). Disparou-se 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-se a enzima, tomou-se uma alíquota de 0,5mL da solução de sacarose para medir o ART inicial (tempo zero). Um tubo branco foi feito com 1 mL de água destilada.

As alíquotas foram colocadas em tubos de Folin-Wu contendo 0,5mL de água e 1 mL de mistura reativa de Somogyi (de acordo com o item 4.3.1.3), sendo, em seguida, imersos em banho-fervente por exatos 10 minutos. Resfriaram-se, a seguir, em banho de gelo. Adicionaram-se 2,0mL do reagente Somogyi III aos tubos, que foram agitados para expelir os gases. Completou-se com água destilada até a marca de 25mL. Homogeneizou-se bem e após 20 minutos em repouso, as amostras foram lidas a 540nm. O ART formado foi calculado através da curva padrão descrita no Anexo I (item 8.1.4). A unidade de atividade da invertase foi definida como sendo a quantidade em miligramas de ART formados por minuto por mL de meio reacional, nas condições de ensaio.

##### **3.3.1.1. Efeito do pH na atividade da invertase.**

De acordo com o método descrito em 3.3.1., realizaram-se testes em pH: 3,5; 4,0; 4,6; 5,0; 5,5 e 6,0.

### **3.3.1.2. Efeito da temperatura na atividade da invertase.**

De acordo com o método descrito em 3.3.1., realizaram-se testes variando a temperatura, sendo os testes realizados em pH 5,0. As temperaturas utilizadas foram: 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C.

### **3.3.1.3. Efeito da concentração de sacarose na atividade da Invertase (determinação das constantes cinéticas: $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ ).**

Para o cálculo das constantes cinéticas, variou-se a concentração de sacarose no intervalo de 4,0-50,0 mM, sendo as condições de ensaio idênticas às descritas em 3.3.1.

### **3.3.1.4. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da Invertase.**

Para avaliar a estabilidade da invertase em pH 4,6 (pH ótimo) e pH 5,0, ambos à 37°C, deixaram-se soluções da enzima nestas condições por um período máximo de 30h. Preparou-se 7 recipientes contendo 12 mL de solução de invertase diluída 5000 vezes, em solução-tampão acetato 0,01 M e pH 4,6. Após os tempos: 0 (zero); 0,5h; 1h; 2h; 10h; 20h e 30h, dosou-se a atividade enzimática residual, nas condições do ensaio-padrão (item 3.3.1.). As soluções enzimáticas ficaram em banho-maria aquecido a 37° C durante o tempo necessário para o início de cada teste. Realizou-se o mesmo procedimento usando-se solução-tampão acetato 0,01 M e pH 5,0.

### **3.3.2. Caracterização da Glicose Oxidase (GOD).**

Colocou-se em um béquer, com capacidade de 250mL, 125mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH 5,1) em banho-maria a 37°C. Do início ao fim dos testes foi borbulhado ar, já que a glicose oxidase necessita de  $O_2$  para realizar sua catálise. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para ser usada como o branco. Após 10 minutos, dissolveu-se sob agitação (100rpm) 0,15g de glicose P.A. Imediatamente antes de adicionar-se a enzima, tomou-se uma alíquota de 1mL da solução de glicose para medir a  $H_2O_2$  inicial (tempo zero). Após 5 minutos exatos, adicionou-se 25mL de solução aquosa de glicose oxidase (Sigma®, Lote 105H3920: 0,0306g ou 180 U). Disparou-se o cronômetro, passando-se a retirar alíquotas de 1mL do meio reacional a intervalos de 10 minutos até completar o tempo total de reação de 60 minutos (1h). As alíquotas, assim que retiradas, foram colocadas em banho-fervente para bloquear a reação. Ao final do teste, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com  $\lambda = 240nm$  para determinar a  $H_2O_2$  formada. A unidade de atividade da glicose oxidase ( $V_{GOD}$ ) foi definida como

sendo a quantidade em miligramas de  $H_2O_2$  formada por minuto por mL de meio reacional nas condições de ensaio (Anexo 8.2.).

O  $O_2$  dissolvido (mantido em aproximadamente 4ppm) foi lido com oxímetro em cada um dos tempos de retirada de alíquota.

#### **3.3.2.1. Determinação da atividade enzimática da GOD.**

De acordo com método descrito em 3.3.2., o teste foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental.

#### **3.3.2.2. Efeito do pH na atividade da GOD.**

De acordo com método descrito em 3.3.2., realizaram-se testes em pH: 4,0; 4,5; 5,0; 5,1; 5,5; 6,0 e 6,5.

#### **3.3.2.3. Efeito da temperatura na atividade da GOD.**

De acordo com o método descrito em 3.3.2., realizaram-se testes variando a temperatura, mantendo-se o pH 5,1. As temperaturas utilizadas foram: 30°C, 35°C, 37°C, 40°C e 45°C.

#### **3.3.2.4. Efeito da concentração de glicose na atividade da GOD (determinação das constantes cinéticas: $K_m$ e $V_{máx}$ ).**

Para o cálculo das constantes cinéticas, variou-se a concentração de glicose no intervalo de 2-25mM, sendo as condições de ensaio idênticas às descritas em 3.3.2.

#### **3.3.2.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da GOD.**

Preparou-se 6 balões de 25ml de solução de GOD (180 U), em solução-tampão acetato 0,01M e pH 5,0. Após os tempos: 0 (zero); 0,5h; 1h; 2h; 10h; 20h e 30h, foram realizados testes com esta solução enzimática, na qual dosou-se a atividade enzimática residual, nas condições do ensaio-padrão (item 3.3.2.). As soluções enzimáticas ficaram em banho-maria aquecido a 37°C durante o tempo necessário para o início de cada teste.

### **3.3.3. Bioconversão da sacarose pela invertase, em reator descontínuo-alimentado, utilizando diferentes leis de alimentação do reator.**

#### **3.3.3.1. Estabelecimento da quantidade de invertase para a hidrólise de uma solução de 64 g/L de sacarose.**

Foram realizados testes em batelada para estabelecer a quantidade de invertase necessária, para converter totalmente uma solução de 64 g/L de sacarose, no tempo pré-determinado de 1h. Como o volume total de substrato a ser adicionado nos testes descontínuo-alimentados seria de 300 mL, então esse foi o volume usado para o estabelecimento da quantidade de invertase no teste de batelada, o que equivalia a 19,2g de sacarose. Fixou-se 64 g/L pois é a metade da concentração de sacarose (128 g/L), além da qual a atividade invertásica diminui (VITOLLO, 2004).

Os testes foram realizados segundo metodologia descrita a seguir:

Em um béquer de 500 mL colocou-se 250 mL de tampão acetato (pH = 5,0) e deixou-se por 10 minutos sob agitação (100rpm) à 37°C. Dissolveu-se 19,2 g de sacarose sob agitação. Após a dissolução, foram adicionados 50 mL de solução contendo a invertase (diluída com tampão pH = 5,0). Deixou-se reagindo por 60 minutos, tomando-se alíquotas do meio reacional a cada 10 minutos. A quantidade de açúcares redutores totais foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson.

#### **3.3.3.2. Testes de conversão da sacarose por processo descontínuo-alimentado, usando diferentes leis de alimentação do reator.**

Após o estabelecimento da diluição adequada para a conversão da sacarose, realizaram-se testes descontínuo-alimentados, utilizando-se diferentes leis de alimentação do reator. O processo era realizado da maneira descrita a seguir:

Em um béquer de 500mL de capacidade colocou-se 50mL de tampão acetato 0,05M (pH 5,0) e 50mL de solução enzimática (pH 5,0; 776,6 U), totalizando os 100mL de partida. O enchimento do béquer foi feito em 1h até o volume final de 400mL, pela adição de 300mL da solução de sacarose (64g/L), de acordo com uma lei de adição [constante, linear crescente, linear decrescente, exponencial crescente ou exponencial decrescente] (Tabela 1). A reação foi feita sob agitação constante (100rpm) a 37°C. A cada 6 min foram retiradas amostras para fins analíticos (método de Somogyi-Nelson).



**Tabela 1.** Leis de adição das soluções de sacarose (64g/L) nos testes descontínuo-alimentados.

| <i>Adição</i>           | <i>Lei</i>               | <i>Forna integrada</i>                     |
|-------------------------|--------------------------|--|
| Constante               | $\phi = (V_f - V_o)/t$   | $\phi = (V_f - V_o)/t_f$                   |
| Linear crescente        | $\phi = \phi_o + k.t$    | $(V - V_o) = \phi_o.t + k.t^2/2$           |
| Linear decrescente      | $\phi = \phi_o - k.t$    | $(V - V_o) = \phi_o.t - k.t^2/2$           |
| Exponencial crescente   | $\phi = \phi_o.e^{k't}$  | $(V - V_o) = \phi_o/k' . (e^{k't} - 1)$    |
| Exponencial decrescente | $\phi = \phi_o.e^{-k't}$ | $(V - V_o) = - \phi_o/k' . (e^{-k't} - 1)$ |

Os volumes realmente adicionados em cada teste descontínuo-alimentado, bem como a dedução das correspondentes equações de cálculo são apresentados no ANEXO 10.

### **3.3.4. Bioconversão da glicose pela glicose oxidase, em reator descontínuo-alimentado, utilizando diferentes leis de alimentação do reator.**

Foram realizados testes em reator descontínuo-alimentado para conversão de uma solução de glicose de 32g/L em ácido glicônico, usando-se as enzimas glicose oxidase e catalase (usada para degradar a água oxigenada oriunda da conversão de glicose em ácido glicônico). Os experimentos foram realizados segundo metodologia utilizada para os testes com invertase (3.3.3.2.), sendo que a catalase era diluída juntamente com o substrato (glicose) que seria adicionado ao reator.

Adotou-se a alimentação linear decrescente (que obteve melhor resultado para a invertase) como parâmetro para determinar as quantidades máximas de GOD e catalase, que poderiam ser utilizadas para uma alta conversão, sem que ocorressem problemas no funcionamento do reator (espumação abundante devido à ação da catalase e a presença das enzimas). Após testes exploratórios, definiram-se as quantidades limite de glicose oxidase (7000 U) e catalase (236.000U) com as quais a espumação no reator não causasse muita interferência na reação. Além disso, percebeu-se que o tempo de 1h não era suficiente para uma conversão significativa; desta forma o tempo total de reação foi aumentado para 4h, sendo que as adições de substrato e retiradas de amostras passaram a ser feitas a cada 24min. Ao final do teste, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm para determinar a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual e em seguida, as alíquotas foram submetidas ao teste de Somogyi-Nelson e lidas a 540nm para determinar o ART residual.

Desta forma os testes descontínuo-alimentados para conversão de glicose em ácido glicônico foram realizados segundo metodologia descrita no próximo tópico.

### **3.3.4.1. Testes de conversão da glicose por processo descontínuo-alimentado, usando diferentes leis de alimentação do reator.**

Em um béquer de 500mL de capacidade colocou-se 50mL de tampão acetato 0,05M (pH 5,1) e 50mL de solução enzimática de GOD ( 7000 U), totalizando os 100mL de partida. O enchimento do béquer foi feito em 4h até o volume final de 400mL, pela adição de 300mL da solução de glicose (32g/L) + catalase , de acordo com uma lei de adição [constante, linear crescente, linear decrescente, exponencial crescente ou exponencial decrescente]. As correspondentes equações de adição são encontradas na Tabela 1 e ANEXO 10. A reação foi feita sob agitação constante (100rpm) a 37°C. A cada 24min foram retiradas amostras para fins analíticos.

Para a mensuração da quantidade de glicose residual (Somogy-Nelson) e de água oxigenada, foi preciso realizar cada teste duas vezes, ou seja, uma vez com substrato e outra sem substrato, para que fosse descontado a absorbância (a 540 nm e a 240 nm) resultante apenas da presença das enzimas. Além disso, a interferência da água oxigenada também foi levada em conta; desta forma, para os testes feitos com substrato, as amostras obtidas de cada tempo (após serem medidas as quantidades de água oxigenada) passavam por tratamento com catalase, durante meia hora e a 37°C, antes de se executar o teste de Somogyi-Nelson. O tratamento era realizado da seguinte forma:

- Preparava-se uma solução de catalase dissolvendo 16 mg da enzima em 60 mL de água destilada.
- Para cada amostra procedia-se da seguinte forma: tomava-se 0,5 ml de amostra e juntava-se com 4,5 mL de sol. de catalase (diluição de 10x) e deixava-se por 30 min. a 37°C;
- Depois tomava-se 0,1 mL do diluído anterior e colocava-se em tubo de follin-wu contendo 0,9 mL de água destilada (diluição de 100x) + 1 mL de mistura reativa.
- O branco era feito tomando-se 0,5 mL de água destilada + 4,5mL de sol. de catalase (diluição de 10x); deixando-se por 30 min. a 37°C; depois tomava-se 0,1 mL do diluído anterior e colocava-se em tubo de follin-wu

contendo 0,9 mL de água destilada (diluição de 100x) + 1 mL de mistura reativa.

Desta forma, através da degradação da água oxigenada, podia-se minimizar seu efeito na mensuração da glicose residual, e, por conseguinte, na mensuração da real taxa de conversão.

### **3.3.5. Bioconversão da sacarose por processo descontínuo-alimentado, com alimentação linear decrescente, usando: invertase, glicose oxidase e catalase.**

Como os resultados dos processos descontínuo-alimentados com ambos os substratos (sacarose e glicose), demonstraram que a melhor lei de adição foi a linear decrescente, então, essa foi a escolhida para fazer o teste multienzimático.

Em um béquer de 500mL de capacidade, colocou-se 50mL de solução de invertase (0,44mL de invertase original + 49,56mL de tampão pH 5,1 = 776,6U) mais 50mL de solução de glicose oxidase (7000 U) em tampão pH 5,1, totalizando os 100mL de partida. O enchimento do béquer foi feito em 4h até o volume final de 400mL pela adição de 300mL da solução (pH 5,1) de sacarose (64g/L) + catalase (80mg = 236.000U), de acordo com a lei de adição linear decrescente. A reação ocorreu sob agitação constante (100rpm) a 37°C. A cada 24min foram retiradas amostras para fins analíticos.

### **3.3.6. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator contínuo com membrana.**

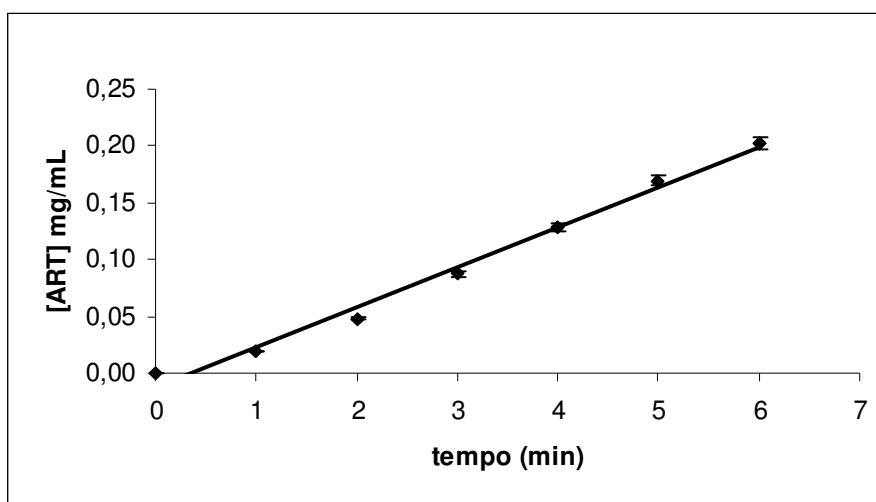
Os testes contínuos foram realizados em Reator CSTR (BM-unimodular, célula de ultrafiltração da Millipore®) no qual uma membrana possuindo um corte molecular de 100 kDa foi fixada na base do reator. O sistema contou com entrada de ar e o volume do meio reacional foi fixado em 300 mL. A pressão interna no reator foi mantida em 3 bar durante todos os experimentos. As enzimas foram adicionadas simultaneamente e o volume de saída foi recolhido de hora em hora (100mL/h) em frascos de Erlenmeyer. As quantidades de invertase, GOD e catalase foram variadas de acordo com as soluções de sacarose (pH=5,1) que eram utilizadas (64g/L, 100g/L e 150g/L). A temperatura foi fixada em 37°C e o tempo de residência para todos os testes foi de 3h. Foram analisadas a quantidade de água oxigenada residual (em 240nm) e a concentração de ART (540nm) das amostras retiradas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização da invertase.

#### 4.1.1. Determinação da atividade enzimática da Invertase.

O teste foi realizado em quintuplicata com o intuito de se avaliar o erro experimental. A atividade enzimática é definida pela inclinação da reta ( $a$ ) em  $y = ax+b$ , de forma que a atividade encontrada ( $v$ ) foi de 0,0353mg de ART formado por minuto e por mL de meio reacional (Figura 1). Considerando a diluição final da enzima (50.000 vezes), a atividade enzimática no extrato original foi de 1765 mg de ART formados/min.mL ( 1765 U/mL extrato; sendo  $U_{invertase} = \text{mg ART formados/min}$ ). Levando-se em conta a quantidade de proteína no extrato original da enzima (que é de 2,741 mg proteína / ml extrato) pôde-se calcular a atividade específica da invertase, que foi de 643,93 U/mg proteína.

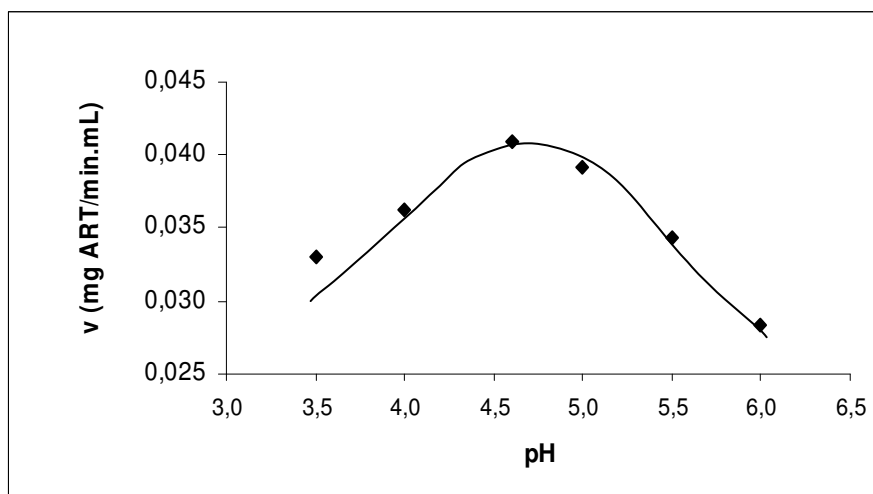


**Figura 1.** Variação da concentração de ART em função do tempo. A equação de regressão linear é:  $y = 0,0353x - 0,0123$  ( $r = 0,995$ ), na qual  $y$  é a concentração de ART em mg/mL e o  $x$ , tempo de reação (min).

O desvio-padrão encontrado foi de 0,000896 mg/min.mL de ART e o coeficiente de variação, 2,54%.

#### 4.1.2. Efeito do pH na atividade da invertase.

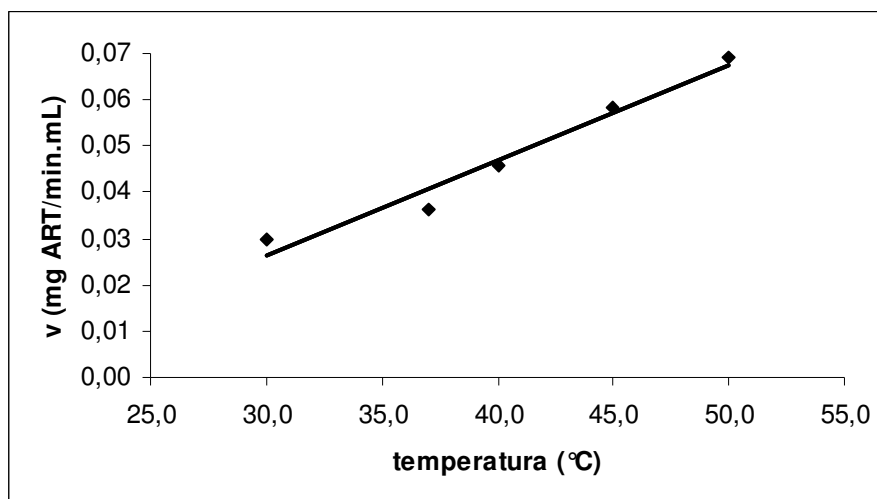
Através da figura 2 pode-se perceber que a maior atividade (0,041 mg ART/min.mL) ocorreu em pH 4,6, corroborando o estabelecido pela literatura para a invertase (MANSOUR e DAWOUD, 2003, ARRUDA e VITOLO, 1999).



**Figura 2.** Efeito do pH sobre a atividade da invertase.

#### 4.1.3. Efeito da temperatura na atividade da invertase.

Na Figura 3, apresenta-se a variação da atividade invertásica frente à temperatura no pH 5,0. Pode-se observar que a atividade invertásica variou linearmente com o aumento da temperatura. Este comportamento se deve ao fato das enzimas industriais (como a usada, que é da MERCK®) terem em sua composição, substâncias coadjuvantes, as quais conferem maior termorresistência à molécula enzimática (TOMOTANI, 2002).



**Figura 3.** Efeito da temperatura sobre a atividade da Invertase, sendo o pH do meio reacional igual a 5,0. A equação de regressão linear é:  $v = 0,0021T - 0,0358$  ( $r=0,990$ ).

**Tabela 2.** Atividade enzimática da Invertase em função da variação de temperatura (pH= 5,0).

| Temp. (°C) | v (mg ART/min.mL) |
|------------|-------------------|
| 30,0       | 0,0296            |
| 37,0       | 0,0362            |
| 40,0       | 0,0456            |
| 45,0       | 0,0583            |
| 50,0       | 0,0691            |

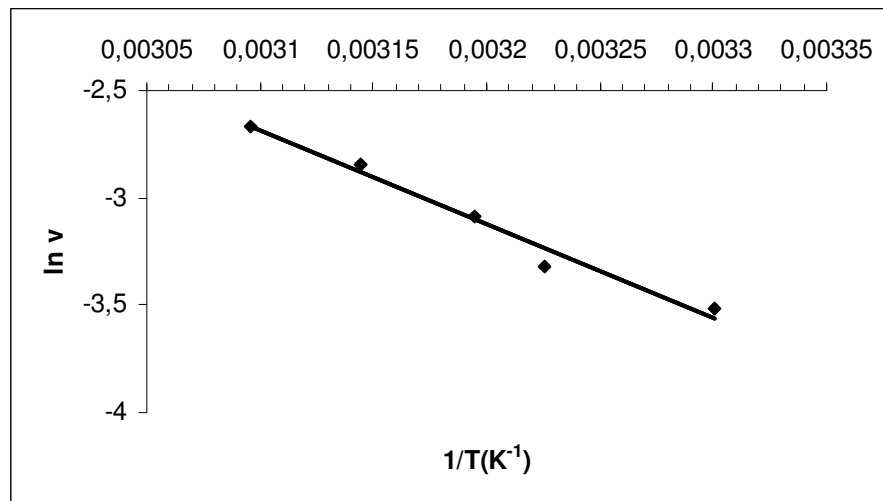
Para calcular a energia de ativação (Ea) e a Entalpia de reação ( $\Delta H$ ), utilizou-se o método convencional de Arrhenius, através das equações:

$$\ln v = \frac{Ea}{2,303 \times R} \times \frac{1}{T} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\Delta H = Ea - R \times T \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde, R = constante universal dos gases (8,3144 J/mol.K) e T = temperatura absoluta (K).

Os dados utilizados são mostrados na Tabela 3 e a correspondente reta de regressão, apresentada na Figura 4.



**Figura 4.** Logaritmo da atividade da invertase (v) em função do inverso da temperatura para o cálculo da Energia de Ativação (Ea), sendo a equação de regressão linear:

$$\ln v = -4360,1(1/T) + 10,831 \quad (r = 0,990).$$

**Tabela 3.** Dados utilizados para a determinação da Energia de Ativação ( $E_a$ ) da reação catalisada pela invertase.

| $T (^{\circ}C)$ | $T(K)$ | $v (mgART/min.mL)$ | $1/T (K^{-1}) \times 10^3$ | $\ln v$ |
|-----------------|--------|--------------------|----------------------------|---------|
| 30              | 303    | 0,0296             | 3,30                       | -3,52   |
| 37              | 310    | 0,0362             | 3,23                       | -3,32   |
| 40              | 313    | 0,0456             | 3,19                       | -3,09   |
| 45              | 318    | 0,0583             | 3,14                       | -2,84   |
| 50              | 323    | 0,0691             | 3,09                       | -2,67   |

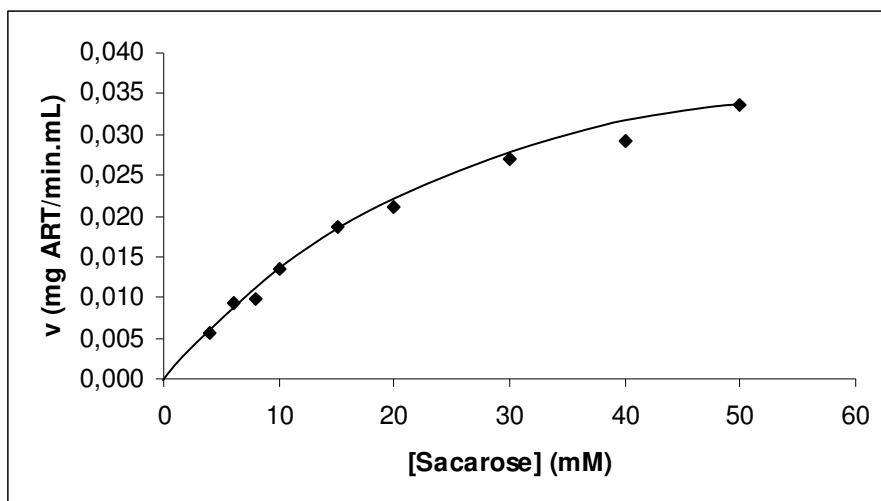
Os valores calculados para Entalpia e a Energia de Ativação foram:  $\Delta H = 33,7$  kJ/mol e  $E_a = 36,3$  kJ/mol.

#### 4.1.4. Efeito da concentração de sacarose na atividade da Invertase (determinação das constantes cinéticas: $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ ).

As atividades invertásicas, mediante cada concentração inicial de sacarose, são mostradas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Dados utilizados para o cálculo das constantes cinéticas da invertase, aplicando o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk.

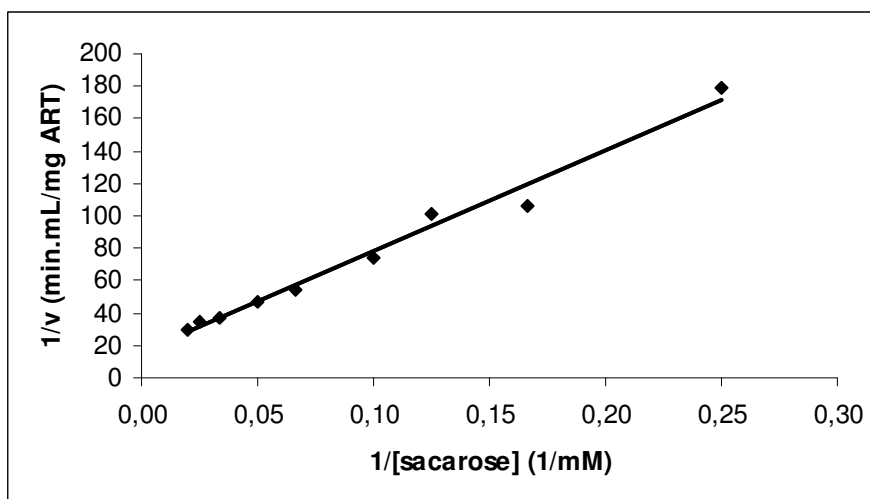
| Sacarose (mM) | $v (mgART/min.mL)$ | $1/[substrato]$ | $1/v$  |
|---------------|--------------------|-----------------|--------|
| 4,0           | 0,0056             | 0,250           | 178,60 |
| 6,0           | 0,0094             | 0,167           | 106,40 |
| 8,0           | 0,0099             | 0,125           | 101,00 |
| 10,0          | 0,0136             | 0,100           | 73,53  |
| 15,0          | 0,0186             | 0,0667          | 53,76  |
| 20,0          | 0,0211             | 0,050           | 47,39  |
| 30,0          | 0,0269             | 0,033           | 37,17  |
| 40,0          | 0,0292             | 0,025           | 34,25  |
| 50,0          | 0,0335             | 0,020           | 29,85  |



**Figura 5.** Atividade da invertase em função da concentração de sacarose.

Na Figura 5 apresenta-se a variação da atividade invertásica com relação a concentração de sacarose. O perfil hiperbólico da curva obtida confirma que a cinética da invertase, segue o modelo de Briggs-Haldane.

Elaborando-se um gráfico do tipo  $1/v = f(1/S)$ , obtém-se uma reta, a qual permite que as constantes cinéticas sejam calculadas (Figura 6).



**Figura 6.** Inverso da atividade invertásica em função do inverso da concentração de sacarose, conforme o método de Lineweaver-Burk. A equação de regressão linear é:

$$1/v = 624,2(1/s) + 15,52 \quad (r = 0,991).$$

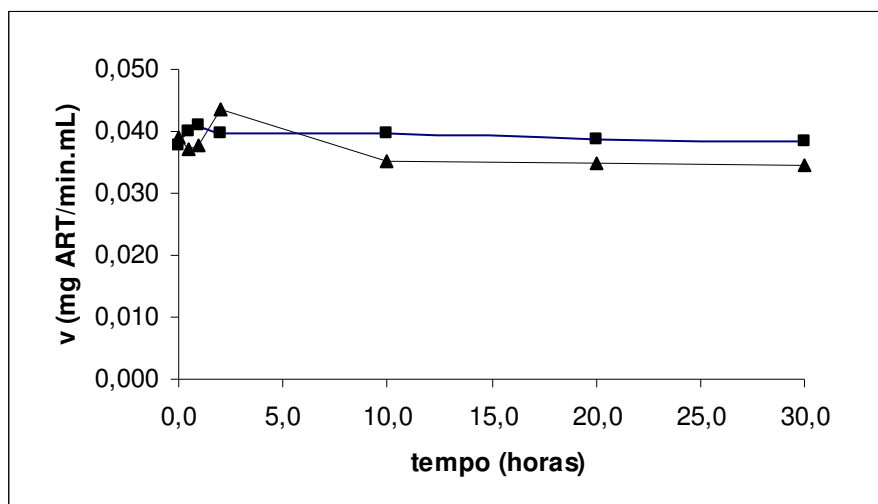
Tomando-se a equação da reta mostrada na Figura 6, calculou-se para  $K_m$  e  $V_{máx}$  os valores 40,2 mM e 0,064 mg de ART/min.mL de meio reacional,



respectivamente. Ressalta-se que este valor de  $K_M$  está dentro do intervalo (25mM – 100mM) encontrado na literatura (VITOLLO, 2004).

#### 4.1.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da Invertase.

Estes visaram avaliar a estabilidade da invertase em pH 4,6 (pH ótimo) e pH 5,0. Para isso, deixaram-se soluções da enzima nestas condições por um período máximo de 30h. Os resultados são apresentados na Figura 7 e na Tabela 5.



**Figura 7.** Estabilidade da invertase à temperatura de 37°C em pH = 4,6 (▲) e 5,0 (■), por um tempo total de 30h.

**Tabela 5.** Atividade invertásica residual, determinada de tempo em tempo, até perfazer um total de exposição de 30h.

| Testes (h) | v residual ( mg ART/min.mL) - pH 4,6 | v residual( mg ART/min.mL) - pH 5,0 |
|------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,0        | 0,0389                               | 0,0378                              |
| 0,5        | 0,0370                               | 0,0399                              |
| 1,0        | 0,0378                               | 0,0411                              |
| 2,0        | 0,0436                               | 0,0396                              |
| 10,0       | 0,0351                               | 0,0396                              |
| 20,0       | 0,0347                               | 0,0388                              |
| 30,0       | 0,0344                               | 0,0383                              |

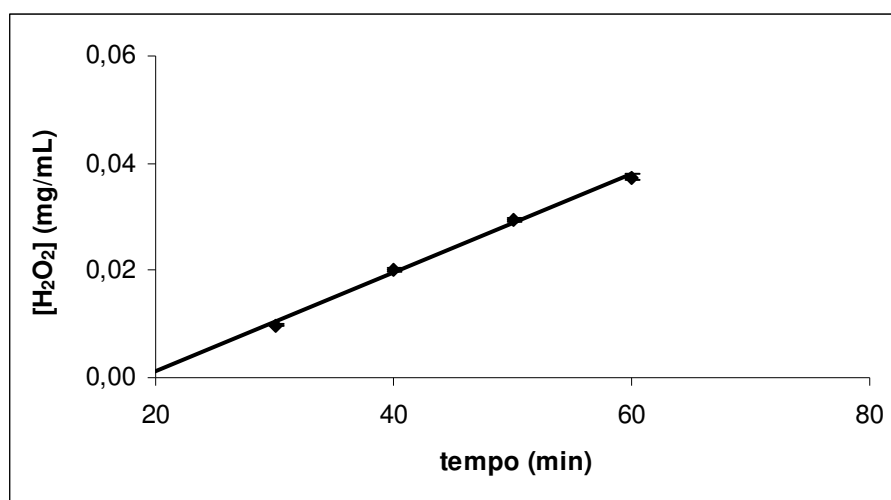
A invertase mostrou-se estável em pH 5,0 por um tempo total de 30h e a 37°C. No entanto, em pH 4,6 por 30h e à mesma temperatura, a enzima, também, mostrou-se estável, embora com uma diminuição pequena de atividade, da ordem de 10% (Figura 7 e tabela 5). Esse resultado corrobora o estudo realizado por KERN e colaboradores

(1992), segundo os quais diferentes formas de invertase não tiveram redução de sua atividade, quando tratadas por 42 h em pHs entre 4,5 e 6,0 e a 30°C.

## 4.2. Caracterização da Glicose Oxidase (GOD).

### 4.2.1. Determinação da atividade enzimática da GOD.

O teste foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental. A atividade enzimática é definida pela inclinação da reta ( $a$ ) em  $y = ax+b$ , de forma que a atividade encontrada foi de  $98 \times 10^{-5}$  mg de  $H_2O_2$  formada por minuto e por mL de meio reacional (Figura 8). Baseado nas informações de rótulo da glicose oxidase (1g = 6000U; 1U =  $1 \mu\text{mol}$  de  $\beta$ -D-glicose em D-gluconolactona e  $H_2O_2/\text{min}$ ), tem-se que a atividade específica da GOD foi de 236,8 U/mg de proteína.



**Figura 8.** Variação da concentração de água oxigenada (mg/mL) em função do tempo.

A equação de regressão linear é:  $y = 0,00098x - 0,02049$  ( $r = 0,997$ ), na qual  $y$  é a concentração de água oxigenada e  $x$ , o tempo de reação.

**Tabela 6.** Testes realizados para conversão da glicose em ácido glicônico pela GOD e formação de  $H_2O_2$  (pH 5,1 e 37°C).

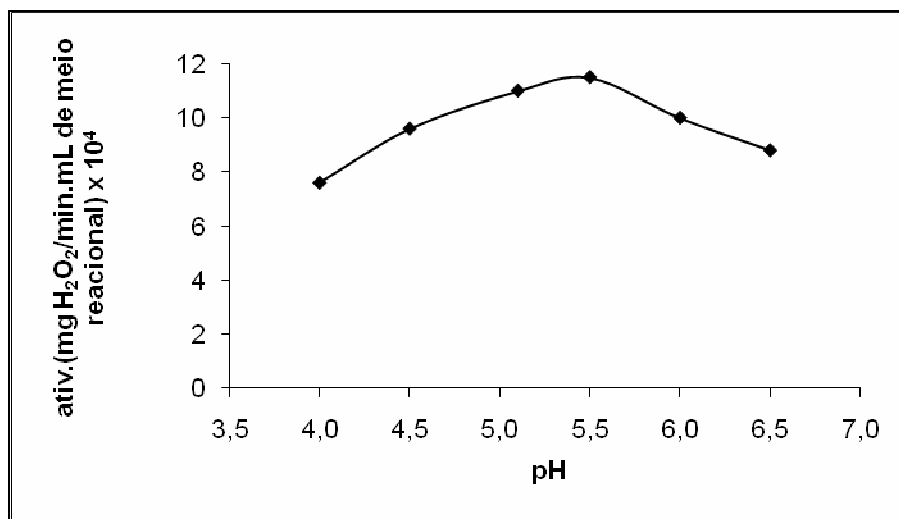
| Tempo (min) | Teste 1 | Teste 2 | Teste 3 | Teste 4 | Teste 5 | Média  |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 0           | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0      |
| 10          | nd      | nd      | nd      | nd      | nd      | nd     |
| 20          | nd      | nd      | nd      | nd      | nd      | nd     |
| 30          | 0,0108  | 0,0115  | 0,0118  | 0,0121  | 0,0107  | 0,0111 |
| 40          | 0,0204  | 0,0207  | 0,0214  | 0,0206  | 0,0213  | 0,0203 |
| 50          | 0,0304  | 0,0308  | 0,0311  | 0,0323  | 0,0318  | 0,0309 |
| 60          | 0,0386  | 0,0372  | 0,0365  | 0,0376  | 0,0362  | 0,0354 |

\*nd = não determinado.

O desvio-padrão encontrado foi de  $1,8 \cdot 10^{-5}$  mg de  $H_2O_2$ /min.mL e o coeficiente de variação, 1,84%.

#### 4.2.2. Efeito do pH na atividade da GOD.

Na Figura 9 apresentam-se os dados referentes à variação da atividade da GOD frente aos diferentes valores de pH do meio reacional.



**Figura 9.** Efeito do pH sobre a atividade da glicose oxidase.

**Tabela 7.** Atividade enzimática da Glicose Oxidase em função da variação do pH; temperatura de 37°C.

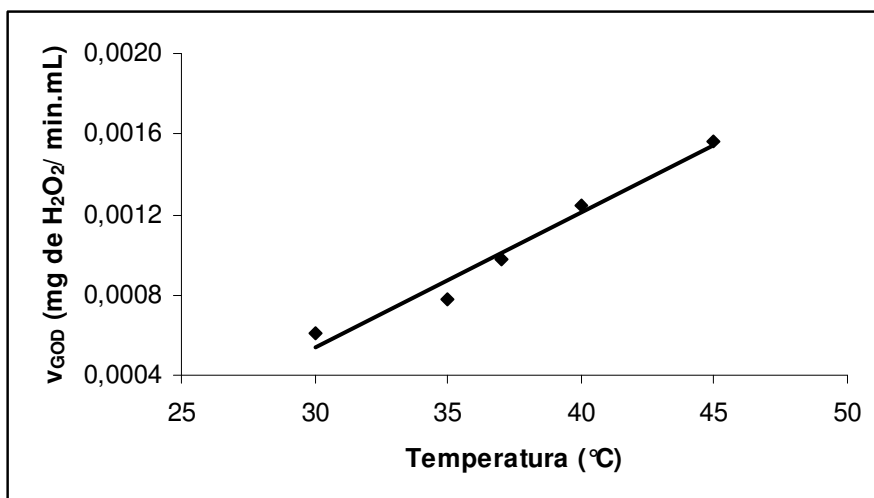
| <i>pH</i> | $v_{GOD} (mg H_2O_2/min. mL) \times 10^4$ |
|-----------|---|
| 4,0       | 7,6                                       |
| 4,5       | 9,6                                       |
| 5,1       | 11,0                                      |
| 5,5       | 11,5                                      |
| 6,0       | 10,0                                      |
| 6,5       | 8,8                                       |

Através dos resultados apresentados na Tabela 7 e na Figura 9, pode-se observar que o pH cujo valor proporcionou a melhor atividade da glicose oxidase foi 5,5; o que vai ao encontro dos resultados da literatura (RABA, MOTTOLA, 1995; FOGARTY, KELLY, 1990).

Segundo BAO et al (2001) o pH ótimo para a GOD seria 5,0, o qual está bem próximo ao determinado.

#### 4.2.3. Efeito da temperatura na atividade da GOD.

A figura 10 apresenta os dados relativos aos testes em pH 5,1 utilizando as temperaturas de 30°C, 35°C, 37°C, 40°C e 45°C.



**Figura 10.** Atividade da Glicose Oxidase em função da variação da temperatura, pH 5,1. A equação de regressão linear é:  $v_{GOD} = 0,00007T - 0,00145$  ( $r=0,990$ ).

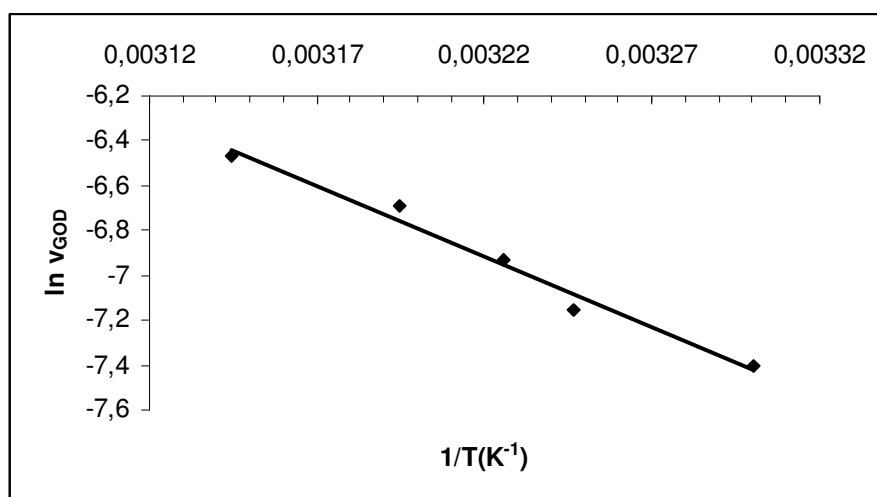
**Tabela 8.** Atividade enzimática da Glicose Oxidase em função da variação da temperatura, pH 5,1.

| <i>Temperatura</i> | <i>Atividade enzimática (mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /min.mL)</i> |
|--------------------|---|
| 30                 | 0,00061   |
| 35                 | 0,00078   |
| 37                 | 0,00098   |
| 40                 | 0,00124   |
| 45                 | 0,00156   |

Assim como ocorrido com a invertase, o aumento da temperatura proporcionou um aumento da atividade enzimática. Entretanto, temperatura acima de 45°C poderia levar à inativação das enzimas.

Para calcular a energia de ativação ( $E_a$ ) e a entalpia de reação ( $\Delta H$ ), utilizou-se as equações 1 e 2, respectivamente.

Os dados utilizados são mostrados na Tabela 9 e a correspondente reta de regressão, apresentada na Figura 11.



**Figura 11.** Logaritmo da atividade da GOD em função do inverso da temperatura para o cálculo da Energia de Ativação (Ea), sendo a equação de regressão linear:  $\ln v_{GOD} = -6315,1(1/T) + 13,422$  ( $r = 0,990$ ).

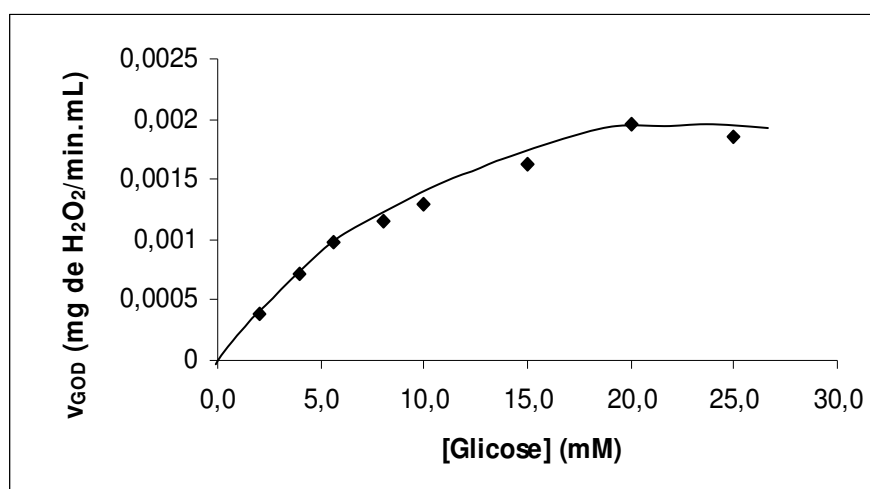
**Tabela 9.** Dados utilizados para a determinação da Energia de Ativação (Ea) da reação catalisada pela glicose oxidase.

| $T$ (°C) | $T$ (K) | $v$ (U/mL) | $1/T$ (k <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>3</sup> | $\ln v$ |
|----------|---------|------------|--|---------|
| 30       | 303     | 0,00061    | 3,30                                       | -7,40   |
| 35       | 308     | 0,00078    | 3,25                                       | -7,16   |
| 37       | 310     | 0,00098    | 3,23                                       | -6,93   |
| 40       | 313     | 0,00124    | 3,19                                       | -6,69   |
| 45       | 318     | 0,00156    | 3,14                                       | -6,46   |

Os valores calculados para Ea e  $\Delta H$  foram iguais a 52,5 kJ/mol e 49,9 kJ/mol, respectivamente.

#### 4.2.4. Efeito da concentração de glicose na atividade da GOD (determinação das constantes cinéticas: Km e Vmáx).

As atividades da GOD frente a cada concentração de glicose (2-25mM) são mostradas na Tabela 10.

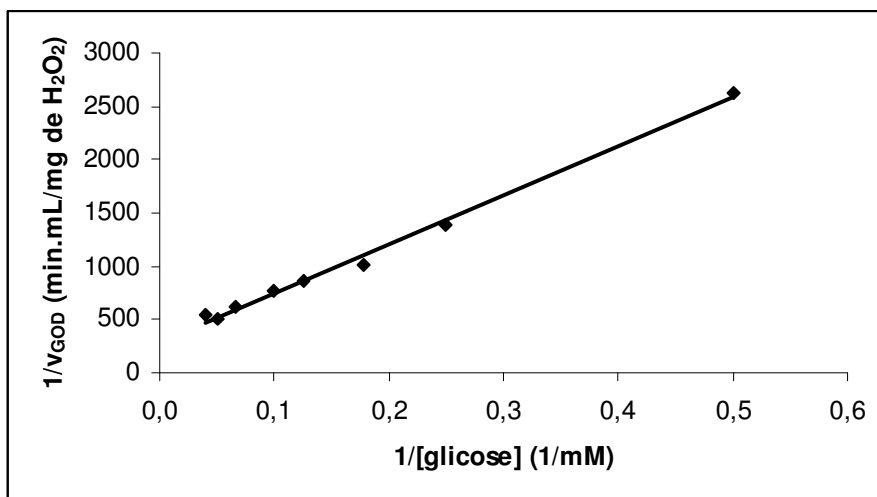


**Figura 12.** Atividade da GOD em função da concentração de glicose.

**Tabela 10.** Dados utilizados para o cálculo das constantes cinéticas da GOD, aplicando o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk.

| <i>Glicose (mM)</i> | <i>Ativ. enzimática (mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min.mL)</i> | <i>1/[substrato]</i> | <i>1/atividade</i> |
|---------------------|--|----------------------|--------------------|
| 2,0                 | 0,00038  | 0,500                | 2631,6             |
| 4,0                 | 0,00072  | 0,250                | 1388,9             |
| 5,6                 | 0,00098  | 0,179                | 1020,4             |
| 8,0                 | 0,00115  | 0,125                | 869,6              |
| 10,0                | 0,00129  | 0,100                | 775,2              |
| 15,0                | 0,00162  | 0,0667               | 617,3              |
| 20,0                | 0,00195  | 0,050                | 512,8              |
| 25,0                | 0,00186  | 0,040                | 537,6              |

Na Figura 12, apresenta-se a variação da atividade da GOD com a concentração de glicose. O perfil hiperbólico da curva obtida confirma que a cinética da GOD segue o modelo de Briggs-Haldane. Elaborando-se um gráfico do tipo  $1/v_{GOD} = f(1/S)$ , obtém-se uma reta, da qual as constantes cinéticas são calculadas (Figura 13).



**Figura 13.** Inverso da atividade da GOD em função do inverso da concentração de glicose, conforme método de Lineweaver-Burk. A equação de regressão linear é:

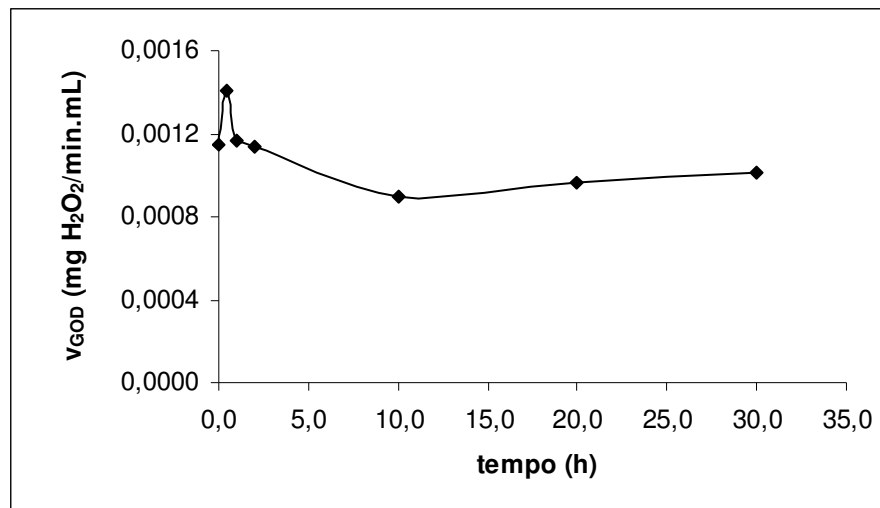
$$(1/v_{GOD}) = 4584(1/S) + 293 \quad (r= 0,997).$$

Da equação da reta mostrada na Figura 13, calculou-se para  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  os valores 15,6 mM e  $3,41 \times 10^{-3}$  mg de  $H_2O_2$  formado/min.mL, respectivamente.

#### 4.2.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da GOD.

Da Figura 14, observa-se que a GOD entre 0 e 30h tem a atividade diminuída em cerca de 12% (Tabela 11). Essa oscilação seria causada por mudanças não profundas da estrutura molecular da enzima. Por exemplo, além das mudanças conformacionais das duas cadeias peptídicas, a ocorrência de óxido-redução do íon ferroso/férrico e do FAD/FADH<sub>2</sub>. A oscilação após 0,5h proviria de alguma mudança estrutural mais brusca.

É importante notar que a queda da atividade da GOD após 30h é pequena (12%), o que mostra sua boa estabilidade perante o pH e temperatura testados. Este dado é importante, pois se for preciso realizar um teste de várias horas de duração, a enzima ainda manterá uma boa atividade e realizará a conversão eficientemente.



**Figura 14.** Estabilidade da GOD mantida em pH 5,0 e 37°C por um período total de 30h.

**Tabela 11.** Atividade residual da GOD, determinada de tempo em tempo, até perfazer um total de exposição de 30h.

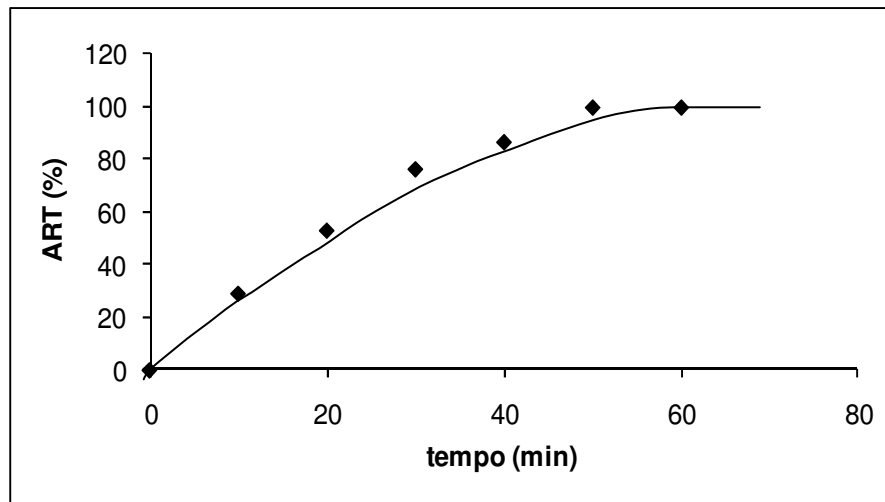
| Testes (h) | $v_{GOD}$ residual (mg de $H_2O_2$ formado/ min.mL) $\times 10^3$ |
|------------|---|
| 0          | 1,15  |
| 0,5        | 1,41  |
| 1          | 1,17  |
| 2          | 1,14  |
| 10         | 0,900   |
| 20         | 0,960   |
| 30         | 1,01  |

### 4.3. Bioconversão da sacarose pela invertase, em reator descontínuo-alimentado, utilizando diferentes leis de alimentação do reator.

#### 4.3.1. Estabelecimento da quantidade de invertase para a hidrólise de uma solução de 64 g/L de sacarose.

A figura 15 mostra o desempenho da conversão da sacarose, quando foi utilizada uma quantidade de invertase de 776,6U.



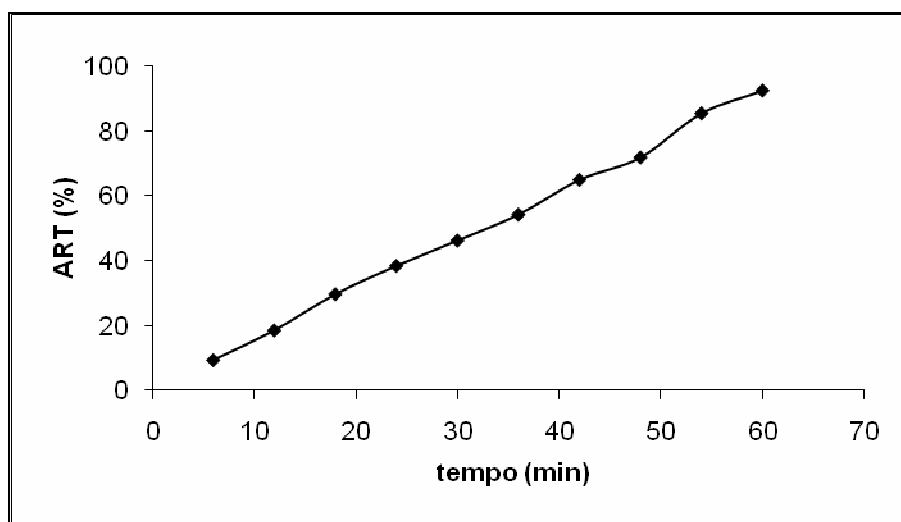


**Figura 15.** Conversão total de sacarose (64g/L) em ART em função do tempo.

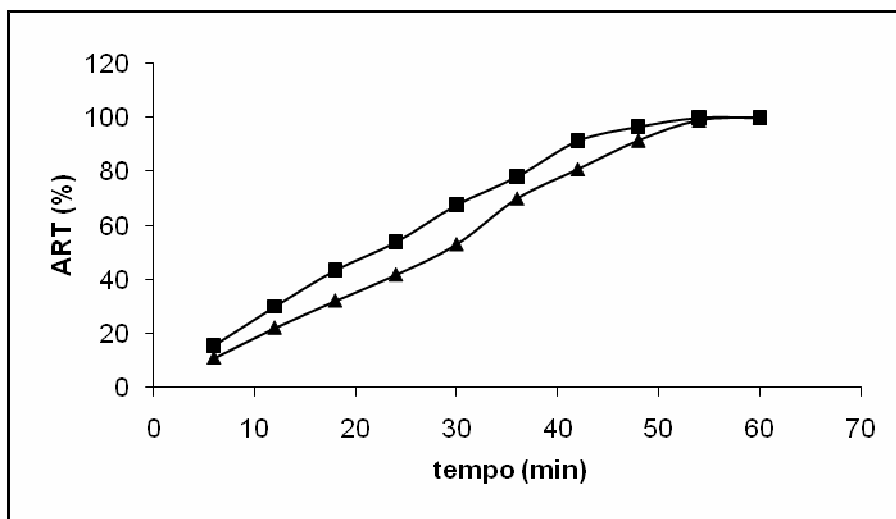
Observando-se a figura 15, percebe-se que a diluição final da invertase utilizada foi adequada para a conversão total da solução de sacarose (64g/L), já que todo o substrato foi convertido dentro do período de tempo estabelecido (1h). Portanto, essa foi a diluição utilizada para os testes de conversão em reator descontínuo-alimentado.

#### 4.3.2. Testes de hidrólise da sacarose por processo descontínuo-alimentado, usando diferentes leis de alimentação do reator.

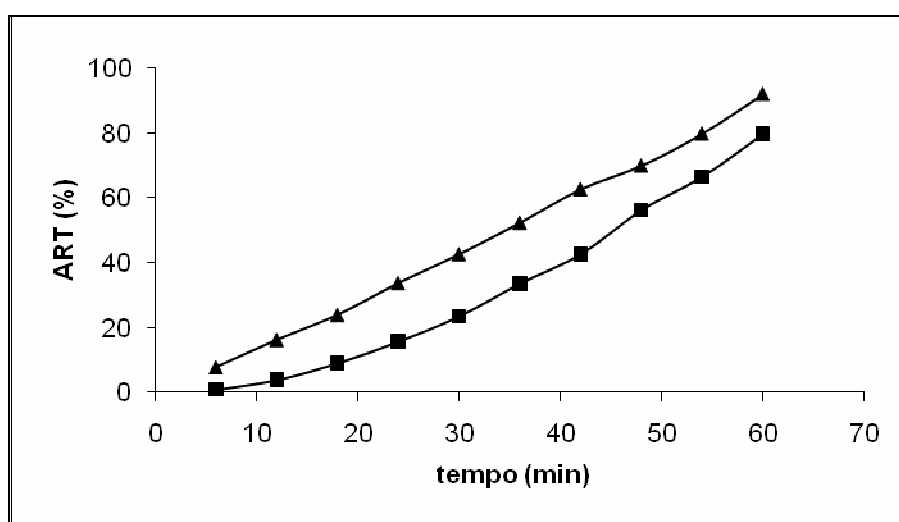
As figuras 16, 17 e 18 mostram o desempenho catalítico obtido com cada tipo de alimentação. O procedimento está descrito no item 3.3.3.2.



**Figura 16.** Formação de açúcares redutores durante processo descontínuo-alimentado, no qual a solução de sacarose (64g/L) foi adicionada segundo a lei constante.



**Figura 17.** Formação de açúcares redutores durante processos descontínuo-alimentados, nos quais a solução de sacarose (64g/L) foi adicionada segundo as leis: linear decrescente (■); exponencial decrescente(▲).



**Figura 18.** Formação de açúcares redutores durante processos descontínuo-alimentados, nos quais a solução de sacarose (64g/L) foi adicionada segundo as leis: linear crescente (■) e exponencial crescente (▲).

Na Tabela 12 observa-se que a hidrólise completa da sacarose foi obtida através das adições linear e exponencial decrescentes. Porém, a atividade hidrolítica média para a adição linear decrescente foi 12% maior do que aquela obtida com a adição exponencial decrescente.

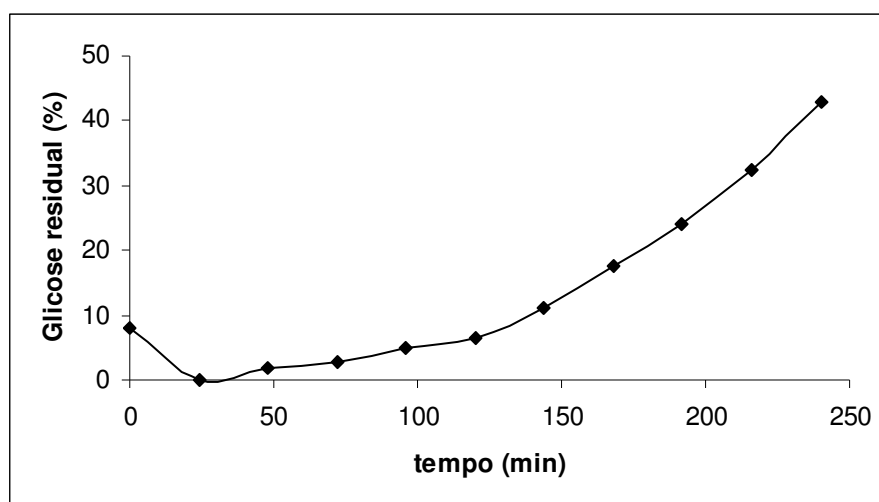
**Tabela 12.** Atividades hidrolíticas médias e respectivos rendimentos dos processos descontínuo-alimentados com sacarose, executados sob diferentes leis de adição.

| <i>Forma de alimentação</i> | <i>v (g ART/min)</i> | <i>Rendimento (%)</i> |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|
| Constante                   | 0,29                 | 92,5                  |
| Linear decrescente          | 0,40                 | 100,0                 |
| Linear crescente            | 0,33                 | 79,6                  |
| Exponencial decrescente     | 0,35                 | 100,0                 |
| Exponencial crescente       | 0,30                 | 91,9                  |

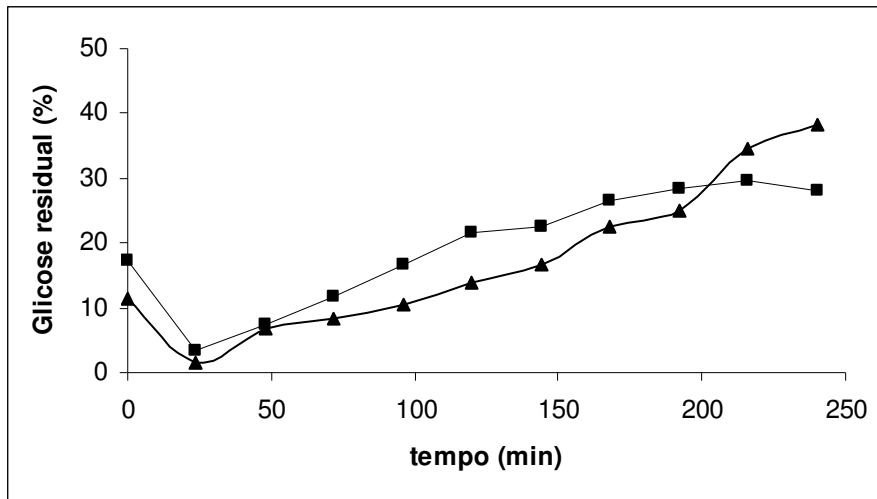
#### 4.4. Bioconversão da glicose pela glicose oxidase, em reator descontínuo-alimentado, utilizando diferentes leis de alimentação do reator.

##### 4.4.1. Testes de conversão da glicose por processo descontínuo-alimentado, usando diferentes leis de alimentação do reator.

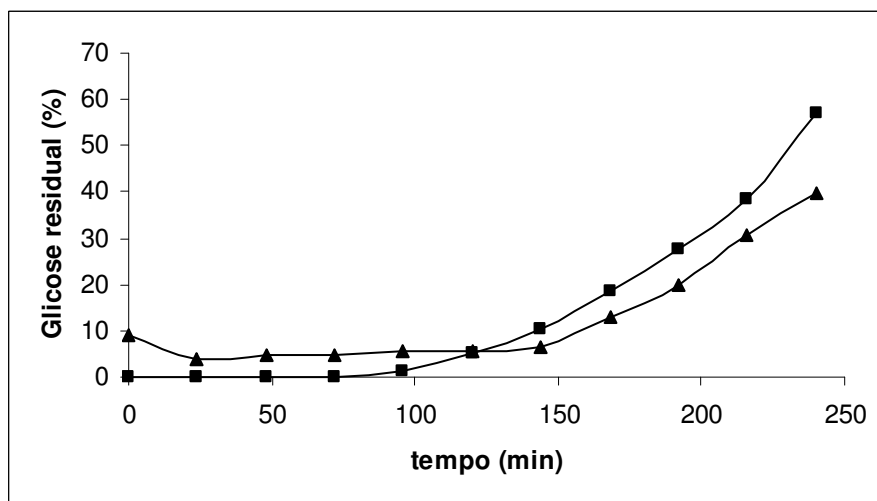
As figuras 19, 20 e 21 mostram o desempenho catalítico obtido com cada tipo de alimentação na conversão da glicose em ácido glicônico. O procedimento está descrito no item 3.3.4.1.



**Figura 19.** Desempenho da conversão de glicose em processo descontínuo-alimentado, no qual a solução substrato (32g/L) foi adicionada de acordo com a lei constante.



**Figura 20.** Desempenho da conversão de glicose em processo descontínuo-alimentado, no qual a solução substrato (32g/L) foi adicionada de acordo com as leis: linear decrescente (■) e exponencial decrescente(▲).



**Figura 21.** Desempenho da conversão de glicose em processo descontínuo-alimentado, no qual a solução substrato (32g/L) foi adicionada de acordo com as leis: linear crescente (■) e exponencial crescente(▲).

A tabela 13 mostra os rendimentos obtidos com cada tipo de alimentação e a velocidade média de conversão da glicose em cada tipo de alimentação.

**Tabela 13.** Atividades hidrolíticas médias e respectivos rendimentos dos processos descontínuo-alimentados com glicose, executados sob diferentes leis de adição.

| <i>Forma de alimentação</i> | <i>v (g glicose conv./min)</i> | <i>Rendimento (%)</i> |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Constante                   | 0,023                          | 57,22                 |
| Linear decrescente          | 0,029                          | 72,00                 |
| Linear crescente            | 0,017                          | 42,82                 |
| Exponencial decrescente     | 0,025                          | 61,70                 |
| Exponencial crescente       | 0,024                          | 60,14                 |

Assim como nos testes descontínuo-alimentados com a sacarose, no caso da glicose as melhores taxas de conversão foram obtidas utilizando-se as alimentações linear decrescente (72%) e exponencial decrescente (61,70%), embora estas não tenham atingindo o valor de 100%. A alimentação exponencial crescente obteve taxa de conversão bem próxima da exponencial decrescente (60,14%).

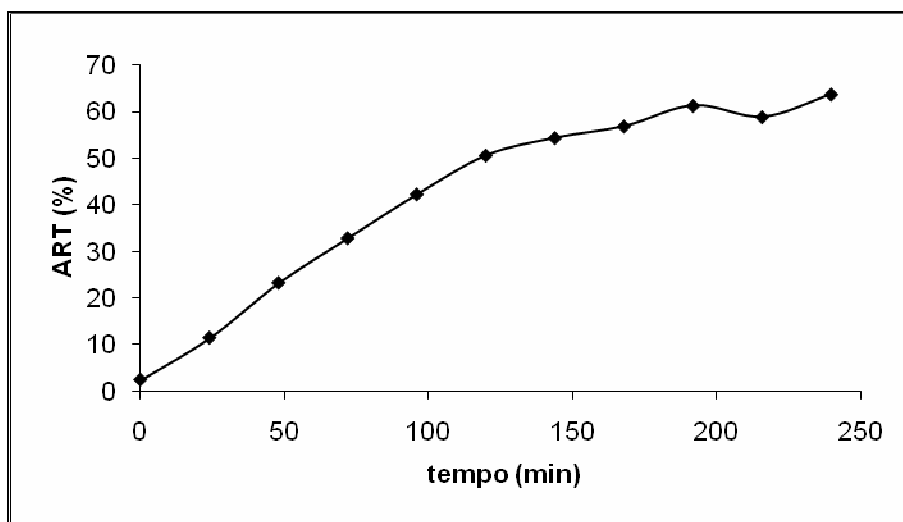
Um dos fatores que pode ter contribuído para a não conversão total da glicose seria a presença de  $H_2O_2$  no meio reacional. Segundo TOMOTANI (2005), a  $H_2O_2$  pode inibir de modo não-competitivo a GOD. No anexo II apresentam-se as curvas de formação de  $H_2O_2$  durante os processos com diferentes alimentações.

Uma maneira de diminuir a quantidade de água oxigenada seria adicionar uma maior quantidade de catalase, porém isso causaria uma espumação mais abundante ainda, o que tornaria o processo menos viável.

Estudos de conversão de glicose em ácido glicônico, por processo descontínuo-alimentado já foram relatados, como no caso de Crognale e colaboradores (2008). Porém nesse estudo a conversão foi feita através de microrganismo, *Penicillium variable* P16, que obteve rendimento de 99,4% na conversão de 240 g/L de glicose em 96 h de fermentação. O problema da utilização de microrganismos é o severo controle que deve haver dos nutrientes essenciais para seu metabolismo e sua grande sensibilidade a qualquer alteração operacional. O resultado dos testes descontínuo-alimentados com glicose oxidase, apesar de não alcançarem 100% de rendimento e o substrato conter apenas 32 g/L de glicose, mostram que a conversão usando apenas a enzima é interessante, pois se forem otimizados os parâmetros reacionais, pode-se chegar a maiores rendimentos.

#### 4.5. Bioconversão da sacarose por processo descontínuo-alimentado, com alimentação linear decrescente, usando: invertase, glicose oxidase e catalase.

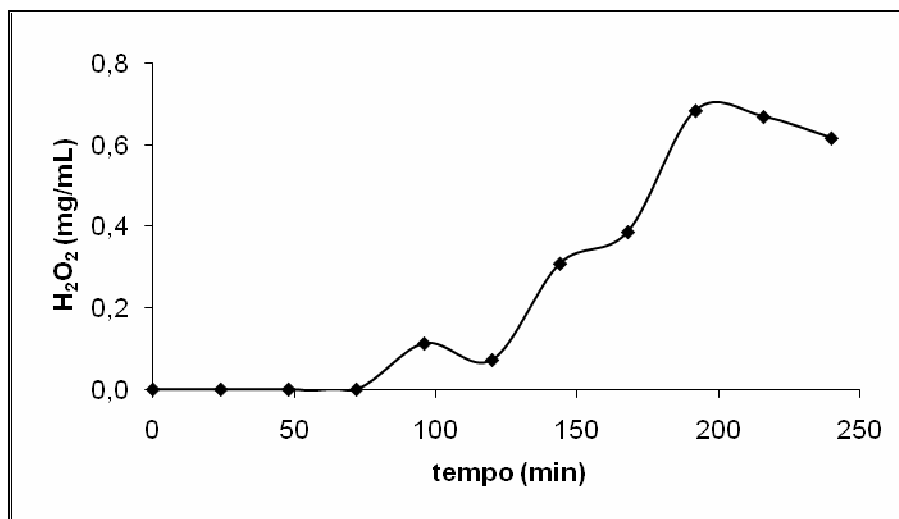
A figura 22 mostra o desempenho catalítico da conversão da sacarose em processo descontínuo-alimentado, de alimentação linear decrescente, na presença de invertase, glicose oxidase e catalase, conduzido conforme descrito no item 3.3.5.



**Figura 22.** Variação da concentração dos açúcares redutores totais em função do tempo para a conversão sacarose/(frutose + ácido glicônico) com o uso simultâneo das enzimas (invertase, glicose oxidase e catalase).

Após 240 min de reação catalisada pelas três enzimas, restaram no meio 63,75% de açúcares redutores, dos quais 50% correspondiam à frutose e 13,75% à glicose não oxidada. Por conseguinte, o rendimento obtido em ácido glicônico foi de 72,5%. Este rendimento coincide com aquele obtido pela ação da (GOD + catalase) sobre a glicose (item 4.4.1.), sendo uma clara indicação que o processo como um todo é limitado pela etapa da oxidação da glicose.

A figura 23 mostra a variação na quantidade de água oxigenada em função do tempo, durante a conversão multienzimática.



**Figura 23.** Formação de água oxigenada durante a conversão multienzimática da sacarose, em processo descontínuo-alimentado, com alimentação linear decrescente.

Percebe-se pela figura 23 que, a partir de 75 minutos, a concentração de água oxigenada no meio reacional cresce continuamente. Mesmo assim o rendimento do processo atingiu um patamar alto (72,5%).

#### 4.6. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator contínuo com membrana.

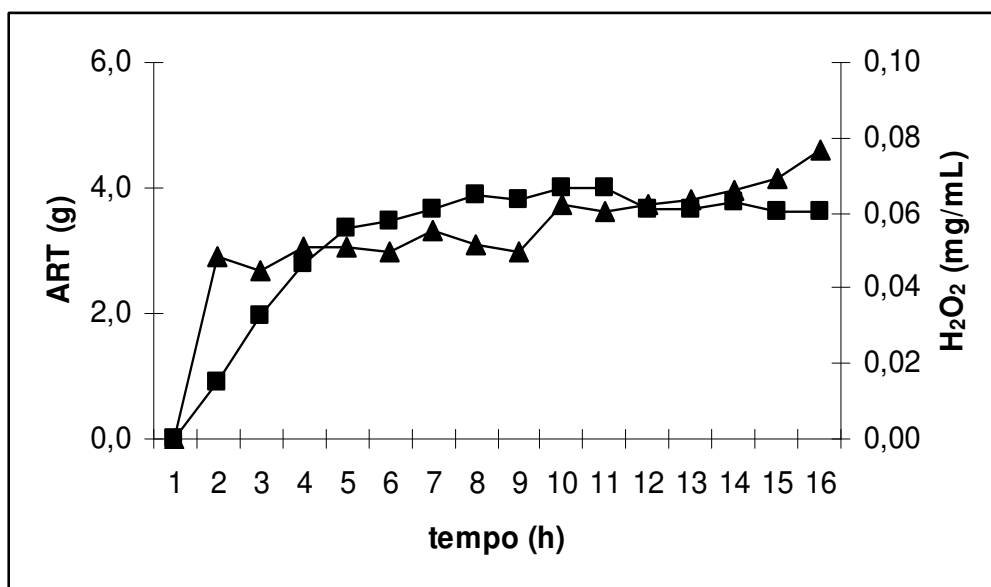
A tabela 14 mostra os rendimentos dos testes contínuos com cada concentração de sacarose, assim como as atividades enzimáticas utilizadas em cada teste e o tempo de residência.

**Tabela 14.** Condições e respectivos rendimentos dos testes contínuos.

| Teste<br>n° | D<br>(h <sup>-1</sup> ) | [sacarose]<br>(g/L) | Atividade enzimática (U) |       |          | Rendimento<br>em ác. Glicônico(%) |
|-------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|-------|----------|-----------------------------------|
|             |                         |                     | Invertase                | GOD   | Catalase |                                   |
| 1           | 3                       | 64                  | 776,6                    | 7000  | 236000   | 43,9                              |
| 2           | 3                       | 64                  | 70,6                     | 7000  | 236000   | 92,3                              |
| 3           | 3                       | 100                 | 70,6                     | 7000  | 236000   | -                                 |
| 4           | 3                       | 100                 | 176,5                    | 7000  | 295000   | 67,4                              |
| 5           | 3                       | 100                 | 176,5                    | 9000  | 354000   | 83,0                              |
| 6           | 3                       | 150                 | 264,75                   | 13000 | 531000   | 76,0                              |

Comparando-se os testes 1 e 2 pode-se perceber que o rendimento aumentou quando foi diminuído a quantidade de invertase utilizada (de 776,6U para 70,6U). Isso evidencia que a ação da glicose oxidase, no teste 1, foi influenciada negativamente pela

atividade alta da invertase, ou seja, a velocidade de hidrólise da sacarose foi maior do que a velocidade de oxidação da glicose, prejudicando a dinâmica total da conversão. A figura 24 mostra a formação de ART durante o teste 2 (no qual se obteve 92,3% de rendimento), assim como a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O estado estacionário foi atingido com aproximadamente 6 horas de experimento.



**Figura 24.** Formação de ART (■) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (▲) durante o teste 2, realizado com solução de 64g/L de sacarose.

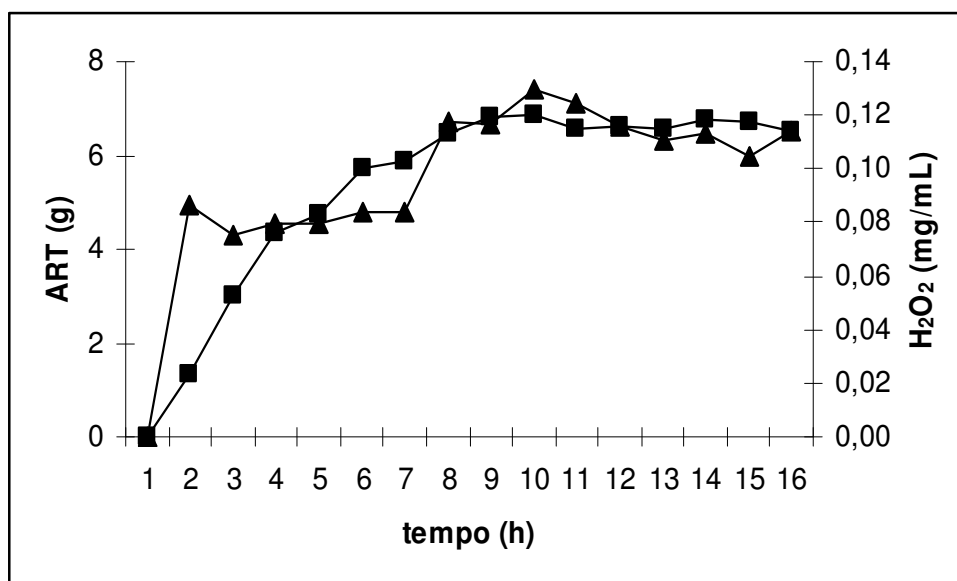
Ao se comparar a quantidade máxima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formada no teste descontínuo-alimentado de vazão linear decrescente (item 4.5.), que foi de aproximadamente 0,7mg/mL, com a quantidade formada no teste contínuo de n° 2, que foi aproximadamente 0,08mg/mL, pode-se inferir que a concentração desse composto foi fator decisivo para não se alcançar um maior rendimento no processo descontínuo-alimentado.

Quando a concentração da solução de sacarose foi aumentada para 100g/L (teste 3), a quantidade de invertase no reator passou a ser insuficiente para hidrolisar toda a sacarose e deixar a glicose livre para a GOD. O traço na tabela indica que não houve como estabelecer o rendimento (em ácido glicônico) já que a quantidade de açúcares redutores recolhidos ao final das 15h de processo era menor do que a metade da quantidade de sacarose alimentada (o que seria equivalente à frutose). Desta forma, no teste 4 aumentou-se para 176,5U a atividade da invertase e para 295000U a atividade da



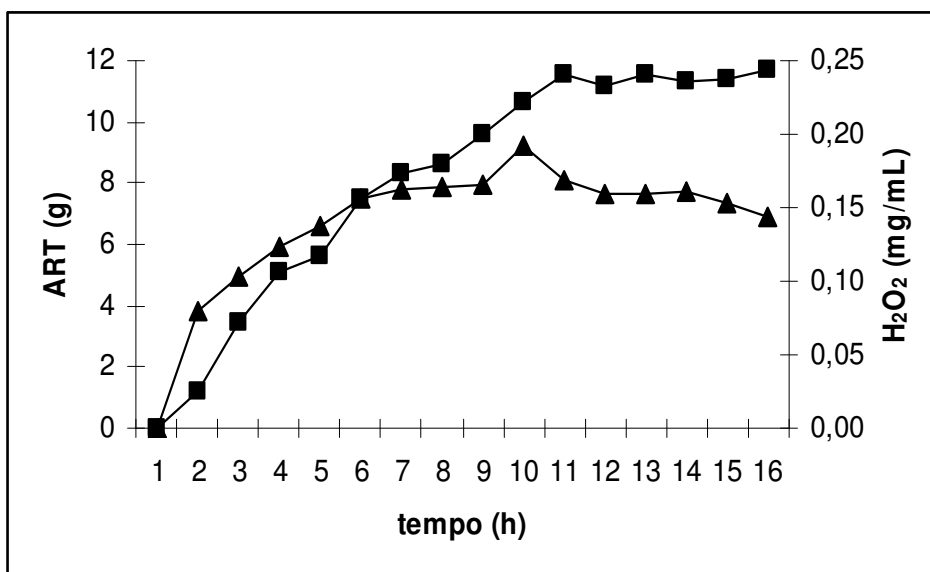
catalase (devido à maior quantidade de água oxigenada formada ao se converter uma solução mais concentrada de sacarose), chegando-se a um rendimento de 67,4%.

No teste 5 (ainda com solução de 100g/L de sacarose) chegou-se a 83% de rendimento aumentando-se a GOD(9000U) e a catalase(354000U), evidenciando-se que a atividade da invertase necessária para converter essa solução (100g/L) era adequada . A figura 25 mostra a formação de ART durante o teste 5, assim como a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O estado estacionário foi atingido com aproximadamente 8 horas de experimento.



**Figura 25.** Formação de ART (■) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (▲) durante o teste 5, realizado com solução de 100g/L de sacarose.

Optou-se, no teste 6, por não continuar com a concentração de 100g/L, já que provavelmente um pequeno aumento na atividade da GOD e talvez catalase resultasse em rendimento próximo a 100%. Desta forma, o último teste foi realizado com solução de 150g/L e a seguinte combinação de enzimas: invertase (264,75U), GOD (13000U) e catalase (531000U). A figura 26 mostra a formação de ART durante o teste 6, assim como a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O estado estacionário foi atingido com aproximadamente 10 horas de experimento, obtendo-se um rendimento de conversão da ordem de 76%.



**Figura 26.** Formação de ART (■) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (▲) durante o teste 6, realizado com solução de 150g/L de sacarose.

Com o intuito de melhorar o rendimento da conversão, repetiu-se o teste 6 com uma quantidade de catalase maior (649.000U). Porém a formação de grande quantidade de bolhas de ar na tubulação de saída do reator (oriundas da degradação da água oxigenada) impediu o estabelecimento de um fluxo de saída constante. Em consequência, o volume coletado a cada hora era variável, impossibilitando manter a vazão específica de alimentação do reator constante. Para contornar este problema técnico, provavelmente, dever-se-ia empregar um reator de maior capacidade munido com tubos de entrada/saída de maior calibre.

## 5. CONCLUSÕES.

A invertase e a glicose oxidase apresentaram como pH ótimos 4,6 e 5,5, respectivamente. Apesar da diferença, o uso de um pH intermediário (pH 5,1) para testes multienzimáticos mostrou-se vantajoso.

A temperatura padrão foi mantida em 37°C, porém, 40°C ou 45°C também podem ser interessantes, pois as atividades enzimáticas da invertase e da glicose oxidase aumentaram linearmente nesse intervalo.

Ambas as enzimas (invertase e glicose oxidase) podem ser utilizadas em processo de até 30h de duração, visto que se mostram estáveis quando mantidas em solução-tampão de pH = 5,0 e a 37°C.

Nos testes descontínuo-alimentados para ambas as enzimas, as alimentações de caráter decrescente mostraram-se mais vantajosas, porém só atingiu-se 100% de conversão no caso dos testes com sacarose.

O teste descontínuo-alimentado na presença das três enzimas (invertase, GOD e catalase) e com alimentação linear decrescente, mostrou-se capaz de converter uma solução de 64 g/L de sacarose em frutose e ácido glicônico. Mesmo não atingindo 100% de rendimento, esse processo obteve uma alta taxa de conversão da sacarose (72,5%), sendo que o fator limitante foi a oxidação da glicose.

A bioconversão contínua em reator com membrana mostrou-se viável e eficiente para converter soluções de sacarose de até 150g/L (76% de rendimento), e obter produtos de interesse. Desta forma pode ser interessante do ponto de vista industrial, como é mostrado no anexo III. Aperfeiçoamentos, como usar reator de maior capacidade, ainda podem ser feitos no processo para otimizar seu rendimento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO-NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: BORZANI, W.; SCHIMIDELL NETTO, W., LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; coords. **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher., v.3, p.411, 2001.
- ARRUDA, L.M.; VITOLO M., Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 8, p.23–33, 1999.
- AZEVEDO, D.C.S.; RODRIGUES, A.E. Design methodology and operation of a simulated moving bed reactor for the inversion of sucrose and glucose-fructose separation. **Chem. Engin. Journ.**, v.82, p.95-107, 2001.
- BAO, J.; FURUMOTO, K.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p. 91–102, 2001.
- BENTLEY, I.S.; WILLIAMS, E.C. Starch conversion. In: GODFREY, T., WEST, S., Eds. **Industrial Enzymology**. 2<sup>nd</sup> Edition, London, UK, MacMillan Press LTD., p.339-356, 1996.
- BERGMEYER, H.U., Ed. **Methods of enzymatic analysis**. 3<sup>rd</sup> Ed., Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, v.2, p.539, 1984.
- BIELLA, S.; PRATI, L.; ROSSI, M. Seletive oxidation of D-glucose on gold catalyst. **J. Catal.**, v.206, p.242-247, 2002.
- BOMMARIUS, A. Biotransformations and enzyme reactors. In: REHM, H.J.; REED, G.; PUHLER, A.; STADLER, P.; STEPHANOPOULOS, G., eds. **Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise**. 2.ed. Weinheim, New York: VCH, p.427-466. [Bioprocessing, v.3], 1993.
- BRAHIM, S.; NARINESING, D.; GUISEPPI-ELIE, A. kinetics of glucoseoxidase immobilized in p(HEMA)-hydrogel microspheres in a packed-bed bioreactor. **J. mol. Catal. B:Enzym.**, v.18, n (1/3), p.69-80, 2002.
- CHERYAN, M.. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Technomic Publishing Co., Inc., Urbana, IL, 1998.
- CROGNALE, S. ; PETRUCCIOLI, M. ; FENICE, M.; FEDERICI, F. Fed-batch gluconic acid production from *Penicillium variabile* P16 under different feeding strategies. **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, p. 445-449, 2008.
- CRUEGER, A; CRUEGER, W. Carbohydrates. In: REED, G.; REHM, H.J.; KIESLICH, K.; BRAUER, H.; PAPE, H.; KENNEDY, J.F.; JACOBSON, G.K., ed. **Biotechnology: a comprehensive treatise**. Weinheim, Verlag Chemie, v.6, 1984.

- CRUEGER, A; CRUEGER, W. Glucose transforming enzymes. In: FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T., eds. **Microbial enzymes and Biotechnology**. 2.ed. London, UK, Elsevier Applied Science, 1990.
- CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. Monitoring and control of TMP and feed flow rate pulsatile operations during ultrafiltration in a membrane module. **Desalination**, v.146, p. 217-222, 2002.
- DATAGRO. In: Agrofólia, Caderno Especial do Jornal Folha de São Paulo, de 02/12/2008, p. B12.
- De QUEIROS, 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.**, v.84, p.767-777, 2002.
- DÍAZ, E.G; CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; LUQUE, S.; FERNANDES, P.; CABRAL, J.M.S. Towards the development of membrane reactor for enzymatic inulin hydrolysis. **Journal of Membrane Science**, v.273, p. 152-158, 2006.
- ERZINGER, G.S.; VITOLO, M. Zymomonas mobilis as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.129, p.787-794, 2006.
- ERZINGER, G.S.; SILVEIRA, M.M.; VITOLO, M; JONAS, R. Determination of glucose-fructose oxidoreductase activity in whole cells of *Z. mobilis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.12, n.1, p.22-24, 1996.
- FANG, M.; GRANT, P.S.; McSHANE, M.J.; LVOV, Y.M. Magnetic bio/nanoreactor with multilayer shells of glucose oxidase and inorganic nanoparticles. **Langmuir**, v.18, n.16, p.6338-6344, 2002.
- FERNANDES, F.A.N.; SOARES, A.B. Modeling of methane steam reforming in a palladium membrane reactor. **Latin American Applied Research.**, v.36, n.3, p.155-161, 2006.
- FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T. Microbial Enzymes and biotechnology. Second edition, **Elsevier Applied Science**, London, 1990.
- GAN, Q.; ALLEN, S.J.; TAYLOR, G. Analysis of process integration and intensification of enzymatic cellulose hydrolysis in a membrane bioreactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.80, p. 688-698, 2005.
- GIORNO, L.; DRIOLI, E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Trends Biotechnol.**, v.18, n.8, p.339-349, 2000.
- GORDON, L.; VARGA, M.G.; DOMINGUEZ, E.; EMNÉUS, J. Analysis of mono-, oligo- and polysaccharides by enzyme reaction detection. In: LAM, S.; MALIKIN, G., eds. **Analytical applications of immobilized enzyme reactors**. London, Glasgow: Blackie Academic and Professional, p.51-130, 1994.

- GOULAS, A.K.; COOPER, J.M.; GRANDISON, A.S.; RASTALL, R.A. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextransucrase and dextranase, **Biotechnol. Bioeng.** v.88, p. 778, 2004.
- ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. **European Polymer Journal**, v.39, p.2375-2381, 2003.
- KENNEDY, J.F.; PIMENTEL, M.C.B.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L. Sucrose biosensor as an alternative tool for sugarcane Field samples. **J Sci Food Agric** v.87, p.2266–2271, 2007.
- KERN, G; SCHULKE, N; SCHMID, F.X. and JAENICKE, R. Stability, quaternary structure, and folding of internal, external, and core-glycosylated invertase from yeast. **Protein Science**, v.1, p.120-131,1992.
- LIU, X.; NEOH, K.G.; CEN, T.; KANG; E.T. Enzymatic activity of glucose oxidase covalently wired via viologen to electrically conductive polypyrrole films. **Biosens. Bioelectronic**, v.19, p. 823-834, 2004.
- MANSOUR, E.H.; DAWOUD, M.. Immobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p.446-450, 2003.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em novembro de 2009.
- NAKAO, K.; KIEFNER, A.; FURUMOTO, K.; HARADA, T. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. **Chem. Eng. Sci.**, v.52, p.4127-4133, 1997.
- NEVES, L. C. M. Emprego de Reator com Membrana na obtenção de Frutose e Ácido Glicônico a partir da Sacarose. São Paulo. p.165. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2006.
- NEVES, L.C.M.; VITOLO, M. Use of glucose oxidase in a membrane reactor for gluconic acid production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.136, p.161-170, 2007.
- PANKE, S.; WUBBOLTS, M.G.. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. **Current Opin. Chem. Biol.** v.9, p.188-194, 2005.
- PERALTA, M.R.; MARQUES, DE SOUZA, C.; BÔER, C.G. As principais oxidorreduções de uso industrial. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R., Eds. **Enzimas como agents tecnológicos**. Ribeirão Preto, SP, Legis Summa,. p.412, 2004.
- PÉREZ-TERRAZAS, J. E.; IBARRA-JUNQUERA, V.; ROSU, H. C.; Cellular automata modeling of continuous stirred tank reactors. **Korean J. Chem. Eng.**, 25(3), p.461-465, 2008.

- RABA, J., MOTTOLA, H.A. Glucose oxidase as an analytical reagent. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 25, n.1, p.1-42, 1995.
- RASIAH, I.A.; SUTTON, K.H.; LOW, F.L.; LIN, H.M; GERRARD, J.A. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. **Food Chem** v.89, p.325–332, 2005.
- ROCHA-FILHO, J.A.; VITOLO, M. **Enzimas no contexto da síntese orgânica**. São Paulo: Autores, p. 43, 1998.
- SANTOS, C.A. **Radicais livres: aspectos químicos, biológicos, patológicos e preventivos**. Santo André, SP, UNIABC. [Monografia de conclusão de Curso], 2001.
- SCHIMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. *Biorreatores e processos fermentativos*. In: SCMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher., v.2, p.179-192, 2001.
- SEGEL, I.H. **Bioquímica**. Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, Rj, 1976.
- SENGUPTA, S.; MODAK, J.M. Optimization of fed-batch bioreactor for immobilized enzyme process. **Chemical Engineering Science**, v.56, p.3315-3325, 2001.
- SHEU, D.C; LIO, P.J; CHEN, S.T.; LIN, C.T.; DUAN, K. Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of  $\beta$ -fructofuranosidase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, n.23, p.1499-1503, 2001.
- SMITH, J.E. **Biotechnology**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, p.236, 1996.
- TOMOTANI, E.J. **Imobilização da Invertase em Resina de Troca Iônica (tipo DOWEX): seu Uso na modificação da sacarose**. São Paulo. p.161. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2002.
- TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. **Journal of food Engineering**, v.80, p.662-667, 2007.
- TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1020-1025, 2007a.
- TOMOTANI, E.J. **Bioconversão de Sacarose em Ácido Glicônico e Frutose usando Reator de Membrana**. São Paulo, p.102. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2006.

- TOMOTANI, E.J., NEVES, L.C.M., VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucoseoxidase in membrane bioreactor. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.121, p.149-162, 2005.
- TRAU, D.; RENNEBERG, R. Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications. **Biosens. Bioelectron.**, v.1, p.1-9, 2003.
- VASILEVA, N.; GODJEVARGOVA, T. Study on the behavior of glucose oxidase immobilized on microfiltration polyamide membrane. **J. Membr. Sci.**, v.239, n.2, p.157-161, 2004.
- VITOLO, M. Invertase. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R., Eds. **Enzimas como agentes tecnológicos**. Ribeirão Preto, SP, Legis Summa, p.412, 2004.
- VOJINOVIC, V.; CALADO, C.R.; SILVA, A.I.; MATEUS, M. Micro-analytical GO/HRP bioreactor for glucose determination and bioprocess monitoring. **Biosens. Bioelectronics**, v.20, p.1955-1961, 2005.
- WENKIN, M.; RUIZ, P.; DELMON, B.; DEVILLERS, M. The role of bismuth as promoter in Pd-Bi catalysts for the selective oxidation of glucose to gluconate. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, v.180, n.1/2, p.141-159, 2002.
- WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. (org). **Handbook of Food Enzymology**. Marcel Dekker, New York, p.1128, 2002.
- WOODWARD, J.R.; SPOKANE, R.B. Analytical enzymes biosensors. In: GODFREY, T., WEST, S., Eds. **Industrial Enzymology**. 2<sup>nd</sup> Edition, London, UK, MacMillan Press LTD, p.49-59, 1996.
- YOSHIMOTO, M.; WANG, S.; FUKUNAGA, K.; WALDE, P.; NAKAO, K. Preparation and characterization of reactive and stable glucose oxidase-containing liposomes modulated with detergent. **Biotechnol. Bioeng.**, v.81, n.6, p.695-704, 2003.
- ZHAO, H.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; LI, Z. Use of the glucose oxidase system for the estimation of the oxygen transfer rate in a solid-state bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, n.7, p.843-846, 2002.



## **7. ANEXO I – Métodos.**

### **7.1.. Padronização dos reagentes de Somogyi-Nelson**

A padronização do método foi realizada utilizando-se o método de Somogyi-Nelson, segundo adaptação feita por TOMOTANI (2002).

#### **7.1.1. Confeção dos reagentes de Somogyi**

- Solução Alcalina (Somogyi I)

Dissolveram-se os seguintes sais em 1000 mL de água destilada:

NaHCO<sub>3</sub>.....20,0g

NaKC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.....15,0g

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.....30,0g

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....180,0g

- Solução alcalino-cúprica (Somogyi II)

Dissolveu-se 46,0g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 100mL de uma solução de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O de 40g/L e completou-se o volume da dissolução a 200mL.

- Solução arseno-molibdica (Somogyi III)

Dissolveu-se 25g de molibdato de amônio em 400mL de água destilada e 3g de arseniato de sódio em 25mL de água destilada. Adicionou-se, a seguir, o ácido sulfúrico à solução de molibdato de amônio e, a seguir, juntou-se à solução de arseniato. Completou-se o volume da solução final à 475mL.

#### **7.1.2. Preparação das soluções de glicose**

Dissolveu-se 0,1g de glicose P.A. em 100mL de água destilada. Tomou-se 20 mL da solução e completou-se essa alíquota com 100mL de água destilada, obtendo-se desta forma uma solução final com concentração de 0,2mg/mL.

#### **7.1.3. Estabelecimento da curva-padrão**

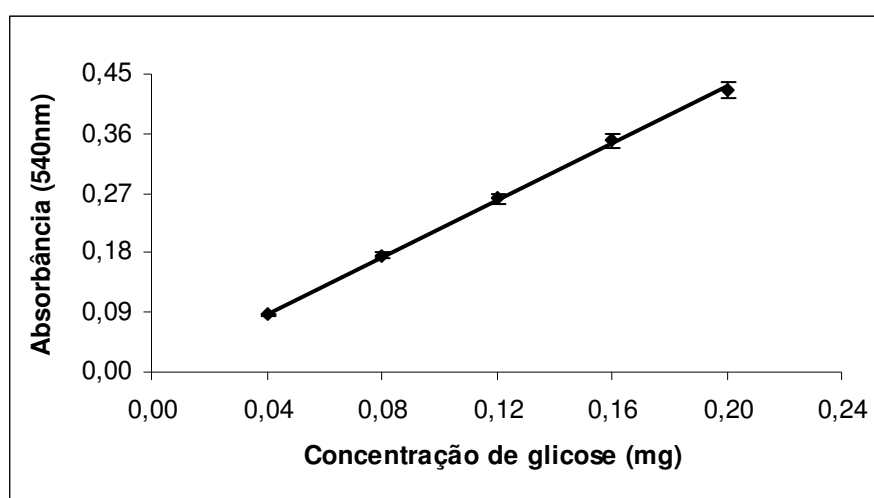
Em tubos de folin-wu colocou-se os volumes indicados na Tabela 1, sendo a mistura reativa constituída de 4 partes de Somogyi I e 1 parte de Somogyi II. A seguir, colocou-se os tubos em banho fervente por 10 min, retirando-os em seguida e os colocando em banho de gelo. Após o resfriamento, adicionou-se 2,0 mL de Somogyi III em cada tubo, agitando-os para remover os gases formados pela reação. Homogeneizaram-se os tubos e a cor desenvolvida foi lida em espectrofotômetro a 540nm, após repouso de 20 min. O procedimento foi repetido mais quatro vezes.

**Tabela 1.I.A.** Volumes indicados para o método de Somogyi-Nelson.

| tubo (nº) | Solução de glicose (mL) | H <sub>2</sub> O (mL) | Mistura Reativa (mL) | Somogyi III (mL) |
|-----------|-------------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| Branco    | -                       | 1,0                   | 1,0                  | 2,0              |
| 1         | 0,2                     | 0,8                   | 1,0                  | 2,0              |
| 2         | 0,4                     | 0,6                   | 1,0                  | 2,0              |
| 3         | 0,6                     | 0,4                   | 1,0                  | 2,0              |
| 4         | 0,8                     | 0,2                   | 1,0                  | 2,0              |
| 5         | 1,0                     | -                     | 1,0                  | 2,0              |

#### 7.1.4. Determinação do erro experimental.

O teste de Somogyi-Nelson foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental do método.



**Figura 1.I.A.** Curva Média Final de Padronização da Glicose, pelo método de Somogyi-Nelson, sendo a equação de regressão linear:  $y = 2,13x + 0,0037$  ( $r = 0,9996$ ), na qual  $y$  é a absorbância lida e  $x$ , a quantidade de glicose em miligramas. Desvio Padrão: 0,0031 mg de glicose. Coeficiente de Variação: 2,7%.

Quando algum dos reagentes de Somogyi-Nelson chegava ao fim, confeccionava-se o novo reagente e novamente fazia-se uma curva para determinar a nova equação a ser usada.

## 7.2. Determinação da dosagem de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 7.2.1. Determinação da Curva padrão.

Diluiu-se uma solução de água oxigenada 10V 50 vezes (misturou-se 1ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10V em 49ml de água destilada). Solução diluída com 0,608mg/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

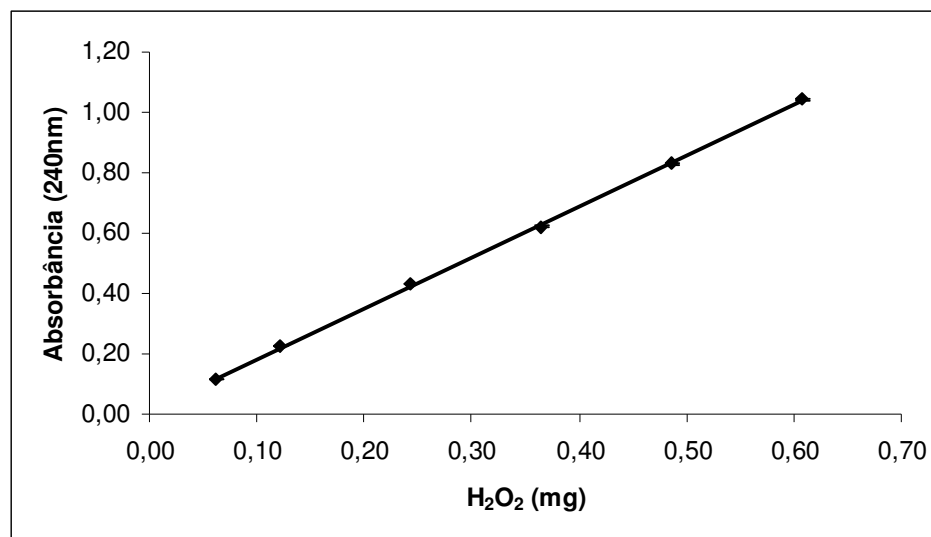
**Tabela 2.I.A.** Volumes indicados para a determinação da  $H_2O_2$ .

| <i>Tubos</i> | $H_2O_2$ (ml) | $H_2O$ (ml) | $H_2O_2$ (mg) |
|--------------|---------------|-------------|---------------|
| B            | 0             | 1,0         | 0             |
| 1            | 0,1           | 0,9         | 0,0608        |
| 2            | 0,2           | 0,8         | 0,1216        |
| 3            | 0,4           | 0,6         | 0,2432        |
| 4            | 0,6           | 0,4         | 0,3648        |
| 5            | 0,8           | 0,2         | 0,4864        |
| 6            | 1,0           | 0           | 0,6080        |

Mediu-se cada diluição a 240 nm em um espectrofotômetro (BERGMEYER, 1984).

### 7.2.2. Determinação do erro experimental.

O teste foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental do procedimento.



**Figura 2.I.A.** Curva Média Final de Padronização da Água Oxigenada, pelo método de leitura direta em  $\lambda= 240\text{nm}$ , sendo a equação de regressão linear:  $y = 1,60x + 0,049$  ( $r= 0,9994$ ), na qual  $y$  é a absorbância lida e  $x$ , a quantidade de água oxigenada (mg).

Desvio Padrão: 0,0014 mg de  $H_2O_2$ .

Coefficiente de Variação: 0,49%.

## 7.3. Determinação da proteína solúvel

### 7.3.1. Determinação da curva-padrão

Preparou-se 5 soluções de albumina, pesando-se 0,01g da proteína e acrescentando-se 5mL de solução de NaOH 5mM. Completou-se o volume até 100mL

com água destilada. Na tabela 3, são mostradas as diluições que foram realizadas na própria cubeta do espectrofotômetro:

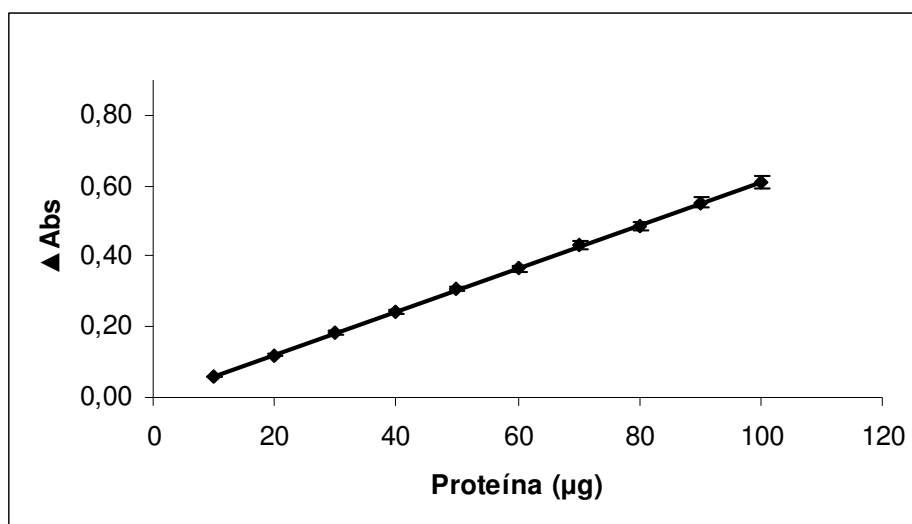
**Tabela 3.I.A.** Volumes indicados para a determinação da quantidade de proteína solúvel.

| <i>Tubo (nº)</i> | <i>Solução de albumina (mL)</i> | <i>H<sub>2</sub>O (mL)</i> |
|------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Branco           | -                               | 1,0                        |
| 1                | 0,1                             | 0,9                        |
| 2                | 0,2                             | 0,8                        |
| 3                | 0,3                             | 0,7                        |
| 4                | 0,4                             | 0,6                        |
| 5                | 0,5                             | 0,5                        |
| 6                | 0,6                             | 0,4                        |
| 7                | 0,7                             | 0,3                        |
| 8                | 0,8                             | 0,2                        |
| 9                | 0,9                             | 0,1                        |
| 10               | 1,0                             | -                          |

As absorvâncias de cada diluição foram medidas a 215nm e 225nm em espectrofotômetro (SEGEL, 1976). Para a determinação da concentração de proteína, utilizou-se a diferença entre as absorvâncias medidas.

### 7.3.2. Determinação do erro experimental.

O teste foi realizado em quintuplicata com o intuito de se determinar o erro experimental do procedimento.



**Figura 3.I.A.** Curva Média Final de Padronização de Proteína (albumina), pelo método da diferença de absorção no UV, sendo a equação de regressão linear :  $y = 0,0061x - 0,0017$  ( $r = 0,99994$ ), na qual  $y$  é a diferença de absorvância lida (215nm-225nm) e  $x$ , a quantidade de proteína ( $\mu\text{g}$ ).

Desvio Padrão: 2,0447 µg de proteína.

Coefficiente de Variação: 2,55%.

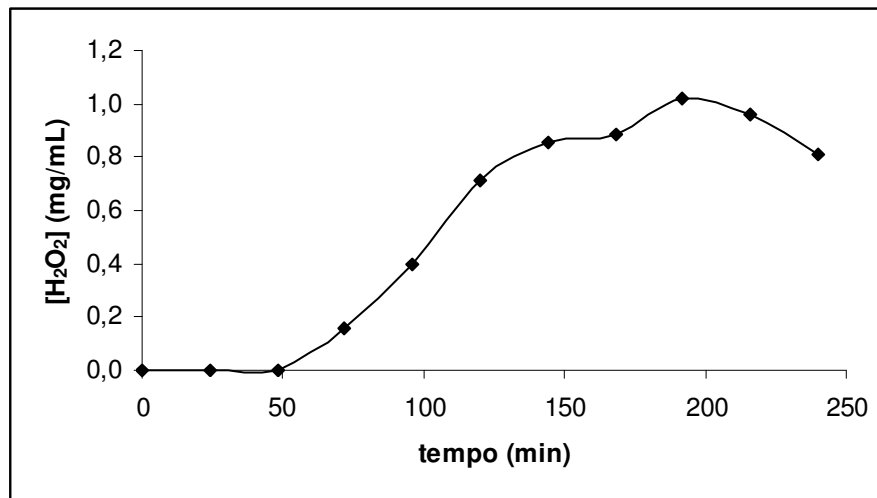
#### **7.4. Quantificação de proteína na solução original de invertase.**

Diluiu-se 1mL de invertase (MERCK®) em 49mL de água destilada (diluição 1:50) em um balão volumétrico de 50 mL. Mediu-se a absorvância da amostra nos comprimentos de onda 215nm e 225nm, conforme descrito no item anterior. A concentração de proteína na solução original de invertase era de 2,74 mg/ml.

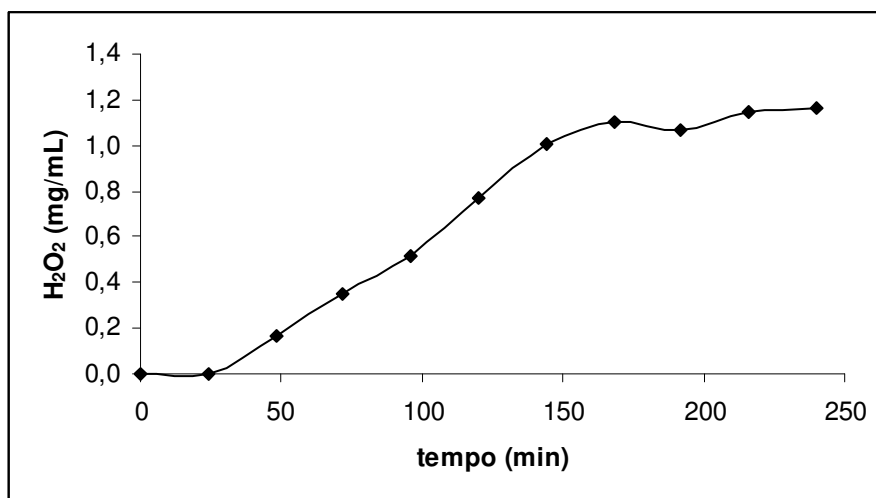
#### **7.5. Quantificação de proteína na GOD.**

Diluiu-se 180U (0,0306g) de glicose oxidase (SIGMA®) em 25mL de água destilada (diluição 1:25) em um balão volumétrico de 25 mL. Mediu-se a absorvância da amostra nos comprimentos de onda 215nm e 225nm, conforme descrito no item 7.3.1. A concentração de proteína na amostra original de GOD era 0,0248 mg de proteína/mg de sólido.

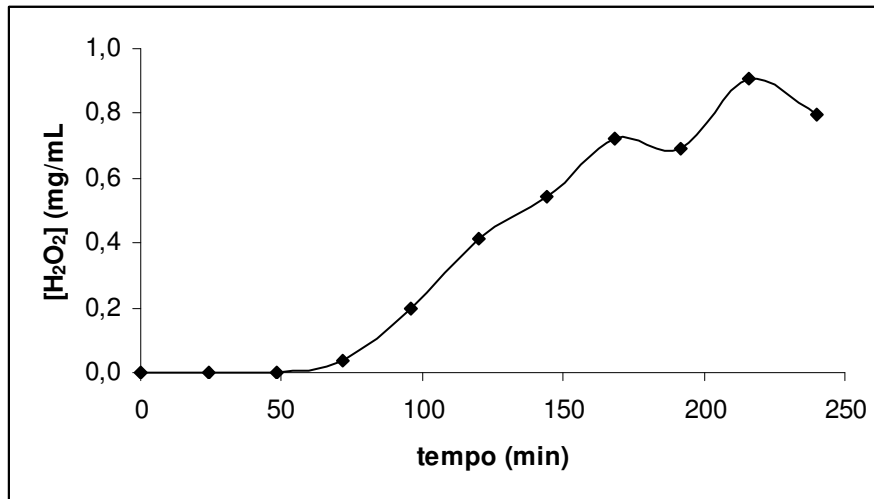
**8. ANEXO II – Gráficos de formação de água oxigenada durante conversão da glicose (32g/L) por processo descontínuo-alimentado, realizado com diferentes leis de alimentação do reator. (item 4.4.1.).**



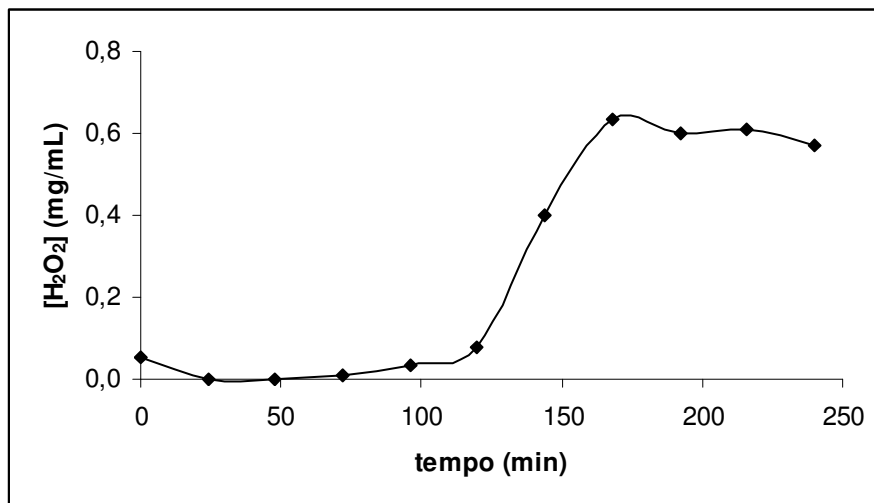
**Figura 1.II.A.** Formação de água oxigenada durante processo descontínuo-alimentado, realizado com alimentação constante.



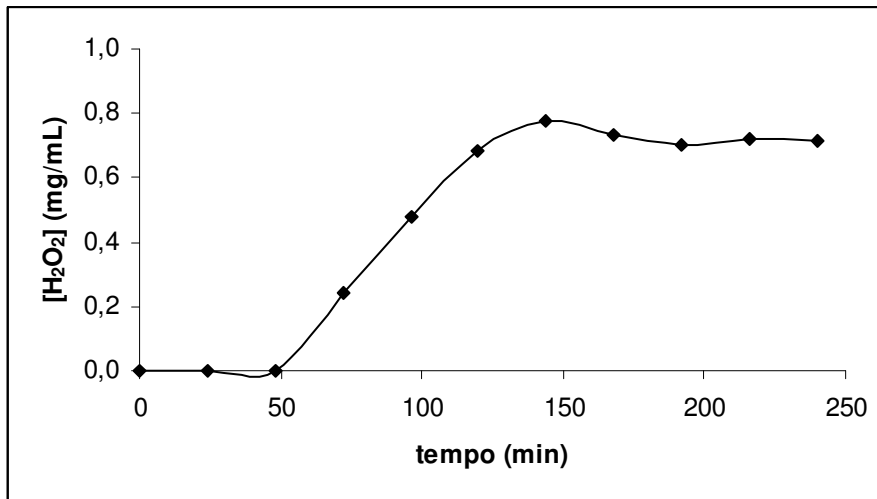
**Figura 2.II.A.** Formação de água oxigenada durante processo descontínuo-alimentado, realizado com alimentação linear decrescente.



**Figura 3.II.A.** Formação de água oxigenada durante processo descontínuo-alimentado, realizado com alimentação exponencial decrescente.



**Figura 4.II.A.** Formação de água oxigenada durante processo descontínuo-alimentado, realizado com alimentação linear crescente.



**Figura 5.II.A.** Formação de água oxigenada durante processo descontínuo-alimentado, realizado com alimentação exponencial crescente.



## 9. ANEXO III – Noção de custo do processo contínuo (com relação à sacarose).

Seguem abaixo os custos aproximados para conversão de 1 kg de sacarose (grau pA) em glicose e ácido glicônico, utilizando-se uma solução de 150g/L, com 76% de rendimento em ácido glicônico (conforme tabela 14, teste 6).

Em 15h de processo são utilizados:

- **Sacarose pA MERCK® = 208g**

1000g sacarose pA = R\$ 303,10

208g sacarose pA = **R\$ 84,87**

- **Invertase MERCK® = 0,15mL = 264,75U**

2500 mL Invertase = R\$ 700,72

0,15 mL Invertase = **R\$ 0,04**

- **Glicose oxidase SIGMA® = 13000U**

50000U GOD = R\$ 223,00

13000U GOD = **R\$ 60,00**

- **Catalase SIGMA® = 0,18g = 531000U**

5g Catalase = R\$ 260,00

0,18g Catalase = **R\$ 9,36**

- **Energia elétrica = 13,725Kwh**

1 Kwh = R\$0,30

13,725Kwh = **R\$ 4,12**

**Total = R\$ 158,40**

Para a conversão de 208g de sacarose pA, com 76% de rendimento em ácido glicônico, são gastos R\$ 158,40.

208g = R\$ 158,40

1000g = **R\$ 761,54**

Utilizando-se o reator contínuo com membrana para converter 1 kg de sacarose pA em frutose e ácido glicônico, através de solução de 150g/L e com rendimento de 76% em ácido glicônico, são gastos aproximadamente **R\$ 761,54**.

## 10. ANEXO IV – Demonstração das equações utilizadas para calcular os volumes adicionados para cada tipo de alimentação do reator.

### Alimentação constante

$$\emptyset = \frac{V_f - V_i}{\theta} \quad (1)$$

$\theta$  = tempo de enchimento do reator

$V_i$  = volume inicial do meio reacional no reator

$V_f$  = volume final do meio reacional no reator

Particularizando para o caso:  $\theta = 1\text{h}$  e  $V_f - V_i = 300\text{mL} = 0,3\text{L}$

$$\emptyset = \frac{0,3}{1} = 0,3\text{L/h}$$

Fixando o intervalo de adição em 6min (0,1h), tem-se um volume total adicionado ao reator até um dado instante ( $V_{ad}$ )

$$V_{ad} = (V_f - V_i) = \emptyset \cdot \Delta t \quad (2)$$

$$V_{ad} = 0,3 \cdot \Delta t$$

**Tabela 1.** Quantidades de solução de sacarose (64g/L) colocadas em cada intervalo de 6 minutos durante o teste com alimentação constante.

| tempo (t) (h) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol. a adic. (mL) no inst. t | massa de sac. (g) |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------|
| 0,0           | 30                            | 30                           | 1,92              |
| 0,1           | 60                            | 30                           | 1,92              |
| 0,2           | 90                            | 30                           | 1,92              |
| 0,3           | 120                           | 30                           | 1,92              |
| 0,4           | 150                           | 30                           | 1,92              |
| 0,5           | 180                           | 30                           | 1,92              |
| 0,6           | 210                           | 30                           | 1,92              |
| 0,7           | 240                           | 30                           | 1,92              |
| 0,8           | 270                           | 30                           | 1,92              |
| 0,9           | 300                           | 30                           | 1,92              |
| 1,0           | -                             | -                            |                   |

**Tabela 1.A.** Quantidades de solução de glicose (32g/L) colocadas em cada intervalo de 24 minutos durante o teste com alimentação constante.

| tempo (t) (min) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol.(mL) de sol. glic.+ cat. | massa glicose (g) |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------|
| 0               | 30                            | 30                           | 0,9600            |
| 24              | 60                            | 30                           | 0,9600            |
| 48              | 90                            | 30                           | 0,9600            |
| 72              | 120                           | 30                           | 0,9600            |
| 96              | 150                           | 30                           | 0,9600            |
| 120             | 180                           | 30                           | 0,9600            |
| 144             | 210                           | 30                           | 0,9600            |
| 168             | 240                           | 30                           | 0,9600            |
| 192             | 270                           | 30                           | 0,9600            |
| 216             | 300                           | 30                           | 0,9600            |
| 240             | -                             | -                            |                   |

### Alimentação com vazão linear decrescente

$$\dot{Q} = \dot{Q}_i - kt \quad (1)$$

$\dot{Q}$  = vazão de alimentação (L/h)

$\dot{Q}_i$  = vazão de alimentação inicial (L/h)

k = constante de adição linear (L/h<sup>2</sup>)

t = tempo de adição (h)

$$\dot{Q} = \frac{dV}{dt} \quad (2)$$

Substituindo (2) na (1)

$$\frac{dV}{dt} = \dot{Q}_i - kt$$

$$\int_{V_i}^V dV = \dot{Q}_i \int_0^t dt - k \int_0^t t \cdot dt$$

$$V_{ad} = \Delta V = (V - V_i) = \dot{Q}_i \cdot t - k \cdot \frac{t^2}{2} \quad (3)$$

Tem-se que: para t =  $\theta$  (**tempo total para adição**), então V = V<sub>f</sub>

Substituindo na equação (3):

$$(V_f - V_i) = \dot{Q}_i \cdot \theta - (k \cdot \theta^2)/2 \quad (4)$$

Mas, para t =  $\theta$ ,  $\dot{Q} = 0$  (imposição inicial já que a alimentação é linear decrescente)

Da equação (1):

$$\dot{Q}_i = k \cdot \theta \quad (5)$$

Particularizando: (V<sub>f</sub> - V<sub>i</sub>) = 0,3L e  $\theta = 1h$

Da equação (4) tem-se:

$$0,3 = \dot{Q}_i - k/2 \quad (6)$$

Da equação (5), tem-se

$$Q_i = k \quad (7)$$

Resolvendo o sistema formado pelas equações (6) e (7):

$$0,3 = k - k/2 = k/2$$

$$k = 0,6 \text{ (L/h}^2\text{)} \text{ e } Q_i = 0,6 \text{ (L/h)}$$

Substituindo os valores de  $k$  e  $Q_i$  na equação (3)

$$V_{ad} = (V - V_i) = 0,6.t - 0,3.t^2 \quad (8)$$

Fazendo  $\Delta t = 6\text{min (0,1h)}$

$$V_{ad} = 0,6t - 0,3.t^2$$

**Tabela 2.** Quantidades de solução de sacarose (64g/L) colocadas em cada intervalo de 6 minutos durante o teste com alimentação linear decrescente.

| tempo (t) (h) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol. a adic. (mL) no inst. t | massa sac. (g) |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| 0,0           | 57                            | 57                           | 3,648          |
| 0,1           | 108                           | 51                           | 3,264          |
| 0,2           | 153                           | 45                           | 2,880          |
| 0,3           | 192                           | 39                           | 2,496          |
| 0,4           | 225                           | 33                           | 2,112          |
| 0,5           | 252                           | 27                           | 1,728          |
| 0,6           | 273                           | 21                           | 1,344          |
| 0,7           | 288                           | 15                           | 0,960          |
| 0,8           | 297                           | 9                            | 0,576          |
| 0,9           | 300                           | 3                            | 0,192          |
| 1,0           | -                             | -                            |                |

**Tabela 2.A.** Quantidades de solução de glicose (32g/L) colocadas em cada intervalo de 24 minutos durante o teste com alimentação linear decrescente.

| tempo (t) (min) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol.(mL) de sol. glic.+ cat. | massa glicose (g) |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------|
| 0               | 57                            | 57                           | 1,8240            |
| 24              | 108                           | 51                           | 1,6320            |
| 48              | 153                           | 45                           | 1,4400            |
| 72              | 192                           | 39                           | 1,2480            |
| 96              | 225                           | 33                           | 1,0560            |
| 120             | 252                           | 27                           | 0,8640            |
| 144             | 273                           | 21                           | 0,6720            |
| 168             | 288                           | 15                           | 0,4800            |
| 192             | 297                           | 9                            | 0,2880            |
| 216             | 300                           | 3                            | 0,0960            |
| 240             | -                             | -                            |                   |

### Alimentação com vazão linear crescente

$$\dot{Q} = \dot{Q}_i + k \cdot \theta \quad (1)$$

$\dot{Q}$  = vazão de alimentação (L/h)

$\dot{Q}_i$  = vazão de alimentação inicial (L/h)

k = constante de adição linear (L/h<sup>2</sup>)

$\theta$  = tempo de adição (h)

$$\dot{Q} = \frac{dV}{dt} \quad (2)$$

Igualando (1) e (2)

$$\frac{dV}{dt} = \dot{Q}_i + k \cdot t$$

$$\int_{V_i}^V dV = \dot{Q}_i \int_0^t dt + k \int_0^t t \cdot dt$$

$$V_{ad} = (V - V_i) = \dot{Q}_i \cdot t + k \cdot t^2 / 2 \quad (3)$$

Temos: quando  $t = \theta \rightarrow V = V_f$

Logo

$$(V_f - V_i) = \dot{Q}_i \cdot \theta + (k \cdot \theta^2) / 2 \quad (4)$$

Como a adição é linear crescente, por questão de lógica, a vazão inicial sendo mínima, seu menor valor será zero, ou seja

$$\dot{Q}_i = 0$$

Finalmente, a equação (3) fica desta forma

$$V_{ad} = (V - V_i) = (k \cdot t^2) / 2 \quad (5)$$

Particularizando,  $(V_f - V_i) = 0,3L$  e  $\theta = 1h$  e aplicando a equação (4)

$$0,3 = k/2$$

$$k = 0,6L/h^2$$

$$\dot{Q}_i = 0$$

$$V_{ad} = (0,6 \cdot t^2) / 2$$

$$V_{ad} = 0,3 \cdot t^2$$

**Tabela 3.** Quantidades de solução de sacarose (64g/L) colocadas em cada intervalo de 6 minutos durante o teste com alimentação linear crescente.

| tempo (t) (h) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol. a adic. (mL) no inst. t | massa sac. (g) |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| 0,0           | 3                             | 3                            | 0,192          |
| 0,1           | 12                            | 9                            | 0,576          |
| 0,2           | 27                            | 15                           | 0,960          |
| 0,3           | 48                            | 21                           | 1,344          |
| 0,4           | 75                            | 27                           | 1,728          |
| 0,5           | 108                           | 33                           | 2,112          |
| 0,6           | 147                           | 39                           | 2,496          |
| 0,7           | 192                           | 45                           | 2,880          |
| 0,8           | 243                           | 51                           | 3,264          |
| 0,9           | 300                           | 57                           | 3,648          |
| 1,0           | -                             | -                            |                |

**Tabela 3.A.** Quantidades de solução de glicose (32g/L) colocadas em cada intervalo de 24 minutos durante o teste com alimentação linear crescente.

| tempo (t) (min) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol.(mL) de sol. glic.+ cat. | M glicose (g) |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|---------------|
| 0               | 3                             | 3                            | 0,0960        |
| 24              | 12                            | 9                            | 0,2880        |
| 48              | 27                            | 15                           | 0,4800        |
| 72              | 48                            | 21                           | 0,6720        |
| 96              | 75                            | 27                           | 0,8640        |
| 120             | 108                           | 33                           | 1,0560        |
| 144             | 147                           | 39                           | 1,2480        |
| 168             | 192                           | 45                           | 1,4400        |
| 192             | 243                           | 51                           | 1,6320        |
| 216             | 300                           | 57                           | 1,8240        |
| 240             | -                             | -                            |               |

### Alimentação com vazão exponencial decrescente

$$\dot{V} = \dot{V}_i e^{-k't} \quad (1)$$

$\dot{V}$  = vazão de alimentação (L/h)

$\dot{V}_i$  = vazão de alimentação inicial (L/h)

$k'$  = constante de adição exponencial ( $h^{-1}$ )

$t$  = tempo de adição (h)

lembrando que

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt}, \text{ então}$$

$$\frac{dV}{dt} = \dot{V}_i e^{-kt}$$

$$\int_{V_i}^V dV = \Phi i \cdot \int_0^t e^{-kt} \cdot dt$$

$$\int_0^t e^{-kt} \cdot dt =$$

$$-k \cdot t = y$$

$$\frac{dy}{dt} = -k \rightarrow dt = \frac{dy}{k}$$

$$\int_0^{-kt} e^y \left(-\frac{dy}{k}\right) = -\frac{1}{k} \cdot \int_0^{-k \cdot t} e^y \cdot dy$$

$$= -\frac{1}{k} [e^{-kt} - e^0] = -\frac{1}{k} [e^{-kt} - 1]$$

$$\int_0^t e^{-kt} \cdot dt$$

$$V_{ad} = (V - V_i) = -\frac{\Phi i}{k} \cdot (e^{-kt} - 1) \quad (2)$$

Quando  $t = \theta$ ,  $V = V_f$ , logo:

$$(V_f - V_i) = -\frac{\Phi i}{k} \cdot (e^{-k\theta} - 1) \quad (3)$$

Rearranjando a equação (2)

$$\frac{-\Phi i}{k} = (V - V_i) / (e^{-kt} - 1) \quad (4)$$

Substituindo a equação (4) na equação (3)

$$(V_f - V_i) = (V - V_i) / (e^{-k \cdot t} - 1) \cdot (e^{-k \cdot \theta} - 1)$$

$$V_{ad} = (V - V_f) = (V_f - V_i) \cdot [(e^{-kt} - 1) / (e^{-k \cdot \theta} - 1)] \quad (5)$$

Particularizando:

$$(V_f - V_i) = 0,3L; \theta = 1h \text{ e } k = 0,5h^{-1}$$

$$V_{ad} = 0,3 \cdot [(e^{-0,5 \cdot t} - 1) / (e^{-0,5 \cdot 1} - 1)] = 0,3 [(e^{-0,5 \cdot t} - 1) / (-0,3937)]$$

$$V_{ad} = 0,7621 - 0,7621 \cdot e^{-0,5 \cdot t}$$

**Tabela 4.** Quantidades de solução de sacarose (64g/L) colocadas em cada intervalo de 6 minutos durante o teste com alimentação exponencial decrescente.

| tempo (t) (h) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol. a adic. (mL) no inst. t | massa sac. (g) |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| 0,0           | 37,2                          | 37,2                         | 2,3808         |
| 0,1           | 72,6                          | 35,4                         | 2,2656         |
| 0,2           | 106,2                         | 33,6                         | 2,1504         |
| 0,3           | 138,2                         | 32,0                         | 2,0480         |
| 0,4           | 168,7                         | 30,5                         | 1,9520         |
| 0,5           | 197,6                         | 28,9                         | 1,8496         |
| 0,6           | 225,2                         | 27,6                         | 1,7664         |
| 0,7           | 251,4                         | 26,2                         | 1,6768         |
| 0,8           | 276,3                         | 24,9                         | 1,5936         |
| 0,9           | 300,0                         | 23,7                         | 1,5168         |
| 1,0           | -                             | -                            |                |

**Tabela 4.A.** Quantidades de solução de glicose (32g/L) colocadas em cada intervalo de 24 minutos durante o teste com alimentação exponencial decrescente.

| tempo (t) (min) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol.(mL) de sol. glic.+ cat. | massa glicose (g) |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------|
| 0               | 37,2                          | 37,2                         | 1,1904            |
| 24              | 72,6                          | 35,4                         | 1,1328            |
| 48              | 106,2                         | 33,6                         | 1,0752            |
| 72              | 138,2                         | 32,0                         | 1,0240            |
| 96              | 168,7                         | 30,5                         | 0,9760            |
| 120             | 197,6                         | 28,9                         | 0,9248            |
| 144             | 225,2                         | 27,6                         | 0,8832            |
| 168             | 251,4                         | 26,2                         | 0,8384            |
| 192             | 276,3                         | 24,9                         | 0,7968            |
| 216             | 300,0                         | 23,7                         | 0,7584            |
| 240             | -                             | -                            |                   |

#### Alimentação com vazão exponencial crescente

$$\dot{Q} = \dot{Q}_i \cdot e^{k \cdot t} \quad (1)$$

$\dot{Q}_i$  = vazão inicial de alimentação (L/h)

$k'$  = constante de adição exponencial ( $h^{-1}$ )

$t$  = tempo de adição (h)

$$\frac{dV}{dt} = \dot{Q}_i \cdot e^{k \cdot t}$$

$$\int_{V_i}^V dV = \dot{Q}_i \cdot \int_0^t e^{k \cdot t} \cdot dt$$

$$\int_0^t e^{k \cdot t} \cdot dt$$

$$y = k \cdot t$$

$$\frac{dy}{dt} = k \rightarrow dt = \frac{dy}{k}$$

$$\int_0^t e^{k \cdot t} \cdot dt = \int_0^{kt} e^y \cdot \frac{dy}{k} =$$

$$= \frac{1}{k} \cdot [e^{k \cdot t} - e^0] = \frac{1}{k} \cdot (e^{k \cdot t} - 1)$$

$$V - V_i = \frac{\dot{Q}_i}{k} \cdot (e^{k \cdot t} - 1) \quad (2)$$

Quando  $t = \theta$ ,  $V = V_f$ , logo:

$$V_f - V_i = \frac{\dot{Q}_i}{k} \cdot (e^{k \cdot \theta} - 1) \quad (3)$$

Rearranjando a equação (3)

$$\frac{\dot{Q}_i}{k} = (V - V_i) / (e^{k \cdot t} - 1) \quad (4)$$



Substituindo a equação (4) na eq. (3)

$$(V_f - V_i) = [(V - V_i)/(e^{k \cdot t} - 1)] \cdot (e^{k \cdot \theta} - 1)$$

$$V_{ad} = (V - V_i) = (V_f - V_i) \cdot [(e^{k \cdot t} - 1)/(e^{k \cdot \theta} - 1)] \quad (5)$$

Particularizando:

$$(V_f - V_i) = V_{ad} = 0,3 \cdot [(e^{0,5 \cdot t} - 1)/(e^{0,5 \cdot 1} - 1)]$$

$$V_{ad} = 0,4621 \cdot e^{0,5 \cdot t} - 0,4621$$

**Tabela 5.** Quantidades de solução de sacarose (64g/L) colocadas em cada intervalo de 6 minutos durante o teste com alimentação exponencial crescente.

| tempo (t) (h) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol. a adic. (mL) no inst. t | massa sac. (g) |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| 0,0           | 23,7                          | 23,7                         | 1,5168         |
| 0,1           | 48,6                          | 24,9                         | 1,5936         |
| 0,2           | 74,8                          | 26,2                         | 1,6768         |
| 0,3           | 102,4                         | 27,6                         | 1,7664         |
| 0,4           | 131,3                         | 28,9                         | 1,8496         |
| 0,5           | 161,8                         | 30,5                         | 1,9520         |
| 0,6           | 193,8                         | 32,0                         | 2,0480         |
| 0,7           | 227,4                         | 33,6                         | 2,1504         |
| 0,8           | 262,8                         | 35,4                         | 2,2656         |
| 0,9           | 300,0                         | 37,2                         | 2,3808         |
| 1,0           | -                             | -                            |                |

**Tabela 5.A.** Quantidades de solução de glicose (32g/L) colocadas em cada intervalo de 24 minutos durante o teste com alimentação exponencial crescente.

| tempo (t) (min) | Vol. adic. (mL) até o inst. t | Vol.(mL) de sol. glic.+ cat. | M glicose (g) |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|---------------|
| 0               | 23,7                          | 23,7                         | 0,7584        |
| 24              | 48,6                          | 24,9                         | 0,7968        |
| 48              | 74,8                          | 26,2                         | 0,8384        |
| 72              | 102,4                         | 27,6                         | 0,8832        |
| 96              | 131,3                         | 28,9                         | 0,9248        |
| 120             | 161,8                         | 30,5                         | 0,9760        |
| 144             | 193,8                         | 32,0                         | 1,0240        |
| 168             | 227,4                         | 33,6                         | 1,0752        |
| 192             | 262,8                         | 35,4                         | 1,1328        |
| 216             | 300,0                         | 37,2                         | 1,1904        |
| 240             | -                             | -                            |               |

## 11. ANEXO V – Resumos submetidos a eventos.



### **Bioconversão Enzimática da Sacarose por Processo Descontínuo-alimentado**

**Fadi Antoine Taraboulsi Júnior, Ester Junko Yoriyaz, Michele Vitolo**

Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, bloco 16 – Av. Lineu Prestes, nº 580, Butantã – Cidade Universitária, São Paulo – SP, CEP: CEP: 05508-900.  
E-mail: fadijr@usp.br

#### **RESUMO**

*Neste trabalho, avaliou-se a hidrólise da sacarose pela invertase ( $K_m = 40,2 \text{ mM}$  e  $V_{m\acute{a}x} = 6,44 \times 10^{-2} \text{ mg ART/min.mL}$ ) em processo descontínuo-alimentado. A hidrólise foi executada com invertase ( $0,0353 \text{ U/mL}$  de meio reacional) a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,0$  e sob agitação ( $100\text{rpm}$ ). A solução de sacarose ( $64\text{g/L}$ ) foi adicionada segundo as leis de adição: constante ( $F = [V_f - V_0] \div t_f$ ), linear crescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot t + (k \cdot t^2) \div 2$ ), linear decrescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot t - (k \cdot t^2) \div 2$ ), exponencial crescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot [e^{kt} - 1] \div k$ ) e exponencial decrescente ( $[V - V_0] = -F_0 \cdot [e^{-kt} - 1] \div k$ ). O tempo total de adição da solução substrato foi de 1h, sendo o volume inicial de meio no reator igual a  $100\text{mL}$  e o volume final  $400\text{mL}$  em todos os testes. A cada 6min foram tomadas alíquotas para fins analíticos. Obteve-se 100% de conversão, quando a solução substrato foi adicionada segundo as leis linear decrescente (atividade invertásica média de  $0,40 \times 10^3 \text{ U/mL}$ ) e exponencial decrescente (atividade invertásica média de  $0,35 \times 10^3 \text{ U/mL}$ ).*

**Palavras-chave:** Bioconversão, enzima microbiana, processo descontínuo-alimentado

**Apoio financeiro / Bolsa:** CNPQ.

**Apresentação:** Pôster.



UEM

Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Tecnologia  
Departamento de Engenharia Química  
IX SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS  
Maringá, 23 a 27 de novembro de 2009



## BIOCONVERSÃO DA SACAROSE EM AÇÚCAR INVERTIDO E DA GLICOSE EM ÁCIDO GLICÔNICO, ATRAVÉS DE PROCESSO DESCONTÍNUO-ALIMENTADO

Fadi Antoine Taraboulsi Júnior\*, Ester Junko Tomotani, Michele Vitolo  
Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas –  
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, bloco 16 – Av. Lineu Prestes, nº 580, Butantã – Cidade Universitária, São Paulo – SP, CEP: CEP: 05508-900.  
E-mail: fadijr@usp.br

### RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se a hidrólise da sacarose pela invertase ( $K_m = 40,2 \text{ mM}$  e  $V_{m\acute{a}x} = 6,44 \times 10^{-2} \text{ mg ART/min.mL}$ ) assim como a conversão da glicose em ácido glicônico, pela ação da glicose oxidase ( $K_m = 15,63 \text{ mM}$  e  $V_{m\acute{a}x} = 3,41 \times 10^{-3} \text{ mg de H}_2\text{O}_2 \text{ formado/min.mL}$ ), ambas em processo descontínuo-alimentado. As hidrólises foram executadas com invertase ( $0,0353 \text{ U/mL}$  de meio reacional) a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,0$  e sob agitação ( $100\text{rpm}$ ) e glicose oxidase ( $0,00098 \text{ U/mL}$  de meio de reação) a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,1$  e  $100\text{rpm}$ . A solução de substrato ( $64\text{g/L}$ -sacarose;  $32\text{g/L}$ -glicose) foi adicionada segundo as seguintes leis: constante ( $F = [V_f - V_0] \div t_f$ ), linear crescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot t + (k \cdot t^2) \div 2$ ), linear decrescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot t - (k \cdot t^2) \div 2$ ), exponencial crescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot [e^{kt} - 1] \div k$ ) e exponencial decrescente ( $[V - V_0] = -F_0 \cdot [e^{-kt} - 1] \div k$ ). O tempo total de adição do substrato foi de 1h para sacarose e 4h para glicose, sendo o volume inicial de meio igual a 100mL e o volume final 400mL. Para os dois substratos, as adições linear e exponencial decrescentes foram as mais eficientes, obtendo-se hidrólise completa da sacarose e conversão de 72% para a oxidação da glicose.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioconversão, enzima microbiana, processo descontínuo-alimentado.

**Apoio financeiro / Bolsa:** CNPQ.

**Apresentação:** Pôster.

## 12. ANEXO VI – Trabalho completo publicado em anais de eventos.



### **Bioconversão Enzimática da Sacarose por Processo Descontínuo-alimentado**

**Fadi Antoine Taraboulsi Júnior, Ester Junko Yoriyaz, Michele Vitolo**

Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, bloco 16 – Av. Lineu Prestes, nº 580, Butantã – Cidade Universitária, São Paulo – SP, CEP: CEP: 05508-900.  
E-mail: fadijr@usp.br

#### **RESUMO**

*Neste trabalho, avaliou-se a hidrólise da sacarose pela invertase ( $K_m = 40,2 \text{ mM}$  e  $V_{máx} = 6,44 \times 10^{-2} \text{ mg ART/min.mL}$ ) em processo descontínuo-alimentado. A hidrólise foi executada com invertase ( $0,0353 \text{ U/mL}$  de meio reacional) a  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,0$  e sob agitação ( $100\text{rpm}$ ). A solução de sacarose ( $64\text{g/L}$ ) foi adicionada segundo as leis de adição: constante ( $F = [V_f - V_0] \div t_f$ ), linear crescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot t + (k \cdot t^2) \div 2$ ), linear decrescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot t - (k \cdot t^2) \div 2$ ), exponencial crescente ( $[V - V_0] = F_0 \cdot [e^{kt} - 1] \div k$ ) e exponencial decrescente ( $[V - V_0] = -F_0 \cdot [e^{-kt} - 1] \div k$ ). O tempo total de adição da solução substrato foi de 1h, sendo o volume inicial de meio no reator igual a  $100\text{mL}$  e o volume final  $400\text{mL}$  em todos os testes. A cada 6min foram tomadas alíquotas para fins analíticos. Obteve-se 100% de conversão, quando a solução substrato foi adicionada segundo as leis linear decrescente (atividade invertásica média de  $0,40 \times 10^3 \text{ U/mL}$ ) e exponencial decrescente (atividade invertásica média de  $0,35 \times 10^3 \text{ U/mL}$ ).*

**Palavras-chave:** Bioconversão, enzima microbiana, processo descontínuo-alimentado.

#### **INTRODUÇÃO**

O ciclo de produção de cana e o uso dos seus produtos (etanol, bagaço e açúcar) - com destaque para o etanol, combustível ecológico, limpo e renovável, produto importante para a autonomia energética do país - representam hoje uma grande contribuição à redução das emissões globais de  $\text{CO}_2$  (MACEDO, 2006). O Brasil é reconhecidamente uma potência sucroalcooleira mundial, haja vista a área plantada (acima de 5 milhões de hectares), as quantidades de cana colhida (não inferior a 300 milhões de toneladas/ano) e de etanol (acima de 20 bilhões de litros/ano) e açúcar (maior que 20 milhões de toneladas/ano) produzidos.

Embora a sacarose seja um produto de mercado consolidado, a busca de processos alternativos, que a utilizam como matéria-prima, para, inclusive, obter derivados de maior valor agregado (glicose, açúcar invertido, xarope de frutose, frutooligosacarídeos, ésteres de sacarose), pode contribuir com ganhos extras para o setor sucro-alcooleiro ou para redirecionar sua produção nos períodos de oscilação do mercado mundial de açúcar. Inclusive, o açúcar invertido, “per se” um produto de valor comercial (usado como adoçante ou fonte de carbono em meios para fermentação, por exemplo), pode ser usado para a obtenção de outros produtos, como o ácido glicônico, que é muito usado na indústria química e farmacêutica (TOMOTANI, 2006). No caso em que a demanda pelo açúcar cai, os armazéns abarrotados do produto têm seu custo de estocagem aumentado, além da deterioração do produto com o tempo, já que o açúcar é muito higroscópico. A possível conversão do excesso de açúcar refinado em etanol combustível acarreta perda financeira, haja vista o etanol ter valor agregado inferior ao do açúcar refinado.

A hidrólise da sacarose, originalmente feita com HCl concentrado e à temperatura de 85°C, pode ser conduzida pelo uso de enzimas hidrolíticas como a  $\alpha$ -glicosidase ou a invertase, sendo esta última a mais usada (VITOLLO, 2004). As vantagens da hidrólise enzimática repousam nas condições mais brandas de reação (pH: 4,5 a 5,0 e temperatura: 30°C a 45°C), na obtenção de hidrolisado sem impurezas (por exemplo, produtos de ciclização da glicose e da frutose em pH ácido forte e temperatura elevada, como furfural e hidroximetilfurfural) e na geração de efluentes inofensivos ao meio ambiente. A literatura sobre a hidrólise da sacarose com a invertase (EC.3.2.1.26) é muito extensa (VITOLLO, 2004). Porém, a conversão enzimática da sacarose por processo descontínuo-alimentado, visando a conversões por sistemas reacionais multienzimáticos (como a conversão direta da sacarose em frutose e ácido glicônico na presença de invertase, glicose oxidase e catalase), ainda, não foi explorada.

Neste trabalho, foi avaliada a conversão enzimática da sacarose por processo descontínuo-alimentado, sendo a solução substrato adicionada ao reator (64g/L), segundo diferentes leis de adição; a saber, constante, linear crescente, linear decrescente, exponencial crescente e exponencial decrescente. As estratégias de alimentação do reator foram estabelecidas, levando em conta o uso de soluções concentradas de sacarose (acima de 50g/L) a serem hidrolisadas pela invertase, sem que a enzima sofra inibição pelo substrato (VITOLLO, 2004).

## MATERIAL E MÉTODOS

A invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Invertin®, lote: K31583338) e a sacarose (lote: K29959887 218) foram obtidas da MERCK®. Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Beckman-Coulter (Modelo DU 640).

### Processo descontínuo-alimentado

Em um béquer de 500mL de capacidade colocou-se 100mL de tampão acetato 0,05M (pH 5,0) e invertase (1,765 U). O enchimento do béquer foi feito em 1h até o volume final de 400mL pela adição de 300mL da solução de sacarose (64g/L), de acordo com uma lei de adição [constante, linear crescente, linear decrescente, exponencial crescente ou exponencial decrescente]. A reação foi feita sob agitação constante (100rpm) a 37°C. A cada 6min foram retiradas amostras para fins analíticos.

As leis para a adição da solução de sacarose foram: **Adição constante** [ $F = (V_f - V_0) \div t_f$ ]; **Adição linear crescente** [ $(V - V_0) = F_0 \cdot t + (k \cdot t^2) \div 2$ ]; **Adição linear decrescente** [ $(V - V_0) = F_0 \cdot t - (k \cdot t^2) \div 2$ ]; **Adição exponencial crescente** [ $(V - V_0) = F_0 \cdot (e^{kt} - 1) \div k$ ]; e, **Adição exponencial decrescente** [ $(V - V_0) = - F_0 \cdot (e^{-kt} - 1) \div k$ ].

Onde  $F$  = vazão de alimentação (L/h);  $F_0$  = vazão inicial de alimentação;  $V_0$  = volume inicial de meio reacional (L);  $V$  = volume de meio reacional (L) em um dado instante ( $t$ ) (L);  $V_f$  = volume final do meio reacional (L);  $t_f$  = tempo total de adição (h);  $k$  = constante de adição.

Os parâmetros de reação (temperatura e pH) do processo descontínuo-alimentado, foram estabelecidos através da avaliação da atividade invertásica frente ao pH (3,5 – 6,0) e à temperatura (30°C – 50°C) (Figuras 2 e 3). Para fixar o tempo total de reação, fez-se o estudo da estabilidade da invertase frente à temperatura (fixada em 37°C) e ao pH (4,6 e 5,0) (Figura 4).

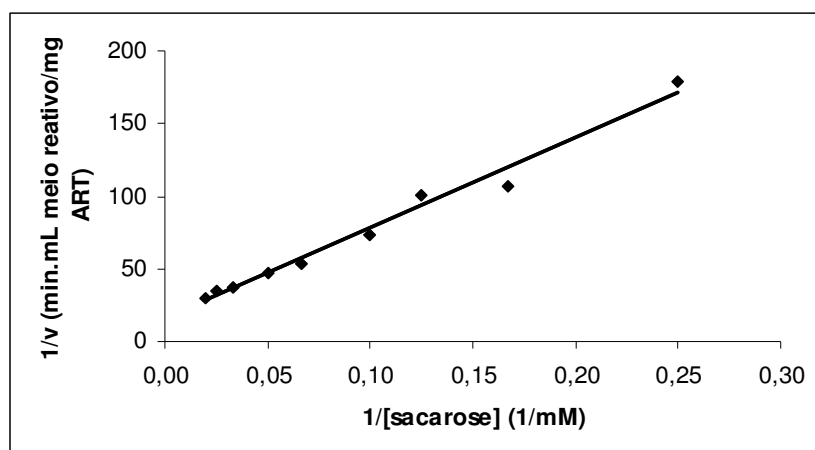
### Procedimentos Analíticos

#### Dosagem dos açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada usando-se o método de Somogyi-Nelson, segundo adaptação feita por TOMOTANI (2002). A curva-padrão foi feita usando-se solução aquosa de glicose pA na concentração de 0,2 mg/mL.

#### Medida da atividade da invertase (ensaio padrão)

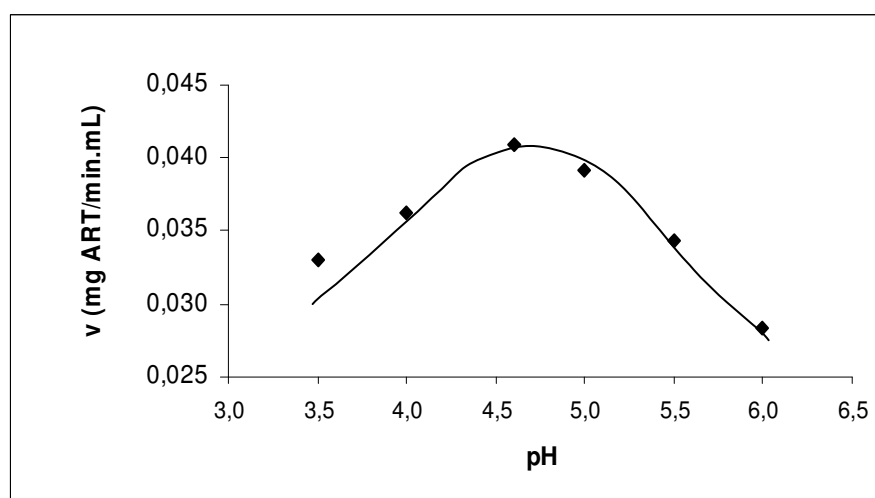
Em um banho-maria a 37°C colocava-se um becker com capacidade de 250 mL contendo 108 mL de solução tampão acetato 0,01M (pH 5,0). Após 10 minutos dissolvia-se sob agitação 12 g de sacarose. Depois de cinco minutos exatos adicionava-se 12 mL de solução aquosa de invertase (diluída 5000 vezes). Disparava-se o cronômetro, passando-se a retirar alíquotas de 0,5 mL do meio reacional a intervalos de 1 minuto até completar o tempo total de seis minutos. A unidade de atividade da invertase (U) foi definida como a quantidade em gramas de açúcares redutores formados por minuto nas condições do ensaio. A invertase utilizada neste trabalho tinha atividade igual 0,0353 U/mL. Através do método convencional de Lineweaver-Burk (Figura 1) determinaram-se as constantes cinéticas da enzima, sendo  $K_M = 40,2\text{mM}$  e  $V_{\max} = 0,0644 \text{ mg ART/min.mL}$ . Ressalta-se que este valor de  $K_M$  está dentro do intervalo (25mM – 100mM) encontrado na literatura (VITOLLO 2004).



**Figura 1. Variação do inverso da velocidade frente ao inverso da concentração de substrato, segundo o método de Lineweaver-Burk. A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é:  $y = 624,19x + 15,52$  ( $r = 0,991$ ).**

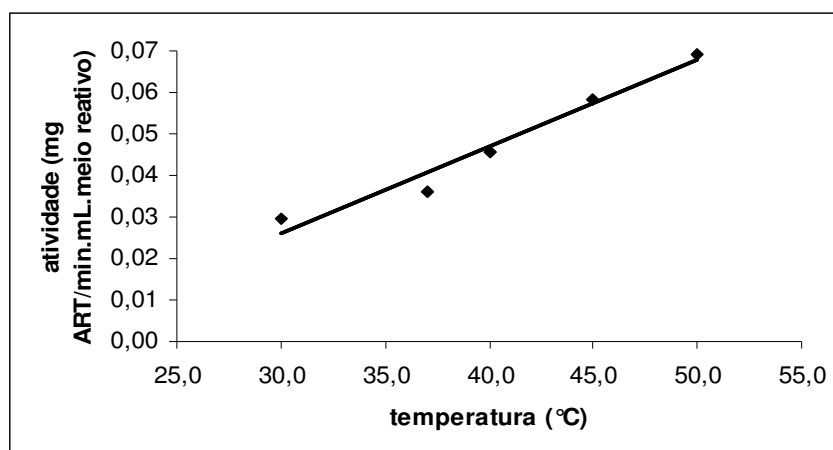
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da Figura 2, observa-se que a maior atividade (0,041 U/mL de meio) ocorreu em pH 4,6, corroborando o estabelecido pela literatura para a invertase, que se situa na faixa 4,5-5,0 (TOMOTANI, 2006; MANSOUR e DAWOUD, 2003).



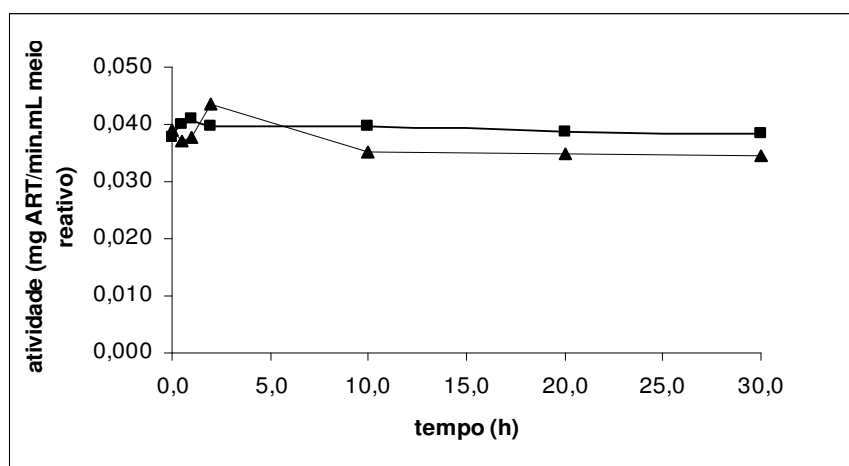
**Figura 2. Atividade da invertase frente ao pH.**

Observa-se da Figura 3 que a atividade da invertase aumenta linearmente com a temperatura, quando esta é variada no intervalo de 30°C a 50°C. Segundo TOMOTANI (2002), a atividade da invertase começa a diminuir à temperatura superior a 55-60°C. Entretanto, a experiência mostra não ser interessante realizar a hidrólise à temperatura superior a 60°C, porque a velocidade da hidrólise ácida da sacarose aumenta, assim como a concentração de produtos colaterais indesejados (furfural, dentre outros).



**Figura 3. Atividade da invertase frente à temperatura. A equação da reta, obtida pelo método dos mínimos quadrados, é:  $y = 0,0021x - 0,0358$  ( $r = 0,98$ ).**

Aplicando o método convencional de Arrhenius [ $\text{Log } v = f(1/T)$ ] aos dados mostrados na Figura 3, obteve-se a reta de regressão linear:  $\text{Log } v = - 4360,1.(1/T) + 10,831$  ( $r = 0,990$ ). Por conseguinte, a energia de ativação e a entalpia da reação de hidrólise da sacarose pela invertase foram, respectivamente, iguais a 36,3 kJ/mol e 34,0 kJ/mol.



**Figura 4. Estabilidade da invertase à temperatura de 37°C em pH = 4,6 (▲) e 5,0 (■).**

A invertase mostrou-se estável em pH 5,0 por um tempo total de 30h a 37°C. No entanto, em pH 4,6 por 30h e à mesma temperatura, a enzima, também, mostrou-se estável, embora com uma diminuição pequena de atividade, da ordem de 10% (Figura 4). Esse resultado ratifica o estudo realizado por KERN e colaboradores (1992), no qual diferentes formas de invertase não tiveram redução de sua atividade quando tratadas por 42 h em pHs entre 4,5 e 6,0 e à 30°C.

Nas Figuras 5 e 6 são apresentadas as curvas de formação do ART em função do tempo, para os ensaios descontínuo-alimentados, cujas equações, representativas das leis de adição de substrato utilizadas, são mostradas na Tabela 1.



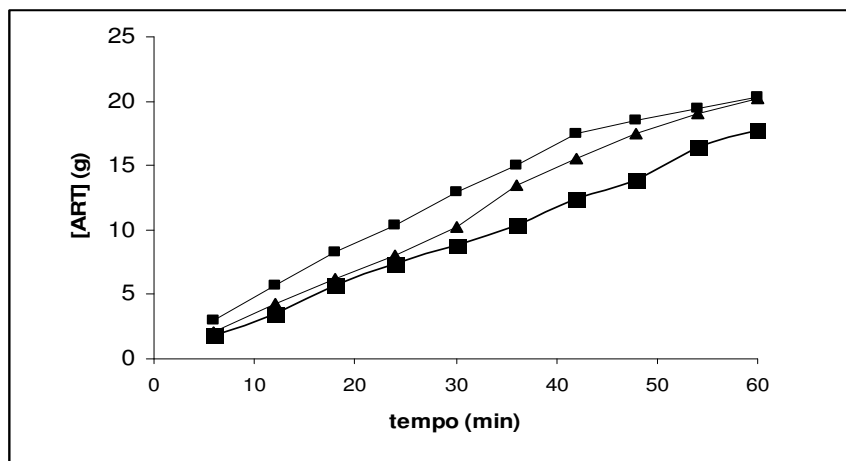


Figura 5. Formação de açúcares redutores durante processos descontínuo-alimentados, nos quais a solução de sacarose (64g/L) foi adicionada segundo as leis: constante (■); linear decrescente (◻); exponencial decrescente(▲).

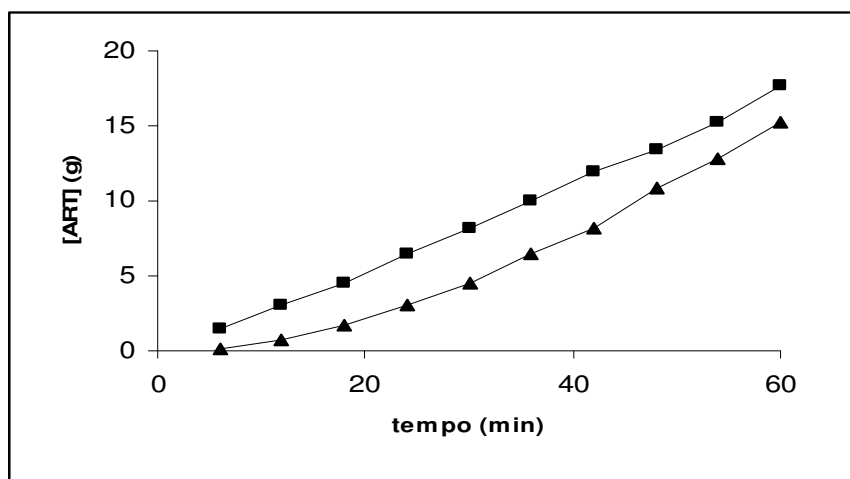


Figura 6. Formação de açúcares redutores durante processos descontínuo-alimentados, nos quais a solução de sacarose (64g/L) foi adicionada segundo as leis: linear crescente (▲) e exponencial crescente (■).

Tabela 1. Atividades hidrolíticas médias e respectivos rendimentos dos processos descontínuo-alimentados, executados sob diferentes leis de adição.

| Forma de alimentação    | Equação                                    | v (x 10 <sup>3</sup> U/mL) | Rendimento (%) |
|-------------------------|--|----------------------------|----------------|
| Constante               | $V_{ad} = 0,3 \cdot \Delta t$              | 0,30                       | 92             |
| Linear decrescente      | $V_{ad} = 0,6t - 0,3t^2$                   | 0,40                       | 100            |
| Linear crescente        | $V_{ad} = 0,3t^2$                          | 0,33                       | 80             |
| Exponencial decrescente | $V_{ad} = 0,7621 - 0,7621 \cdot e^{-0,5t}$ | 0,35                       | 100            |
| Exponencial crescente   | $V_{ad} = 0,4621 \cdot e^{0,5t} - 0,4621$  | 0,30                       | 92             |

Da Tabela 1 e Figuras 5 e 6 observa-se, finalmente, que a hidrólise completa da sacarose foi obtida através das adições linear e exponencial decrescentes. Porém, a

atividade hidrolítica média para adição linear decrescente foi 12% maior do que aquela obtida com a adição exponencial decrescente.

## CONCLUSÃO

Os testes em reator descontínuo-alimentado mostraram que as alimentações linear e exponencial decrescentes propiciaram melhor desempenho. No entanto, a maior velocidade média de conversão (0,40 U/mL) foi observada quando a adição de sacarose obedeceu à lei linear decrescente. Este modo de conduzir o processo descontínuo-alimentado permitiu contornar inequivocamente a inibição da invertase pelo excesso de substrato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KERN, G; SCHULKE, N; SCHMID, F.X. and JAENICKE, R. **Stability, quaternary structure, and folding of internal, external, and core-glycosylated invertase from yeast.** Protein Science, v.1, p.120-131,1992.

MACEDO, I.C. O Ciclo da Cana-de-Açúcar e reduções adicionais nas emissões de CO<sub>2</sub> através do uso como combustível da palha da Cana. **Ministério da Ciência e Tecnologia.** Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 2006.

MANSOUR, E.H.; DAWOUD, M.. **Immobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v.83, p.446-450, 2003.

TOMOTANI, E.J. **Imobilização da Invertase em Resina de Troca Iônica (tipo DOWEX): seu Uso na modificação da sacarose.** São Paulo, 2002. 161p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

TOMOTANI, E.J. **Bioconversão de Sacarose em Ácido Glicônico e Frutose usando Reator de Membrana.** São Paulo, 2006. 102p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

VITOLLO, M. Invertase. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R., Eds. **Enzimas como agentes tecnológicos.** Ribeirão Preto, SP, Legis Summa, 2004. 412p.

**13. ANEXO VII – Trabalho completo enviado para publicação (revista ANALYTICA, ISSN 1677-3055).**

**QUANTIFICAÇÃO DA ÁGUA OXIGENADA EM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE AÇÚCARES REDUTORES USANDO O MÉTODO DE SOMOGYI-NELSON**

Fadi Antoine Taraboulsi Jr. e Michele Vitolo  
Depto. de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B.16, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil.  
E-mail: [fadijr@usp.br](mailto:fadijr@usp.br)

**RESUMO**

A água oxigenada é uma substância de grande utilidade na indústria química, cosmética, farmacêutica e alimentícia, além de seu potencial emprego em nanotecnologia. Existem dezenas de métodos para dosar a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém o uso do método de Somogyi-Nelson (S-N), amplamente usado na dosagem de açúcares redutores (AR), ainda, não foi aplicado na sua determinação. Neste trabalho, demonstrou-se que a determinação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por este método foi precisa e reprodutível, sendo o desvio-padrão e o coeficiente de variação, respectivamente, iguais a 14x10<sup>-4</sup> mg e 2,3%. Demonstrou-se a possibilidade de correção da dosagem do teor de AR em amostras contaminadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, situação observada ao se usar sistemas multienzimáticos em que a glicose oxidase é um dos catalisadores usados.

**INTRODUÇÃO**

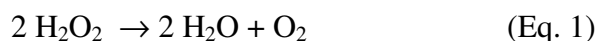
O peróxido de hidrogênio (água oxigenada) puro é um líquido viscoso que ferve a 150°C e congela a - 0,89°C (MAHAN, 1976). É obtido em escala industrial por diferentes processos, dentre outros, citam-se a eletrólise de solução aquosa de ácido sulfúrico a 50% (p/p) (COTTON, WILKINSON, 1978) e através da reação de peróxidos metálicos (por exemplo, CaO<sub>2</sub>) com ácido sulfúrico (MAHAN, 1976). Comumente é encontrada no comércio na forma de solução aquosa nas concentrações (p/v) de 39,5% (130V), 30,4% (100V), 6,1% (20V) e 3,0% (10V). Uma forma comum de se expressar a concentração de uma solução aquosa de água oxigenada é em termos de volume de oxigênio liberado (V), tomando por base que uma solução 1M de água oxigenada equivale a 11,2V.

O peróxido de hidrogênio tem múltiplos usos, sobretudo como agente branqueador de algodão e celulose, conservante na indústria de alimentos (por exemplo, usado como conservante do leite durante o transporte da fazenda para a usina) e curtume, desinfetante e bactericida em geral, inclusive para fins farmacêuticos (solução aquosa 10V), tratamento de efluentes industriais e como oxidante em várias sínteses químicas industriais (PEÑA, et al., 2001; MYAMOTO, et al., 1993; WANG, et al.,

1993; BAKER et al., 1995). Na bioquímica humana a água oxigenada é o produto final da neutralização do radical livre  $O_2^-$  (superóxido) formado nas mitocôndrias – devido à falha no funcionamento da cadeia respiratória – e nas hemácias, produto da reação oxidativa entre o íon ferroso da hemoglobina e o  $O_2$ . O radical superóxido mitocondrial é convertido em  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase, enquanto que na hemácia a  $H_2O_2$  se forma pela combinação espontânea de dois radicais superóxidos, sendo, em seguida, decomposta pela glutatíon peroxidase. A eventual presença da água oxigenada no sangue é eliminada pela catalase, enzima altamente específica para este substrato (STRYER, 1992). Atualmente, no campo da nanotecnologia a  $H_2O_2$  está sendo cogitada como “combustível” para impulsionar nanocápsulas de Au-Pt em meio fluido de alta viscosidade, através de sua decomposição pela Pt em  $H_2O$  e  $O_2$  (MALLOUK, SEN, 2009).

A água oxigenada – embora se assemelhe à água, inclusive na formação de pontes de hidrogênio intermoleculares – não tem utilidade como solvente, porque é muito reativa, decompondo-se com facilidade. Esta característica se deve ao fato dela poder atuar como oxidante ou redutor, dependendo do estado de oxidação da outra substância presente no meio (MAHAN, 1976).

O caráter oxi-red da água oxigenada pode ser inferido a partir de sua reação de decomposição:



Desta reação, observa-se que o número de oxidação (Nox) do átomo de oxigênio na água oxigenada é -1 e nos produtos da decomposição, água e oxigênio gás, o átomo de oxigênio tem Nox -2 e 0, respectivamente.

Por conseguinte, se, digamos, a  $H_2O_2$  for colocada em presença do íon ferroso ( $Fe^{+2}$ ), tem-se a seguinte sequência de reações [ $HO \bullet$ , radical livre hidroxila]:



Ao somar-se as equações 2 e 3, obtém-se a Eq.1. A solução composta pelos íons  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  e  $H_2O_2$  é chamada de reagente de Fenton, muito usada na oxidação de substâncias orgânicas (PRYOR, 1970).

A importância da  $H_2O_2$  nos setores químico, farmacêutico e biológico pode ser sentida pela diversidade de protocolos desenvolvidos para sua quantificação. Assim sendo, o peróxido de hidrogênio pode ser quantificado por volumetria (DIDENKO PUGACH, 1994; OHLWEILER, 1968), espectrofotometria (CLAPP et al., 1989; BERGMAYER, 1984), fluorimetria (HOLM, et al., 1987), quimiluminescência (QIN, et al., 1998), cromatografia (HONG et al., 1998) e eletroquímica (TATSUMA, et al., 1992).

Considerando a característica redutora da  $H_2O_2$ , seria interessante incluir na lista dos métodos de dosagem, o emprego do reagente de Somogyi-Nelson, largamente usado na dosagem de açúcares redutores (ARRUDA, VITOLLO, 1999), do qual resultaria uma solução de cor verde, cuja intensidade seria lida a 540nm em espectrofotômetro. Este procedimento analítico teria como vantagens dosar o teor de  $H_2O_2$  nas amostras – finalidade, ainda, não descrita na literatura – e permitir eliminar o erro devido à presença da  $H_2O_2$  na dosagem dos açúcares redutores formados ou consumidos em processos multienzimáticos, nos quais a glicose oxidase é uma das enzimas utilizadas (TOMOTANI, et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi o de padronizar a determinação da  $H_2O_2$  em presença ou não de açúcares redutores (representados pela glicose) através dos reativos de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944).

## **METODOLOGIA**

### **MATERIAIS**

Os reagentes utilizados, todos de grau pA, foram adquiridos de marcas tradicionais.

### **MÉTODOS**

#### **Determinação de Substâncias Redutoras pelo Método de Somogyi-Nelson**

O método de Somogyi-Nelson compreende o uso dos reativos: I (20g/L de  $NaHCO_3$ , 15g/L de  $NaKC_2H_4O_6$ , 30g/L de  $Na_2CO_3$  e 180g/L de  $Na_2SO_4$ ), II (230g/L de  $Na_2SO_4$  e 40g/L de  $CuSO_4.5H_2O$ ) e III (53g/L de molibdato de amônio, 6,3 g/L de arseniato de sódio e 12 mL de ácido sulfúrico concentrado).

A padronização dos reagentes de Somogyi-Nelson foi feita frente às soluções de glicose pA (0,2mg/mL) e de  $H_2O_2$  (0,608mg/mL; Grau Farmacêutico). Os volumes tomados e as correspondentes quantidades de glicose e  $H_2O_2$  são mostradas na **Tabela 1**.

Em tubos de Folin-Wu colocaram-se os volumes das soluções de glicose ou  $H_2O_2$  indicados na Tabela 1, volumes de água destilada para completar 1mL e 1mL da mistura reativa de Somogyi (4 partes da solução I para 1 parte da solução II) em cada tubo. A seguir, os tubos foram colocados em banho fervente por 10min exatos, sendo em seguida mergulhados em banho de gelo. Uma vez resfriados, adicionou-se 2mL da solução III, agitou-se e completou-se o volume a 25mL com água destilada. Após 30min de repouso, procedeu-se à leitura a 540nm em espectrofotômetro. O procedimento foi repetido um total de cinco vezes tanto para a solução de glicose quanto para a de  $H_2O_2$ . O desvio-padrão ( $\sigma$ ) e o coeficiente de variação (CV) do método foram calculados através das equações (LEVIN, 1978):

$$\sigma = [(\sum P^2 - P_m^2) \div N]^{1/2} \quad (\text{Eq.4})$$

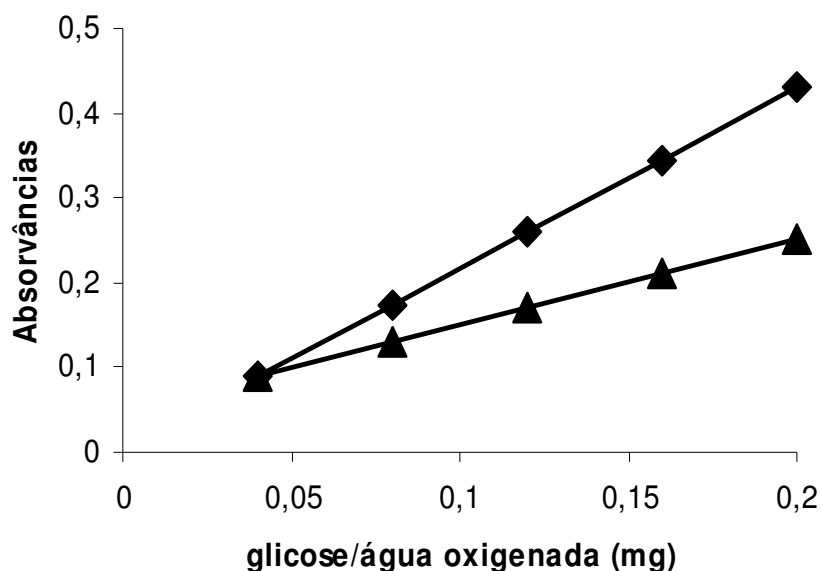
$$\text{CV} = (\sigma \div P_m) \times 100 \quad (\text{Eq.5})$$

Onde N = número de determinações (cinco, neste caso); P = quantidade da substância redutora (mg);  $P_m$  (mg) =  $\sum P/N$ .

Na Figura 1 são mostradas as retas médias das variações da absorvância em função das quantidades de glicose e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**TABELA 1.** Quantidades (mg) de glicose e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentes nos volumes das alíquotas tomadas para estabelecer as curvas-padrão de ambos os agentes redutores pelo método de Somogyi-Nelson.

| GLICOSE<br>(mg) | V <sub>GLICOSE</sub><br>(mL) | Abs <sub>glicose</sub><br>(D.O.) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>(mg) | V <sub>água oxigenada</sub><br>(mL) | Abs <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub><br>(D.O.) |
|-----------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|
| 0,040           | 0,2                          | 0,0889                           | 0,0304                                | 0,050                               | 0,0892  |
| 0,080           | 0,4                          | 0,174                            | 0,0608                                | 0,10                                | 0,130   |
| 0,12            | 0,6                          | 0,259                            | 0,0912                                | 0,15                                | 0,171   |
| 0,16            | 0,8                          | 0,345                            | 0,122                                 | 0,20                                | 0,212   |
| 0,20            | 1,0                          | 0,430                            | 0,152                                 | 0,25                                | 0,252   |
| -               | -                            | -                                | 0,182                                 | 0,30                                | 0,292   |



**Figura 1.** Curvas médias de padronização da glicose (◆) e da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (▲) pelo método de Somgyi-Nelson, sendo as equações de regressão linear para a glicose e a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente,  $y = 2,13x + 0,0037$  ( $r = 0,9996$ ) e  $y = 1,34x + 0,0485$  ( $r = 0,9995$ ). Onde y = absorvância e x = mg da substância redutora (glicose ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## Determinação da Interferência da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na Dosagem da Glicose pelo Método de Somogyi-Nelson

Foram preparadas soluções-mães de glicose (0,2 mg/mL) e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,608 mg/mL). A seguir, tomaram-se volumes entre 5mL e 30mL da solução-mãe de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os quais foram colocados em balões volumétricos de 100mL, sendo os volumes completados até a marca com a solução-mãe de glicose. Resultaram soluções mistas contendo 0,2mg/mL de glicose e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,03mg/mL (SM1), 0,06mg/mL (SM2), 0,09mg/mL (SM3), 0,12mg/mL (SM4), 0,15mg/mL (SM5) e 0,18mg/mL (SM6).

De cada solução mista (SM), tomaram-se volumes de 0,2mL, 0,4mL, 0,6mL, 0,8mL e 1,0mL, os quais foram colocados em tubos de Folin-Wu, contendo 1,0mL da mistura reativa de Somogyi-Nelson e água destilada para inteirar o volume final a 2,0mL. A seguir, procedeu-se como já descrito.

As absorvâncias relacionadas às soluções de glicose, SM1, SM2, SM3, SM4, SM5 e SM6 são mostradas na Tabela 2.

**TABELA 2.** Quantidades de glicose e de água oxigenada, expressas em miligramas, e as correspondentes absorvâncias lidas em 540nm, segundo o método de Somogyi-Nelson. Os valores das absorvâncias encontram-se entre parêntesis.

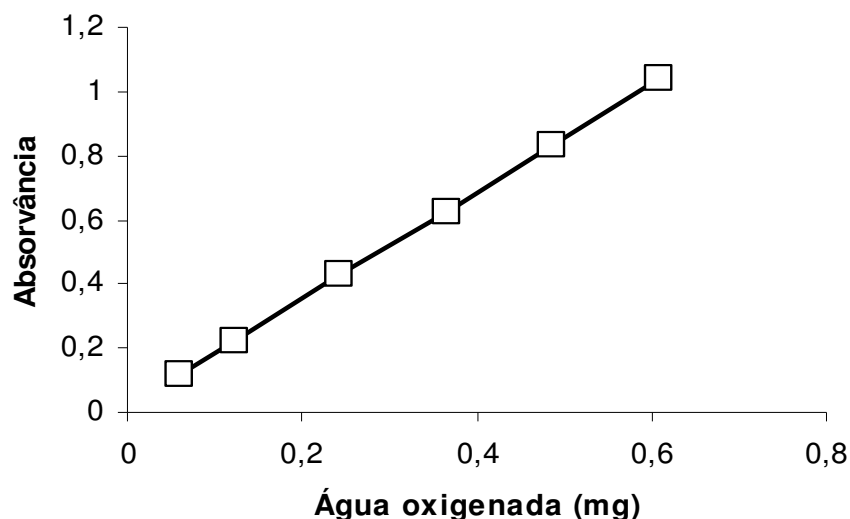
| GLICOSE          | SM1                 | SM2               | SM3               | SM4               | SM5               | SM6               |
|------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0,04<br>(0,0862) | 0,00608<br>(0,0991) | 0,0120<br>(0,109) | 0,0180<br>(0,127) | 0,0240<br>(0,141) | 0,0300<br>(0,140) | 0,0360<br>(0,158) |
| 0,08<br>(0,176)  | 0,0122<br>(0,187)   | 0,0240<br>(0,225) | 0,0360<br>(0,252) | 0,0480<br>(0,272) | 0,0600<br>(0,288) | 0,0720<br>(0,287) |
| 0,12<br>(0,262)  | 0,0182<br>(0,278)   | 0,0360<br>(0,315) | 0,0540<br>(0,356) | 0,0720<br>(0,382) | 0,0900<br>(0,407) | 0,108<br>(0,417)  |
| 0,16<br>(0,349)  | 0,0243<br>(0,360)   | 0,0480<br>(0,418) | 0,0720<br>(0,468) | 0,0960<br>(0,494) | 0,120<br>(0,515)  | 0,144<br>(0,544)  |
| 0,20<br>(0,426)  | 0,0304<br>(0,449)   | 0,0600<br>(0,502) | 0,0900<br>(0,571) | 0,120<br>(0,586)  | 0,150<br>(0,622)  | 0,180<br>(0,663)  |

### Determinação do Teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por Leitura Direta no Ultra-Violeta

A partir de uma solução aquosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10V (grau farmacêutico) diluída 50 vezes, tomaram-se volumes entre 0,1mL e 1,0mL, que foram colocados em cubetas de quartzo, contendo água deionizada em quantidade suficiente para completar 1,0mL. As cubetas foram introduzidas em espectrofotômetro e as absorvâncias das soluções lidas a 240nm. O procedimento foi repetido um total de cinco vezes, sendo o desvio-padrão ( $\sigma$ ) e o coeficiente de variação (CV) do método – calculados a partir das Equações 4 e 5 – iguais a  $14 \times 10^{-4}$  mg e 0,5%, respectivamente. A curva-padrão média para esta determinação está mostrada na Figura 2. As quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usadas para obter a curva-padrão situaram-se no intervalo 0,0608 – 0,608mg (Tabela 3).

**TABELA 3.** Esquema montado para estabelecer a curva-padrão para a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através do método da leitura no UV (240nm).

| TUBO (n.) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (DIL.) (mL) | H <sub>2</sub> O (mL) | ABSORVÂNCIA (D.O) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg) |
|-----------|---|-----------------------|-------------------|------------------------------------|
| Branco    | -   | 1,0                   | -                 | -                                  |
| 1         | 0,1                                       | 0,9                   | 0,116             | 0,0608                             |
| 2         | 0,2                                       | 0,8                   | 0,224             | 0,122                              |
| 3         | 0,4                                       | 0,6                   | 0,433             | 0,243                              |
| 4         | 0,6                                       | 0,4                   | 0,621             | 0,365                              |
| 5         | 0,8                                       | 0,2                   | 0,830             | 0,486                              |
| 6         | 1,0                                       | -                     | 1,04              | 0,608                              |



**Figura 2.** Curva média de padronização da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo método da leitura no UV (240nm), sendo a equação de regressão linear  $y = 1,60x + 0,0490$  ( $r = 0,9994$ ). Onde  $y$  = absorvância e  $x$  = mg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da Figura 1 observa-se que as absorvâncias variam linearmente tanto em relação à glicose quanto à água oxigenada, indicando que o método de Somoyi-Nelson é adequado para dosar ambos os agentes redutores, com destaque para a  $H_2O_2$ , cuja quantificação por este método não está descrita na literatura.

Observa-se, também, da citada figura que a inclinação da reta de regressão para a  $H_2O_2$  ( $1,34 \text{ mg}^{-1}$ ) é cerca 37% inferior à inclinação da reta de regressão para a glicose ( $2,13 \text{ mg}^{-1}$ ). Considerando que as faixas de concentração da glicose (0,04-0,20 mg) e da  $H_2O_2$  (0,0304-0,182 mg) se sobrepõem, pode-se concluir que o poder redutor da  $H_2O_2$  sobre o íon  $Cu^{+2}$  – presente no reativo II de Somogyi-Nelson - é menor do que o da glicose. Este aspecto pode ser evidenciado, tomando por base o ponto de intersecção das retas, representado pelo par ordenado (0,0567; 0,124), de cujo valor  $x = 0,0567 \text{ mg}$  se determinam os correspondentes moles de glicose ( $3,15 \times 10^{-7}$ ) e de  $H_2O_2$  ( $1,67 \times 10^{-6}$ ) capazes de reduzir o mesmo número de moles do íon cúprico. Este fato é diretamente respaldado pelo igual valor da absorvância (y), que no caso é igual a 0,124. Concluiu-se, portanto, que são necessários cerca 5,3 vezes mais  $H_2O_2$  do que glicose para reduzir a mesma quantidade de  $Cu^{+2}$ .

Este fenômeno, também, pode ser compreendido, levando em conta os potenciais de redução ( $E^{0'}$ ) do íon cúprico (+ 0,15V), do ácido glicônico (- 0,45V) e da água oxigenada ( $\pm 0,30V$ ) (SEGEL, 1976). Evidentemente, a substância contendo o átomo de maior potencial de redução - ou seja, maior tendência em receber elétrons -, será um agente redutor mais eficiente. Logo, quando  $Cu^{+2}$  é colocado em presença do ácido glicônico não ocorre reação, porém, quando colocado em presença de glicose, a reação se torna possível, uma vez que  $\Delta E^{0'} = + 0,60V$ . No caso da  $H_2O_2$  e  $Cu^{+2}$ , a reação, também, é possível – ocorrendo com  $\Delta E^{0'} = + 0,45V$  -, dado o caráter oxi-red da  $H_2O_2$ . Lembrando que a energia livre de Gibbs ( $\Delta G'$ ) pode ser calculada através da equação (SEGEL, 1976):

$$\Delta G' = - n.F.\Delta E^{0'} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde  $n$  = número de elétrons transferidos por mol ( $E_q/\text{mol}$ ),  $F$  = constante de Faraday ( $23063 \text{ cal/V.E}_q$ ) e  $\Delta E^{0'}$  = diferença entre os potenciais de redução das semi-reações que compõem o sistema reacional.

Então, as energias livres para as reações  $Cu^{+2}/Cu^+//H_2O_2/O_2$  e glicose/ácido glicônico// $Cu^{+2}/Cu^+$  são iguais a  $- 21 \text{ Kcal/mol}$  de  $Cu^{+2}$  e  $- 28 \text{ Kcal/mol}$  de  $Cu^{+2}$ , respectivamente. Como a maior variação de energia livre de Gibbs está relacionada à reação glicose/ácido glicônico// $Cu^{+2}/Cu^+$ , então fica claro o menor poder redutor da água oxigenada sobre o íon  $Cu^{+2}$ .

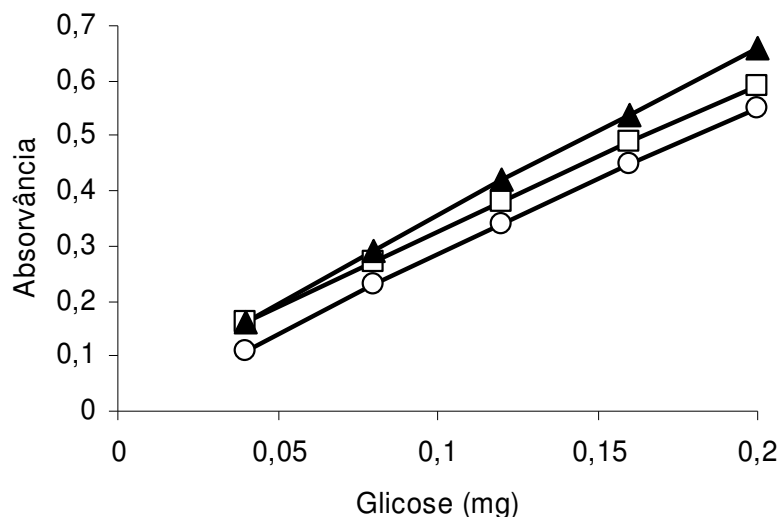
Neste ponto é interessante lembrar que a reação  $Cu^{+2}/Cu^+//H_2O_2/O_2$  se assemelha à de Fenton ( $Fe^{+3}/Fe^{+2}//H_2O_2/O_2$ ), podendo se estabelecer a interrelação ( $Cu^{+2} \leftrightarrow Cu^+$ ), devido ao já salientado caráter dual oxi-red da água oxigenada. Sucede que no método

de Somogyi-Nelson, a redução do íon cúprico se dá em meio alcalino (pH 10) e sob forte aquecimento – em banho de água fervente -, formando-se um precipitado de cor “marron-tijolo” ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), que desloca o equilíbrio totalmente no sentido da redução do íon cúprico. Por esse motivo, a dosagem espectrofotométrica da água oxigenada através do método de Somogyi-Nelson é reprodutível e precisa. Aliás, o desvio-padrão e o coeficiente de variação – calculados através das equações 4 e 5 – para a determinação da glicose foram, respectivamente, iguais a  $31 \times 10^{-4}\text{mg}$  e 2,7%, enquanto que para a água oxigenada foram iguais a  $14 \times 10^{-4}\text{mg}$  e 2,3%, respectivamente.

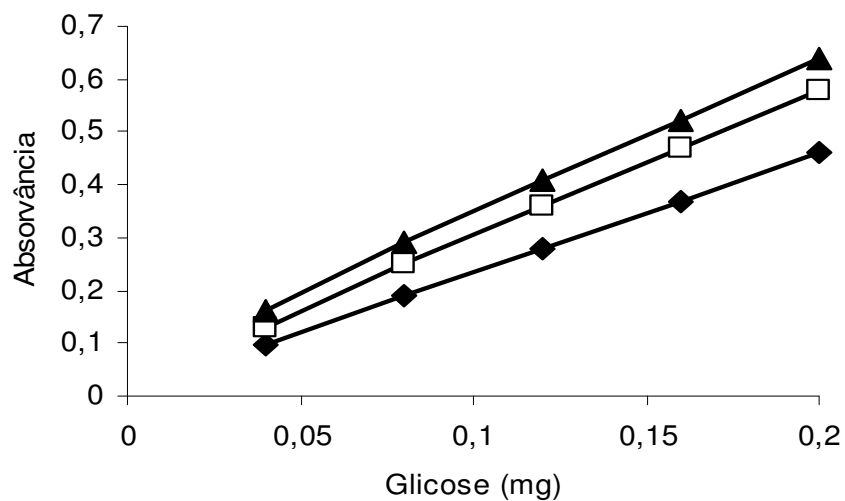
Comparando os métodos da leitura no UV e o de Somogyi-Nelson para a determinação da  $\text{H}_2\text{O}_2$ , observou-se que o método de leitura no UV é mais preciso, uma vez que o seu CV (0,5%) é cerca de cinco vezes menor que o CV (2,5%) do método de Somogyi-Nelson. Porém, a faixa de leitura para as quantidades de água oxigenada determinadas pelo Somogyi-Nelson (0,0304 – 0,1824mg) é inferior àquela da leitura no UV (0,0608 – 0,608mg). Provavelmente, para quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  inferior a 0,0608mg a leitura no UV seria dificultada pelo fato da água, presente em excesso como solvente, interferir na absorção da radiação pela água oxigenada, uma vez que ambas as substâncias possuem estruturas moleculares semelhantes (MAHAN, 1976).

Uma vez demonstrada a aplicabilidade do método de Somogyi-Nelson para dosar a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , restou avaliar a interferência desta substância na determinação dos açúcares redutores – neste trabalho, representados pela glicose – por esse método.

Pela Tabela 2, depreende-se que as absorvâncias das soluções mistas aumentaram, à medida que as concentrações de água oxigenada aumentaram e as concentrações de glicose permaneceram constantes. Fazendo-se os gráficos das absorvâncias das soluções mistas versus concentrações de glicose (Figuras 3 e 4), obtiveram-se, para cada situação, linhas retas com inclinações crescentes em função do aumento da quantidade de compostos redutores (glicose e água oxigenada) feitos reagir com os reagentes de Somogyi-Nelson (Tabela 3).



**Figura 3.** Variação da absorvância em função da concentração de glicose para as soluções mistas SM2 (O), SM4 (□) e SM6 (▲). As correspondentes equações de regressão linear calculadas para cada solução mista foram: SM2:  $y = 2,45x + 0,0201$  ( $r = 0,998$ ); SM4:  $y = 2,78x + 0,0416$  ( $r = 0,996$ ); SM6:  $y = 3,17x + 0,0338$  ( $r = 0,992$ ).



**Figura 4.** Variação da absorvância em função da concentração de glicose para as soluções mistas SM1 (◆), SM3 (□) e SM5 (▲). As correspondentes equações de regressão linear calculadas para cada solução mista foram: SM1:  $y = 2,14x + 0,0189$  ( $r = 0,995$ ); SM3:  $y = 2,76x + 0,0233$  ( $r = 0,990$ ); SM5:  $y = 2,98x + 0,0372$  ( $r = 0,992$ ).

**TABELA 4.** Diferença percentual entre as inclinações das retas relacionadas às soluções mistas frente à inclinação da reta da solução-mãe de glicose.

| SOLUÇÕES (TIPOS) | EQUAÇÃO LINEAR       | INCLINAÇÃO (mg <sup>-1</sup> ) | DIFERENÇA (%) |
|------------------|----------------------|--------------------------------|---------------|
| <b>Glicose</b>   | $y = 2,13x + 0,0037$ | 2,13                           | -             |
| <b>SM1</b>       | $y = 2,14x + 0,0189$ | 2,14                           | 0,50          |
| <b>SM2</b>       | $y = 2,45x + 0,0201$ | 2,45                           | 13            |
| <b>SM3</b>       | $y = 2,76x + 0,0233$ | 2,76                           | 23            |
| <b>SM4</b>       | $y = 2,78x + 0,0416$ | 2,78                           | 24            |
| <b>SM5</b>       | $y = 2,98x + 0,0372$ | 2,98                           | 29            |
| <b>SM6</b>       | $y = 3,17x + 0,0338$ | 3,17                           | 42            |

Da Tabela 4 observa-se que a interferência da água oxigenada na determinação da glicose se torna significativa a partir da SM2, haja vista a diferença percentual de 13% se situar bem acima do coeficiente de variação do método analítico (2,3 – 2,5%).

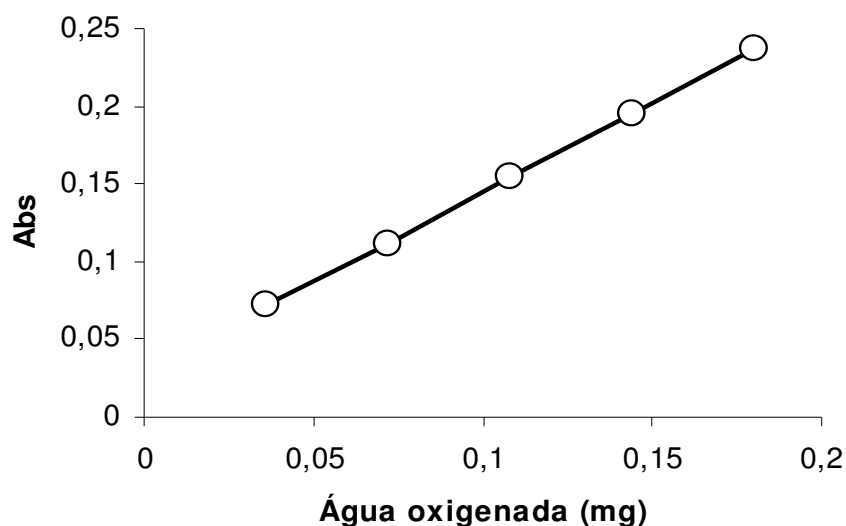
A partir da Tabela 3, fazendo as diferenças entre as absorvâncias de cada solução mista com as absorvâncias da solução-mãe de glicose – cuja concentração foi mantida constante – resultou a Tabela 4. A função  $\Delta Abs = f(H_2O_2)$  representou um gráfico linear para todas as soluções mistas, exceto para a SM1. Na Tabela 5 são mostradas as equações de regressão linear relacionadas a todas as soluções mistas e na Figura 5, a título de ilustração, apresenta-se a reta referente à SM6.

**TABELA 5.** Diferenças entre as absorvâncias das soluções mistas e a solução-mãe de glicose.

|     |                                    |         |        |        |        |        |
|-----|------------------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| SM1 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg) | 0,00608 | 0,0122 | 0,0182 | 0,0243 | 0,0304 |
|     | <b>Δ Abs</b>                       | 0,0126  | 0,0116 | 0,0159 | 0,0114 | 0,0218 |
| SM2 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg) | 0,0120  | 0,0240 | 0,0360 | 0,0480 | 0,0600 |
|     | <b>Δ Abs</b>                       | 0,0232  | 0,0400 | 0,0532 | 0,0678 | 0,0800 |
| SM3 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg) | 0,0180  | 0,0360 | 0,0540 | 0,0720 | 0,0900 |
|     | <b>Δ Abs</b>                       | 0,0405  | 0,0700 | 0,0940 | 0,119  | 0,145  |
| SM4 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg) | 0,0240  | 0,0480 | 0,0720 | 0,0960 | 0,120  |
|     | <b>Δ Abs</b>                       | 0,060   | 0,0900 | 0,121  | 0,145  | 0,170  |
| SM5 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg) | 0,0300  | 0,0600 | 0,0900 | 0,120  | 0,150  |
|     | <b>Δ Abs</b>                       | 0,0553  | 0,090  | 0,132  | 0,166  | 0,200  |
| SM6 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg) | 0,0360  | 0,0720 | 0,108  | 0,144  | 0,180  |
|     | <b>Δ Abs</b>                       | 0,0720  | 0,111  | 0,155  | 0,195  | 0,237  |

**TABELA 6.** Equações de regressão linear para a relação  $\Delta\text{Abs} = f(\text{H}_2\text{O}_2)$  para as soluções mistas contendo as substâncias redutoras (glicose e água oxigenada).

| SOLUÇÃO MISTA | EQUAÇÃO LINEAR      | r      |
|---------------|---------------------|--------|
| SM1           | -                   | -      |
| SM2           | $y = 1,18x + 0,010$ | 0,998  |
| SM3           | $y = 1,43x + 0,016$ | 0,9994 |
| SM4           | $y = 1,15x + 0,035$ | 0,998  |
| SM5           | $y = 1,22x + 0,019$ | 0,9993 |
| SM6           | $y = 1,15x + 0,030$ | 0,9998 |



**Figura 5.** Variação do  $\Delta\text{Abs}$  em função da quantidade de água oxigenada presente na SM6.

A linearidade da função  $\Delta\text{Abs} = f(\text{H}_2\text{O}_2)$  constitui-se em clara evidência que a diferença percentual das inclinações das retas para as soluções mistas frente à da solução-mãe da glicose (Tabela 4), podem ser usadas para corrigir a referida influência. A linearidade da função diferença de absorvância versus quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  indica que uma fração constante da luz de comprimento de onda igual a 540nm é absorvida à medida que a quantidade de substância redutora aumenta. Logo, os percentuais das inclinações das retas das soluções mistas em relação à inclinação relacionada à solução-mãe de glicose, podem ser usados como fatores de correção para a quantificação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson (Tabela 4).

Apesar da Tabela 4 fornecer o percentual a ser descontado da absorvância referente ao açúcar redutor e, dessa maneira, corrigir o valor da medida, fica, ainda, em aberto qual percentual da tabela deve ser escolhido para efetuar a correção. Ou seja,

deve-se saber em que faixa de massas a  $H_2O_2$  presente em uma dada solução mista se situa.

Para isso, deve-se lançar-mão de um método de quantificação direto do teor de  $H_2O_2$  presente na amostra de solução mista. Para tanto, basta tomar uma alíquota da solução mista desconhecida - adequadamente diluída, se necessário - e ler a absorvância a 240nm, conforme preconizado por BERGMAYER (1984) e adaptado por TOMOTANI, et al., (2005). Através de uma curva-padrão (Figura 2) determina-se o teor de  $H_2O_2$ , que permitirá selecionar o intervalo de massas de  $H_2O_2$ , cujo percentual deve ser descontado da absorvância global da solução mista desconhecida. Alternativamente, com o valor da massa de  $H_2O_2$  lida a 240nm, calcula-se o  $\Delta Abs$  correspondente (Figura 5). Mas,  $\Delta Abs = (Abs_{TOTAL} - Abs_{GLICOSE})$ , logo  $Abs_{GLICOSE} = (Abs_{TOTAL} - \Delta Abs)$ . Finalmente, introduzindo o valor de  $Abs_{GLICOSE}$  na curva-padrão da glicose, calcula-se o teor real desta substância na amostra.

## CONCLUSÕES

Os resultados discutidos permitem concluir que o método de Somogyi-Nelson é adequado para dosar a  $H_2O_2$ . Além disso, demonstrou-se ser exequível descontar o efeito da presença da  $H_2O_2$  em solução contendo AR, cuja determinação é feita pelo método de Somogyi-Nelson. Assim, o procedimento geral sugerido é: aplica-se o método de Somogyi-Nelson para determinar a absorvância total da solução mista (glicose e  $H_2O_2$ ). A seguir, determina-se o teor de  $H_2O_2$  pela leitura direta no UV. Lança-se esse valor no gráfico  $\Delta Abs = f(H_2O_2)$ , calculando, a seguir, a absorvância devida somente à glicose [ $Abs_{GLICOSE} = Abs_{TOTAL} - \Delta Abs$ ]. Finalmente, aplica-se o valor da  $Abs_{GLICOSE}$  na curva-padrão da glicose, obtendo-se o teor de AR realmente presente na amostra..

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro concedido para a execução deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MAHAN, B.H. **Química: Um Curso Universitário**. 2ª ed. Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo, SP, p.488, 1976.
2. COTTON, F.A., WILKINSON, E. **Química Inorgânica**. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, RJ, 1978.

3. PEÑA, R.M., GARCIA, S., HERRERO, C., LUCAS, T. Measurements and analysis of hydrogen peroxide rainwater levels in a Northwest region of Spain. **Atmos. Environ.**, v.35, p.209-219, 2001.
4. MIYAMOTO, F., SAEKI, M., YOSHIZAWA, T. A sensitive qualitative color test for residual hydrogen peroxide in foods. **Japan. J. Toxic. Environ. Health**, v.39, p.33, 1993.
5. WANG, J., LIN, Y., CHEN, L. Organic-phase biosensors for monitoring phenol and hydrogen peroxide in pharmaceutical antibacterial products. **Analyst**, v.118, p.277, 1993.
6. BAKER, C. J., HARMON, G. L., GLAZENER, J. A., ORLANDI, E. W., A Noninvasive Technique for Monitoring Peroxidative and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Scavenging Activities during Interactions between Bacterial Plant Pathogens and Suspension Cells. **PlanPhysiol.**, v. 108, p.353-359, 1995.
7. STRYER, L. **Bioquímica**. 3<sup>a</sup> ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 1992.
8. MALLOUK, T.E., AYUSMAN, S. Viagem fantástica. **Scientific American Brasil**, ano 7, n.85, p.68-73, 2009.
9. PRYOR, W.A. **Introdução ao Estudo dos Radicais Livres**. Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo, SP, p.63, 1970.
10. DIDENKO, Y.T., PUGACH, S.P. Spectra of Water Sonoluminescence. **J.Phys.Chem.**, v.98, p.9742- 9749,1994.
11. OHLWEILER, O.A. **Teoria e Prática da Análise Quantitativa Inorgânica**. Editora Universidade de Brasília, Brasília, 1968.
12. CLAPP, P.A., EVANS, D.F., SHERIFF, T.S.S. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide after extraction with ethyl acetate. **Anal.Chim.Acta**, v.218, p.331-334, 1989.
13. BERGMAYER, H.U., Ed. **Methods of enzymatic analysis**. 3<sup>rd</sup> Ed., Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, , v.2, p.539, 1984.
14. HOLM, T.R., GEORGE, G.K., BARCELONA, M.J. Fluorometric determination of hydrogen peroxide in groundwater. **Anal.Chem.**, v.59, p.582-586, 1987.
15. QIN, W., ZHANG, Z., LI, B., LIU, S. Chemiluminescence flow-sensing system for hydrogen peroxide with immobilized reagents. **Anal. Chim. Acta**, v.372, p.357-363, 1998.
16. HONG, J., MAGUHN, J., FREITAG, D., KETTRUP, A. Determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic peroxides by high-performance liquid chromatography

with post-column UV irradiation, derivatization and fluorescence detection. **Fresenius`J.Anal.Chem.**, v.361, p.124-128, 1998.

17. TATSUMA, T., GONDAIRA, M., WATANABE, T. Peroxidase-incorporated polypyrrole membrane electrodes. **Anal.Chem.**, v.64, p.1183-1187, 1992.
18. ARRUDA, L.M.O., VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Appl.Biochem.Biotechnol.**, v.81, n.1, p.23-33, 1999.
19. TOMOTANI, E.J., Das NEVES, L.C.M., VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase in membrane reactor. **Appl.Biochem.Biotechnol.**, v.121-124, p.149-162, 2005.
20. SOMOGYI, M. A New Reagent for Determination of Sugars. A new Sugar Reagent, **J. Biol. Chem.**, v.160, p.61-68, 1945.
21. NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **J.Bio.Chem.**, v.153, p.375-380, 1944.
22. LEVIN, J. **Estatística: aplicada a ciências humanas**. Editora Harper & Row do Brasil LTDA, São Paulo, SP, 1978.
23. SEGEL, I.H. **Bioquímica**. Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, Rj, 1976.



#### **14. Anexo VIII – Declaração.**

Declaramos para os devidos fins que o trabalho intitulado: “Enzimas microbianas na conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico usando reatores descontínuo-alimentado e contínuo com membrana” não envolveu o emprego de seres vivos, dispensando, portanto, a análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal.

São Paulo, 5 de julho de 2010.

---

Prof. Titular Michele Vitolo

---

Pós-graduando Fadi Antoine Taraboulsi Júnior

## **15. ANEXO IX – Documentos.**

### **Normas Específicas da CPG da FCF-USP**

#### VII - Exame de Qualificação

1. O exame de qualificação é obrigatório aos alunos dos programas de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo nos cursos de Mestrado, Doutorado e Doutorado Direto.

2. O exame de qualificação deve ser realizado no máximo até seis meses antes da data limite do curso do aluno (conforme Resolução CoPGr 5140, de 20/09/2004), após completados os créditos mínimos exigidos em disciplinas.

2.1. O aluno que não se qualificar dentro do prazo será desligado do programa.

3. O exame de qualificação consta de:

a) avaliação do projeto de pesquisa, apresentado por escrito na forma de uma monografia;

b) avaliação do projeto de pesquisa, apresentado oralmente na forma de uma aula expositiva;

c) avaliação do *curriculum* Lattes e do histórico escolar de pós-graduação do aluno.

3.1. Seis exemplares da monografia de qualificação deverão ser apresentados junto à Secretaria do Departamento responsável pelo Programa de Pós-Graduação do aluno com pelo menos 20 dias de antecedência em relação à data em se pretenda realizar o exame de qualificação.

3.1.1. Junto com os exemplares, poderá ser encaminhada uma lista com as sugestões de nomes para a composição da Comissão Julgadora.

3.1.2. A monografia de qualificação deve ser confeccionada de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

3.1.2.1. Havendo resultados e conclusões, os mesmos poderão ser incluídos no texto da monografia de qualificação.

3.1.3. A monografia deverá ter um “anexo obrigatório”, no qual deverão constar:

a) cópia do inciso VII desta norma.

b) cópia da ficha do aluno (histórico escolar parcial), emitido pelo FenixWeb.

c) cópia do aval do Comitê de Ética em Pesquisa ou declaração conjunta do aluno e do orientador de que o trabalho dispensa análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal.

4. Cabe à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação indicar a Comissão Julgadora do Exame de Qualificação, composta por 3 (três) membros titulares e 2 (dois) membros suplentes, todos com titulação mínima de Doutor. No mínimo um dos membros titulares e um dos suplentes devem ser estranhos ao programa e ao departamento.

4.1. A participação do orientador na Comissão Julgadora não é obrigatória.

4.2. Preferencialmente, o coordenador e o vice-coordenador deverão atuar juntos no momento da indicação da Comissão Julgadora.

5. A sessão do Exame de Qualificação deve ser pública, com duração máxima de cinco horas.

5.1. Atendendo solicitação prévia do aluno e do orientador, a Coordenadoria do Programa poderá autorizar que a sessão (ou parte da sessão) não seja pública.


5.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da Comissão Julgadora .

6. Ao aluno reprovado é dada uma nova oportunidade para realizar outro exame desde que dentro do prazo estipulado pela Resolução CoPGr 5140, de 20/09/2004. O aluno reprovado na segunda oportunidade será desligado do programa.

São Paulo, 18 de março de 2005.

**Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco**

Presidente da CPG/FCF/USP

- +
- **Mostrar informações complementares**
- 
- **Dados Gerais**
- **Informações Pessoais**
- **Formação acadêmica/Titulação**
- **Idiomas**
- **Atuação profissional**
- **Áreas**
- **Produção em C,T & A**
- **Produção bibliográfica**
  - **Artigos publicados**
  - **Livros e capítulos**
  - **Textos em jornais ou revistas**
  - **Trabalhos Completos/Resumos Publicados em Anais de Congressos**
  - **Artigos aceitos para publicação**
  - **Apresentações de trabalho**
  - **Demais tipos de produção bibliográfica**
- **Produção técnica**
  - **Software com registro de patente**
  - **Software sem registro de patente**
  - **Produtos tecnológicos**
  - **Processos e técnicas**
  - **Trabalhos técnicos**
- **Produção artística/cultural**
- **Demais trabalhos**
- **Eventos**
- **Participação em eventos**
- **Organização de eventos**

 [Rede de Colaboração](#)



[Diretório de grupos de pesquisa](#)



## Fadi Antoine Taraboulsi Júnior

Possui graduação em Biotecnologia pela Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP (2008). Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Microbiologia Aplicada. Realiza mestrado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, na área de Enzimologia. **(Texto informado pelo autor)**

**Última atualização do currículo em 11/05/2010**

Endereço para acessar este CV:  
<http://lattes.cnpq.br/5332282995517133>



### Dados pessoais

**Nome** Fadi Antoine Taraboulsi Júnior

**Nome em citações bibliográficas** TARABOULSI JÚNIOR, F. A.

**Sexo** Masculino

#### **Formação acadêmica/Titulação**

- 2008** Mestrado em andamento em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (Conceito CAPES 5) .  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.  
*Título:* ENZIMAS MICROBIANAS NA CONVERSÃO DA SACAROSE EM FRUTOSE E ÁCIDO GLICÔNICO USANDO REATORES DESCONTÍNUO-ALIMENTADO E CONTÍNUO COM MEMBRANA, *Orientador:* Dr. Michele Vitolo.  
*Bolsista do(a):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .  
*Palavras-chave:* reator descontínuo; glicose oxidase; invertase; catalase; bioconversão multienzimática.  
*Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica.  
*Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica / *Subárea:* Enzimologia.  
*Setores de atividade:* Indústrias de Transformação.
- 2004 - 2008** Graduação em Biotecnologia .  
Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP.  
*Título:* Avaliação de linhagens fúngicas e bacterianas pré-selecionadas visando possíveis propriedades antibióticas contra Escherichia coli.  
*Orientador:* Dr. Pedro de Oliva Neto.  
*Bolsista do(a):* Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, , .

#### **Atuação profissional**

**Universidade de São Paulo, USP, Brasil.**

#### **Vínculo institucional**

- 2008 - Atual** Vínculo: Pesquisador de mestrado, Enquadramento Funcional: sem vínculo, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

**Outras informações** Bolsista CNPQ

**Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP, FCLA, Brasil.**

#### **Vínculo institucional**

- 2006 - 2007** Vínculo: estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Regime: Dedicção exclusiva.

**Outras informações** BOLSISTA FAPESP DURANTE UM ANO E MEIO

#### **Áreas de atuação**

- 1.** *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia / *Subárea:* Microbiologia Aplicada.
- 2.** *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica / *Subárea:* Enzimologia.

#### **Idiomas**

- Inglês** Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
- Português** Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

### Artigos completos publicados em periódicos

1. ★ TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; ANDREOTTI, D. Z. ; MADEIRA JUNIOR, J. V. ; SILVA, A. R. ; [OLIVA NETO, P.](#) . Seleção de microorganismos com atividade antibiótica contra Escherichia coli. Analytica (São Paulo) <sup>JCR</sup>, v. 29, p. 60-69, 2007.

### Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. ★ TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; ANDREOTTI, D. Z. ; MADEIRA JUNIOR, J. V. ; SILVA, A. R. ; [OLIVA NETO, P.](#) . Seleção de microorganismos com atividade antibiótica contra Escherichia coli. In: XVI SINAIFERM - Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007, Curitiba-PR. Anais do XVI SINAIFERM, 2007.

### Resumos publicados em anais de congressos

1. TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; YORIYAZ, E. J. ; Vitolo . Bioconversão enzimática da sacarose por processo descontínuo-alimentado. In: XVII SINAIFERM - Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal - RN. XVII SINAIFERM - Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.
2. TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; TOMOTANI, E.J. ; Vitolo . Bioconversão da sacarose em açúcar invertido e da glicose em ácido glicônico, através de processo descontínuo-alimentado. In: IX SHEB - Simpósio de Hidrólise enzimática de Biomassas, 2009, Maringá - RN. IX SHEB - Simpósio de Hidrólise enzimática de Biomassas, 2009.
3. TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; ANDREOTTI, D. Z. ; MADEIRA JUNIOR, J. V. ; SILVA, A. R. ; [OLIVA NETO, P.](#) . Avaliação de linhagens fúngicas e bacterianas pré-selecionadas visando possíveis propriedades antibióticas contra Escherichia coli.. In: CBCTA- Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba-PR. Anais do CBCTA 2006, 2006.
4. TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; ANDREOTTI, D. Z. ; MADEIRA JUNIOR, J. V. ; SILVA, A. R. ; [OLIVA NETO, P.](#) . Avaliação de linhagens fúngicas e bacterianas pré-selecionadas com possíveis propriedades antibióticas contra Escherichia coli.. In: I Fórum de Biotecnologia do Vale do Paranapanema, 2006, Assis-SP. Anais do I Fórum de Biotecnologia do Vale do Paranapanema, 2006.

### Apresentações de Trabalho

1. TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; YORIYAZ, E. J. ; Vitolo . Bioconversão enzimática da sacarose por processo descontínuo-alimentado. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. ★ TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; TOMOTANI, E.J. ; Vitolo . BIOCONVERSÃO DA SACAROSE EM AÇÚCAR INVERTIDO E DA GLICOSE EM ÁCIDO GLICÔNICO, ATRAVÉS DE PROCESSO DESCONTÍNUO-ALIMENTADO. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; ANDREOTTI, D. Z. ; MADEIRA JUNIOR, J. V. ; SILVA, A. R. ; [OLIVA NETO, P.](#) . SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA CONTRA Escherichia coli. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. ★ TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; ANDREOTTI, D. Z. ; MADEIRA JUNIOR, J. V. ; SILVA, A. R. ; [OLIVA NETO, P.](#) . Avaliação de linhagens fúngicas e bacterianas pré-selecionadas visando possíveis propriedades antibióticas contra Escherichia coli.. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. TARABOULSI JÚNIOR, F. A. ; ANDREOTTI, D. Z. ; MADEIRA JUNIOR, J. V. ; SILVA, A. R. ; [OLIVA NETO, P.](#) . Avaliação de linhagens fúngicas e bacterianas pré-selecionadas visando possíveis propriedades antibióticas contra Escherichia coli.. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

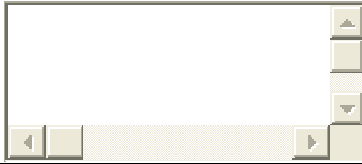
## Eventos

### Participação em eventos

1. XVII SINAIFERM - Simpósio Nacional de Bioprocessos. Bioconversão enzimática da sacarose por processos descontínuo-alimentado. 2009. (Simpósio).
2. IX SHEB - Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Bioconversão da sacarose em açúcar invertido e da glicose em ácido glicônico, através de processo descontínuo-alimentado.. 2009. (Simpósio).
3. XVI SINAIFERM - Simpósio Nacional de Bioprocessos. Seleção de microorganismos com atividade antibiótica contra Escherichia coli. 2007. (Congresso).
4. CBCTA- Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Valiação de linhagens fúngicas e bacterianas pré-selecionadas visando possíveis propriedades antibióticas contra Escherichia coli. 2006. (Congresso).
5. I Fórum de Biotecnologia do Vale do Paranapanema. Avaliação de linhagens fúngicas e bacterianas pré-selecionadas com possíveis propriedades antibióticas contra Escherichia coli. 2006. (Congresso).

### Organização de eventos

1. TARABOULSI JÚNIOR, F. A. . 8º Encontro de Biociências e Biotecnologia de Assis.. 2005. (Congresso).



**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

---

**9134 - 6602472/1 - Fadi Antoine Taraboulsi Junior**

**Email:** fadijr@usp.br  
**Data de Nascimento:** 12/10/1980  
**Cédula de Identidade:** RG - 34.788.905-0 - SP  
**Local de Nascimento:** Distrito Federal  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharel em Biotecnologia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2008

---

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica  
**Área:** Tecnologia de Fermentações  
**Data de Matrícula:** 28/07/2008  
**Início da Contagem de Prazo:** 28/07/2008  
**Data Limite:** 28/01/2011  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Michele Vitolo - 28/07/2008 até o presente. E.Mail: michenzi@usp.br

**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 08/04/2010

**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**

**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**

**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**

**Histórico de Ocorrências:** Ingressou no Mestrado em 28/07/2008  
Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2010

---

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2010





**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

9134 - 6602472/1 - Fadi Antoine Taraboulsi Junior

| Sigla                 | Nome da Disciplina  | Início     | Término    | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação  |
|-----------------------|---|------------|------------|---------------|-------|-------|-------|------|-----------|
| FBT5736-4/1           | Métodos Gerais de Esterilização com Aplicações no Campo Farmacêutico  | 04/08/2008 | 05/10/2008 | 90            | 6     | 90    | A     | N    | Concluída |
| FBT5733-4/4           | Uso Industrial de Enzimas   | 02/03/2009 | 03/05/2009 | 90            | 6     | 100   | A     | N    | Concluída |
| FBT5715-6/2           | Complementos de Matemática Aplicada para Biotecnologia  | 03/03/2009 | 27/04/2009 | 120           | 8     | 100   | A     | N    | Concluída |
| FBA5728-2/9           | Aprimoramento Didático  | 02/04/2009 | 29/04/2009 | 60            | 4     | 100   | A     | N    | Concluída |
| Atividade do Programa | Participou de Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBT0535 Biotecnologia Farmacêutica, ministrada para alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1) | 01/07/2009 | 30/11/2009 | -             | 3     | 0     | -     | -    | -         |

|                                | Créditos mínimos exigidos  |                              | Créditos obtidos |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------|
|                                | Para exame de qualificação | Para depósito da dissertação |                  |
| <b>Disciplinas:</b>            | 25                         | 25                           | 27               |
| <b>Atividades Programadas:</b> |                            |                              |                  |

|                    |    |    |    |
|--------------------|----|----|----|
| <b>Seminários:</b> |    |    |    |
| <b>Estágios:</b>   |    |    |    |
| <b>Total:</b>      | 25 | 25 | 27 |

**Créditos Atribuídos à Dissertação: 71**

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR 3588, de 11.05.2005 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/03/2010.

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

---

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2010

**Impresso em:** 31/05/10 16:00:05