



**Universidade Federal de Goiás**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia**

**Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae* IMOBILIZADA EM POLIANILINA SOBRE O CALDO DE CANA**

**Aluno: Eduardo Fernandes Barbosa**  
**Orientadora: Dra Kátia Flávia Fernandes**  
**Co-Orientador: Dr. Flávio Marques Lopes**

**Goiânia,**  
**2009**

**Universidade Federal de Goiás**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae* IMOBILIZADA EM POLIANILINA SOBRE O CALDO DE CANA**

**EDUARDO FERNANDES BARBOSA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia, área de concentração em Biologia Molecular e Celular.

**Goiânia,**  
**2009**

## Agradecimentos

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me ajudando a transpor barreiras, superar meus limites, aprender sempre e encontrar a felicidade nas coisas simples e corriqueiras da vida... e dessa forma, conquistar o *impossível*;

Aos meus pais e minha irmã, que são meu referencial, meu porto seguro e minha inspiração;

À professora Kátia Flávia, que possibilitou e foi grande responsável por grandes mudanças e conquistas na minha vida. Serei grato por toda vida pela oportunidade, pela paciência, pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais, e pelos momentos de amizade que passamos juntos;

Ao professor Flávio Marques (Mané), que me acompanha e sempre muito me ajuda, desde o início da jornada no Laboratório de Química de Proteínas (LQP), tanto como orientador quanto como amigo;

À minha família, pelo fundamental apoio, orações e boas intenções;

À minha namorada Juliana, pelo companheirismo, carinho e atenção;

Aos meus companheiros de laboratório (Aline, Bárbara, Adriane e Gustavo) pela agradável companhia, amizade e força nos momentos difíceis;

A todos colegas de mestrado, principalmente os mais próximos (Renata, Lorena, Marcelo, Andrei, Marcela, Leandro e Dayane), pelo companheirismo e amizade;

Ao professor Cirano, por permitir o uso do seu laboratório para utilização de alguns equipamentos;

Aos professores Arthur, Ivan e Roberto, pelas dicas e comentários sobre meu trabalho e montagem dos reatores;

À PUC-GO, departamento de Engenharia de Alimentos, pela liberação do uso do equipamento de determinação da atividade de água;

Ao Instituto de Química da UFG, pela liberação dos equipamentos necessários para determinações de viscosidade;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

*...E se fez luz...*

## Lista de Figuras

Figura 01- Mecanismo de formação do complexo ativo invertase-sacarose.....	18
Figura 02- Classificação dos métodos de imobilização de enzimas.....	20
Figura 03- Forma básica da polianilina .....	21
Figura 04-Variação da quantidade de enzima utilizada para a imobilização da invertase em PANIG.....	33
Figura 05- Variação do tempo de imobilização de invertase em PANIG .....	34
Figura 06- Variação do pH de imobilização da invertase .....	35
Figura 07- Variação da temperatura de imobilização.....	36
Figura 08- Variação do pH de reação para a invertase nas formas livre e imobilizada ..	38
Figura 09- Variação da temperatura de reação para invertase nas formas livre e imobilizada .....	40
Figura 10- Variação do tempo de reação para as formas livre e imobilizada .....	41
Figura 11- Análise da estabilidade de armazenamento da invertase livre e imobilizada em PANIG.....	42
Figura 12- Análise da estabilidade térmica da invertase livre e imobilizada .....	43
Figura 13- Análise da retenção de atividade do sistema PANIG-Invertase .....	45
Figura 14- Otimização do sistema em batelada (quantidade de PANIG- <i>Invertase</i> ) .....	46
Figura 15- Otimização do sistema em batelada (tempo de reação) .....	48

## **Lista de Tabelas**

Tabela 01- Revisão bibliográfica sobre imobilização de invertase .....	22
Tabela 02- Eficiência da PANIG na retenção de invertase ativa .....	37
Tabela 03- Otimização do sistema de batelada: variação da concentração de substrato utilizada .....	47
Tabela 04- Análise das características e propriedades do caldo de cana.....	48
Tabela 05- Análise do produto de hidrólise em sistema de batelada.....	49

## Lista de Abreviaturas

**EC** = (*Enzyme Commission of the IUBMB*) Código ou chave de classificação de enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular;

°**BRIX** = equivale a aproximadamente 1 grama de sólidos dissolvido em 100 gramas da solução em questão;

**PANI** = polianilina;

‘**BSTR**’ = (*Batch Stirred Tank Reactor*): reator de batelada de tanque agitado;

‘**CSTR**’ = (*Continuous Stirred Tank Reactor*): reator contínuo de tanque agitado;

‘**CSTR-UF**’ = (*Continuous Stirred Tank Reactor – Ultra Filter*): reator contínuo de tanque agitado com ultra filtração;

**PBR** = (*Packed Bed Reactor*): reator de leito contínuo;

**PFR** = (*Fluidized Bed Reactor*): reator de leito fluidizado;

**PANIG** = polianilina ativada com glutaraldeído;

**E.B.** = solução de extrato bruto;

**ADNS** = Ácido 3,5, dinitrosalicílico;

**UE** = unidades de enzima;

**PANIG-Invertase** = invertase imobilizada em polianilina ativada com glutaraldeído;

***A<sub>w</sub>*** = atividade de água;

**ANOVA** = análise de variância;

**DMS** = diferença mínima significativa;

**AE** = atividade específica;

**PCC** = planejamento composto central;

**μgP** = micrograma de proteína;



## Resumo

Este trabalho descreve a imobilização da enzima invertase em polianilina sintetizada quimicamente e ativada com glutaraldeído (PANIG) para produção de xarope de açúcar invertido a partir de caldo de cana. Atividade da invertase livre, presente no extrato bruto (E.B.), obtido a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae*, foi caracterizada e estabelecida em temperatura de 50°C; pH de 4,5 em tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e tempo de reação de 10 minutos, com uma atividade de 11,31 ± 0,36 UE mL<sup>-1</sup>. A partir da imobilização por ligação covalente, testou-se alguns parâmetros de otimização da imobilização enzimática, como quantidade de enzima, tempo de imobilização, pH e temperatura de imobilização. A imobilização ótima foi obtida em tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5, tempo de imobilização de 1 hora, temperatura de 50°C e 169,55 UE mg<sup>-1</sup> de PANIG. A eficiência de imobilização foi de 0,86. A estabilidade do sistema PANIG-*Invertase* foi testada frente ao tempo de armazenamento e termoestabilidade, sendo que após 75 dias de armazenamento em tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5 obteve-se 94% da atividade inicial, com apenas 17% retidos para a enzima livre. A invertase imobilizada não apresentou variação nas condições ótimas em comparação à livre, porém a imobilizada apresentou-se mais estável em condições adversas, como pH abaixo e acima das condições ótimas e apresentou aumento da termoestabilidade. Algumas características do produto hidrolisado foram avaliadas (Atividade de água, viscosidade e coloração), em comparação ao caldo de cana *in natura*, mostrando que o sistema testado possibilita modificações no caldo de cana que ampliam as possibilidades de utilização do xarope obtido na produção de doces, sorvetes e xaropes ricos em frutose. A elevada estabilidade do sistema testado, junto à sua retenção elevada de atividade, sugerem a aplicação do sistema em reatores.

**Palavras-chave:** Invertase imobilizada, polianilina (PANIG), caldo de cana e xarope de açúcar invertido.

## Abstract

This work describes the immobilization of invertase on chemically synthesized polyaniline and activated with glutaraldehyde (PANIG) for production of invert syrup from sugarcane juice. Free invertase activity present in crude extract (E.B.) obtained from cells of *Saccharomyces cerevisiae*, was characterized for an evaluation of interferences present in the extract on enzyme activity (optimum conditions: temperature 50 ° C, pH of 4.5 in sodium acetate buffer 0.1 mol L<sup>-1</sup> and reaction time of 10 minutes, with an activity of 11.31 ± 0.36 EU mL<sup>-1</sup>). We tested some parameters optimization of enzyme immobilization, such as amount of enzyme, immobilization time, pH and temperature of immobilization. The optimal immobilization was obtained in buffer sodium acetate 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 4.5, immobilization time of 1 hour at 50°C and 169.55 EU mg<sup>-1</sup> PANIG. The efficiency of immobilization was 0.86. The stability of the system PANIG-Invertase was tested against the storage time and thermostability, and after 75 days storage in buffer sodium acetate 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 4.5 was obtained for 94% of initial activity with only 17% retained for the free enzyme. The immobilized invertase didn't change the optimal conditions compared to the free, but the immobilized was more stable in adverse conditions such as pH below and above optimum conditions showed an increase in thermostability. Some features of the hydrolysis product were evaluated (water activity, viscosity and color), compared to the sugarcane juice in nature, showing that the reactors allowed changes in sugarcane juice that expand the possibilities for using syrup obtained in the production of sweets, ice cream and syrups rich in fructose. The high stability of the system tested, along with its high retention of activity strongly suggests the use of the system in reactors.

**Keywords:** Invertase immobilized polyaniline (PANIG), sugarcane juice and invert syrup.

## Sumário

Agradecimentos .....	3
Lista de figuras .....	5
Lista de tabelas .....	6
Lista de abreviaturas .....	7
Resumo .....	9
Abstract.....	10
<b>1.Introdução .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.Caldo de cana .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Enzimas - <i>Invertase</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Imobilização de enzimas.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4. Suportes .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5. Imobilização de <i>Invertase</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>1.6. Objetivo Geral.....</b>	<b>23</b>
<i>1.6.1. Objetivos Específicos .....</i>	<i>23</i>
<b>2. Metodologia.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Obtenção do Extrato Bruto (E.B.) de invertase .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Determinação de proteína no Extrato Bruto (E.B.) .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3. Ensaio de atividade da invertase livre e imobilizada.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4. Análise dos parâmetros de reação sobre invertase livre (pH, temperatura e tempo de reação .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5. Síntese de polianilina (PANI) .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6. Ativação da polianilina com glutaraldeído (PANIG) .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7. Imobilização de invertase em polianilina (PANIG) .....</b>	<b>26</b>
<b>2.8. Otimização dos parâmetros de imobilização .....</b>	<b>27</b>
<i>2.8.1. Quantidade de enzima .....</i>	<i>27</i>
<i>2.8.2. Tempo de imobilização .....</i>	<i>27</i>
<i>2.8.3. pH de imobilização .....</i>	<i>27</i>
<i>2.8.4. Temperatura de imobilização .....</i>	<i>27</i>
<b>2.9. Determinação da eficiência de imobilização .....</b>	<b>28</b>
<b>2.10. Análise da estabilidade do sistema contendo invertase imobilizada em polianilina com glutaraldeído: armazenamento e termoestabilidade .....</b>	<b>28</b>

<b>2.11. Ensaio de uso repetido do sistema (PANIG-Invertase)</b> .....	28
<b>2.12. Otimização do sistema de batelada</b> .....	29
2.12.1. <i>Varição da massa de PANIG-Invertase</i> .....	29
2.12.2. <i>Varição da concentração de substrato</i> .....	29
2.12.3. <i>Varição do tempo reacional</i> .....	29
<b>2.13. Análise do caldo de cana</b> .....	30
2.13.1. <i>Obtenção de caldo de cana</i> .....	30
2.13.2. <i>Determinação de açúcares totais</i> .....	30
2.13.3. <i>Determinação de açúcares redutores</i> .....	30
2.13.4. <i>Determinação da atividade de água</i> .....	30
2.13.5. <i>Determinação da viscosidade</i> .....	31
2.13.6. <i>Análise da coloração do caldo de cana</i> .....	31
<b>2.14. Análise Estatística</b> .....	31
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	32
<b>3.1. Atividade da invertase presente no Extrato Bruto (E.B.)</b> .....	32
<b>3.2. Influência do pH, temperatura, tempo de reação na atividade da invertase livre</b> .....	32
<b>3.3. Síntese e ativação da polianilina com glutaraldeído</b> .....	32
<b>3.4. Otimização dos parâmetros de imobilização</b> .....	33
<b>3.5. Eficiência de imobilização de invertase em PANIG</b> .....	36
<b>3.6. Análise dos parâmetros de reação sobre a atividade da invertase livre e imobilizada</b> .....	37
3.6.1. <i>Varição do pH de reação</i> .....	37
3.6.2. <i>Varição da temperatura de reação</i> .....	39
3.6.3. <i>Varição do tempo de reação</i> .....	40
<b>3.7. Análise da estabilidade do sistema</b> .....	41
3.7.1. <i>Estabilidade de Armazenamento</i> .....	41
3.7.2. <i>Estabilidade Térmica</i> .....	43
<b>3.8. Ensaio de uso repetido (PANIG-Invertase)</b> .....	44
<b>3.9. Otimização do sistema de batelada</b> .....	45
3.9.1. <i>Varição da massa de PANIG-Invertase</i> .....	45
3.9.2. <i>Varição da concentração de substrato</i> .....	46
3.9.3. <i>Varição do tempo de reação</i> .....	47
<b>3.10. Análises do caldo de cana</b> .....	48

<b>4. Conclusões e Perspectivas</b> .....	51
<b>4.1. Conclusões</b> .....	51
<b>4.2. Perspectivas</b> .....	52
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	53
<b>Anexos</b> .....	61

## 1. Introdução

O açúcar invertido é uma mistura de açúcares, cujos principais constituintes são glicose, frutose e sacarose residual. Em solução, também chamado de xarope de açúcar invertido, é obtido pela reação de hidrólise ou inversão da sacarose, resultando em uma mistura equimolar de glicose e frutose (CABRAL, 1989 e ALMEIDA et. al., 2005).

A reação de hidrólise da sacarose pode ser catalisada por enzimas, por ácidos ou por resinas trocadoras de cátions (AKGOL et al., 2001; VICENTE, 2000 e CHEN et al., 2000). Do ponto de vista industrial, a inversão química apresenta maior simplicidade operacional, porém o produto final apresenta qualidade inferior quando comparado ao obtido por inversão enzimática, uma vez que na primeira observa-se certo escurecimento devido à formação de subprodutos tóxicos nas reações secundárias, como hidroximetilfurfural (RODRIGUES, 2000).

A principal enzima utilizada na inversão de sacarose – a invertase (E.C. 3.2.1.26 -  $\beta$ -D fructofuranosidase) – é um catalisador biológico que apresenta uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a geração de subprodutos indesejáveis na reação, facilitando a separação dos produtos e reduzindo problemas de tratamento de efluentes.

Um modo para utilizar a hidrólise enzimática é a imobilização da invertase, pois garante os benefícios da especificidade da catálise e pode-se reduzir o custo do processo, por permitir a reutilização da enzima e eliminar etapas posteriores ao processo de hidrólise, tais como etapas de purificação da solução de açúcar invertido. Alta produtividade, alta estabilidade e o baixo custo para imobilização da invertase são requisitos fundamentais para competir com o processo ácido tradicional (BERGAMASCO et. al., 2000; COUTINHO FILHO et. al., 2005 e MANSFELD et al., 1992)

### 1.1. Caldo de cana

A cana-de-açúcar (*Saccharum ssp*) é uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais devido à grande contribuição socioeconômica que sua exploração representa, em razão de seu grande teor de sacarose e outros nutrientes (STUPIELLO, 1987). O setor sucroalcooleiro está em plena ascensão em função da forte demanda interna e externa, o que se manifesta pela expansão da capacidade produtiva existente e pela implantação de

novas unidades, bem como, melhoria tecnológica no processo de produção de cana-de-açúcar, tais como: introdução de novas cultivares adaptados ao clima, tipo de solo e sistema de corte (manual e mecânico) e maior uso de irrigação (CONAB, 2007). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (CONAB, 2009).

Os produtos da cana-de-açúcar ocupam posição de destaque na economia nacional e possuem ampla utilização, podendo ser utilizados *in natura* sob forma de forragem para alimentação animal, ou como matéria-prima na fabricação de caldo de cana, rapadura, melado, cachaça e, principalmente, na produção do açúcar e do álcool (MENDES, 2006).

O caldo de cana ou garapa é uma bebida energética, não alcoólica, de sabor doce, popularmente consumido no Brasil (OLIVEIRA, 2006). Essa bebida é caracterizada como um líquido opaco, de coloração que varia de parda ao verde escuro, viscoso, cuja composição química pode mudar em função da variedade, idade e higienização da cana-de-açúcar (FAVA, 2004). O líquido preserva todos os nutrientes presentes na cana, entre eles minerais como ferro, cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio, além de vitaminas do complexo B e vitamina C. (FAVA, 2004).

O caldo de cana é constituído basicamente por água (75-82%), tendo entre 18 e 25% de sólidos totais dissolvidos. Dentre os sólidos totais dissolvidos têm-se os açúcares, tais como sacarose (14,5-23,5%), glicose (0,2-1,0%) e frutose (0,0-0,5%), matéria orgânica (0,8-1,5%) e componentes inorgânicos (0,2-0,7%) (DELGADO, 1975). A matéria orgânica compreende: matéria nitrogenada (proteínas, amidas, aminoácidos), gorduras e ceras, pectina, ácidos, matérias corantes (clorofila, antocianina e sacaretina); os inorgânicos são os minerais como sílica e potássio (principalmente) além de fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, ferro, alumínio e cloro (DELGADO, 1975).

O pH do caldo é pouco ácido, variando entre 5 e 6, sendo mais comum o intervalo 5,2 - 5,4. Estes valores de pH associados à presença de altas concentrações de açúcares e elevada atividade de água, tornam a garapa um produto altamente perecível em termos microbiológicos. (LEME Jr.; BORGES, 1965 e MARTUCCI, 1983).

Tal produto se constitui num sistema coloidal muito complexo, no qual o meio de dispersão é a água. As partículas dispersas podem ser grosseiras (bagacilho, areia, terra, gravetos); coloidais (cera, gordura, proteínas, gomas, corantes, dextranas, amido); moleculares ou iônicas (açúcares, sais minerais, ácidos orgânicos) (COPERSUCAR, 1994).

Neste sistema alguns constituintes como os açúcares, as amidas e os aminoácidos, estão em dispersão molecular de difícil separação; os ácidos orgânicos e os sais minerais

apresentam-se dissociados; as matérias corantes, sílica, gomas, pectinas, proteínas e partículas de cera estão em estado de dispersão coloidal. Também, pode-se encontrar em suspensão, partículas de bagaço e outras impurezas (LEME Jr.; BORGES, 1965; BAYMA, 1974; DELGADO; CESAR, 1977 e COPERSUCAR, 1994).

Do ponto de vista da clarificação do caldo de cana, os constituintes mais importantes são aqueles responsáveis pela opacidade e cor do caldo: proteínas (albumina), colóides (polissacarídeos como dextrana), sais (cinzas), pigmentos naturais (clorofila), pectina e compostos resultantes de reações químicas no caldo (sacaretina) (JENKINS, 1966).

O nitrogênio é encontrado no caldo de cana, principalmente na forma de aminoácidos (30,5% do total de nitrogênio) e amidas (24,1% do total de nitrogênio), existindo menores quantidades de proteínas e outros compostos, como nitratos (17,8% do total de nitrogênio). Dentre as proteínas destacam-se: albumina (9,5% de nitrogênio), nucleínas (6,3% de nitrogênio), e albuminoses (5,3% de nitrogênio) (DELGADO, 1975 e HOING, 1973).

O teor de colóides (gomas/polissacarídeos) presente no caldo é estimado entre 0,02-0,29%. Sua permanência no caldo retarda a sedimentação de impurezas, dificultando a clarificação (DELGADO, 1975). As gomas existentes são compostas por açúcares como: arabinose, xilose, galactose, glucose, manose e ramnose, com predominância da arabinose e galactose. Há também as pentosanas, que estão presentes no caldo na faixa de 0,02-0,05% do total dos constituintes (HOING, 1973). A maior parte destes componentes permanece no caldo clarificado na forma de colóides de proteção, contribuindo assim, para o aumento da viscosidade do xarope, das massas cozidas e dos méis (DELGADO, 1975).

A cana é uma gramínea que absorve pouca substância mineral do solo, fato que pode ser observado pelo conteúdo total de cinzas. Os constituintes inorgânicos consistem de sílica (0,351%) e o potássio (0,158%) são os minerais mais abundantes no caldo, além do fósforo (0,098%), cálcio (0,018%) e magnésio (0,014%) presentes em menores proporções (BAYMA, 1974).

De acordo com estudos realizados por Prati e Moretti (2002) e Prati et al. (2003, 2004, 2005) é possível elaborar a partir do caldo de cana uma bebida à base de garapa parcialmente clarificada-estabilizada misturada ou não a sucos de frutas ácidas. Nesse produto seriam preservados grande partes dos nutrientes presentes no caldo de cana, associando-se ainda ao benefício de um tempo de armazenamento em prateleira prolongado.



## 1.2. Enzimas – *Invertase*

De uma maneira geral, a grande maioria das enzimas pode ser definida como proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. São catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (GÜRSEL et al., 2003; ISIK et al., 2003).

As enzimas são os catalisadores eficientes e hoje são amplamente utilizados em várias áreas; na biocatálise industrial, na síntese de aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e antibióticos, na tecnologia de alimentos, em aplicações em diagnósticos clínicos e na bioconversão (BUCHHOLZ et al., 2006; KAPLAN; PESCE, 1989 e CABRAL, 1982).

Na indústria de alimentos o uso de enzimas é bastante comum devido sua alta especificidade e a não geração de subprodutos tóxicos, o que pode ocorrer com a utilização de catalisadores sintéticos ou ácidos (SANJAY; SUGNAN, 2005).

Invertase ou  $\beta$ -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise da extremidade não redutora do resíduo  $\beta$ -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos. Além disso, a invertase catalisa reações de transferência com outros aceptores, resultando na formação de oligossacarídeos constituídos por unidades de glicose e frutose (VICENTE, 2000).

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

Andjelkovic et al. (2009) em seus estudos com invertase extraídas de células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando uma metodologia de extração semelhante à desse trabalho, mostraram a existência de quatro isoformas de invertase extracelular. A isoforma mais utilizada na indústria alimentícia corresponde a mais estável, que pode ser purificada e utilizada pelos métodos tradicionais. Foi mostrado ainda que utilizando-se das diferenças nas reatividades químicas das isoformas poder-se-ia aumentar os rendimentos dos processos de imobilização covalente.

O mecanismo de ação da invertase não é totalmente conhecido, mas estudos com a enzima têm sugerido o envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica (WISEMAN; WOODWARD, 1975). Um mecanismo para a formação do complexo ativo invertase-sacarose foi proposto por Bowski et al. (1971), o qual está representado na figura 01. Pode-se observar a influência do pH no mecanismo de ligação do sítio ativo da invertase com grupos ácidos e básicos, sendo que o complexo ativo só é formado na condição intermediária de pH do meio reacional.

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

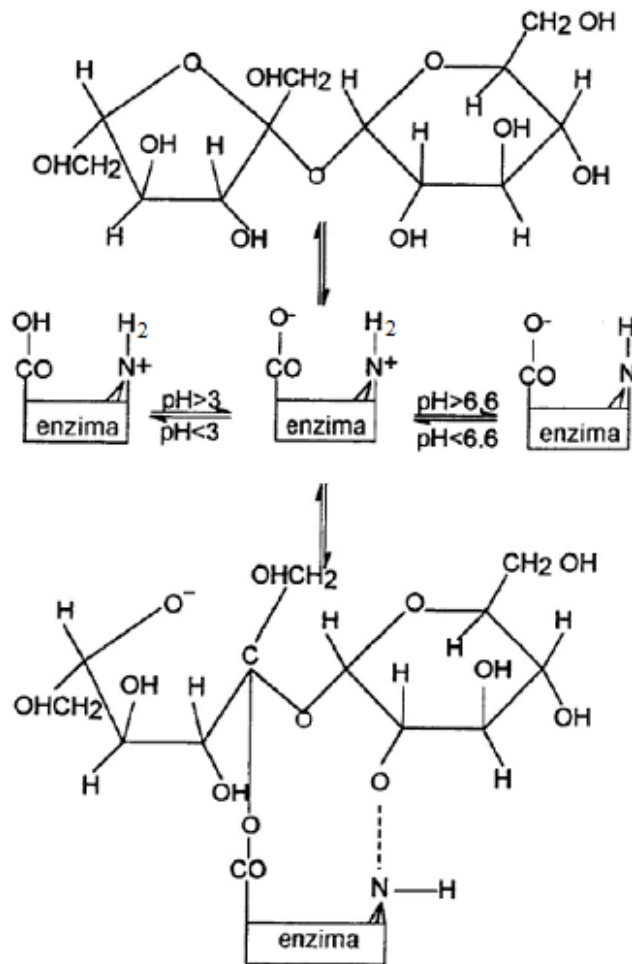


Figura 01 – Mecanismo sugerido para a formação do complexo ativo invertase-sacarose segundo Bowski et al. (1971)

### 1.3. Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas reúne um cabedal de técnicas, que tem como finalidade comum a retenção ou confinamento da molécula enzimática em uma região definida do espaço, preservando sua atividade catalítica, de modo a permitir seu uso repetido e continuamente (SILVA, 2000).

A imobilização reduz o custo operacional do uso desses catalisadores, uma vez que eles podem ser reutilizados em vários ciclos. Além disso, a imobilização possibilita a interrupção do curso da reação, pela remoção do complexo enzima/suporte do meio reacional, garantindo maior controle da qualidade dos produtos, o que nem sempre é possível com a enzima livre (MORAIS, 2004).

Há vários meios de se classificar os métodos utilizados atualmente para imobilizar enzimas. Cada método de imobilização possui vantagens e desvantagens, considerando que, ao se imobilizar uma enzima, há geralmente uma mudança nos parâmetros da reação catalisada, como por exemplo, velocidade máxima da reação, constante de Michaelis - Menten, temperatura ótima e pH de imobilização. O grau ou natureza dessa mudança dependerá não somente do método de imobilização utilizado, mas também das características intrínsecas da enzima em questão, do tipo de suporte adotado, assim como da reação catalisada (AKSOY et al., 1998).

A escolha do método de imobilização dependerá, portanto, do sucesso da imobilização. Tal escolha depende, por sua vez, das maiores vantagens apresentadas, como tempo de preparo, custo, estabilidade da ligação e, portanto, a durabilidade do sistema (LOPES, 2003).

Os métodos de imobilização podem ser divididos nas seguintes categorias: oclusão em gel, microencapsulação, adsorção física, ligação química covalente e ligação química cruzada. A figura 02 representa os diversos métodos de imobilização de enzimas, proposto por Blanch e Klark, (1996).

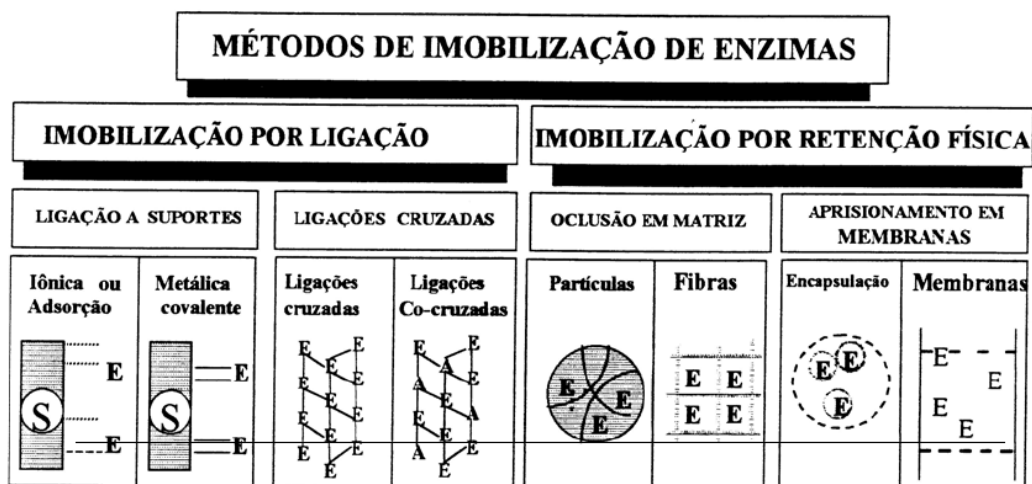


Figura 02- Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. Onde E representa a enzima e S o suporte proposto por Blanch e Klark (1996).

O método de imobilização por ligação covalente emprega os mais variados tipos de ligação, sendo possível imobilizar uma enzima por meio de qualquer um de seus grupos reativos. Sendo assim, há inúmeras opções de reações que podem ser utilizadas para imobilização via ligação covalente. Uma atenção especial deve ser dispensada para que a região da estrutura da enzima responsável pelo desempenho da atividade catalítica não seja envolvido na formação da ligação covalente entre a enzima e o suporte, o que representaria como consequência uma enzima retida desprovida de atividade (SILVA, 2000).

O método da ligação química escolhido para a imobilização da enzima nesse estudo foi a ligação covalente, que é muito utilizado e investigado, e baseia-se na formação de ligações covalentes entre as moléculas da enzima e/ou do suporte com reagentes funcionais. O glutaraldeído, devido suas propriedades bifuncionais, tem sido um dos reagentes mais utilizados na imobilização de enzimas, devido à formação de ligações covalentes entre o suporte sólido e a enzima, conferindo à enzima maior estabilidade (OLIVEIRA; VIEIRA, 2006).

#### 1.4. Suportes

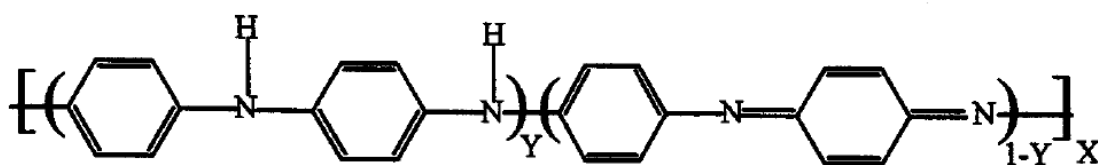
Atualmente uma imensa variedade de suportes tem sido utilizada para a imobilização de enzimas. De um modo geral, classificando-os de acordo com sua natureza química,

podemos descrever duas classes: suportes orgânicos e inorgânicos, sendo possível apontar uma série de vantagens e desvantagens a cada um desses tipos de suporte.

Os suportes orgânicos, que podem ser naturais ou sintéticos, têm sido propostos para a imobilização de enzimas. Sua principal vantagem constitui da sua versatilidade de participarem em um grande número de diferentes reações, o que favorece sua ativação. Como desvantagem apresenta limitações na sua aplicação em algumas áreas devido à sua pobre estabilidade, bem como a dificuldade de reaproveitamento do suporte por métodos simples e ainda à sua susceptibilidade ao ataque microbiológico (SILVA, 2000).

Os suportes inorgânicos têm a sílica e vidros de poros controlados como seus principais representantes. Sua característica mais promissora se deve à possibilidade de obtenção de materiais com propriedades morfológicas variadas, tais como diâmetros do poro, área superficial e forma das partículas, somadas às propriedades mecânicas, particularmente, a baixa compressibilidade, tornou tais suportes os elementos de escolha para montagem de reatores para aplicação industrial (KENNEDY; WHITE, 1986).

O suporte utilizado nesse estudo, pertencente à classe dos polímeros orgânicos sintéticos, foi a Polianilina (PANI). A PANI sintetizada quimicamente tem sido utilizada como suporte para imobilização de enzimas devido à suas propriedades químicas tais como estabilidade durante armazenamento, reatividade com glutaraldeído, alta capacidade de retenção de proteínas e capacidade de estabilizar enzimas em pH alcalino (FERNANDES, 2003; 2004; 2005). O termo polianilina refere-se a uma família ou classe de polímeros constituídos de 1000 ou mais unidades repetitivas, cuja forma básica encontra-se representada na figura 03, obtida pela polimerização química ou eletroquímica da anilina:



**Forma básica da polianilina ou Esmeraldina**

**Figura 03- Forma básica da polianilina ou p-poli(fenilenoaminaimina)**

## 1.5. Imobilização de Invertase

A invertase tem sido reportada como a primeira enzima que foi imobilizada. Este relato originou do trabalho de Nelson e Griffin (1916) que apresentou a atividade hidrolítica da invertase após adsorção em carvão ativado. A partir deste trabalho é possível verificar uma ampla aplicação da invertase em diversos tipos de suportes, como pode ser observado na tabela 01.

Tabela 01 – Revisão bibliográfica sobre imobilização de invertase

<b>Autor/Ano</b>	<b>Suporte</b>	<b>Tipo de Imobilização</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Chibata et al./1978</b>	DEAE-Sephadex	Adsorção	Resolução de misturas racêmicas de aminoácidos;
<b>Chen et al./2000</b>	Filme copolimerizado de polianilina e ácido acrílico	Covalente	Obtenção de superfície ativa;
<b>Tanriseven; Dogan/ 2001</b>	Cápsulas de alginato	Encapsulamento	Produção de açúcar invertido;
<b>D'Souza; Godbole/ 2002</b>	Casca de arroz	Adsorção e covalente cruzada	Reaproveitamento de resíduos alimentícios;
<b>Amaya-Delgado et al./ 2005</b>	<i>Nylon</i>	Covalente	Produção de xarope rico em frutose;
<b>Coutinho et al. / 2005</b>	Sílica porosa	Adsorção, iônica e cruzada	Produção de xarope de açúcar invertido;
<b>Sanjay; Sugunan/ 2005</b>	Montmorillonite K-10	Adsorção e covalente	Construção de reatores;

<b>Bagal; Karve/ 2006</b>	Membrana porosa	Aprisionamento	Fabricação de biossensores;
<b>Empregul et al./ 2006</b>	Gelatina e poliacrilamida	Covalente cruzada	Aplicações biotecnológicas;
<b>Marquez/ 2007</b>	Resinas trocadoras de íons	Adsorção e iônica	Produção de açúcar invertido.

Os inúmeros trabalhos sobre invertase imobilizada descritos na literatura aplicam a enzima imobilizada na hidrólise de uma solução de sacarose. Muito pouco foi investigado sobre o uso dessa enzima imobilizada na catálise de sacarose presente em outros produtos. Existem inúmeros produtos naturais e manufaturados ricos em sacarose que podem ser utilizados como substrato dessa enzima. Pode se citar como exemplos sucos de frutas, bebidas açucaradas, bem como o caldo de cana. No presente trabalho, escolheu se o caldo de cana como substrato para a invertase imobilizada em polianilina ativada com glutaraldeído (PANIG), uma vez que o produto hidrolisado poderia apresentar vantagens em suas propriedades e utilizações.

## 1.6. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é usar a invertase imobilizada para hidrolisar a sacarose de caldo de cana.

### 1.6.1. Objetivos específicos

- Extrair a enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Caracterizar a atividade da invertase presente no Extrato Bruto (E.B.);
- Otimizar a imobilização da invertase;
- Analisar a estabilidade da enzima livre e imobilizada;
- Analisar o uso repetido do complexo enzima-suporte.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Obtenção do extrato bruto (E.B.) de invertase

O extrato bruto (E.B.) foi obtido segundo Chaplin (1990). Foram adicionados 30 mL de uma solução de bicarbonato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em 10 g de fermento biológico seco (fermento de panificação *Fleishmann – A.B. BRASIL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE ALIMENTOS LTDA, Pederneiras SP*). A mistura foi mantida a  $40^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos para a separação dos componentes celulares da enzima solubilizada no sobrenadante. O sobrenadante foi liofilizado e armazenado a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Determinação de proteína no extrato bruto (E.B.)

O E.B. liofilizado (0,5 g) foi diluído em 30 mL de tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,6. A determinação da concentração de proteínas foi feita pelo método do micro Bradford (1976) tendo como padrão uma curva de albumina bovina (BSA). Para cada ensaio, foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  da amostra para 1 mL do reativo de Bradford, com um tempo de reação de 10 minutos. Findado o tempo de reação fez-se a leitura a 595 nm em espectrofotômetro (*Bel photonics Spectrophotometer SP2000 UV*). O valor de absorbância obtido foi convertido em valor de concentração de proteína pela equação:  $Y = 0,0394x + 0,3047$ , com  $R^2 = 0,999$ , onde x representa a concentração ( $\mu\text{g } 100\mu\text{L}^{-1}$ ) e Y representa o valor da absorbância. Testes em branco foram feitos com água em substituição à amostra.

### 2.3. Ensaio de atividade da invertase livre e imobilizada

A atividade da enzima invertase nas formas livre e imobilizada foi determinada pela concentração de açúcares redutores produzidos após o tempo de ensaio. A quantificação de açúcares redutores foi realizada segundo Miller (1959), com adaptações, utilizando o ácido 3-5-dinitrossalicílico (ADNS) como reagente de cor.

Para determinação da atividade da invertase solúvel, adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de extrato bruto ( $3,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $11,31 \text{ UE mL}^{-1}$ ), 1 mL de tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 1 mL de



solução de sacarose 1% ( $0,029 \text{ mol L}^{-1}$ ), e a mistura foi incubada à  $50^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Em seguida foram retirados  $100 \mu\text{L}$  da mistura que foram adicionados a  $1,0 \text{ mL}$  do reagente ADNS. A mistura foi levada a banho-maria fervente por 5 minutos e resfriada em água corrente. A leitura da absorbância foi realizada a  $550 \text{ nm}$ . Testes em branco foram feitos com água em substituição à amostra.

O teor de açúcar redutor foi determinado por curva padrão, a qual apresentou um faixa de linearidade de  $0,1$  a  $1,4 \text{ mg}$  de glicose ( $R^2 = 0,9977$ ). A conversão dos valores absorbância em concentração de açúcar redutor obedeceu à equação  $Y = 0,9975x - 0,1428$ ; onde  $x$  corresponde à concentração de açúcares redutores ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e  $Y$  corresponde aos valores de absorbância.

Uma unidade de enzima (UE) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir  $1,0 \mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto, nas condições específicas de ensaio.

#### **2.4. Análise dos parâmetros de reação sobre a atividade invertase livre (*pH, temperatura e tempo de reação*)**

Para determinar as condições ótimas de reação foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (para valores de pH situados na faixa de  $3,5$  a  $5,5$ ) e fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (para valores de pH situados na faixa de  $6,0$  a  $7,5$ ). A temperatura de reação foi variada em valores entre  $24$  e  $60^\circ\text{C}$ , controlada por banho termostatizado. O tempo da reação foi variado de  $5$  a  $60$  minutos.

#### **2.5. Síntese de polianilina (PANI)**

A síntese de polianilina foi realizada seguindo a metodologia descrita por Fernandes et al. (2003), adicionando-se, volume a volume, uma solução de  $0,61 \text{ mol L}^{-1}$  do agente oxidante persulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) a uma solução  $0,44 \text{ mol L}^{-1}$  de anilina ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ ), ambas preparadas em ácido clorídrico ( $\text{HCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$ ).

A reação de polimerização se processou pela adição gota a gota de solução de agente oxidante sobre a solução de anilina, com leve agitação, por um período mínimo de duas horas, mantendo-se as soluções em temperatura próxima a  $-4^\circ \text{C}$ . Findada a adição de agente oxidante a solução permanecia sob agitação por 30 minutos, seguido por 2 horas de repouso,

finalizando a síntese. O precipitado resultante da síntese, constituído do polímero recém sintetizado, foi separado por filtração a vácuo em funil de *Büchner* e então lavada exaustivamente com HCl 2,0 mol L<sup>-1</sup>. Finalmente o polímero foi seco em dessecador à temperatura ambiente. O polímero foi armazenado em frasco de plástico opaco (polietileno de alta densidade), ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

## **2.6. Ativação da polianilina com glutaraldeído (PANIG)**

A ativação da polianilina foi realizada pela ligação de poliglutaraldeído segundo a metodologia adotada por Fernandes (2003). Esta ativação se baseia na ligação de moléculas de glutaraldeído em sítios específicos na estrutura da PANI. Essas ligações propiciam a ligação da enzima durante a imobilização. Na ativação, inicialmente preparou-se uma solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7. Misturou-se a solução de PANI na proporção de 10 mL de glutaraldeído para 1 mg de PANI. A suspensão foi mantida em sistema aquecido, parcialmente vedado, por duas horas. Lavou-se a polianilina ativada com glutaraldeído em funil com tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 e 6, para retirar o excesso de glutaraldeído não ligado. O polímero ativado (PANIG) foi seco em dessecador à vácuo (PANIG), sendo então armazenado em frasco plástico opaco (polietileno de alta densidade), ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

## **2.7. Imobilização de invertase em polianilina (PANIG)**

Foram pesados 5 mg de PANIG e adicionados a 75 µL de solução de invertase com 11,31 UE mL<sup>-1</sup>, juntamente com 925 µL de solução tampão de acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,6. O conjunto foi agitado por 1 hora em determinada temperatura. Após a reação de imobilização, o sistema foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante (S<sub>0</sub>) foi recolhido. Para remoção completa de qualquer resíduo de imobilização não ligado covalentemente foram feitas lavagens do conjunto PANIG-Invertase com 1 mL de solução salina (NaCl 0,5 e 1%), preparadas em tampão acetato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 4,6, obtendo os sobrenadantes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>. Os sobrenadantes resultantes (S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>) foram recolhidos, reunidos, dialisados contra água destilada e liofilizados para a determinação da concentração de proteínas e verificação da eficiência da imobilização.

## **2.8. Otimização dos parâmetros de imobilização (*quantidade de enzima, tempo de imobilização, pH e temperatura*)**

### *2.8.1. Quantidade de enzima*

A quantidade de enzima ofertada para o processo de imobilização foi variada, nos valores de 25, 50, 75, 100 e 150  $\mu\text{L}$  de solução de invertase contendo  $11,31 \text{ UE mL}^{-1}$ . Aos volumes da solução de invertase foram adicionados volumes de solução tampão de acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,6 complementares a 1 mL (975  $\mu\text{L}$ ; 950  $\mu\text{L}$ ; 925  $\mu\text{L}$ ; 900  $\mu\text{L}$  e 850  $\mu\text{L}$ , respectivamente). A quantidade de PANIG foi mantida fixa em 5 mg, o tempo de imobilização foi de 1 hora e a temperatura de 30 °C.

### *2.8.2. Efeito do tempo de imobilização*

Em seguida o tempo de imobilização foi variado. A massa de PANIG utilizada foi mantida fixa em 5 mg de PANIG. O volume da solução de invertase utilizada foi de 75  $\mu\text{L}$ , que corresponde a 169,65 UE para cada grama de PANIG. A temperatura foi fixada em 30° C. Os tempos de imobilização foram variados de 30 minutos a 24 horas. A atividade foi medida pela metodologia já descrita acima (item 2.3.).

### *2.8.3. Efeito do pH*

Foram feitos testes para verificar o efeito do pH sobre o processo de imobilização de invertase em PANIG. Nestes testes, a enzima invertase foi solubilizada em tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , para os valores de pH entre 3,5 e 5,5 e em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para os valores de pH entre 6,0 e 7,5. Alíquotas de 75  $\mu\text{L}$  de uma solução de invertase (169,65 UE para cada grama de PANIG), junto com 925  $\mu\text{L}$  da solução tampão em questão, foram adicionadas a 5 mg de PANIG e deixada sob agitação, a temperatura de 30 °C, por 1h. A atividade foi medida pela metodologia já descrita acima (item 2.3.).

### *2.8.4. Efeito da temperatura*

Foram realizados testes para verificar o efeito da temperatura sobre a imobilização. Nesses testes o tempo foi de 1 hora, 75 $\mu\text{L}$  de solução de invertase (169,65 UE para cada

grama de PANIG) e 5 mg de PANIG, em banho termostático, ajustado nas seguintes temperaturas: 4, 30 e 40 °C. A atividade foi medida pela metodologia já descrita no item 2.3.

### **2.9. Determinação da eficiência da imobilização (PANIG-*Invertase*)**

Após o processo de imobilização enzimática e separação da matriz polimérica insolúvel (PANIG) por centrifugação à 10.000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante resultante do processo de imobilização e as três soluções de lavagem foram coletadas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e dissolvidas novamente em tampão acetato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,6 e a concentração de proteínas foi mensurada através do método de micro Bradford. A atividade enzimática do sobrenadante foi medida pela metodologia já descrita acima (item 2.3.).

### **2.10. Análise da estabilidade do sistema contendo invertase imobilizada em polianilina ativada com glutaraldeído: armazenamento e termoestabilidade.**

Armazenou-se, em ambiente climatizado com temperatura reduzida e ajustada em 4 °C, alíquotas de 500 µL de solução de invertase (11,31 UE mL<sup>-1</sup>) e alíquotas da invertase imobilizada em PANIG suspensas em 500 µL de solução tampão acetato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,6 (7,32 UE mL<sup>-1</sup>). Foram realizados ensaios de atividade após armazenamento de 4 a 75 dias de armazenamento.

A estabilidade térmica para as formas livre e imobilizada da invertase foi determinada após a sua incubação por período de tempo entre 5 e 60 minutos, com temperatura entre 40 e 60° C. Após a incubação foram feitos os testes de atividade para a enzima livre e imobilizada.

### **2.11. Ensaios de uso repetido do sistema (PANIG-*Invertase*)**

Nos ensaios iniciais de uso repetido do sistema contendo invertase imobilizada em PANIG, após a reação de hidrólise da sacarose, o sistema foi submetido a 3 lavagens com excesso de tampão acetato pH 4,6, sendo que a separação da enzima imobilizada foi feita por

centrifugação à 10.000 rpm por 2 minutos. A atividade foi medida pela metodologia já descrita acima (item 2.3.).

## **2.12. Otimização do sistema**

O sistema para reação em batelada apresentava câmara de reação em formato tubular, constituído de polietileno de alta densidade, com capacidade máxima de 34 mL, volume útil de 20 mL. Junto à base inferior possuía um tubo capilar de vidro, com 3 camadas de filtro de *nylon* que separava o produto hidrolisado da enzima imobilizada em PANIG após o tempo reacional.

### *2.12.1. Variação da massa de PANIG-Invertase*

As massas de PANIG- *Invertase* testadas foram entre 10 e 200 mg, com solução de sacarose de 20 % (p/v). A concentração da solução de sacarose escolhida foi de 20%, pois esse valor se aproxima da concentração média de sacarose encontrada no caldo de cana de muitas espécies de cana de açúcar. A atividade foi medida pela metodologia já descrita acima (item 2.3.).

### *2.12.2. Variação da concentração de substrato*

Para se verificar o efeito da concentração na eficiência hidrolítica do sistema de batelada, foram testadas concentrações de 15, 20 e 25% (p/v) de sacarose. A atividade foi medida pela metodologia já descrita acima (item 2.3.).

### *2.12.3. Variação do tempo de reação*

Os tempos de reação testados foram de 5 a 50 minutos, com concentração de sacarose de 20% (p/v). Foi realizado ainda o teste de uso repetido para o sistema de batelada para verificar a manutenção da atividade da invertase após os ciclos de uso desse sistema, sendo que a atividade foi mensurada pela metodologia descrita acima para esse tipo de determinação (item 2.3.).

## 2.13. Análises do caldo de cana

### 2.13.1. Obtenção do caldo de cana

O caldo de cana utilizado no processamento foi extraído de cana de açúcar (*Sacharum ssp.*) variedade RB867515, obtidas da Usina Açucareira Centroálcool S/A., Inhúmas-GO. Após o recebimento, as canas foram raspadas para eliminação de contaminantes presentes nos colmos. Para a extração do caldo, foi utilizado moedor de cana de material inoxidável.

Após a obtenção, o caldo foi filtrado à vácuo em filtro de *nylon*, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e acondicionado em recipiente vedado à temperatura de 4°C até a realização das análises.

### 2.13.2. Determinação de açúcares totais

A determinação dos açúcares totais foi realizada pelo método do fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Os teores de açúcar foram determinados por espectrofotometria a 490 nm utilizando curva padrão de glicose a 1%, com intervalo de 10 a 90 µg. Para a análise do caldo de cana a amostra teve que ser diluída em 1:1000.

### 2.13.3. Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores no caldo de cana seguiu a mesma metodologia utilizada nos testes de verificação de atividade enzimática, segundo Miller (1959). A concentração determinada no caldo de cana foi descontada dos valores de concentração de açúcares redutores obtidos após a hidrólise enzimática (item 2.3).

### 2.13.4. Determinação da atividade de água

A determinação da atividade de água ( $A_w$ ) das amostras de caldo de cana e do produto hidrolisado testados foi feita em aparelho AquaLab, digital, (CX-2, DECAGON), acoplado a um banho termostático. As determinações foram realizadas a uma temperatura média de 25°C. As amostras eram colocadas nos recipientes de plástico específicos do aparelho até o preenchimento de um terço da sua altura. O recipiente era então encaixado no suporte do aparelho, a gaveta era fechada e era feita a leitura da atividade de água.

### 2.13.5. Determinação da viscosidade

A viscosidade foi determinada em viscosímetro de Ostwald acoplado a um controlador de temperatura SCHOTT CT 52 e a um aspirador SCHOTT AVS 350. Um volume de 10 mL da amostra foi transferido para o viscosímetro limpo e seco e foi deixado estabilizar por 10 minutos até atingir a temperatura de 25°C. O líquido foi aspirado e o tempo de escoamento era medido. Para a determinação da viscosidade através desta metodologia, se faz necessário a medida da densidade dos líquidos testados. Para tanto, foi pesado, inicialmente o picnômetro vazio, limpo, seco e com tampa. Posteriormente foi pesado com água destilada e depois com o líquido teste e as massas específicas foram determinadas. Os picnômetros completamente cheios foram levados a um banho termostatizado a 25°C por 10 minutos.

O viscosímetro de Oswald permite uma determinação simples do coeficiente de viscosidade a partir de uma substância padrão. Neste caso as medidas de viscosidade são feitas por comparação entre o tempo na vazão do fluido de viscosidade conhecida, geralmente água, e o de um fluido de viscosidade desconhecida. Neste caso a equação usada é:

$$\eta_1 / \eta_2 = d_1 \cdot t_1 / d_2 \cdot t_2$$

onde  $d_1$  e  $d_2$  são as densidades dos fluidos conhecido e desconhecido, respectivamente e  $t_1$  e  $t_2$  são os tempos correspondentes para que escoem volumes iguais dos líquidos. A precisão na operação com este viscosímetro depende do controle das variáveis temperatura, tempo, alinhamento vertical e volume da substância estudada.

### 2.13.6. Análise da coloração do caldo de cana

A coloração do caldo de cana *in natura* e do caldo de cana hidrolisado foi determinada pela leitura da transmitância da amostra a 420 nm em espectrofotômetro, segundo Pulzatto (1995).

## 2.14. Análise Estatística

Todos os ensaios foram feitos em triplicata para a obtenção das médias e dos desvios padrão. Os dados obtidos tiveram suas médias comparadas pela Análise de Variância (ANOVA) segundo um único critério, com nível de significância ( $\alpha$ ) igual a 0,05 e teste *t* pareado ( $\alpha$  igual a 0,05) e teste Tukey (DMS).

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1. Atividade da invertase presente no extrato bruto (E.B.) usada no trabalho**

O E.B. obtido apresentou uma concentração média de proteínas de  $3,46 \pm 0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Obteve-se uma atividade em unidades de enzima de  $11,31 \pm 0,36 \text{ UE mL}^{-1}$ . A atividade específica (AE) da enzima foi de  $3269 \pm 10 \text{ U mg}^{-1}$ .

#### **3.2. Influência do pH, temperatura e tempo de reação na atividade da invertase livre**

No presente trabalho, a enzima extraída de células de *Saccharomyces cerevisiae* e utilizada para os processos de imobilização e construção do sistema não passou por nenhum processo de purificação. Assim sendo, a atividade da enzima livre foi caracterizada para observar se havia interferência de algum constituinte do E.B. na reação enzimática em diferentes condições de catálise e também para fins de comparação com a enzima imobilizada.

O valor ótimo de pH encontrado foi 4,5, estando de acordo com os valores ótimos de pH descritos na literatura (GÁSCON et al. 1981; SEGEL, 1979; DIXON; WEBB, 1979 e ANDJELKOVIC et al., 2009). A temperatura ótima foi de 50° C, valor também de acordo com a literatura (BAGAL; KARVE, 2006 e MARQUEZ, 2007). Com relação ao tempo de reação foi escolhido o tempo de 10 minutos como valor para o ensaio padrão, por ser o ponto central da região de resposta linear.

#### **3.3. Síntese e ativação da polianilina com glutaraldeído (PANIG)**

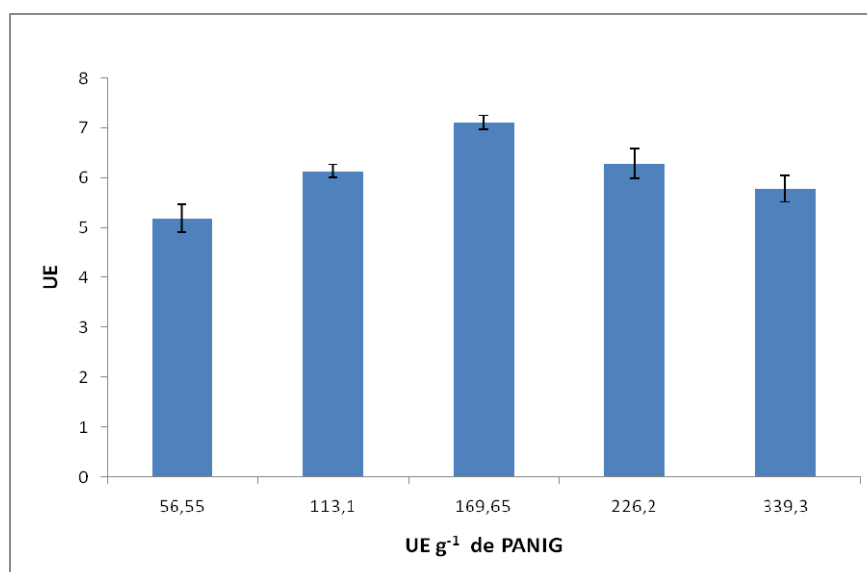
A síntese química de polianilina usando persulfato de amônio e HCl resultou em rendimento médio de 88,3%, resultando em um material na forma de pó fino, de cor verde-brilhante. O rendimento foi mantido após processo de ativação com glutaraldeído. A ligação do glutaraldeído à PANI confere a presença de sítios para ligação covalente das enzimas que possuem grupos amino periféricos. As características físico-químicas do polímero são alteradas após o procedimento de ativação, resultando em um pó de aspecto negro opaco. Resultados similares foram obtidos por Lopes (2003) e Fernandes (2003).



### 3.4. Otimização dos parâmetros de imobilização (*quantidade de enzima, tempo de imobilização, pH e temperatura* )

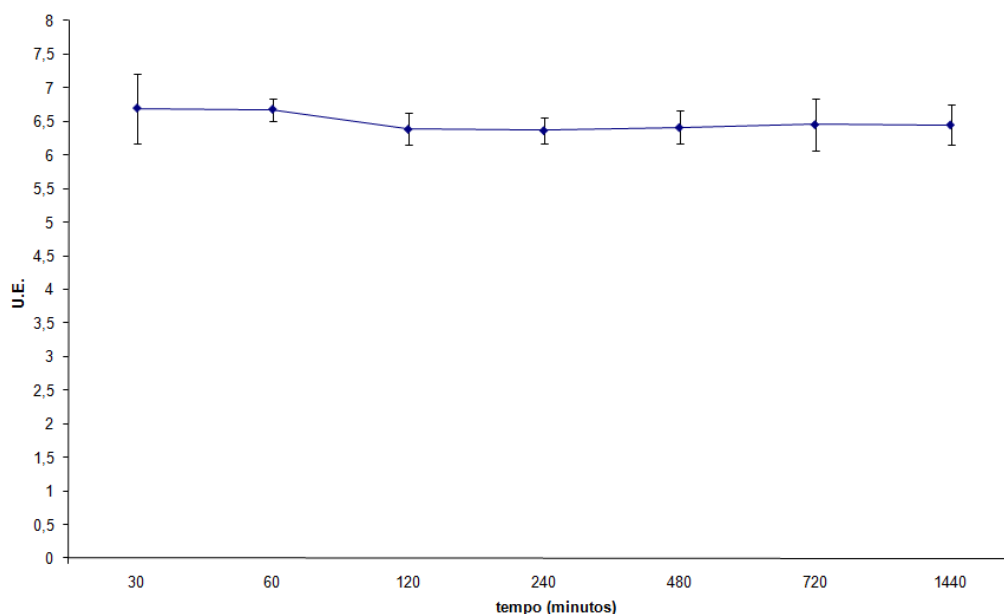
Foi avaliada, inicialmente, a quantidade de enzima presente no E.B. que representaria a condição ótima para o processo de imobilização. Os resultados obtidos estão representados na figuras 04.

Após análise estatística dos resultados (anexo 01) verificou-se que há um aumento significativo na atividade da enzima imobilizada quando a quantidade ofertada foi aumentada de 56,55 UE g<sup>-1</sup> de PANIG até 169,65 UE g<sup>-1</sup> de PANIG. A partir desse ponto há um decréscimo na atividade de enzima imobilizada, provavelmente devido a formação de várias camadas de enzimas que se depositam umas sobre as outras, resultando em excessiva proximidade dos sítios ativos, o que pode levar a impedimento estérico ao substrato (SILVA, 2000).



**Figura 04-** Variação da quantidade de enzima utilizada para a imobilização da invertase em PANI. 5 mg de PANIG; 30 °C de temperatura; tempo de 1 hora; agitação mecânica por inversão; volumes de E.B. utilizados ( 25, 50, 75, 100 e 150 µL) e tampão acetato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 4,6.

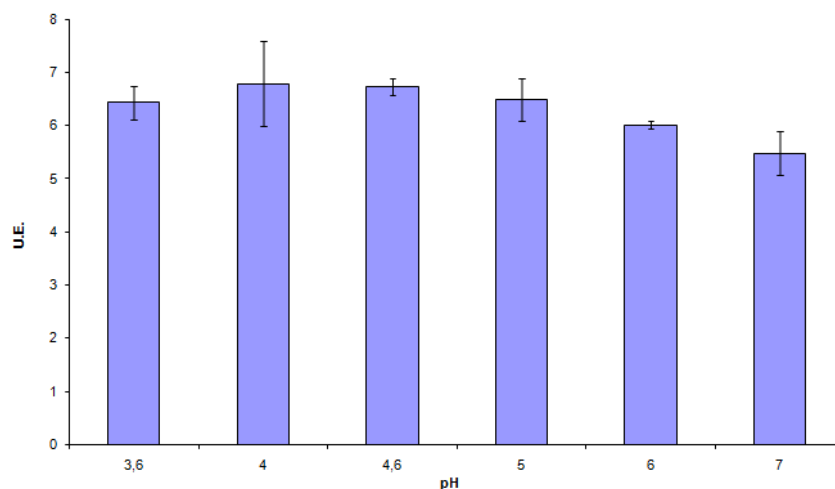
A variação do tempo de imobilização em valores entre 30 minutos e 24 horas, nas condições testadas, não resultou em alteração estatisticamente significativa na quantidade de enzima retida (anexo 2), conforme mostra a figura 05. Foi escolhido então o tempo de imobilização de 60 minutos, pois apresenta menores variações e desvios na atividade da enzima imobilizada, quando comparada com o tempo de 30 minutos.



**Figura 05- Variação do tempo de imobilização de invertase em PANIG. 5 mg de PANIG; 30 °C de temperatura; agitação mecânica por inversão; 75 µL de E.B.e tampão acetato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>pH 4,6.**

O pH ótimo para imobilização de uma enzima é aquele em que os grupos reativos do suporte e da enzima estão apropriadamente reativos (SILVA, 2000). Conforme demonstrado na figura 06, na faixa entre 3,6 e 5,0 não existe diferença significativa entre as médias de imobilização quando comparadas. Os valores de pH 6,0 e 7,0 diferem significativamente das demais médias, comprovados por *teste t* (anexo 03). A solução tampão utilizada para imobilização da enzima nos ensaios seguintes foi o acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,6 sendo esse tampão o mais utilizado em ensaios de imobilização de invertase (KOTWAL; SHANKAR, 2009).

Amaya-Delgado et al. (2005) obtiveram resultados similares ao imobilizar invertase extracelular de *Saccharomyces cerevisiae* em *nylon* ativado com glutaraldeído.

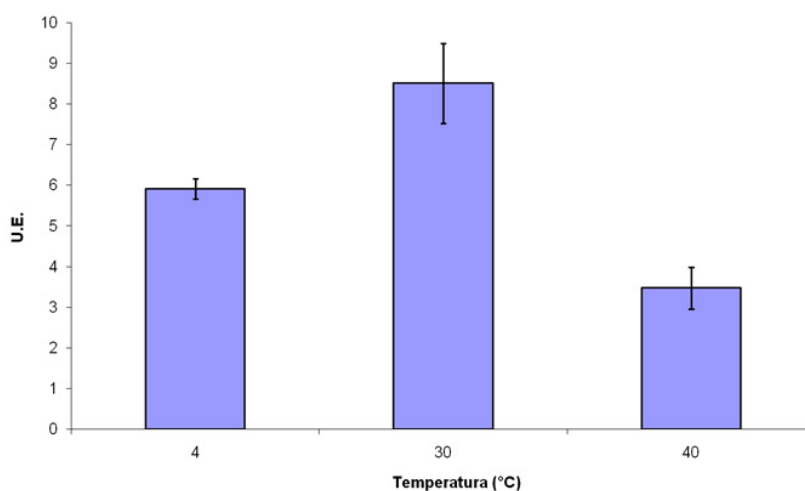


**Figura 06- Variação do pH de imobilização da invertase: tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , para os valores de pH 4,0 e 5,0 e em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para os valores de pH 6,0 , 7,0 e 8,0; 5 mg de PANIG;  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura; agitação mecânica por inversão e  $75 \text{ }\mu\text{L}$  de E.B. e solução de sacarose 1% (p/v) como substrato.**

A análise da temperatura do ambiente de imobilização também é de grande importância. O nível de agitação da molécula pode refletir diretamente na quantidade de enzima que interage com o suporte, ligando-se e ficando então imobilizada

A figura 07 representa a resposta da imobilização frente à variação da temperatura, sendo que a temperatura ótima, com maior retenção da atividade para a enzima imobilizada foi alcançada com  $30^\circ \text{C}$ . Os resultados apontam que houve diferença significativa entre as médias analisadas (anexo 04). Bagal e Karve (2006) avaliaram também a influência da temperatura e do pH no processo de imobilização de invertase e obtiveram resultados próximos aos deste estudo, com temperatura ótima entre  $30$  e  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH de 4,5.

Marquez (2007), analisando as influências da temperatura e do pH na imobilização, simultaneamente, através do *Planejamento Composto Central (PCC)* obteve resultados similares: a faixa de temperatura que resultou em alta atividade ficou compreendida nas proximidades de  $30^\circ\text{C}$  e o pH 4,5 foi o responsável pela maior atividade enzimática.



**Figura 07- Variação da temperatura de imobilização. Temperaturas de 4, 30 e 40°C, 5 mg de PANIG-Invertase; agitação mecânica por inversão; 75  $\mu$ L de E.B. e tampão acetato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,6 e solução de sacarose 1% (p/v) como substrato.**

Assim sendo, foi definido como condições ótimas de imobilização em PANIG para a invertase presente no E.B. como sendo: pH de 4,6; temperatura de 30°C; 169,63 U g<sup>-1</sup> de PANIG, e tempo de imobilização de 1 hora.

### **3.5. Eficiência de imobilização de invertase em PANIG**

O processo de imobilização, nas condições ótimas, resultou numa retenção de atividade enzimática equivalente à aproximadamente 62% e uma eficiência de 0,86. Esse e outros aspectos referentes à retenção de atividade, retenção de proteínas e eficiência da imobilização estão representados na tabela 02, assim como a relação existente entre a atividade específica e a quantidade em massa de PANIG, o que representa de fato a atividade funcional das partículas de PANIG-*Invertase* obtidas:

**Tabela 02- Eficiência da PANIG na retenção de invertase ativa**

	UE	% imobilizada	$\mu\text{gP}$	% imobilizada	AE	Eficiência	AE/ mg PANIG
<b>Livre</b>	11,31	62	3,46	75	3,27	0,86	0,504
<b>Imobilizada</b>	7,32		2,6		2,82		

Alguns aspectos devem ser considerados quando se avalia a eficiência de um processo de imobilização. Dentre eles, deve-se dispensar maior atenção à imobilização por grupos funcionais relacionados com a atividade enzimática, que traz como consequência, a imobilização de enzimas desprovidas de atividade, assim como o chamado *overloading* ou sobrecarga, que ocorrem quando várias camadas de enzimas se depositam umas sobre outras, resultando em excessiva proximidade de sítios ativos o que pode levar ao impedimento estérico pelo substrato (FERNANDES, 2000).

A eficiência do método foi medida pela razão de atividade específica da enzima livre e a atividade específica da enzima imobilizada. Obteve-se uma eficiência de imobilização de 0,86, ou seja, aproximadamente 86 % da proteína retida preservou sua atividade catalítica. Pode-se considerar aqui que a fonte de enzimas utilizada constituía-se de um extrato bruto, possibilitando a imobilização de outras proteínas, além da enzima invertase. Eficiência igual a 1 ou 100 % são alcançadas na maioria das vezes em sistemas que utilizam enzimas puras como fonte de proteínas em processos completamente otimizados – relação ótima de suporte, espaçador e condições de imobilização – (SILVA, 2000).

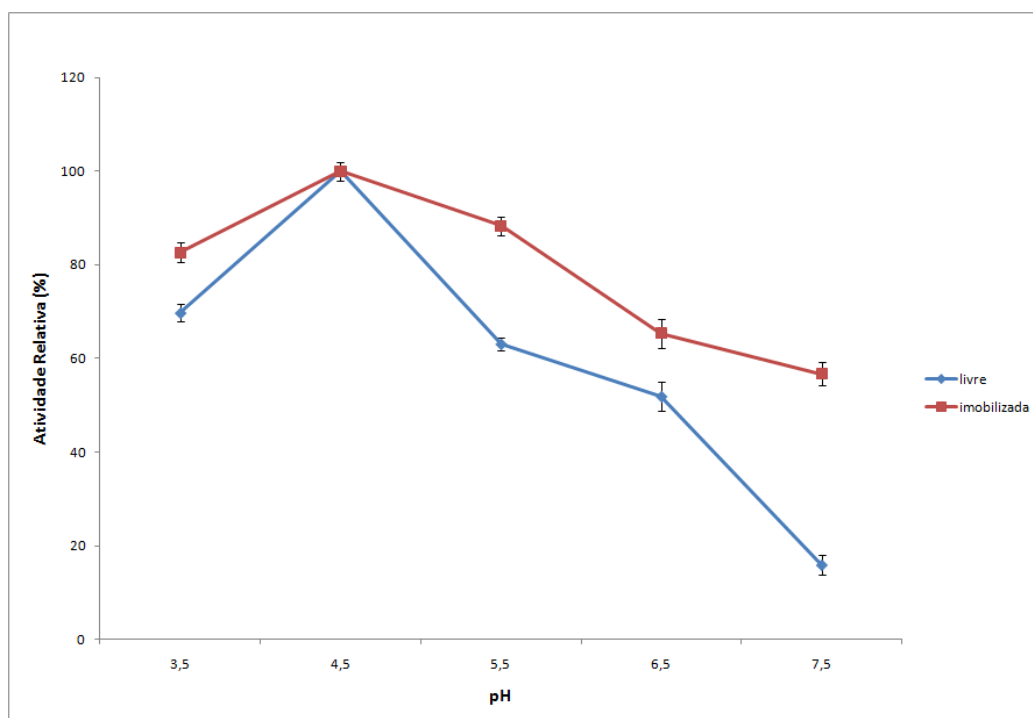
Chen *et al.*, 2000, imobilizou covalentemente invertase em filmes de polianilina na forma esmeraldina com superfície modificada com ácido acrílico, obteve uma eficiência de 40 %. A baixa eficiência foi atribuída à acessibilidade reduzida do substrato e mudanças conformacionais na enzima induzidas pela imobilização.

### **3.6. Análise dos parâmetros de reação sobre a atividade da invertase livre e imobilizada (pH, temperatura e tempo de reação)**

#### **3.6.1. Variação do pH de reação**

As condições nas proximidades do ambiente catalítico influenciam notoriamente a catálise de uma enzima, bem como o processo de imobilização. Dentre esses fatores, o pH exerce grande influência na atividade e estabilidade das enzimas. Os vários aminoácidos que compõe a proteína possuem grupos laterais básicos, neutro ou ácidos, portanto a enzima pode ser carregada positivamente ou negativamente, dependendo do pH. Tais grupos ionizáveis são freqüentemente parte do sítio ativo, já que um mecanismo catalítico ácido-base está ligado à catálise enzimática. Assim, para a enzima estar cataliticamente ativa, só existe um estado particular de ionização. Dessa forma, a enzima ativa será uma fração maior ou menor da concentração total da enzima, dependendo do pH. A velocidade da reação aumenta com pH até um valor ótimo a partir do qual a velocidade decresce, ou devido à desnaturação ou a existência de estados de ionização inadequados (SEGEL, 1979 e DIXON; WEBB, 1979).

Na figura 08, apresenta-se a atividade relativa das forma livres e imobilizadas frente à variação do pH do meio reacional.



**Figura 08- Variação do pH de reação para a invertase nas formas livre e imobilizada. Tampões utilizados: acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (para valores de pH situados na faixa de 3,5 a 5,5) e fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( para valores de pH situados na faixa de 6,0 a 7,5). 5 mg de PANIG-Invertase;  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura de reação e tempo de 10 minutos e solução de sacarose 1% (p/v).**

Ambas formas apresentaram pH ótimo de 4,5, porém a forma livre mostrou-se menos estável em condições mais básicas e ácidas, indicando que o processo de imobilização estabilizou a atividade da invertase.

Andjelkovic et al. (2009) em suas investigações com purificação e caracterização das 4 diferentes isoformas de invertase extracelulares produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* determinaram que essas apresentam um valor de pH ótimo na faixa de 3,5 – 5,0. Foi demonstrado ainda que essas enzimas apresentam a mesma massa molecular e outras propriedades catalíticas, como Km, temperatura ótima, porém com diferenças no *pI*, estabilidade térmica e reatividade química. Bora et al. (2005) obtiveram o pH ótimo para a invertase livre igual a 5,0.

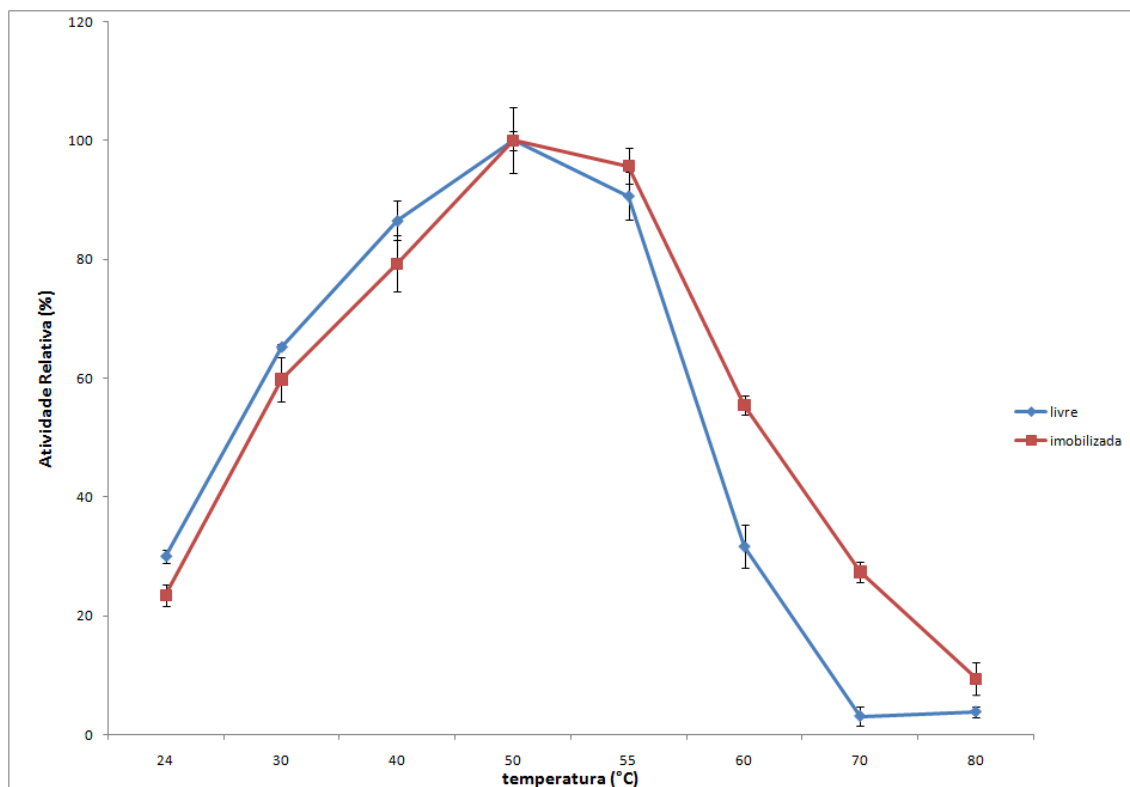
Invertases de outros organismos apresentam valores bastante próximos de condição ótima de pH de reação: Alegre et al. (2009), pesquisando as formas intra e extracelular da invertase do fungo *Aspergillus caespitosus* em diferentes condições de crescimento, obtiveram, para todas as formas de invertase, valores ótimos de pH na faixa de 4,0 – 6,0; Stano et al. (2008), em seus trabalhos com invertase de *Melissa officinalis* L. obtiveram o valor de 4,5 como pH ótimo.

A imobilização de enzimas em PANIG tem-se mostrado bastante favorável para a estabilização da atividade desses catalisadores biológicos em condições extremas de pH (FERNANDES et al., 2003, 2004; 2005 e PURCENA et al., 2008).

Supõe-se que o polímero forneça à enzima um microambiente favorável à catálise. No caso do pH, acredita-se que a PANIG forneça prótons à enzima quando o ambiente reacional apresenta carência desse cátion, evitando ou minimizando alterações estruturais na enzima, estabilizando-a (BÉNÉZETH, 2009).

### 3.6.2. Variação da temperatura de reação

Outro fator influente na catálise enzimática é a temperatura. O perfeito funcionamento das enzimas requer condições específicas, pois elas são ativas em estreitas faixas de pH e temperatura (ERGINER et al., 2000). A resposta da invertase livre e imobilizada frente à variação da temperatura está representada na figura 09:



**Figura 09-** Variação da temperatura de reação para invertase nas formas livre e imobilizada. Tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,6; 5 mg de PANIG-Invertase; tempo de reação de 10 minutos e solução de sacarose 1 % (p/v) como substrato.

Observa-se que o processo de imobilização da invertase em PANIG não alterou o valor da temperatura ótima, porém a enzima imobilizada apresenta atividade superior à forma livre em temperaturas mais elevadas (60 - 80°C), indicando que a imobilização estabilizou a enzima nessas condições.

No trabalho de Bagal; Karve (2006), as influências da temperatura e do pH foram analisadas e obtiveram resultados próximos aos deste estudo para a invertase livre.

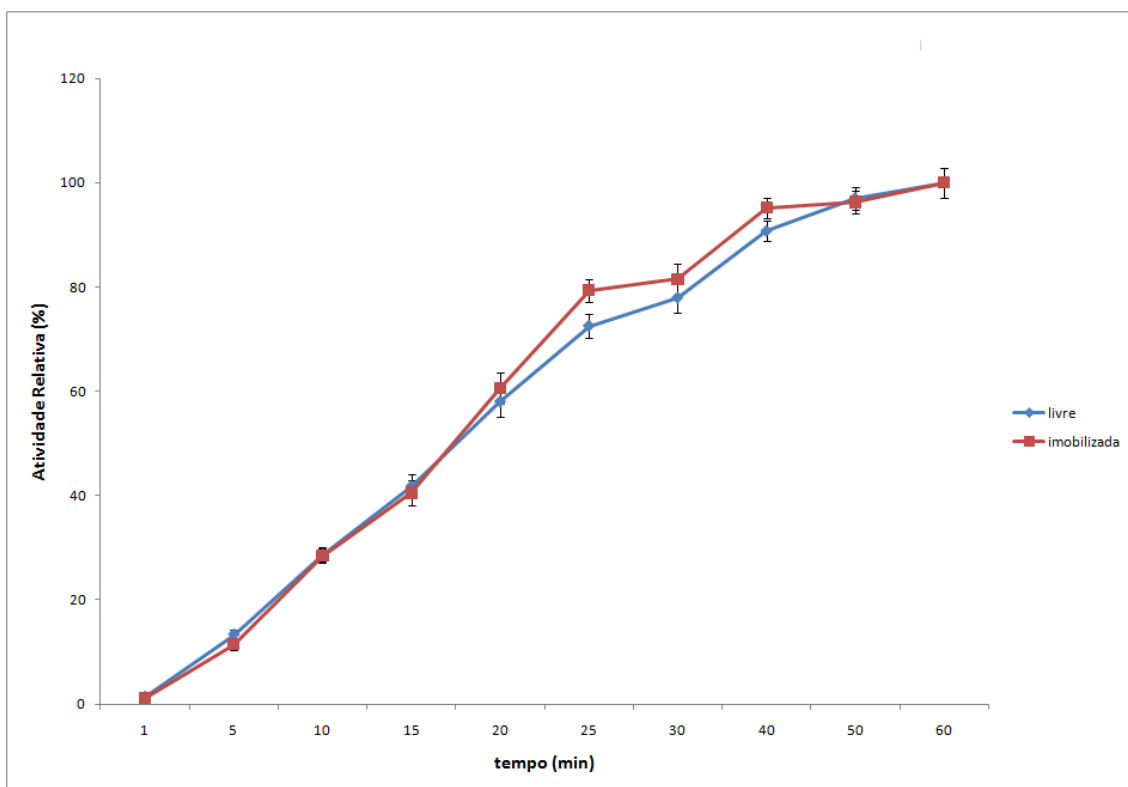
Marquez (2007), analisando as influências da temperatura e do pH, simultaneamente, através do planejamento experimental *Planejamento Composto Central* (PCC) obteve resultados bastante similares para a enzima livre, sendo a temperatura ótima igual a 47°C e pH 4,7.

Resultados semelhantes com invertase imobilizada foram encontrados por Amaya-Delgado et al. (2005); Danisman et al. (2004) e Bora et al. (2004).

### 3.6.3. Variação do tempo de reação



Após a imobilização fatores como limitações à difusão e transferência de massa podem interferir na cinética de aparecimento de produto em função do tempo. Na figura 10 estão representados os resultados da variação do tempo de reação para invertase livre e imobilizada:



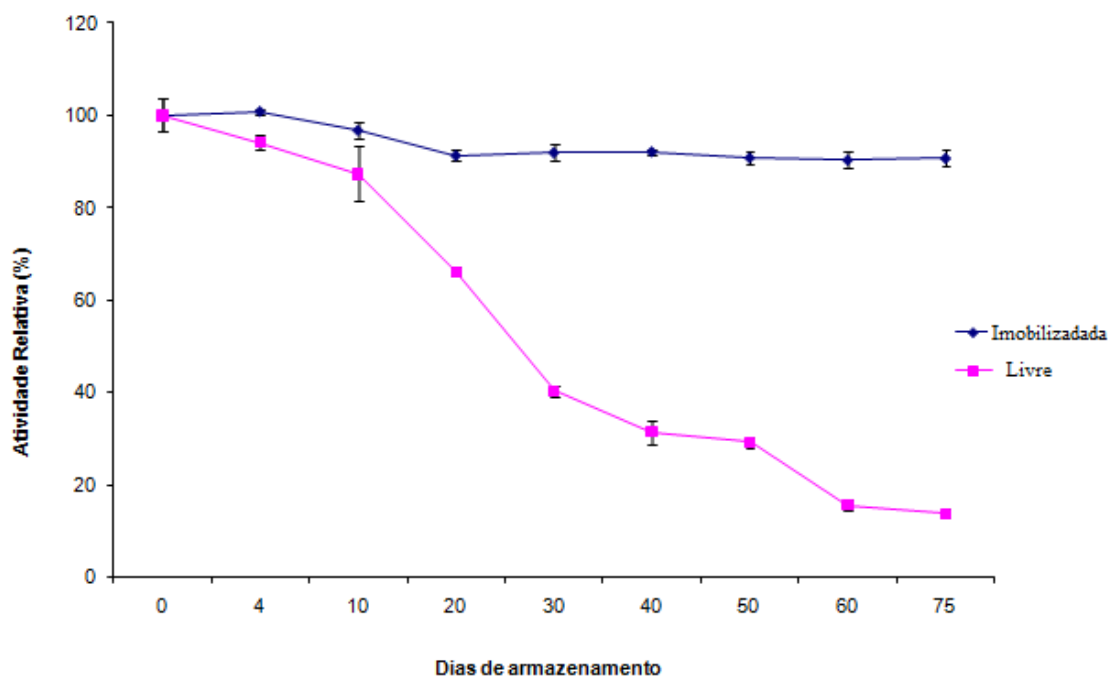
**Figura 10-** Variação do tempo de reação para invertase nas formas livre e imobilizada. Tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,6; 5 mg de PANIG-Invertase; tempo de reação de 10 minutos e solução de sacarose 1 % como substrato.

Nota-se que a invertase livre e imobilizada em PANIG apresentam o mesmo perfil frente à variação do tempo de reação, indicando que o processo de imobilização não causou interferência na acessibilidade do substrato ao sítio catalítico da enzima ou mudanças conformacionais significativa que resultassem em perdas de atividade catalítica.

### 3.7. Análise da estabilidade do sistema

#### 3.7.1. Estabilidade de armazenamento

O uso de enzimas como catalisadores para processos industriais em larga escala é limitado por seu alto custo de produção e baixa estabilidade de armazenamento. A tecnologia de imobilização enzimática vem se mostrando uma excelente ferramenta para melhorar as propriedades enzimáticas, tais como: estabilidade, especificidade, reprodutibilidade, seletividade e redução da influência de interferentes presentes no meio reacional (BETANCOR; LUCKARIFT, 2008). A maioria das enzimas não são estáveis durante o armazenamento em soluções e sua atividade decresce gradualmente com o tempo. A figura 11 apresenta as atividades relativas referentes às formas livre e imobilizada em PANIG quando armazenadas em tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,6 à  $4^\circ \text{ C}$  :



**Figura 11-** Análise da estabilidade de armazenamento da invertase livre e imobilizada em PANIG.  $500 \mu\text{L}$  de solução de E.B. e  $5 \text{ mg}$  de PANIG-Invertase armazenados em tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,6; à  $4^\circ \text{ C}$ .

O sistema contendo invertase imobilizada em PANIG (PANIG-Invertase) mostrou-se claramente mais estável durante o armazenamento, mantendo aproximadamente 94% de atividade após 75 dias de armazenamento, sendo que a forma livre apresentou apenas cerca de 17% de atividade remanescente no mesmo período.

Tümtürk (2000) ao imobilizar invertase no dímero granular de ácido-co-alquil-poliamina, conseguiu a manutenção de 100% de atividade da invertase imobilizada após um mês de armazenamento, enquanto a forma livre manteve apenas 21% de sua atividade inicial.

### 3.7.2. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica representa outro fator importante para a aplicação de enzimas em reatores de escala industrial. Dependendo do suporte escolhido pode-se aumentar ou diminuir a estabilidade da enzima. Suzuki et al. (1966) imobilizaram invertase em DEAE-celulose, resultando em um decréscimo da termoestabilidade e mudança do pH ótimo em direção ao lado ácido, enquanto Gómez et al.(2006) obteve um aumento da estabilidade térmica e de armazenamento da invertase imobilizada em pectina. Na figura 12 estão apresentadas as atividades relativas das formas livre e imobilizada depois de variados tempos de incubação:

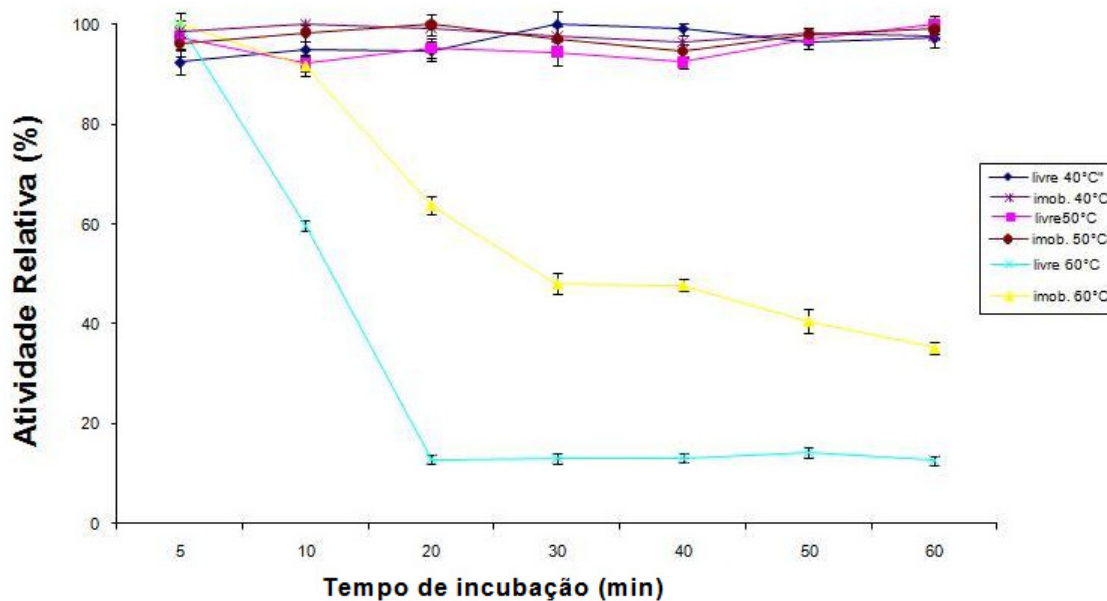


Figura 12- Análise da estabilidade térmica da invertase livre e imobilizada em PANIG. 75  $\mu$ L de solução de E.B. e 5 mg d PANIG-Invertase incubados nas diferentes temperaturas em tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,6. Tempo de reação de 10 minutos e solução de sacarose 1% (p/v) como substrato.

No presente estudo, em temperaturas mais amenas (40 e 50°C) ambas as formas mantiveram-se estáveis por até 60 minutos de incubação. Porém, a 60°C a forma livre mostrou-se menos estável que a imobilizada, sugerindo então que as interações entre enzima e

suporte fornecem condições mais favoráveis para que a enzima conserve sua atividade catalítica nessas condições adversas.

D'Souza e Godbole (2002) em seus estudos de imobilização de invertase em polietilenoimino coberto com casca de arroz observaram que a imobilização não alterou o valor de temperatura ótima, porém causou aumento na estabilidade térmica.

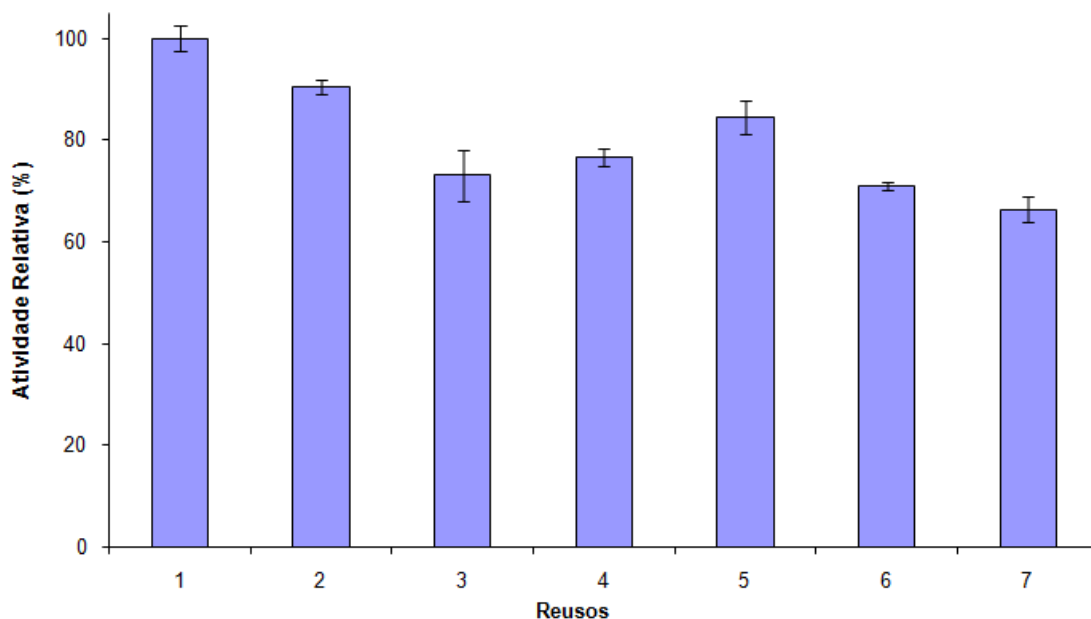
No trabalho de Amaya-Delgado et al. (2005), tanto para temperaturas mais altas quanto para as mais baixas estudadas, o tempo de meia-vida obtido para invertase imobilizada covalentemente em *Nylon-6* foi maior se comparada à solúvel. O mesmo ocorreu no trabalho de Danisman et al. (2004) para invertase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

### **3.8. Ensaio de uso repetido do sistema (PANIG-*Invertase*)**

Após a imobilização nas condições ótimas, testou-se o sistema frente à reprodutibilidade e manutenção da atividade enzimática após ciclos de uso do sistema contendo PANIG-*Invertase*. A figura 13 apresenta a atividade relativa remanescente após sete ciclos de reuso, mostrando que a atividade se mantém em 60 % após os usos do sistema e lavagens com tampão entre os ensaios.

A variação observada relaciona-se ao método utilizado para a separação da PANIG, visto que a síntese química de PANI resulta em uma preparação heterogênea contendo inclusive nanopartículas que não podem ser recuperadas da reação por centrifugação.

O passo seguinte então foi a elaboração de um modelo experimental que minimizasse esse tipo de erro, e possibilitasse ainda a hidrólise do caldo de cana.

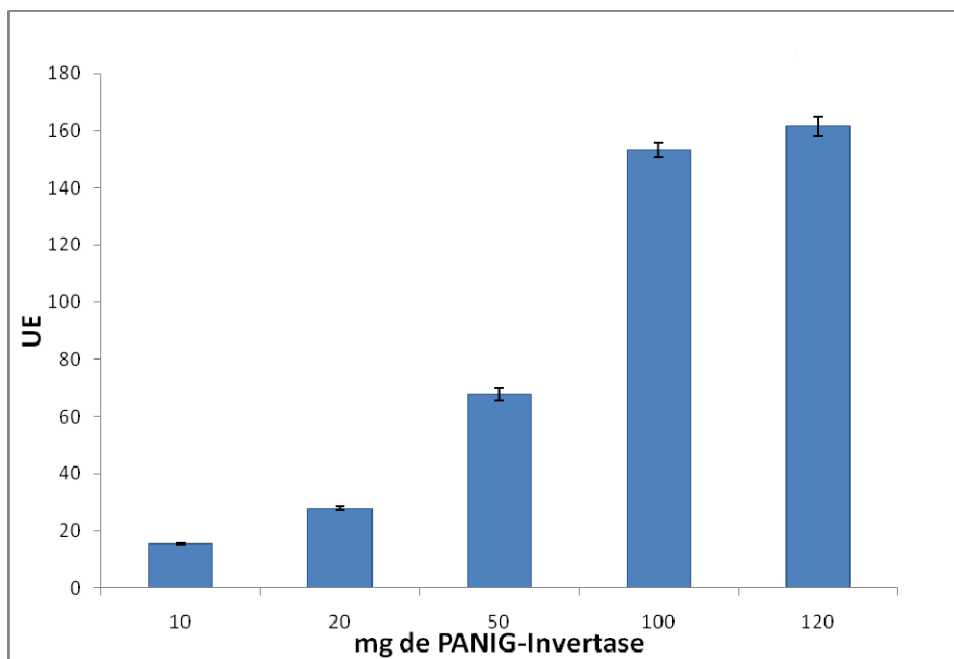


**Figura 13-** Análise da retenção de atividade do sistema PANIG-*Invertase* após ciclos de reuso. Tempo de reação de 10 minutos, à 50 °C, tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,6 e sacarose 1% (p/v) como substrato.

### 3.9. Otimização do sistema de batelada

#### 3.9.1. Variação da massa de PANIG-*Invertase*

A quantidade de PANIG-*Invertase* presente no sistema de reação em batelada foi testada na hidrólise da solução de sacarose 20 % (p/v). Conforme mostrado na figura 14, a atividade da invertase imobilizada aumenta de 10 a 100 mg de PANIG-*Invertase*, saindo da linearidade a partir de 120 mg de material. Escolheu-se então a massa de PANIG-*Invertase* de 100 mg para continuação da otimização.



**Figura 14- Otimização do sistema em batelada: variação da quantidade de PANIG-Invertase. Temperatura de 50 °C; tempo de reação de 10 minutos, tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,6, solução de sacarose 20% (p/v) como substrato.**

### 3.9.2. Variação da concentração de substrato

Verificou-se a influência da variação da concentração do substrato na resposta do sistema, para 100 mg de PANIG-Invertase. Foram variadas concentrações próximas aos valores encontrados no caldo de cana, em torno de 20% (p/v) de sacarose (ALMEIDA, 2005). Na tabela 03 é possível verificar que a atividade da invertase imobilizada aumenta em função da concentração da solução de sacarose até 20 % (p/v). A partir desse valor a reação atinge a saturação de substrato.

Tabela 03- Otimização do sistema de batelada: variação da concentração de substrato utilizada

Concentração da solução de sacarose em % (p/v)	UE
15	133,34 ± 3,36 <sup>a</sup>
20	161,09 ± 4,45 <sup>b</sup>
25	162,82 ± 5,22 <sup>b</sup>
30	164,67 ± 3,36 <sup>b</sup>

Valores apresentados como média ± desvio padrão de três determinações. Dados na mesma coluna acompanhados pela mesma letra não apresentam diferença estatística significava ( $p \leq 0,05$ )

### 3.9.3. Variação do tempo de reação

O próximo passo de otimização do sistema foi a verificação do tempo de reação necessário para completa conversão do substrato. A determinação desse parâmetro é de fundamental importância para os casos em que se deseja uma completa conversão. Pode-se, a partir desse dado estabelecer o tempo de residência do substrato na câmara de reação. Conforme exposto na figura 15, observa-se um aumento linear na faixa de variação de tempo de 5 a 40 minutos ( $R^2 = 0,9967$ ). Acima de 50 minutos a relação perde-se a linearidade, não havendo aumento significativo na produção de xarope de açúcar invertido. Escolheu-se então como valor de tempo de reação de 40 minutos para o sistema em batelada, numa tentativa de se obter a máxima hidrólise de sacarose.

O sistema, contendo 100 mg de PANIG-*Invertase*, volume útil de 20 mL e com um tempo de reação de 40 minutos foi escolhido para a hidrólise do caldo de cana. Nessas condições, apresentou retenção acima de 90% para 25 ciclos de utilização.

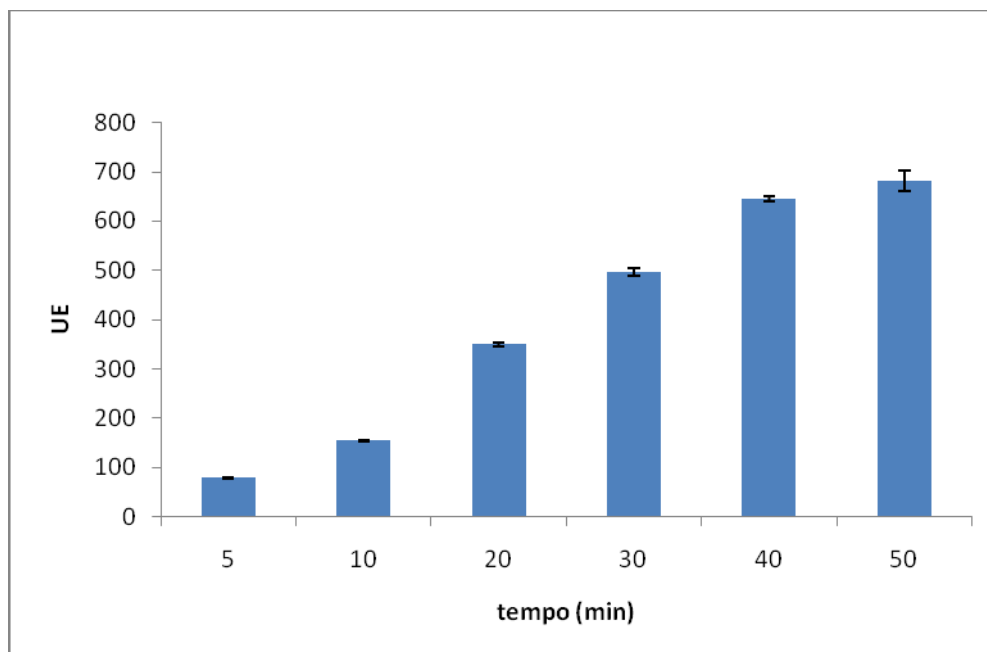


Figura 15- Otimização do sistema em batelada: variação do tempo de reação. 100 mg de PANIG-Invertase; temperatura de 50 °C; tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,6, solução de sacarose 20% (p/v) como substrato.

### 3.10. Análises do caldo de cana

O caldo de cana utilizado nesse trabalho teve alguns parâmetros analisados para verificação da sua qualidade. Como pode ser visto na tabela 04, o caldo de cana apresentou valores de pH, açúcares totais e redutores, cor, viscosidade e atividade de água compatíveis com aqueles apontados na literatura (MARTUCCI, 1983; PRATI; CAMARGO, 2008; DELGADO, 1975; PULZATTO, 1995 e YUSOF et al., 2000).

Tabela 04- Análise das características e propriedades do caldo de cana

	<i>Açúcares Totais</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>Açúcares Redutores</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>Viscosidade</i> (cP)	<i>Atividade de água</i> (Aw)	<i>pH</i>	<i>Cor</i> (420 nm)
<b>Caldo de cana</b>	252,55 ± 1,21	4,92 ± 0,73	2,03 ± 0,11	0,997 ± 0,09	5,25 ± 0,1	3,613 ± 0,25



Após tratamento no sistema otimizado, estas propriedades sofreram alterações, particularmente a viscosidade, que passou de 2,03 cP ( $\pm 0,11$ ) para 3,73 cP ( $\pm 0,31$ ). Este é um parâmetro muito importante, pois reflete diretamente sobre potencialidades de aplicação do xarope obtido na indústria alimentícia (produção de doces e sorvetes) e farmacêutica (produção de xaropes ricos em frutose) (SPOHR, 2008; SILVA et al., 2006).

Na tabela 05, são mostradas algumas propriedades do hidrolisado de caldo de cana, obtidas em sistema de reação em batelada.

**Tabela 05- Análise do produto de hidrólise do caldo de cana em sistema de batelada**

	<i>Atividade de água (<math>A_w</math>) do produto hidrolisado</i>	<i>Viscosidade do produto hidrolisado (cP)</i>	<i>Cor (420 nm)</i>
<b>Resultado obtido</b>	0,968 $\pm$ 0,09	3,73 $\pm$ 0,31	0,58 $\pm$ 0,11

Analisando os resultados obtidos na tabela 05 pode-se ressaltar que houve significativa redução da cor entre o caldo de cana e os produtos hidrolisados, sugerindo que o sistema pode ter funcionado como filtro seletivo de alguns componentes causadores do escurecimento do caldo de cana (NOGUEIRA, 2007). Esses componentes podem ter se adsorvido à PANIG-*Invertase*, não estando presentes no produto hidrolisado. Fernandes et al. (2004) relataram a capacidade da PANIG em adsorver compostos fenólicos metoxilados coloridos, tais como tetraguaicol e *o*-dianisina. Essa ação adsorvente da PANIG pode ser utilizada na clarificação do açúcar invertido obtido.

A atividade de água ( $A_w$ ) apresentou uma ligeira redução no produto hidrolisado em comparação ao caldo de cana. Mesmo não alcançando valores que impossibilite a proliferação microbiológica, essa redução na quantidade de água livre pode dificultar a contaminação do caldo (AFONSO, 2003). A amplitude pequena dessa redução da atividade de água pode ser justificada pela necessidade do acréscimo de quantidades muito grandes de açúcar na solução para ocasionar reduções da  $A_w$  (DITCHFIELD, 2000). Troller (1983) relatou que a atividade de água de uma solução de sacarose 25 % (p/v) apresenta valores de  $A_w$  de 0,96 e que uma solução de 78 % apresenta a  $A_w$  de 0,95.

O sistema otimizado apresenta propriedades vantajosas que justificam sua utilização, como seu índice de conversão, perfil de catálise regular durante os ciclos de usos, o que possibilita um grande controle de qualidade do produto final. Somado à redução da  $A_w$ , clarificação (redução de cor) e elevada conversão, este sistema se mostrou bastante promissor para aplicações em reatores, podendo futuramente investigar suas potencialidades em escala ampliada para aplicações industriais.

As características do produto de hidrólise são favoráveis para o tratamento do caldo de cana em reatores contendo invertase imobilizada em PANIG, com possíveis aplicações em larga escala, tanto na indústria alimentícia ou farmacêutica.

## 4. Conclusões e Perspectivas

### 4.1. Conclusões

→ A enzima invertase foi extraída de células de *Saccharomyces cerevisiae*, com atividade ótima em tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, temperatura de  $50^\circ\text{C}$  utilizando como substrato uma solução de sacarose 1% (p/v) e um tempo de reação de 10 minutos. Nessas condições, o E.B. apresentou  $11,31 \pm 0,36 \text{ UE mL}^{-1}$  e atividade específica de  $3269 \pm 10 \text{ U mg}^{-1}$ ;

→ O processo de imobilização de invertase em PANIG foi otimizado, sendo as condições ótimas encontradas para o processo de imobilização foram: tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5; temperatura de  $50^\circ\text{C}$ ; tempo de 1 hora de imobilização, agitação mecânica e  $169,7 \text{ UE g}^{-1}$  de PANIG;

→ A eficiência de imobilização de invertase em PANIG foi de 0,86; com retenção de 62 % de atividade enzimática e 75% de retenção de proteínas;

→ A invertase imobilizada apresentou maior atividade em pH ácido e alcalino comparada à forma livre e em temperaturas mais elevadas, entre  $60$  e  $80^\circ\text{C}$ ;

→ Observou-se um aumento na estabilidade de armazenamento e na termoestabilidade para a invertase imobilizada em PANIG, quando comparada com a forma livre;

→ O sistema otimizado testado em batelada apresentou uma considerável regularidade no padrão de hidrólise da sacarose presente no caldo de cana. Reteve acima de 90 % de atividade por 25 ciclos;

→ O produto de hidrólise obtido, quando comparado com o caldo de cana, apresentaram características vantajosas, como: menor cor; maior viscosidade e menor atividade de água.

## **4.2. Perspectivas**

→ Testar modelos de reatores contendo invertase imobilizada em PANIG para hidrólise da sacarose presente no caldo de cana;

→ Analisar a viabilidade econômica dos reatores para a produção de xarope de açúcar invertido;

→ Transferir as escalas para aplicação em processos industriais.

## 5. Referências Bibliográficas

ALEGRE, A.C.P., POLIZELI, M.L.T.M., TERENCEI, H.F., JORGE, J.A., GUIMARÃES, L.H.S. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (3), p. 612-622. 2009

AMAYA-DELGADO, L.; HIDALGO-LARA, M. E.; MONTES-HORCASISTAS, M. C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chemistry*, v.99, p. 299-304, 2005.

ANDJELKOVIC', U., *et al.* Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*. 2009.

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

AKSOY, S. *et al.* Stability of alfa-amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *Journal of Biotechnol.* 1998.

ALMEIDA A. C. S., ARAÚJO L.C., COSTA A.M., ABREU C.A.M., LIMA M. A. G. A., PALHA M.L.A.P.F. Sucrose hydrolysis catalyzed by autoimmobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*. v. 8. 2005

BAGAL, D.; KARVE, M. S. Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose-guar gum biopolymer membrane. *Analytica Chimica Acta*, v. 555, p.316-321, 2006.

BAILEY, J.E. ; OLLIS D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. New York, McGraw-Hill, 1986.

BAYMA, C. *Tecnologia do Açúcar: da matériaprima à evaporação*. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool. 292p. (Manual técnico – Coleção Canavieira, n.13).1974

BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. R.; SEO, J. H.; BRAND, O.; Spain, J. C. *Biotechnol. Bioeng.* (2008) 99 261 7. 2008.

BÉNÉZETH, D.J. WESOLOWSKI, D.A. PALMER, M.L. MACHESKY. *Effect of Amines on the Surface Charge Properties of Iron Oxides*. *J Solution Chem* (2009) 38: 925–945. 2009.

BERGAMASCO, R.; BASSETTI, F. J. MORAES F.; ZANIN, G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. *Brazilian Journal of Chemical engineering*. v. 17 no. 4-7. 2000.

BLANCH H. W. ; CLARK D. S. *Biochemical Engineering*. New York, Marcel Dekker, 1996.

BOUCHOOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U.T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Book reviews/ *Carbohydrate Polymers*. 63: 144. 2006.

BORA, U.; KANNAN, K.; NAHAR, P. A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. *Journal of Membrane Science*, v. 250, p. 215-222, 2005.

BOWSKI F. O., SAINI R., RYU D.Y., VIETH W. R. Kinetic modelling of the hydrolysis of sucrose by invertase. *Biotechnology Bioengineering*, v. 13, p. 641-656, 1971.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. San Diego, v.72, n.5, p.248-254, 1976.

CABRAL, J. M. F. Estudos de imobilização de enzimas pelo método dos metais de transição. Tese de doutorado. Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa, 1982.

CABRAL, F. A. Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), 1989.

CAO L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. 2005.

CHAPLIN, M.; BUCKE, C. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. 1990.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-Açúcar Safras 2007/2008 , primeiro levantamento, maio/2007*. Brasília: Conab, 12 p. 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2009 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2009.

COPERSUCAR. *Clarificação*. São Paulo: Centro de Tecnologia Copersuca. 58p. 1994.

CARBERRY J.J. *Chemical and Catalytic Reaction Engineering*. New York, Mc-Graw-Hill, 1976.

CHEN, Y.; KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. *European Polymer Journal*, v. 36, p. 2095-2103, 2000.

CHIBATA I. *Immobilized Enzymes-Research and Development*. Tokyo. Kadansha Ltd, 1978.

CHIBATA I.; TOSA T.; SATO T.; MORI T.; MATSUO Y. Preparation and industrial application of immobilized aminoacyclases. *Fermentation Technology Today*, p. 383-389, 1972.

COUTINHO, FILHO U.; RIBEIRO, E. J.; MAUGERI FILHO, F. Estabilidade de invertase imobilizada em sílica. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15, Recife, 2005. Anais, 2005.

DANISMAN, T.; TAN, S.; KACAR, Y.; ERGENE, A. Analytical, Nutritional and Clinical Methods: Covalent immobilization of invertase on microporous PHEMA-GMA membrane. *Food Chemistry*, v. 85, p. 461-466, 2004.

DALLA-VECCHIA R., NASCIMENTO M.G., SOLDI . Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, 2004.

DELGADO, A.A. *A clarificação do caldo de canas despalhadas manualmente e a fogo em função do tempo de espera para a industrialização*. Piracicaba,1975. 148p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, 1975.

DELGADO, A.A.; CESAR, M.A.A. *Elementos de Tecnologia e Engenharia do Açúcar de Cana*. v.1. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP. 1061p.1977.

DIXON M. ;WEBB E. C. *Enzymes*. 3 ed. London, Longman Group Limited, 1979.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *Journal. Biochemical and Biophysical Methods*, v. 52, p. 59-62, 2002.

DITCHFIELD, C. Estudos dos métodos para a medida da atividade de água. 146f. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 2000.

DUBOIS M.; GILLES K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A, SMITH F. Colorimetric Method from Determination of Sugars and Related Substances. *Nature*. V. 28, n 3, p. 350-356. 1956.

EMREGUL E., SUNGUR S., AKBULUT U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. *Food Chemistry*, v. 97, p. 591-597, 2006

ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. *Reactive ; Functional Polymers*, v. 45, p. 227-233, 2000.

FAVA, A.R. *Atletas ingerem garapa para repor energia*. *Jornal da Unicamp*. 2004; 18:(250), 2004.

FERNANDES, K.F. Imobilização de Horseradish Peroxidase em diferentes polianilinas: aplicações analíticas. Tese (Doutorado) Universidade de Campinas. 79f. 2000.

FERNANDES, K. F. et al. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers *Process Biochemistry*. v.38, n.9, p. 1379-1384, 2003.

FERNANDES, K. F. et al. Properties of horseradish peroxidase immobilized onto polyaniline. *Process Biochemistry*. v.39, n.9, p. 957-962, 2004

FERNANDES, K. F. et al. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer *Process Biochemistry*. v.40, n.3-4, p. 1155-1159, 2005.

GÁSCON S., NEUMANN N. P., LAMPEN J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 3, p. 33-38, 1981.

GÓMEZ L, RAMÍREZ HL, NEIRA-CARRILLO A, VILLALONGA R. Polyelectrolyte complex formation mediated immobilization of chitosan–invertase neoglycoconjugate on pectincoated chitin. *Bioprocess Biosyst Eng*;28:387–95.2006.



GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAĞCI, Y.. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. *Reactive ; Functional Polymers*, v. 57, p. 57-65, 2003

HOING, P. *Principles of sugar technology*. New York: Elsevier Publishing Company, 767p. 1973.

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

JENKINS, G.H. *Introduction to cane sugar technology*. New York: Elsevier Publishing Company, 478p.1966.

KAPLAN, L.A. ; PESCE A.J. *Clinical Chemistry – theory, analysis and correlation*. New York: The C.V. Mosby Co. (2<sup>a</sup> ed.), p. 24. 1989.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C.A. *Principle of Immobilization of Enzymes*. In: Alan Wiseman (ed), “*Handbook of Enzyme Biotechnology*”, cap. 4, pag.147. New York.1986.

KOTWAL, S.M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*. Research review paper. 27. 311–322. 2009.

LEME Jr., J; BORGES, J.M. *Açúcar de cana*. Viçosa: Imprensa Universitária, 1965. 328p. 1965.

LOPES, F.M. *Biossensor espectrofotométrico para determinação de glicose*. 2003. 51f.Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

MANSFELD, J.; SCHELLENBERGER, A.; ROMBACH, J. Application of polystyrene-bound invertase to continuous sucrose hydrolysis on pilot scale. *Biotechnology Bioengineering*. V. 40, p.997-1003, 1992.

MARQUEZ, L.D.S. Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas. 2007. 124 f. Dissertação ( Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais, 2007.

MARTUCCI, E.T. *Tecnologia do açúcar de cana*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1983. 163p. 1983.

MENDES, L.C. *Eficiência nutricional de cultivares de cana-de-açúcar*. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MESSING, R. A. Carriers for immobilized biologically active systems in advances in biochemical engineering, v. 10, 1978.

MILLER, G.L. Use dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, Washington, v.31, n.2, p.426-428, 1959.

MILOVANOVIC A., BOZIC N., VUJCIC Z. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. *Food Chemistry*, v. 10.2006.

MORAIS, R.R. *Imobilização de Resamilase em fibra de Luffa cylindrica e Luffa operculata*. 2004. 45f. (Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharelado em Farmácia). Universidade Estadual de Goiás. 2004.

NELSON, J.M., GRIFFIN, E.G. Adsorption of invertase. *J Am Chem Soc* 1916; 38: 1109–15. 1916.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. Clarificação de Caldo de Cana por Micro e Ultrafiltração: Comprovação de Viabilidade Técnica em Experimentos Preliminares Braz. *J. Food Technol.*, Campinas, v. 10, n. 1, p. 57-62, jan./mar. 2007.

OLIVEIRA, A.C.G. et al. *Análise das Condições do Comércio de Caldo de Cana em Vias Públicas de Municípios Paulistas*. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, 13(2): 06-18, 2006

OLIVEIRA I.R.W.Z.; VIEIRA I.C. *Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização de peroxidase de vegetal em matriz de quitosana*. *Química Nova*, São Paulo, v.29, n.5, p.932-939, 2006.

PRATI, P.; CAMARGO, G.A. Características do caldo de cana e sua influência na estabilidade de bebida. *BioEng. Campinas*, v.2; n. 1. 2008.

PRATI, P.; MORETTI, R.H. Desenvolvimento de processo para clarificação de caldo de cana para consumo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre, RS. 2002.

PRATI, P.; MORETTI, R.H.; CARDELLO, H.M. Influência da adição de ácido ascórbico na composição e nas características sensoriais da garapa parcialmente clarificada-estabilizada e estocada sob refrigeração. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, PR, v.21, n.2 (jul./dez.), p. 323-342, 2003.

PRATI, P.; MORETTI, R.H.; CARDELLO, H.M.A.B.; GÂNDARA, A.L.N. Estudo da vida- prateleira de bebida elaborada pela mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e suco natural de maracujá. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, PR, v.21, n.2 (jul./dez.), p. 295-310, 2004.

PRATI, P.; MORETTI, R.H.; CARDELLO, H.M.A.B. Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificadaestabilizada e sucos de frutas ácidas. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, São Paulo, SP, v.25, n.1 (jan./mar.), p.147-152, 2005.

PURCENA, L.L.A. Imobilização e caracterização de tripsina imobilizada covalentemente em polianilina. Dissertação (Mestrado em Biologia) Universidade Federal de Goiás. 61f. 2008.

PULZATTO, M.E. Ação do fósforo e do enxofre na clarificação por sulfo-defecação do caldo de cana de açúcar. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas.89f. São Paulo. 1995.

RODRIGUES, M.V.N. et al. *Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental*. Recebido para publicação em 25/09/99. Aceito para publicação em 20/06/00.CPQBA/UNICAMP – C.P. 6171, SP, 2000.

SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Invertase immobilized on montmorillonite:reusability enhancement and reduction in leaching. *Catalysis Communications*, v. 6. p81-86, 2005.

SEGEL I. H. *Bioquímica, Teoria e Problemas*. Traduzido Grassiano D.M., Rio de Janeiro, Livros técnicos e Científicos Editora, 1979.

SILVA, E.A.B.; SOUZA, A.A.V.; SOUZA, S.G.V.; RODRIGUES, A.E. Analysis of the high fructose syrup production using reactive SMB technology. *Chemical Engineering Journal*. 188. 167-181. 2006.

SILVA, K.F.F. *Imobilização de Horseradish Peroxidase em Diferentes Polianilinas*. 2000.139f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) Universidade Estadual de Campinas. 2000.

STANO, J., MICIETA, K., KORENOVA, M., BLANARIKOVA, V., TINTEMANN, V., NEMEC, P., ALSIKOVA. Study of immobilized and extracellular invertase of lemon balm. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 44, No. 6, 2008.

STUPIELLO, J. P. *A cana-de-çúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S. B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. v. 2. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 30-51. 1987.*

SUZUKI H, OZAWA Y, MAEDA H. Studies on the water-insoluble enzyme hydrolysis of sucrose by insoluble yeast invertase. *Agric Biol Chem* 1966;30:807–12.1966.

TANRISEVEN, A.; DOĞAN, S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 1081-1083, 2001.

TROLLER, J.A. Methods to measure water activity. *Journal of Food Protection*. v. 46, n. 2, p. 129-134. 1983.

TÜMTÜRK H, TUFAN Y. Immobilization of invertase onto dimmer acid-co-alkyl polyamine. *J Appl Polym Sci* 2004;93:1526–30.2004.

VICENTE A. A. Preparação de Açúcar Invertido por Meio de Invertase Imobilizada em Sílica. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química . Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2000.

WISEMAN A. ; WOODWARD J. Industrial yeast invertase stabilization. *Process Biochemistry*, v. 10, p. 24-30, 1975.

YUSOF, S.; SHIAN, L.S.; OSMAN, A. Changes in quality of sugar cane juice upon delayed extraction and storage. *Food Chemistry*. 68, 395-401. 2000.

ZANIN, G. M. Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 1989.

## ANEXOS

### *Análises Estatísticas*

Anexo 01: Comparação das médias da quantidade de enzima para imobilização por ANOVA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	6,014	1,5035	26,6153
Resíduos	10	0,5649	0,05649	
Total	14	6,579		

Anexo 02: Comparação das médias da variação do tempo de imobilização por ANOVA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	6	0,34	0,056	0,845
Resíduos	14	0,9177	0,0655	
Total	20	1,2577		

Anexo 03: Comparação das médias do pH de imobilização por ANOVA e teste t

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	5	4,397	0,8794	11,038
Resíduos	12	0,956	0,0796	
Total	17	5,3541		
<b>Teste t(4,6 – 6,0); <math>\alpha(0,05)</math>GL (2): t calculado: 8,546 → t tabelado: 4,30</b>				
<b>Teste t(4,6 – 7,0); <math>\alpha(0,05)</math>GL (2): t calculado: 6,782 → t tabelado: 4,30</b>				

Anexo 04: Comparação das médias da temperatura de imobilização por ANOVA

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	38,07	19,035	114,21
Resíduos	6	1	0,166	
Total	8	39,07		

Anexo 05: Comparação das médias da otimização do sistema de batelada, variação da concentração de substrato

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	1980,19	660,06	4,06
Resíduos	8	139,46	17,43	
Total	11			

Anexo 06- Resultados obtidos para avaliar a influência da quantidade de enzima, tempo de imobilização, pH e temperatura no processo de imobilização

Experimento	Variável	Atividades Enzimática obtidas (UE)
	<b><i>Quantidade de enzima(μL)</i></b>	
1	25	5,18228; 5,459532; 4,905045
2	50	6,129905; 5,994534; 6,2652
3	75	7,1150; 7,258409; 6,971597
4	100	6,288481; 6,600516; 5,976447
5	150	5,790647; 6,05404; 5,527253
	<b><i>Tempo de Imobilização( horas)</i></b>	
1	0,5	7,15132; 6,314065; 6,619892
2	1	6,519620; 6,765285; 6,750244
3	2	6,299024; 6,258916; 6,604851
4	4	6,549701; 6,294011; 6,258916
5	8	6,304037; 6,644959; 6,288997
6	12	6,19875; 6,354173; 6,810407
7	24	6,17869; 6,62490; 6,549702
	<b><i>pH de imobilização</i></b>	
1	3,6	6,614878; 6,253902; 6,43439
2	4	7,251599; 6,329106; 6,790352
3	4,6	6,760271; 6,700108; 6,519621
4	5	6,414336; 6,57477; 5,938049
5	6	6,018266; 6,003225; 5,907967
6	7	5,381545; 5,582087; 4,950379
	<b><i>Temperatura de imobilização(°C)</i></b>	
1	4	3,280867; 3,862439; 3,280867
2	30	8,264336; 8,860949; 8,409729
3	40	6,454444; 5,917995; 5,366504
	<b><i>Otimização do sistema de batelada (variação da concentração-%)</i></b>	
1	15	133,3404; 129,9798; 136,7009
2	20	161,0904; 156,6354; 165,5454
3	25	162,8201; 157,5951; 168,0451
4	30	164,6751; 161,3145; 168,0356