

**URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ALINE RICHETTI

**Proposição de metodologias para
imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus*
NRRL Y-7571 em alginato de sódio e carvão ativado e
para quantificação de frutooligossacarídeos por
cromatografia líquida de alta eficiência**

URI - ERECHIM

Julho, 2013

PROPOSIÇÃO DE METODOLOGIAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 EM ALGINATO DE SÓDIO E CARVÃO ATIVADO E PARA QUANTIFICAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

ALINE RICHETTI

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Doutorado em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Helen Treichel
Débora de Oliveira
Rogério Marcos Dallago

ERECHIM, RS
Julho de 2013

Aline Richetti

Tese de Doutorado submetida ao corpo docente da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim, Programa de Doutorado em Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Helen Treichel, D.Sc.
(UFFS) (Orientadora)

Débora de Oliveira, D.Sc.
(UFSC) (Orientadora)

Rogério Marcos Dallago, D. Sc.
(URI - Erechim) (Orientador)

Marcio Antonio Mazzuti, D. Sc.
(UFMS)

Gean Delise Leal Pasquali Vargas
(UFFS)

Marcelo Luis Mignoni
(URI- Erechim)

Marcus Vinícius Tres
(URI – Erechim)

Erechim, julho de 2013.

Richetti, Aline

Proposição de metodologias para imobilização de inulinase de *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* NRRL Y-7571 em alginato de sódio e carvão ativado e para quantificação de frutooligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência / Aline Richetti – 2013.

118f.:il.

Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2013.

Orientadores: Helen Treichel
Débora de Oliveira
Rogério Marcos Dallago

1. Imobilização. 2. Inulinases. 3. Frutooligossacarídeos. – Teses I. Treichel, Helen. Oliveira, Débora. Dallago, Rogério Marcos (Orient.) II. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias. III. Título.

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada,
não existirão resultados.”*

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida. Agradeço-lhe todos os dias por poder existir, e pelas oportunidades que tens me dado.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira e Prof^a. Dr^a. Helen Treichel pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, pelo incentivo, por toda a ajuda, amizade, compreensão, paciência e pela confiança e dedicação que depositaram em mim. Muito obrigada!

Ao Professor Dr. Rogério Marcos Dallago pela grande ajuda e disponibilidade de sempre, amizade, compreensão, confiança, pelos valiosos ensinamentos, pela oportunidade de aprender cada dia mais, pelo incentivo e por toda a orientação. Muito obrigada!

Ao Professor Dr. José Vladimir de Oliveira, por todas as sugestões e ajuda, e por ter me oportunizado a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Marco Di Luccio, Prof. Dr. Márcio Antônio Mazutti e Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel pela ajuda e sugestões.

Aos meus pais Paulo e Maria Elena, por todo o apoio, pela minha educação, e por sempre acreditarem em mim. Obrigada por tudo.

Aos meus irmãos por sempre me incentivarem e torcerem por mim.

Aos colegas de laboratório e amigos Cristiane, Lindomar, Luciane, Ieda e Viviane pelo auxílio, companheirismo, risadas e bons momentos compartilhados.

Aos membros da banca examinadora por aceitaram participar de minha avaliação.

À Capes, CNPq, FAPERJ e Finep pelo financiamento à pesquisa.

À URI – Campus de Erechim pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

PROPOSIÇÃO DE METODOLOGIAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 EM ALGINATO DE SÓDIO E CARVÃO ATIVADO E PARA QUANTIFICAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

Aline Richetti

Julho/2013

Orientadores: Helen Treichel

Débora de Oliveira

Rogério Marcos Dallago

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o processo de imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, uma enzima microbiana que pode ser utilizada na síntese de frutooligossacarídeos. Posteriormente, devido à necessidade de quantificação dos frutooligossacarídeos produzidos, foi desenvolvido e validado um método analítico utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Índice de Refração (CLAE-IR). Para otimizar o processo de imobilização, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 avaliando o efeito das concentrações de alginato de sódio, carvão ativado e glutaraldeído. Os resultados obtidos mostraram que a condição experimental utilizando 2 % de alginato de sódio (m/v), 5 % de glutaraldeído (v/v) e 3 % de carvão ativado (m/v) apresentou a maior atividade específica (2.063,52 U/mg de proteína). A partir destas condições foi realizado o estudo cinético da eficiência do processo de imobilização, a caracterização parcial da enzima e o estudo da estabilidade da inulinase imobilizada. Os resultados obtidos mostraram que a metodologia de imobilização empregada se mostrou eficaz, pois aumentou a atividade específica da inulinase. Para a validação do método analítico, a ferramenta do planejamento experimental também foi utilizada a fim de analisar os efeitos da temperatura da coluna (20 a 40° C) e do detector (25 a 45 °C) em relação à análise cromatográfica. Os menores valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para a kestose, nistose e frutossilnístose foram obtidos no experimento empregando temperaturas similares entre a coluna e o detector. Os resultados obtidos utilizando fase móvel acetonitrila:água (70:30), temperatura da coluna 20 °C e do detector 25 °C, fluxo da fase móvel 1 mL.min⁻¹, volume de injeção 5 µL, com detector por índice de refração, mostraram que o método proposto é adequado, confiável e eficiente para quantificação de frutooligossacarídeos.

Abstract of thesis presented to the Doctoral Program in Food Engineering, as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor in Food Engineering.

IMMOBILIZATION INULINASE OF *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* NRRL Y-7571 AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF FOS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY HIGH EFFICIENCY.

Aline Richetti

July/2013

Advisors: Helen Treichel

Débora de Oliveira

Rogério Marcos Dallago

The aim of this study was to investigate the process of immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a microbial enzyme that can be used in the synthesis of fructooligosaccharides, in activated coal and sodium alginate. Later, due to the need of quantification of fructooligosaccharides produced, was developed and validated an analytical method using high performance liquid chromatography with refractive index detection (CLAE-IR). To optimize the immobilization process, we performed a full factorial design 2^3 evaluating the effect of concentrations of sodium alginate, activated carbon and glutaraldehyde. The results showed that the experimental condition using 2 % sodium alginate (w/v), 5 % glutaraldehyde (v/v) and 3 % activated charcoal (m/v) showed the highest specific activity (2063.52 U/mg protein). From these conditions we performed the kinetic study of the efficiency of the immobilization process, the partial characterization of the enzyme and the study of the stability of immobilized inulinase. The results showed that the method of restraint used was effective because it increased the specific activity of inulinase. For the validation of the analytical method, the tool of the experimental design was also used to examine the effect of column temperature (20 to 40 °C) and the detector (25 to 45 °C) as compared to gas chromatographic analysis. The lowest values of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for kestose, nystose and frutossilnystose were obtained in the experiment employing temperatures similar between the column and the detector. The results obtained using acetronitrila mobile phase: water (70:30), column temperature 20 °C and the detector 25 °C, mobile phase flow 1 mL.min⁻¹, injection volume 5 µL with refractive index detector showed that the proposed method is suitable, reliable and efficient quantification of fructooligosaccharides

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	15
<i>CAPÍTULO 1</i>	18
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.2.1 Enzimas.....	19
1.2.2 Inulinases	20
1.2.3 Imobilização de enzimas	23
1.2.4 Imobilização de inulinases.....	29
1.2.5 Considerações parciais	31
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
1.3.1. Produção da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	32
1.3.2 Imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	34
1.3.3 Determinação da atividade enzimática da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	35
1.3.4 Seleção do suporte de carvão ativado e vazão da bomba a serem utilizados na imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	38
1.3.5 Determinação do tempo reacional e diluição adequada para medida da atividade da enzima imobilizada.....	38
1.3.6 Otimização das condições de imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	39
1.3.7 Estudo cinético da eficiência do processo de imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	40
1.3.8 Caracterização parcial da enzima inulinase imobilizada	40
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42

1.4.1 Testes preliminares para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	42
1.4.2 Otimização das condições de imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	46
1.4.3 Estudo cinético da eficiência do processo de imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	51
1.4.4 Caracterização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 imobilizada	53
1.5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	61
1.5.1 Conclusões.....	61
1.5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	62
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO 2	74
2.1 OBJETIVOS.....	74
2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	75
2.2.1 Frutooligossacarídeos	75
2.2.2 Produção de Frutooligossacarídeos.....	76
2.2.3 Características e aplicações de Frutooligossacarídeos	77
2.2.4 Determinação de Frutooligossacarídeos.....	78
2.2.5 Validação de Método Analítico	81
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	87
2.3.1 Substâncias Químicas e Reagentes.....	87
2.3.2 Preparo da Solução Padrão	87
2.3.3 Validação do Método Analítico	88
2.3.4 Aplicação do método analítico.....	92
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
2.4.1 Otimização das condições cromatográficas: Efeito das temperaturas da coluna e do detector.....	93
2.4.2 Curva analítica e Linearidade.....	97
2.4.3 Seletividade.....	98
2.4.4 Precisão	99
2.4.5 Exatidão	100

2.4.6 Robustez	101
2.4.7 Avaliação do Efeito Matriz	102
2.4.8 Aplicação do método analítico.....	103
2.5 CONCLUSÕES.....	104
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXO I.....	113
ANEXO II.....	115
ANEXO III.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Especificidade da inulinase.	22
Figura 2 - Principais métodos para imobilização de enzimas. Fonte: DALLA VECCHIA <i>et al.</i> (2004).....	26
Figura 3 - Aparato experimental utilizado no processo de imobilização.	35
Figura 4 – Testes preliminares para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 utilizando Carvão Pelegrini 20 x 40 (a), Carvão Pelegrini 12 x 40 (b) e Carvão Alpha LA 810 (c).	44
Figura 5 - Superfícies de respostas para a imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 em função da concentração de alginato de sódio e glutaraldeído (a), de alginato de sódio e carvão ativado (b) e glutaraldeído e carvão ativado (c).	49
Figura 6 – Cinética do processo de imobilização – atividade específica da enzima imobilizada e da solução de tratamento da enzima.	52
Figura 7 – Gráfico de Pareto do efeito da temperatura e pH na atividade da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 imobilizada.	55
Figura 8 – Estrutura química dos frutooligossacarídeos: Kestose (A); Nistose (B) e Frutossilnístose (C) – Fonte: FEIBERG <i>et al.</i> , 2009.	76
Figura 9 - Superfície de resposta para a intensidade/amplitude do ruído (limites de detecção e quantificação) na otimização das condições cromatográficas em HPLC/IR em função da temperatura da coluna e do detector.	96
Figura 10 - Cromatograma de uma amostra sintética contendo Frutose ($t_R = 4.891$ min), glicose ($t_R = 5.246$ min), sacarose ($t_R = 5.760$ min), kestose ($t_R = 6.713$ min), nistose ($t_R = 7.620$ min) e frutossilnístose ($t_R = 8.679$ min).	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^3 para otimização do processo de imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	40
Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para determinação da temperatura e pH ótimos da inulinase imobilizada.	41
Tabela 3 – Testes preliminares para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 utilizando diferentes carvões ativados e vazões de bomba.	43
Tabela 4 - Caracterização dos suportes e inulinase imobilizada em diferentes suportes por análise de BET.	45
Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de atividade de inulinase, teor de proteína e atividade específica.....	47
Tabela 6 - Coeficientes de regressão para a imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.	48
Tabela 7 - Análise de variância para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.	49
Tabela 8 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , (valores codificados e reais) com as respostas em termos de atividade enzimática, teor de proteína e atividade específica da inulinase imobilizada...	54
Tabela 9 – Estabilidade da inulinase imobilizada a 5 °C.....	56
Tabela 10 – Estabilidade da inulinase imobilizada a 25 °C.....	57
Tabela 11 – Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 40 °C.....	58
Tabela 12 – Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 50 °C.....	58
Tabela 13 – Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 60 °C.....	59
Tabela 14 – Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 70 °C.....	59
Tabela 15 - Variáveis e níveis estudados no delineamento composto central 2^2 para otimização das condições cromatográficas.....	88

Tabela 16 – Matriz do planejamento 2^2 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de ruído, limite de quantificação e limite de detecção para a Kestose (K), Nistose (N) e Frutosilnistose (F).	94
Tabela 17 - Coeficientes de regressão para o intensidade/amplitude do ruído nos limites de detecção e quantificação na otimização das condições cromatográficas em CLAE/IR.	95
Tabela 18 - Análise de variância para a intensidade/amplitude do ruído dos limites de detecção e quantificação na otimização das condições cromatográficas em CLAE/IR.	95
Tabela 19 - Valores de faixa linear, r^2 e equação da reta para os açúcares kestose, nistose e frutosilnistose no solvente.....	97
Tabela 20 - Desvio padrão (S) e desvio padrão relativo (DPR%) para a Kestose, Nistose e Frutosilnistose na repetitividade (n=6) de uma solução contendo 5.000 g.L^{-1}	99
Tabela 21 - Desvio padrão (S) e desvio padrão relativo (DPR%) para a Kestose, Nistose e Frutosilnistose na precisão intermediária.	100
Tabela 22 – Valores de recuperação para a kestose, nistose e frutosilnistose.	100
Tabela 23 - Variação na vazão da fase móvel na análise de kestose, nistose e frutosilnistose.	101
Tabela 24 - Variação da composição da fase móvel na análise de Kestose, nistose e frutosilnistose.	102
Tabela 25 - Valores de faixa linear, r^2 e equação da reta para os açúcares kestose, nistose e frutosilnistose na matriz.	103

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a utilização de alimentos que promovem o bem-estar, a melhoria da saúde e a redução do risco de doenças estão se tornando cada vez mais popular, assim como o consumidor está se tornando mais consciente sobre sua saúde. Neste sentido, houve um aumento de atenção em relação aos tipos de carboidratos na dieta, ou seja, os oligossacarídeos não digeríveis, os quais apresentam importantes propriedades físico-químicas e fisiológicas benéficas para a saúde dos consumidores. Destes oligossacarídeos, se pode salientar os frutooligossacarídeos (FOS) (MUSSATTO e MANCILHA, 2007; YUN, 1996).

Frutooligossacarídeos são componentes prebióticos largamente utilizados como ingredientes em alimentos funcionais ao redor do mundo. Como prebióticos, contribuem para o crescimento das bifidobactérias do cólon humano (GUÍO *et al.*, 2009; PERRIN *et al.*, 2005).

As plantas agrícolas são fontes naturais de frutooligossacarídeos, os quais também podem ser obtidos sinteticamente, a partir da sacarose ou da inulina. Destes processos, os obtidos por via microbiana, a partir da sacarose, têm atraído atenção especial (MAUGERI e HERNALSTEENS, 2007; CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Quando a sacarose é utilizada como substrato, obtém-se como produtos frutooligossacarídeos de 2 a 4 unidades fructosil com ligações β -(2-1), com um resíduo α -D-glicosil terminal, conhecidos como kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutosilnistose (GF₄), sacarose não reagida, glicose e frutose. Quando utilizado inulina como substrato, através de sua hidrólise enzimática, são produzidos frutooligossacarídeos de cadeia longa (VANKOVÁ e POLAVIK, 2010; CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

As enzimas microbianas podem ser classificadas em três grandes campos de aplicação: aquelas utilizadas para sintetizar compostos; outras específicas para reações de bioconversão; e algumas capazes de hidrolisar polímeros em monômeros de interesse econômico. A inulinase pertence a esta última classe de enzimas, apresentando a capacidade de hidrolisar inulina, um

polímero vegetal, em frutose praticamente pura. Microrganismos do gênero *Kluyveromyces* são reconhecidos como bons produtores de inulinases (VANDAMME e DERYCKE, 1983; MAZUTTI *et al.*, 2010).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo pode provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a estes problemas, a técnica de imobilização tem se revelado uma ferramenta muito poderosa para melhorar quase todas as propriedades da enzima, como estabilidade, atividade, especificidade, seletividade e redução da inibição, bem como tem facilitado sua recuperação e reutilização, podendo ser utilizadas nos processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos (VILLENEUVE *et al.*, 2000; ZANIN e MORAES, 2004; MATEO *et al.*, 2007).

Com base no exposto anteriormente, e tendo em vista as vantagens associadas à imobilização de enzimas e ao potencial de aplicação industrial das inulinases, o Capítulo 1 apresenta a proposição de uma metodologia simples e barata buscando a otimização do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando carvão ativado e alginato de sódio como suportes.

Outro tema relevante na literatura se refere à validação de método analítico para quantificação de frutooligossacarídeos, os quais podem ser sintetizados utilizando enzimas microbianas imobilizadas. Para determinação de frutooligossacarídeos, produzidos pelos dois processos existentes citados anteriormente, uma técnica largamente empregada é a cromatografia líquida acoplada a um detector eletroquímico (CLAE-PAD). Porém, devido à especificidade e elevado custo deste sistema, alternativamente para a determinação de FOS pode ser empregada a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por índice de refração (CLAE-IR), um detector universal e de baixo custo, que permite a quantificação dos FOS nas reações de interesse. Tendo em vista as vantagens do sistema CLAE-IR, e a ausência

de relatos na literatura validando esta metodologia, o Capítulo 2 apresenta o estudo da validação de método analítico para determinação de frutooligossacarídeos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração, buscando, através de estudos experimentais, atender às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados gerados.

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 EM CARVÃO ATIVADO E ALGINATO DE SÓDIO

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral desta etapa do trabalho consistiu em investigar o processo de imobilização da inulinase *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando carvão ativado e alginato de sódio como suportes.

Como objetivos específicos, pode-se citar:

- ✓ Desenvolvimento de metodologia para imobilização da inulinase utilizando carvão ativado e alginato de sódio como suportes;
- ✓ Estudo do efeito das variáveis do processo empregando técnicas de planejamento experimental, visando à otimização das condições de imobilização;
- ✓ Estudo da caracterização parcial da inulinase imobilizada na condição experimental selecionada, em função do processo e do suporte utilizado;
- ✓ Comparação entre os dados experimentais obtidos em cada etapa avaliada, em termos de atividade específica, rendimento de imobilização, percentual de retenção e estabilidade da enzima imobilizada.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à imobilização de enzimas. Com base no exposto anteriormente, levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, ênfase especial será dada ao sistema de imobilização de inulinase microbiana de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

1.2.1 Enzimas

Muito da história da bioquímica refere-se à pesquisa em enzimas. Em 1926, James Sumner's isolou e cristalizou a primeira enzima, a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em NH_3 e CO_2 (VOET *et al.*, 2000). Com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA, todas as enzimas são proteínas (GALVÃO, 2004). Pode-se definir a grande maioria das enzimas como sendo proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. São catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando termodinamicamente uma reação possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (ERGINER *et al.*, 2000; GÜRSEL *et al.*, 2003).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos, envolvendo reações com substratos. São geralmente de natureza protéica, altamente específicas e apresentam grande poder catalítico. A aplicação tecnológica de enzimas é bastante vantajosa quando comparada aos processos químicos por não necessitar de condições de temperatura e pressão drásticas. Uma das vantagens da produção microbiana de enzimas é que se pode utilizar substratos de baixo custo e as mesmas exigirem um tempo relativamente curto de produção (MEDEIROS *et al.*, 1999).

Atualmente, aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas, e destas cerca de 200 são usadas comercialmente, sendo que a maioria das enzimas é de origem microbiana (SHARMA *et al.*, 2001).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, os quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais (CASTRO *et al.*, 2004).

A aplicação das enzimas em produtos e processos industriais ganhou maior importância a partir do início do século XX, com os avanços tecnológicos e científicos em áreas como a bioquímica. Com isso, o mercado de enzimas tornou-se mais atrativo, sendo as mesmas comercializadas e empregadas em larga escala (SAID e PIETRO, 2004).

1.2.2 Inulinases

Dentre as enzimas utilizadas no setor de alimentos, as inulinases microbianas merecem destaque como uma importante classe de enzimas industriais, as quais vêm recebendo especial atenção nos últimos anos (CONTIERO, 2004). As inulinases podem ser obtidas de leveduras, fungos, bactérias e de plantas (MANZONI e CAVAZZONI, 1992). Microrganismos do genero *Kluyveromyces* são reconhecidos como bons produtores de inulinases, os quais possuem boa atividade sobre os substratos sacarose e inulina (KUSHI *et al.*, 1996; MAZUTTI *et al.*, 2010).

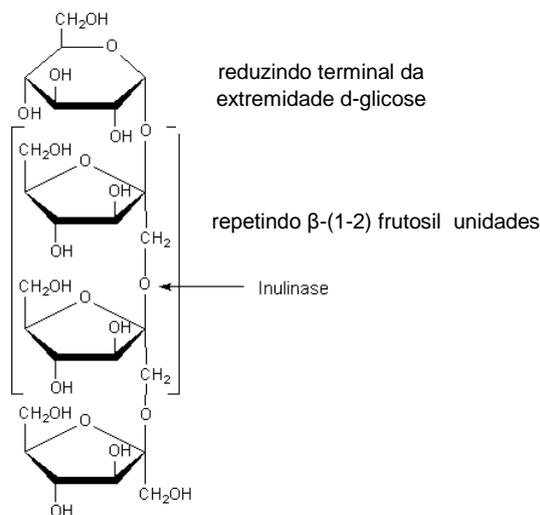
As inulinases foram descobertas por Lindner, em 1900, que observou a capacidade de utilização de inulina por cepas de leveduras *Kluyveromyces marxianus*. Desde então o seu estudo prende a atenção de cientistas, focando na indução, síntese, isolamento, mecanismos de reação e propriedades de inulinases produzidas tanto por vegetais como por microrganismos. Dentre os pioneiros citam-se: Pringsheim e Kohn, os quais produziram inulinase sintetizada por *Aspergillus niger*, Edelman e Jefford, Flood *et al.* e Rutherford e Deacon, que isolaram inulinases de tubérculo de alcachofra de Jerusalém, raiz de chicória e raiz de dália, respectivamente (VANDAME e DERYCKE, 1983).

Inulinases são frutofuranosil hidrolases produzidas por uma ampla variedade de microrganismos, compreendendo bactérias, fungos e leveduras. Esta última classe de microrganismos é a mais relatada na literatura, provavelmente devido ao fácil cultivo e aos altos rendimentos enzimáticos. As fontes mais comuns para produção de inulinase são *Aspergillus* spp. e *Kluyveromyces* spp. (PANDEY *et al.*, 1999; TREICHEL *et al.*, 2011).

As inulinases de levedura mais estudadas são aquelas do gênero *Kluyveromyces* (*K. marxianus* var. *marxianus*, entre os quais são incluídos *K. marxianus* e *K. fragilis* se estendendo a *K. marxianus* var. *lactis* e *K. marxianus* var. *bulgaricus*). Essas leveduras são consideradas ideais para a produção de inulinases, pois crescem rapidamente em altas concentrações celulares e produzem grandes quantidades desta enzima. As inulinases de *K. marxianus* possuem capacidade de hidrolisar tanto inulina como sacarose, rafinose e levanas, apresentando alta atividade para sacarose e 3-rafinose, conduzindo a melhores resultados que os obtidos pelas invertases (VERACHTERT e DE MOT, 1990).

Várias enzimas produzidas por microrganismos e vegetais são capazes de degradar frutanas. De acordo com seus mecanismos catalíticos, estas enzimas podem ser incluídas entre as transferases (EC 2.4.1), com produção de anidrido difrutose, ou entre as hidrolases (EC 3.2.1), com hidrólise de polifrutosanas baseada em um processo de endo ou exo-degradação. Além disso, essas enzimas podem ser distinguidas pela sua especificidade por ligações β -1,2 (encontradas em inulina e sacarose), β -2,6 (encontradas em levanas) ou para ambos os tipos de ligação (VERACHTERT e DE MOT, 1990).

As inulinases são 2,1- β -D frutano furohidrolase (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina, um polímero de frutose, ligadas em β -2,1, liberando moléculas de frutose (ETTALIBI e BARATTI, 2001). A Figura 1 apresenta a especificidade da inulinase frente ao substrato inulina.

Figura 1 – Especificidade da inulinase. Fonte: ETTALIBI e BARATTI, 2001.

As enzimas microbianas podem ser classificadas em três maiores campos de aplicação: aquelas utilizadas para sintetizar compostos; outras específicas para reações de bioconversão; e algumas capazes de hidrolisar polímeros em monômeros de interesse econômico. A inulinase pertence a esta última classe de enzimas, apresentando a capacidade de hidrolisar inulina, um polímero vegetal, em frutose praticamente pura (VANDAMME e DERYCKE, 1983).

Inulinases são enzimas largamente utilizadas para a produção de frutooligossacarídeos, compostos com propriedades funcionais e nutricionais utilizados em dietas de baixa caloria, estimulação de Bifidus e como uma fonte de fibra dietética em preparações alimentares (SILVA-SANTISTEBAN e MAUGERI, 2005).

A maior aplicação de inulinases está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose. A indústria utiliza-se de grande quantidade de polissacarídeos naturais e novas fontes têm sido procuradas com o intuito de suprir a demanda. A utilização das inulinases apresenta-se como uma alternativa para sua obtenção (CONTIERO, 2004).

Atualmente, as inulinases comerciais são obtidas empregando inulina como substrato, a qual é uma matéria-prima com um alto valor agregado. A

inulina é o mais utilizado como fonte de carbono para a produção de inulinase. Porém, uma grande variedade de insumos de cultivo é empregada para uma diversidade de microrganismos, na obtenção desta enzima. Entre estes, pode-se destacar substâncias puras (monossacarídeo, dissacarídeo ou polissacarídeo), compostos ricos em inulina e substratos mistos. Em microrganismos produtores de inulinase com atividade de invertase, pode ser utilizado inulina ou sacarose como fontes de carbono no meio de cultivo. Outros substratos também são utilizados, como derivados de inulina, amidalina, arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, melesitose, metanol, rafinose, salicina e amido (CONTIERO, 2004).

Estudos apresentados na literatura mostram uma forte tendência a substituição da inulina, que é um material de valor elevado, e outros substratos sintéticos, por substratos agroindustriais, visando reduzir os custos de produção da enzima (TREICHEL *et al.*, 2011).

1.2.3 Imobilização de enzimas

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização. O objetivo de se imobilizar enzimas é obter maiores vantagens no uso de enzimas em contraposição às desvantagens de alto custo e baixa estabilidade das preparações (VILLENEUVE *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2010).

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio da reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio (GIRELLI e MATTEI, 2005; PAIVA *et al.*, 2000). As pesquisas sobre esse assunto intensificaram-se a partir dos anos 60, no sentido de estabelecer

métodos eficientes de imobilização, seja por meios físicos ou químicos (VITOLLO, 2001).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra para a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como alta especificidade, condições brandas de reação, baixo consumo de energia, e maior atividade catalítica, sua utilização em processos industriais têm sido limitada. Isto se deve, principalmente, à baixa estabilidade operacional, ao elevado custo de obtenção e à dificuldade de separação do produto final, impedindo seu uso em processos contínuos. Com a finalidade de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, as propriedades das enzimas podem ser melhoradas antes de sua aplicação em escala industrial, onde muitos ciclos e processos com altos rendimentos são desejados. Têm-se então estudado métodos para tornar enzimas insolúveis ao meio de reação, resultando nas técnicas de imobilização enzimática (ZANIN e MORAES, 2004; LADERO *et al.*, 2002; MATEO *et al.*, 2007).

A escolha de um processo de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais do processo, tais como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para a fixação da enzima. Assim, o método escolhido deve atender a duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a controle e *down-streaming process* (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; CAO, 2005).

As enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens em relação às enzimas solúveis. Entre elas, pode-se citar a capacidade de reutilização da enzima, maior facilidade de separação do produto final, diminuindo as etapas posteriores de purificação do mesmo. A imobilização enzimática permite a operação contínua, facilita o controle da reação, reduz o volume desta e possibilita uma alta concentração catalítica no reator. A reação pode ser interrompida no momento desejado pela simples remoção da enzima, em processos de batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência, em reatores contínuos. O processo de imobilização ainda permite a modificação favorável das propriedades catalíticas de algumas enzimas, as quais passam a apresentar maior estabilidade ao pH e a temperatura (ASSIS, 2004).

Como as enzimas não são consumidas na reação, sua ação catalítica é semelhante aos catalisadores inorgânicos. Porém, é diferente dos catalisadores sintéticos comuns pela forma amena que realiza a catálise, geralmente em soluções aquosas neutras, temperatura e pressão ambiente e, principalmente, com elevado grau de especificidade em relação ao substrato. O processo de imobilização tem sido bastante estudado para viabilizar o uso de enzimas industrialmente, permitindo a recuperação e o reaproveitamento da mesma, pois o uso da enzima livre é, em várias situações, inviável economicamente (SEGEL, 1979; RIBEIRO, 1989; COUTINHO FILHO, 1996; VICENTE, 2000).

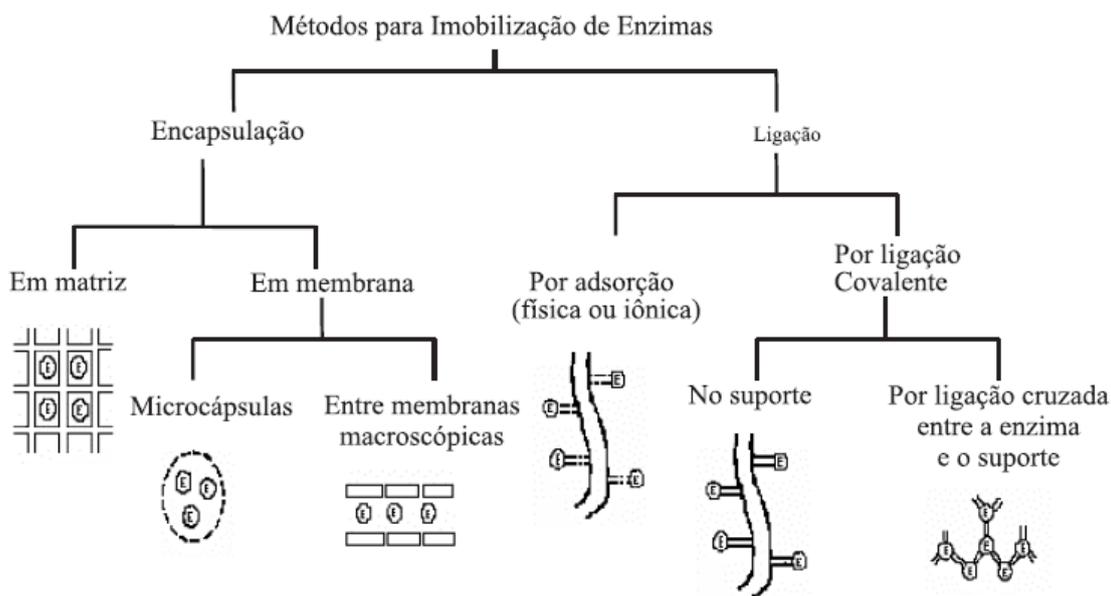
O processo de imobilização enzimática teve início em 1916, quando Nelson e Griffin realizaram a adsorção da enzima invertase em carvão ativado, com retenção de sua atividade catalítica. Apesar desta descoberta, a primeira tentativa de imobilizar uma enzima, com a finalidade de melhorar suas propriedades, foi efetuada em 1953 por Grubhofer e Schleith, quando carboxipeptidase, diastase, pepsina e ribonuclease foram imobilizadas em uma resina de poliaminopoliestireno diazotizada (VICENTE, 2000).

A partir de 1960, foi observado um aumento progressivo nas publicações de trabalhos científicos com enzimas imobilizadas, refletindo o interesse mundial despertado por esta tecnologia. Entretanto, o primeiro processo industrial de imobilização enzimática foi implantado no Japão em 1969, para a

produção de L-aminoácidos; seguido da aplicação de glicose isomerase imobilizada, implantada nos Estados Unidos em 1972, para a isomerização de glicose em frutose. Desde então, novos processos de imobilização e novas aplicações industriais têm sido relatados na literatura (ZANIN e MORAES, 2004).

Inúmeros métodos têm sido descritos na literatura para contornar os possíveis problemas de instabilidade da enzima livre, e otimizar as várias aplicações. As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos. A imobilização pode ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (HAIDER e HUSAIN, 2009; GIRELLI e MATTEI, 2006; DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; VITOLO, 2001), conforme esquema demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Principais métodos para imobilização de enzimas. Fonte: DALLA VECHIA *et al.*, 2004.



1.2.3.1 Imobilização por envolvimento no interior de um suporte

Este método consiste na formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, ou a retenção do biocatalisador por uma membrana porosa. Em ambos os casos, a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. Conseqüentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzima imobilizada. Este método inclui a encapsulação em gel e em fibras e a microencapsulação (ROSEVEAR *et al.*, 1987).

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos, se difundem. Este método permite que seja possível a entrada do substrato e saída do produto, mas não da enzima (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2010).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador. Há uma grande vantagem na utilização desta técnica: a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, há a possibilidade de haver incorporação da enzima na parede da membrana (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; MARIOTTI, 2000).

Na microencapsulação, a enzima é aprisionada em membranas poliméricas semipermeáveis, com grande superfície de contato. É um sistema limitado para substrato com baixa massa molecular, pois este precisa atravessar a membrana para ter acesso à enzima. Conforme citado anteriormente, há uma grande vantagem na utilização desta técnica; contudo, há a possibilidade de haver incorporação da enzima na parede da membrana (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; MARIOTTI, 2000).

1.2.3.2 Imobilização por ligação a um suporte via adsorção física

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros. O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

A combinação de métodos de imobilização de enzimas é realizada para melhorar a estabilidade da proteína imobilizada e para obter enzimas imobilizadas com maior atividade (MATEO *et al.*, 2006).

1.2.4 Imobilização de inulinases

Como exposto anteriormente, com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas, e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional, e a imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente.

Ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, e com boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens são eliminadas e as enzimas podem ser utilizadas nos processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos (ZANIN e MORAES, 2004).

A escolha do método de imobilização a ser utilizado para a imobilização de uma determinada enzima passa, necessariamente, por uma análise da aplicação a que se destina o sistema contendo a enzima imobilizada. Uma vez definida a aplicação e, portanto, as condições operacionais onde a enzima deverá atuar, pode-se então avaliar, dentre as técnicas disponíveis, aquela que melhor se encaixe às necessidades exigidas. Isso posto, é importante avaliar o tempo e os custos necessários para se viabilizar o método de imobilização escolhido, uma vez que tais parâmetros irão se refletir no processo e, portanto, nos custos do produto final (FERNANDES *et al.*, 2010).

A literatura apresenta alguns estudos a respeito da imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes suportes. Entre eles, podem ser citados os trabalhos de COGHETTO *et al.* (2012), os quais imobilizaram a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando montmorilonita como suporte inorgânico. A proporção de enzima e solução tampão de 3:10 e 10 min de imobilização conduziu à maior atividade específica, de 375,07 U/mg proteína. PAULA (2008), imobilizando a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando gelatina como suporte, obteve uma alta taxa de imobilização, de 82,60 %. A inulinase parcialmente purificada de *Kluyveromyces* sp. Y-85 foi imobilizada covalentemente em microesferas de poliestireno (WENLING *et al.*, 1999) com retenção de 75 % de sua atividade.

KUNH *et al.* (2011) avaliaram a influência do tratamento de fluidos pressurizados sobre a atividade enzimática da inulinases de *Kluyveromyces*

marxianus NRRL Y-7571 imobilizada em montmorilonita natural. Os efeitos da concentração de acetato de butila nas características da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 imobilizada em carvão ativado e alginato de sódio foram avaliadas por RISSO *et al.* (2010).

BAJPAI e MARGARITIS (1987) realizaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* por ligação metálica, com 72 % de retenção da atividade enzimática original. Com a finalidade de promover a bioconversão da inulina de *Helianthus tuberosus*, GASPARI *et al.* (1999) estudaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes suportes, como quitina, alginato de sódio, pectina, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada (SPC). Os autores obtiveram a maior taxa de imobilização, de 73 U/g, utilizando quitina com glutaraldeído. Um sistema de imobilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando como suporte alginato de bário tratado com glutaraldeído foi avaliado por BARRANCO-FLORIDO *et al.* (2001).

Outros trabalhos com estudos de imobilização de inulinase são reportados na literatura. SILVA *et al.* (2013) avaliaram a estabilidade da atividade da inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em espuma de poliuretano. YEWALE *et al.* (2013) estudaram a imobilização da inulinase de *Aspergillus niger* NCIM 945 em chitosana e obtiveram 83 % de eficiência de imobilização. A síntese de frutooligossacarídeos utilizando inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571 imobilizada em carvão ativado e alginato de sódio foi investigada por SILVA *et al.* (2013). YUN *et al.* (2000) avaliaram vários suportes na imobilização da inulinase de *Pseudomonas* sp. e encontraram os melhores resultados de eficiência e estabilidade operacional utilizando como suporte poliestireno. Após a imobilização da inulinase de *A. ficcum* em vidro poroso, por ligação covalente, utilizando reagentes de silanização e reticulação, ETTALIBI e BARATTI (2001) obtiveram alta estabilidade térmica e valores de 29 % a 71 % de proteínas aderidas ao suporte, conservando até 77,2 % da atividade imobilizada. KOCHHAR *et al.* (1998), ao imobilizar a inulinase de *A. versicolor*, obtiveram 56 % de retenção da atividade enzimática em quitina e 10% em caseína. CATANA *et al.* (2005)

avaliaram a influência da concentração do suporte alginato de sódio sobre o rendimento de imobilização de uma preparação de inulinase comercial de *A. niger* (Fructozyme L.) visando a hidrólise da sacarose e uma alta atividade foi encontrada na faixa de 50-60 °C. A estabilidade da enzima comercial Fructozyme L. imobilizada em resina Amberlite IRC 50 foi estudada por CATANA *et al.* (2007). GILL *et al.* (2006) imobilizaram a inulinase de *A. fumigatus* em resinas Dowex e Amberlite e obtiveram 63 % e 39 % de retenção da atividade enzimática, respectivamente. Em seus experimentos, ainda obtiveram total retenção enzimática ao imobilizar a inulinase em quitina e em matrizes de afinidade QAE-Sephadex e DEAE-Sephacel e Concanavalina A ligada a esferas de sílica amino-ativadas. Diferentes mecanismos de imobilização de proteínas utilizando como suportes de ativação glutaraldeído foram estudados por BETANCOR *et al.* (2006).

1.2.5 Considerações parciais

Conforme apresentado no decorrer deste capítulo, alguns poucos relatos são encontrados na literatura a respeito da imobilização da enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em carvão ativado e alginato de sódio, porém não há nenhum estudo avaliando a otimização do processo de imobilização.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, onde o efeito de vários suportes e parâmetros relevantes ao processo de imobilização foram investigados. A caracterização parcial do extrato enzimático imobilizado também foi realizada.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental, relacionada à produção de inulinase e otimização do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando alginato de sódio e carvão ativado como suportes. A metodologia empregada para a caracterização parcial do extrato enzimático imobilizado também será apresentada.

1.3.1. Produção da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

1.3.1.1 Microrganismo

Na realização deste trabalho foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, fornecida pelo Departamento de Engenharia de Bioprocessos da UNICAMP. O microrganismo foi mantido a 4 °C em caldo YM contendo: 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de ágar.

1.3.1.2 Pré-inóculo e substratos

O meio para o pré-inóculo era constituído de 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ sacarose, 5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 1,5 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 1,15 g.L⁻¹ de KCl e 0,65 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Cada tubo de caldo YM foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, o qual foi incubado a 30 °C, 150 rpm por 24 horas.

O meio sólido usado como substrato para a produção de inulinase era composto por bagaço de cana suplementado com 15% (p/p) de melaço de cana pré-tratado, 30% (p/p) de água de maceração de milho (AMM) e 20% (p/p) de farelo de soja (MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007). O bagaço de cana, adquirido no mercado local, foi seco em temperatura ambiente e triturado mecanicamente, de maneira a uniformizar o tamanho de partículas. A AMM foi adquirida da Corn Products Internacional – Mogi Guaçu (SP); o melaço de cana

foi adquirido na Refinaria Éster – Campinas (SP) e o farelo de soja foi adquirido na empresa Olfar – Erechim (RS). A umidade inicial dos substratos foi corrigida para 65%, conforme determinada em trabalho anterior (MAZUTTI *et al.*, 2006).

O melaço de cana foi pré-tratado preparando-se uma solução 200 g.L⁻¹ em ácido sulfúrico pH 5,0. Esta solução permaneceu em repouso por 24 horas. Após esse período, o pH final foi ajustado para 4,0 com ácido sulfúrico.

1.3.1.3 Produção de inulinase por fermentação batelada simples (FBS)

A produção de inulinase foi realizada por FES usando estratégia de fermentação batelada simples (FBS). A fermentação foi realizada em biorreator de leito fixo com capacidade útil de 3 kg de bagaço de cana, o mesmo foi conectado a um umidificador de ar o qual fornece ar com umidade relativa de 95-100%, consiste de um cilindro de PVC disposto horizontalmente antes da entrada do ar no biorreator. O ar seco fornecido por um compressor de ar foi bombeado diretamente dentro do umidificador usando um difusor, onde o ar permanecia em contato com a água por um tempo suficiente para que fosse obtido ar saturado nas condições do processo. O biorreator foi carregado com 2 kg de bagaço de cana seco devidamente suplementado. A umidade dos substratos foi corrigida para 65 % (Base seca - p/p) e autoclavado a 121 °C por 20 min. As fermentações iniciaram com um volume de inóculo correspondente a 14 g de massa inicial de células (Mazutti *et al.*, 2010). O experimento foi conduzido por 24 h e após a inulinase foi extraída do meio através da adição de 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,8), seguindo com a incubação à 50 °C, 150 rpm por 30 minutos. A atividade enzimática e teor de proteína foram determinados a partir do sobrenadante, após a filtração dos sólidos. O sobrenadante obtido, ou seja, o extrato enzimático bruto, foi utilizado em todos os experimentos de imobilização enzimática.

1.3.2 Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

1.3.2.1 Suportes para imobilização

Como suportes e coadjuvantes para imobilização da inulinase foram utilizados:

- Carvão ativado Alpha LA 810, umidade máxima 8 %, granulometria 325 mesh, cinzas típicas 5 %, pH alcalino (Alphacarbo);
- Carvão ativado Pelegrini Carbon, umidade inferior a 5 %, granulometria 12x40 mesh, cinzas típicas máximo 5 %, pH 7 a 10 (Pelegrini Carbon);
- Carvão ativado Pelegrini Carbon, umidade inferior a 5 %, granulometria 20x40 mesh, cinzas típicas máximo 5 %, pH 7 a 10 (Pelegrini Carbon);
- Alginato de Sódio (Vetec, Cinética);
- Glutaraldeído 25 % em água (Nuclear, Vetec);
- Sacarose (Fmaia, Vetec).

1.3.2.2 Equipamentos

Para a imobilização da inulinase foi utilizada uma bomba peristáltica modelo 7518-10, marca Masterflex L/S.

1.3.2.3 Procedimento experimental para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Para o processo de imobilização, inicialmente foi preparada uma solução de gel, contendo água destilada e alginato de sódio, os quais foram aquecidos em microondas, até total dissolução. Em seguida, foi adicionada a sacarose. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados o extrato enzimático com atividade pré-estabelecida, o glutaraldeído e o carvão ativado

(Risso, 2004). Com uma bomba peristáltica (Figura 3), o gel foi bombeado em uma solução contendo tampão acetato pH 4,8 0,1 M e cloreto de cálcio 0,2 M com 3,5% de glutaraldeído, em banho de gelo, sob agitação. Após a imobilização, as enzimas permaneceram nesta mesma solução em tratamento na geladeira por 24 h. Após cessado o tempo de tratamento, as enzimas foram lavadas com água destilada e tampão acetato pH 4,8 0,1 M. Em seguida, foram imersas em uma solução de tampão acetato pH 4,8 0,1 M e cloreto de cálcio 0,05 M para manter sua estrutura original.

Figura 3 - Aparato experimental utilizado no processo de imobilização.



1.3.3 Determinação da atividade enzimática da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Substrato

- Tampão acetato pH 4,8 com 2% de sacarose.

Reagentes

- DNS (ácido 3, 5 dinitrosalicílico);
- Tartarato de Sódio e Potássio (15,1 g/L).

Equipamentos

- Espectrofotômetro marca Agilent 8453.

1.3.3.1 Determinação da atividade do extrato enzimático bruto

A atividade enzimática do extrato enzimático bruto foi determinada adicionando-se 0,5 mL da solução de extração adequadamente diluída em 4,5 mL de uma solução tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,8) com 2 % (p/v) de sacarose. Após diluída, a solução foi mantida a 50 °C, por 10 min (MAZUTTI *et al.*, 2006). A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), onde 0,5 mL da amostra anterior foram diluídos em 0,5 mL de DNS e mantidos por 5 min em água em ponto de ebulição. Cessado o tempo reacional, foram adicionados na amostra 8 mL de tartarato de sódio e potássio em banho de gelo. Para cada amostra foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. As amostras foram lidas em triplicata, em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em termos de unidades de inulinase por mL de extrato enzimático bruto (U/mL). Uma unidade por mL de solução enzimática (U/mL) é definida como sendo a capacidade da enzima liberar 1 $\mu\text{mol/mL}$ de frutose por minuto. Os resultados foram expressos em unidade de atividade (U) da inulinase, definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

1.3.3.2 Determinação do teor de proteína do extrato enzimático bruto

A proteína total foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, após 2 min da adição de 0,1 mL de amostra a 5 mL do reagente de Bradford. A concentração de proteína foi expressa em mg/mL.

1.3.3.3 Determinação da atividade da enzima inulinase imobilizada

A atividade enzimática da enzima inulinase imobilizada foi determinada adicionando-se 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) em uma proveta de 25 mL, completando-se a mesma com uma solução de tampão acetato 0,1 M, pH 4,8, com 2 % p/v) de sacarose. Após diluição a solução foi mantida a 50 °C, por 10 min. A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), onde 0,5 mL da amostra anterior foram diluídos em 0,5 mL de DNS e mantidos por 5 min em água em ponto de ebulição. Cessado o tempo reacional, foram adicionados 8 mL de tartarato de sódio e potássio em banho de gelo. Para cada amostra foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. As amostras foram lidas em triplicata, em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidade de atividade (U) da inulinase, definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

1.3.3.4 Determinação do teor de proteína da enzima inulinase imobilizada

A proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As enzimas imobilizadas (esferas) foram esmagadas para liberação da proteína. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, após 2 min da adição de 0,1 mL de amostra a 5 mL do reagente de Bradford. A concentração de proteína foi expressa em mg/mL.

1.3.3.5 Determinação da atividade específica no extrato enzimático bruto e na enzima inulinase imobilizada

A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade do extrato enzimático bruto pela proteína determinada. Para a enzima imobilizada, o mesmo procedimento foi utilizado. A atividade específica (AE) foi expressa em unidade de atividade (U) por miligrama (mg) de proteína.

1.3.4 Seleção do suporte de carvão ativado e vazão da bomba a serem utilizados na imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Para a imobilização do extrato enzimático bruto de inulinase foi utilizada a metodologia de RISSO (2004), onde diferentes suportes de carvão ativado foram avaliados, em diferentes vazões. A quantidade de água destilada utilizada foi de 16,5 mL, alginato de sódio 0,75 g, sacarose 12,5 g, 5 mL de solução enzimática, 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativado para cada experimento.

Os seguintes carvões ativados e vazões da bomba foram utilizados:

- Carvão ativado Alpha LA 810, Pelegrini 12 x 40 e Pelegrini 20 x 40.
- Vazões: 2, 51 e 100 mL.min⁻¹.

1.3.5 Determinação do tempo reacional e diluição adequada para medida da atividade da enzima imobilizada

Os tempos reacionais para determinação da atividade DNS da enzima imobilizada foram testados utilizando o extrato enzimático bruto imobilizado conforme metodologia de RISSO (2004) no suporte de carvão ativado Alpha LA 810.

Diferentes diluições de enzima imobilizada:substrato tampão acetato pH 0,1 M (pH 4,8) 2% (p/v) sacarose (medidas em proveta) foram testadas a fim de se obter uma diluição adequada para medida da atividade em espectrofotômetro.

As seguintes diluições de enzima imobilizada:substrato foram avaliadas:

- 4 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 4 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1 M (pH 4,8), 2 % de sacarose até completar 16 mL.
- 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1 M (pH 4,8), 2 % de sacarose até completar 18 mL.

- 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1 M (pH 4,8), 2 % de sacarose até completar 25 mL.
- 1 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 1 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1 M (pH 4,8), 2 % de sacarose até completar 50 mL.
- 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1 M (pH 4,8), 2 % de sacarose até completar 50 mL.

Amostras foram retiradas nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min e foi medida a atividade conforme método citado anteriormente para determinação da atividade da enzima imobilizada.

1.3.6 Otimização das condições de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Na determinação das condições para otimização do processo de imobilização do extrato enzimático de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central, e mais uma triplicada do ponto central sem a adição de sacarose, totalizando 14 experimentos. Nesta etapa, a quantidade de água foi fixada em 10 mL para 3 mL de solução enzimática e sacarose a 50 % em relação ao total de água e solução enzimática, para todos os experimentos. As faixas de concentração dos suportes alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado estudadas são apresentadas na Tabela 1.

Os experimentos foram realizados conforme procedimento experimental descrito anteriormente, onde os suportes foram adicionados no processo de imobilização nas quantidades estabelecidas no planejamento de experimentos. Após o processo de imobilização foram medidas a atividade enzimática e o teor de proteína, conforme procedimento descrito anteriormente.

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^3 para otimização do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Variáveis/Níveis	Alginato de Sódio (% m/v)	Glutaraldeído (% v/v)	Carvão Ativado (%m/v)
-1	2	5	3
0	5	10	5
1	8	15	7

1.3.7 Estudo da eficiência do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Após a otimização das condições de imobilização da enzima inulinase, um estudo foi realizado a fim de avaliar a eficiência do processo de imobilização no tempo de 24 h de tratamento da enzima em geladeira. A condição experimental utilizada foi a otimizada no primeiro planejamento experimental. Foram medidas a atividade enzimática e o teor de proteína da solução onde a enzima imobilizada permaneceu em tratamento e da enzima imobilizada nos tempos de 0, 0,5 , 4, 8, 12 e 24 h.

1.3.8 Caracterização parcial da enzima inulinase imobilizada

O estudo de caracterização parcial da enzima inulinase imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi realizado em termos de temperatura e pH e estabilidade térmica.

1.3.8.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da inulinase imobilizada

Para o estudo do efeito da temperatura e pH na atividade enzimática realizou-se um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR), totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi de 10 minutos e as

faixas de pH (com adição de 2% de sacarose) e temperatura estudadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2² para determinação da temperatura e pH ótimos da inulinase imobilizada.

Variáveis/Níveis	pH	Temperatura (°C)
-1,41	4,5	40
-1	4,6	44,4
0	5,0	55
1	5,4	65,6
1,41	5,5	70

1.3.8.2 Estabilidade da inulinase imobilizada

A estabilidade da enzima inulinase imobilizada foi avaliada mantendo-se a enzima imobilizada em uma solução de tampão acetato 0,1 M (pH 4,8) e cloreto de cálcio 0,02 M em temperatura ambiente (25 °C) e em geladeira (4 °C). A estabilidade térmica da inulinase imobilizada foi testada incubando a enzima na solução de tampão acetato 0,1 M (pH 4,8) e cloreto de cálcio 0,02 M nas temperaturas 40; 50; 60 e 70 °C. As amostras de enzimas imobilizadas foram retiradas em determinados intervalos de tempo, e foram medidas a atividade enzimática e teor de proteína.

Os dados obtidos em todas as etapas do estudo de otimização e caracterização foram calculados em termos de atividade específica. Os dados obtidos nos planejamentos de experimentos foram tratados estatisticamente com auxílio do Software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc, USA).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando carvão ativo e alginato de sódio como suporte.

1.4.1 Testes preliminares para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Nesta etapa foram realizados experimentos preliminares relacionados à definição do carvão ativado e vazão da bomba a serem aplicados para a obtenção de dados visando à otimização do processo de imobilização empregando a técnica do planejamento de experimentos.

Em todas as amostras foram medidas a atividade enzimática pelo método DNS e teor de proteínas pelo método de Bradford. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados em termos de atividade específica. Também foram realizados testes preliminares a fim de determinar o tempo reacional ideal para medida de atividade da enzima imobilizada.

As medidas de atividade e proteína de cada lote do extrato bruto da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foram realizadas anteriormente a cada processo de imobilização.

1.4.1.1 Seleção do suporte de carvão ativado e vazão da bomba a serem utilizados na imobilização da inulinase

Realizou-se, primeiramente, um teste a fim de avaliar a eficiência de diferentes carvões ativados na imobilização da inulinase e a eficiência da vazão da bomba no processo de imobilização.

Os resultados obtidos seguindo metodologia descrita anteriormente para imobilização de inulinase, com os respectivos tipos de carvões ativados usados e vazões da bomba utilizadas são apresentados na Tabela 3.

Para todos os experimentos de imobilização, foram medidas a atividade enzimática e o teor de proteína, os quais possibilitaram o cálculo da atividade

específica. O mesmo método foi utilizado para medida da atividade do extrato enzimático bruto (enzima livre), o qual foi utilizado no processo de imobilização.

Tabela 3 – Testes preliminares para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando diferentes carvões ativados e vazões de bomba.

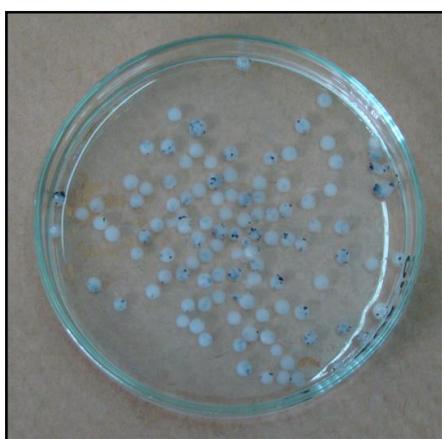
Carvão ativado	Vazão da bomba (mL.min⁻¹)	Atividade enzimática (U/mL)	Teor de proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
Alpha LA 810	2	101,7	0,0672	1512,7
	51	123,1	0,0565	2179,9
	100	112,0	0,0601	1865,0
Pelegrini 12x40	2	5,5	0,0068	819,3
	51	44,5	0,0137	3266,5
	100	25,7	0,0145	1771,0
Pelegrini 20x40	2	32,4	0,0067	4856,2
	51	13,8	0,0128	1078,3
	100	49,0	0,0057	8659,2
Extrato Bruto	-	70,0	0,4185	167,3

A condição experimental utilizada neste teste preliminar de imobilização foi a mesma condição otimizada por RISSO (2004), a qual imobilizou a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, utilizando 16,5 g de água destilada, 0,75 g de alginato de sódio, 12,5 g de sacarose, 5 mL de solução enzimática, 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativado.

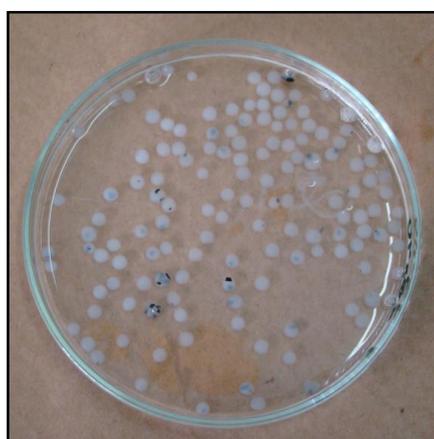
Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que o extrato bruto imobilizado utilizando o suporte carvão ativado Pelegrini (20 x 40) (Figura 4a), nas vazões de 2 e 100 mL.min⁻¹ apresentou as maiores atividades específicas (4.856,2 e 8.569,2 U/mg de proteína, respectivamente). Uma alta atividade específica também foi observada com carvão ativado Pelegrini (12 x 40) (Figura 4b) na vazão de 51 mL.min⁻¹ (3.266,5 U/mg proteína). Apesar dos carvões ativados Pelegrini apresentarem maiores atividades específicas para o extrato bruto imobilizado, sua granulometria original não permitia a boa consecução do processo, principalmente em termos do entupimento causado

na bomba. Desta forma, o carvão ativado Alpha LA 810, em forma de pó (Figura 4c) foi escolhido para ser utilizado nos próximos experimentos, na vazão de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, o qual, apesar de apresentar menor atividade específica ($1.512,7 \text{ U/mg proteína}$) foi o que promoveu melhor gotejamento da solução de imobilização, resultando em esferas uniformes e facilitando a consecução dos experimentos.

Figura 4 – Testes preliminares para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando Carvão Pelegrini 20 x 40 (a), Carvão Pelegrini 12 x 40 (b) e Carvão Alpha LA 810 (c).



(a)



(b)



(c)

1.4.1.2 Caracterização dos suportes utilizados na imobilização e inulinase imobilizada em diferentes suportes de carvão ativado e alginato de sódio

A partir das isotermas de adsorção do nitrogênio foram determinadas as seguintes propriedades dos suportes carvão ativado utilizados na imobilização da inulinase e da inulinase imobilizada nos diferentes suportes: diâmetro médio do poro (determinado pelo modelo BJH); V_{BJH} (volume dos poros, determinado pelo modelo BJH) e A_{BET} (área específica determinada pela isoterma BET). O resultado da caracterização é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização dos suportes e inulinase imobilizada em diferentes suportes por análise de adsorção/dessorção de N_2 .

Suporte/enzima imobilizada	Diâmetro de poro (nm)	Volume de poro (mL/g)	Área específica BET (m^2/g)
Carvão ativado Alpha LA 810	274	$4,50 \times 10^{-1}$	656,0
Carvão ativado Pelegrini 12x40	214	$2,48 \times 10^{-1}$	464,0
Carvão ativado Pelegrini 20x40	216	$2,50 \times 10^{-1}$	463,0
Inulinase imobilizada Alginato + Alpha LA 810	366	$4,49 \times 10^{-2}$	48,9
Inulinase imobilizada em alginato + Pelegrini 12x40	501	$9,26 \times 10^{-2}$	73,9
Inulinase imobilizada em alginato + Pelegrini 20x40	472	$7,98 \times 10^{-2}$	67,5

Através da Tabela 4 pode ser observado que a inulinase imobilizada nos carvões ativados Alpha LA 810, Pelegrini 12 x 40 e Pelegrini 20 x 40, juntamente com o suporte alginato de sódio apresenta diâmetro de poro maior se comparado com o diâmetro de poro da lipase comercial Novozym 435 (15,0 nm). Este fator pode ter determinado as altas atividades da inulinase imobilizada em comparação com a enzima livre, obtidos neste trabalho. Elevadas áreas superficiais dos suportes, comparando com vários suportes testados e apresentados na literatura (SCHERER, 2010) também podem ter influenciado positivamente na eficiência do processo de imobilização.

1.4.1.3 Determinação do tempo reacional e diluição adequada para medida da atividade da enzima imobilizada

Para determinação do tempo reacional ideal para medida da atividade da enzima imobilizada, amostras da inulinase imobilizada nos carvões Alpha LA 810, Pelegrini 12 x 40 e Pelegrini 20 x 40 foram retiradas nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos e foi medida a atividade, conforme método para determinação da atividade da enzima imobilizada (DNS), descrito anteriormente. Através das medidas de absorvância em espectrofotômetro verificou-se que o tempo de 10 minutos foi o ideal para a medida da atividade da enzima imobilizada.

Nos testes utilizando os diferentes carvões, nas diferentes diluições enzima imobilizada:substrato tampão acetato, a condição avaliada utilizando 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1 M (pH 4,8), 2 % de sacarose até completar 25 mL (em proveta), apresentou melhores resultados, com valores dentro dos limites da faixa da curva de calibração. Os resultados das atividades (U/mL) obtidas em relação ao tempo, juntamente com as diferentes diluições testadas são apresentadas no Anexo I.

Com base nos resultados obtidos, o tempo de 10 minutos e a diluição enzima imobilizada:substrato (2 mL enzima completando-se em proveta até 25 mL com substrato tampão acetato 0,1 M (pH 4,8), 2 % sacarose) foram fixados para todos os experimentos de medida da atividade da inulinase imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

1.4.2 Otimização das condições de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Nesta etapa avaliou-se o efeito da concentração de alginato de sódio (AS), glutaraldeído (G) e carvão ativado (CA) na imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Nesta etapa, a quantidade de água adicionada foi fixada em 10 mL, a quantidade de enzima livre em 3 mL e da sacarose em 50 % em relação ao total de água e solução enzimática para todos os experimentos. A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento, com

triplicata do ponto central (ensaios 9, 10 e 11) e mais triplicata do ponto central sem a adição de sacarose (ensaios 12, 13 e 14) com os valores codificados e reais, e as respostas para atividade de inulinase, teor de proteína e atividade específica. A partir desta tabela pode-se observar que foram obtidas diferentes atividades específicas em função dos níveis estudados neste planejamento experimental para cada variável independente avaliada.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental 2³ (valores codificados e reais) com as respostas em termos de atividade de inulinase, teor de proteína e atividade específica.

Ensaio	Alginato de sódio (%m/v)	Glutaraldeído (%v/v)	Carvão ativado (%m/v)	Atividade de inulinase (U/mL)	Teor de proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
1	-1 (2)	-1 (5)	-1 (3)	145,6	0,0706	2063,5
2	+1 (8)	-1 (5)	-1 (3)	36,6	0,0657	557,9
3	-1 (2)	+1 (15)	-1 (3)	150,9	0,0825	1829,1
4	+1 (8)	+1 (15)	-1 (3)	49,3	0,0620	796,0
5	-1 (2)	-1 (5)	+1 (7)	123,3	0,0872	1414,4
6	+1 (8)	-1 (5)	+1 (7)	65,3	0,0870	750,8
7	-1 (2)	+1 (15)	+1 (7)	142,1	0,0866	1640,5
8	+1 (8)	+1 (15)	+1 (7)	66,7	0,0827	807,4
9	0 (5)	0 (10)	0 (5)	109,0	0,0760	1436,0
10	0 (5)	0 (10)	0 (5)	101,0	0,0813	1242,2
11	0 (5)	0 (10)	0 (5)	131,3	0,0791	1660,9
12	0 (5)	0 (10)	0 (5)	28,9	0,0835	346,5
13	0 (5)	0 (10)	0 (5)	24,8	0,0884	281,3
14	0 (5)	0 (10)	0 (5)	27,1	0,0881	307,4
Extrato bruto				34,5	0,4361	79,1

Verifica-se que o maior valor de atividade específica da inulinase imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi obtida nos menores níveis de concentração de alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado, correspondente ao ensaio 1 do planejamento de experimentos, conduzindo a valores de atividade específica de 2.063,5 U/mg proteína. Pode-se verificar também que menores atividades específicas foram observadas nos ensaios 12,

13 e 14, os quais foram realizados sem a adição de sacarose, assim como nos ensaios 2, 4, 6 e 8, onde foram utilizadas maiores concentrações do suporte alginato de sódio.

Os resultados obtidos nos ensaios 1 a 11 do planejamento experimental foram estatisticamente analisados, onde foram estimados os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de t e p, apresentados na Tabela 6. Os resultados obtidos permitiram a obtenção de um modelo codificado otimizado para a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em função da concentração de alginato de sódio, o qual está apresentado na Equação 1. Para validação do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 7. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,94) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validou estatisticamente o modelo ($p < 0,05$), e permitiu a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 5.

Tabela 6 - Coeficientes de regressão para a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(4)	P
Média	1290,8	73,7	17,5	0,0001
(1) Alginato sódio (AS)	-504,4	86,4	-5,8	0,0043
(2) Glutaraldeído (G)	35,8	86,4	0,4	0,6994
(3) Carvão ativado (CA)	-79,2	86,4	-0,9	0,4111
Interação 1 x 2	37,8	86,4	0,4	0,6843
Interação 1 x 3	130,3	86,4	1,5	0,2061
Interação 2 x 3	34,8	86,4	0,4	0,7077

* efeitos significativos a $p < 0,05$.

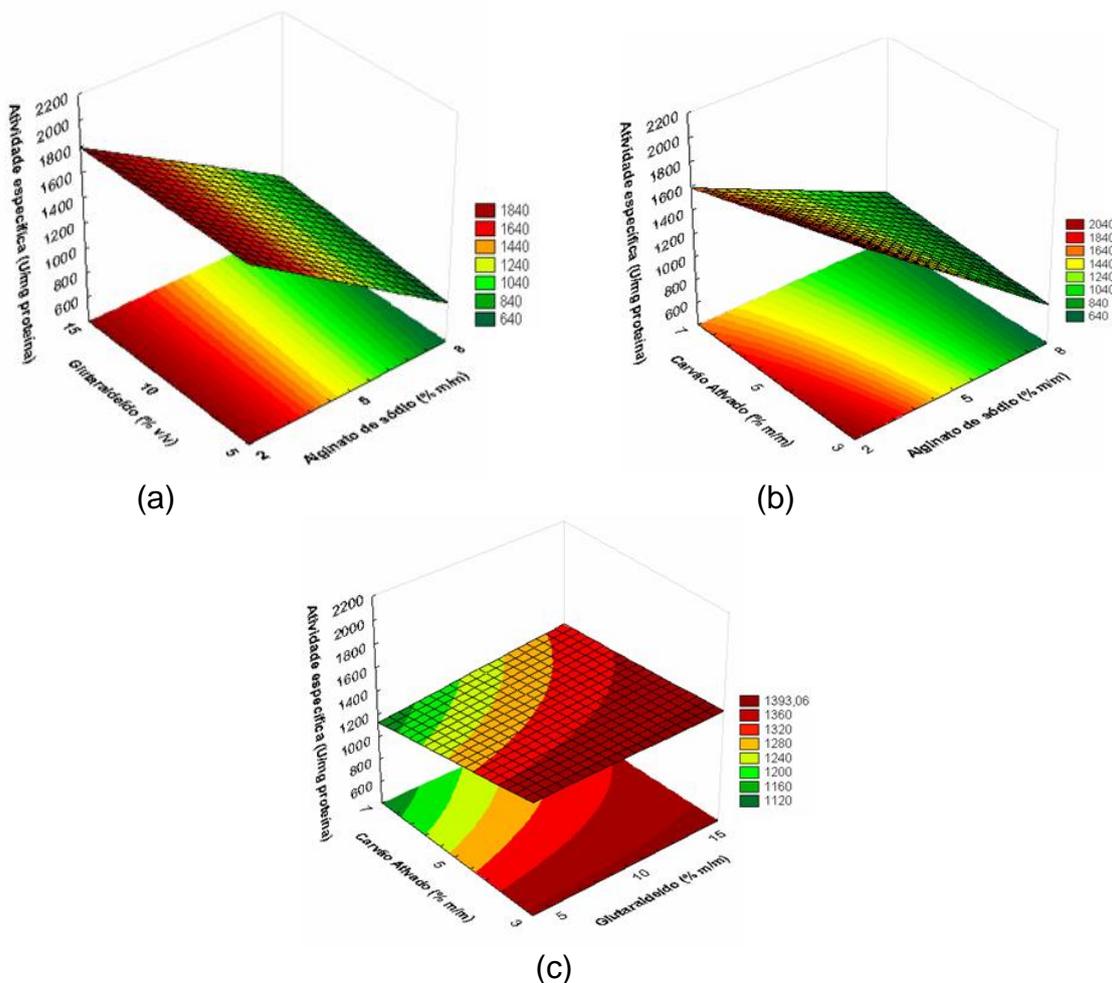
$$\text{Atividade específica da inulinase imobilizada (U / mg proteína)} = 1290,8 - 504,4.AS + 35,8.G - 79,2.CA + 37,8.AS.G + 130,3AS.CA + 34,8.G.CA \quad (1)$$

Tabela 7 - Análise de variância para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	2253414	6	375569	6,28
Residual	239030	4	59757,5	
Total	2492444	10		

R = 0,94; $F_{0,05, 6,4} = 6,16$.

Figura 5 - Superfícies de respostas para a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em função da concentração de alginato de sódio e glutaraldeído (a), de alginato de sódio e carvão ativado (b) e glutaraldeído e carvão ativado (c).



O efeito da concentração do suporte alginato de sódio na imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 pode ser visualizado

na Figura 5 (a) e (b), onde nas menores concentrações de alginato de sódio maiores atividades específicas foram obtidas.

Através da Figura 5 (a) nota-se que na mais baixa concentração de alginato de sódio estudada, a concentração de glutaraldeído não influenciou no processo de imobilização, porém concentrações mais altas de alginato de sódio na faixa de concentração de glutaraldeído estudada conduziram a menores atividades específicas. O mesmo resultado pode ser visualizado na Figura 5 (c), onde a concentração de glutaraldeído não influenciou no processo de imobilização, porém concentrações mais altas de carvão ativado na faixa de concentração de glutaraldeído estudada conduziram a menores atividades específicas.

PAULA (2007), imobilizando a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em carvão ativado, obteve atividade específica de 0,34 U/mg de proteína. GASPARI *et al.* (1999) estudaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. em diferentes suportes, onde o substrato foi convertido no gel com eficiência de 26 % utilizando como suportes alginato de sódio com glutaraldeído. BARRANCO-FLORIDO *et al.* (2001) avaliaram um sistema de imobilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando como suporte alginato de bário tratado com glutaraldeído e obtiveram até 85 % de atividade residual após cinco ciclos de utilização das células para a reação de hidrólise de inulina.

Outros sistemas enzimáticos foram também imobilizados utilizando alginato de sódio como suporte. Como exemplo pode-se citar o trabalho de LU *et al.* (2013), os quais imobilizaram células de *W. anomala* XS1 em alginato de cálcio, as quais foram utilizadas para purificação de frutooligossacarídeos. SILVA *et al.* (2008) imobilizaram enzimas amilase de malte de milho por oclusão em alginato de sódio utilizando metodologia de planejamento de experimentos para otimização do processo. Os melhores resultados foram obtidos quando as soluções de malte de milho foram imobilizadas utilizando duas faixas de concentração, uma entre 3,7 - 5 g/L e outra entre 15 - 16,2 g/L, com pH entre 4,8 e 6,6, utilizando 4 % (m/v) de alginato de sódio. DAY *et al.* (2003) atingiram um rendimento de cerca de 75 % na imobilização de α -

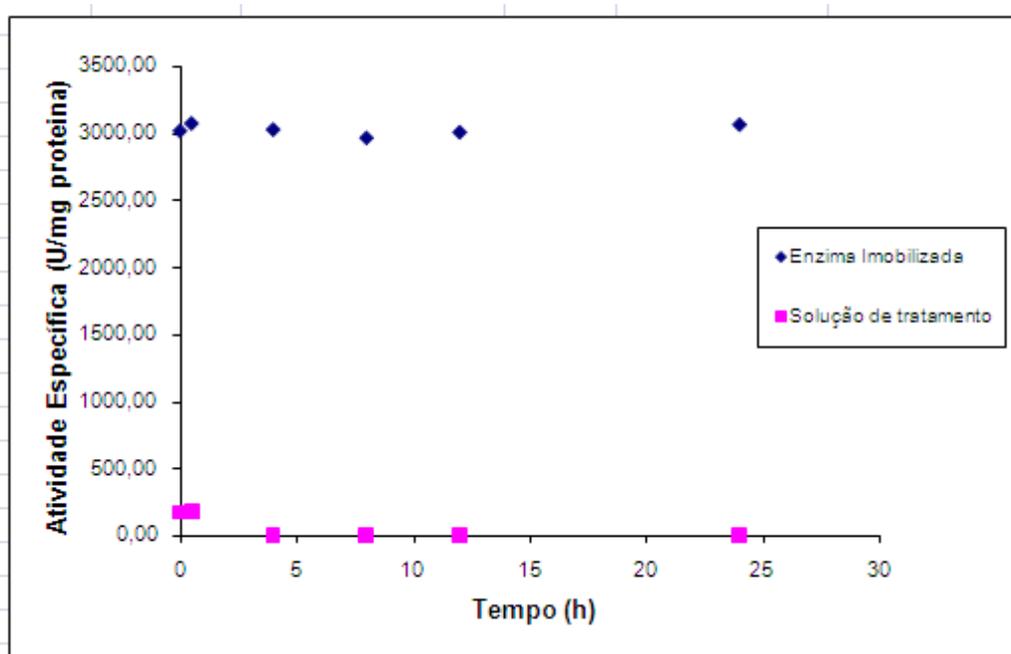
amilase de uma linhagem de *Bacillus circulans* GRS313 utilizando alginato de sódio como suporte.

1.4.3 Estudo da eficiência do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

A avaliação da eficiência do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi realizada a partir dos resultados obtidos na condução do planejamento de experimentos. O estudo foi realizado no tempo de 24 horas de tratamento da enzima imobilizada em geladeira. A condição experimental utilizada foi a otimizada no primeiro planejamento, o ensaio 1, o qual apresentou a maior atividade específica (2.063,5 U/mg de proteína). Foram medidas as atividades enzimática e específica da enzima imobilizada ao longo do período de armazenamento (24 horas) em geladeira. A enzima foi mantida, durante este período em solução tampão acetato 0,1 M (pH 4,8) e cloreto de cálcio 0,02 M. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 0,5, 4, 8, 12 e 24 horas. A Figura 6 apresenta o comportamento da atividade específica ao longo das 24 horas, medida na enzima imobilizada e na solução que a continha.

A partir da Figura 6 pode-se observar para a enzima imobilizada uma atividade específica inicial de 3.020,9 U/mg de proteína, permanecendo constante até 24 horas, apresentando atividade específica final de 3.067,9 U/mg de proteína. Para a solução de tratamento da enzima, pode-se verificar valores insignificantes de atividade específica nos tempos de 0 e 0,5 horas, zerando a partir de 4 horas em tratamento na geladeira. A observação da figura permite verificar que toda a enzima livre foi imobilizada no suporte proposto após um tempo de 24 horas de tratamento em geladeira, confirmando que a metodologia empregada foi eficiente no processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, conduzindo a rendimentos de imobilização da ordem de 100%.

Figura 6 – Eficiência do processo de imobilização – atividade específica da enzima imobilizada e da solução de tratamento da enzima.



PAULA (2007) estudou a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em diferentes suportes e obteve eficiência de imobilização de 2,25 % utilizando carvão ativado como suporte, 3,0 % utilizando carvão ativado tratado com etanol, 16,9 % com o suporte de sílica de porosidade controlada e caldo de imobilização parcialmente purificado, e 82,6 % de eficiência de imobilização utilizando gelatina. Utilizando diferentes estratégias de imobilização em suportes orgânicos quitosana e agarose, com diferentes protocolos de ativação, VIEIRA (2009) estudou a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* e obteve rendimento de imobilização de 100% por adsorção iônica da enzima em MANAE-Agarose, com drástica redução da atividade hidrolítica do derivado após o entrecruzamento com polialdeído dextrana e glutaraldeído. O mesmo autor estudou a imobilização da β -galactosidase por ligação covalente em quitosana coagulada e obteve maior atividade catalítica em solução de KOH 0,5 M a 50 °C e ativado com glutaraldeído 0,8 % (v/v), com atividade recuperada e rendimento de imobilização de 100 %.

1.4.4 Caracterização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada

Conforme mencionado na revisão bibliográfica, existem dois grandes problemas associados à aplicação industrial de inulinases para produção de frutose: (i) a inulina tem uma solubilidade limitada à temperatura de armazenamento, e (ii) há uma grande chance de contaminação microbiana na temperatura de armazenamento. Porém, o processo industrial para produção de frutose e frutooligossacarídeos é realizado em torno de 60 °C. A maioria das inulinases perde a atividade depois de poucas horas a esta temperatura e conseqüentemente é preciso o reabastecimento da enzima, aumentando assim o custo de produção. No entanto, há um crescente interesse na produção e caracterização de inulinases termoestáveis (GILL *et al.*, 2006).

Deste modo, o conhecimento de temperatura e influência de pH na atividade de enzima é importante para determinação de taxas de reação ótimas. Temperatura alta e pH baixo podem diminuir o risco de contaminação, melhorando a solubilidade de alguns substratos, e podem também reduzir a formação de cor em alguns xaropes (VANDAMME e DERYCKE, 1983).

1.4.4.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

Para o estudo do efeito da temperatura e pH na atividade enzimática realizou-se um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR), com 4 pontos axiais e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi de 10 minutos e as faixas de pH (com adição de 2 % de sacarose) e temperatura estudadas são apresentadas na Tabela 8.

Neste estudo, a condição utilizada na imobilização do extrato bruto foi a condição otimizada no primeiro planejamento, o ensaio 1, o qual apresentou maior atividade específica.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8, o qual mostra que a maior atividade específica ocorreu no ensaio 5, com pH 4,5 e temperatura de 55 °C (1.531,7 U/mg de proteína), seguida pelos ensaios 8 e 3, respectivamente, com pH 5,0 e 4,6 e temperatura de 70 e 65,6 °C.

Tabela 8 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2², (valores codificados e reais) com as respostas em termos de atividade enzimática, teor de proteína e atividade específica da inulinase imobilizada.

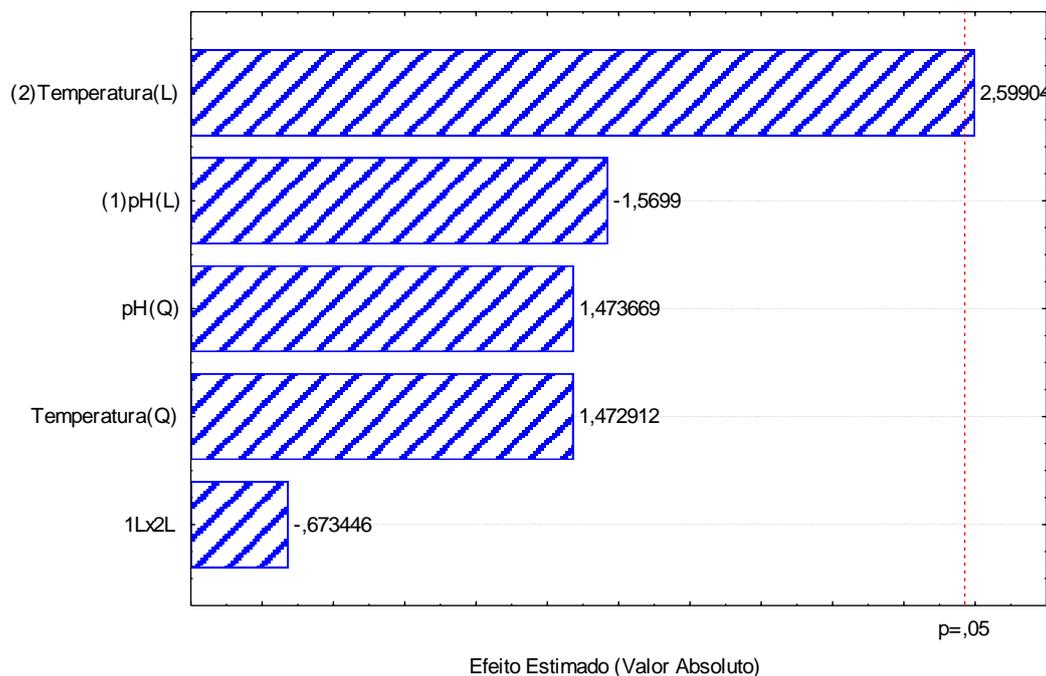
Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade de inulinase (U/mL)	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (U/mg proteína)
1	4,6 (-1)	44,4 (-1)	44,2	0,0664	666,0
2	5,4 (1)	44,4 (-1)	55,9	0,0664	843,1
3	4,6 (-1)	65,6 (+1)	78,5	0,0664	1182,2
4	5,4 (1)	65,6 (+1)	69,6	0,0664	1048,6
5	4,5 (-1,41)	55,0 (0)	101,7	0,0664	1531,7
6	5,5 (+1,41)	55,0 (0)	51,4	0,0664	775,5
7	5,0 (0)	40 (-1,41)	53,7	0,0664	809,0
8	5,0 (0)	70 (+1,41)	99,4	0,0664	1497,9
9	5,0 (0)	55,0 (0)	52,7	0,0664	794,6
10	5,0 (0)	55,0 (0)	46,2	0,0664	695,9
11	5,0 (0)	55,0 (0)	51,7	0,0664	779,6
Extrato bruto	4,8	50	17,00	0,4299	39,5
Inulinase imobilizada	4,8	50	67,83	0,0664	1021,6

Os resultados obtidos no planejamento experimental foram estatisticamente analisados, e não foi possível a validação de um modelo empírico que descrevesse a atividade da inulinase *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada em função das variáveis independentes estudadas. O gráfico de Pareto com o efeito das variáveis pH e temperatura é apresentado na Figura 7.

Através da Figura 7 verifica-se que a temperatura apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$), mostrando que uma maior temperatura poderia resultar em uma maior atividade específica para a enzima inulinase imobilizada.

O efeito do pH sobre a atividade da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* imobilizada em gelatina foi avaliado por PAULA *et al.* (2008), na faixa de 2,5-8,0, onde um ótimo de atividade enzimática foi encontrado a pH 3,5.

Figura 7 – Gráfico de Pareto do efeito da temperatura e pH na atividade da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada.



Os mesmos autores avaliaram o efeito da temperatura na atividade da inulinase imobilizada e obtiveram maior atividade a 60 °C. ETTALIBI e BARATTI (2001) obtiveram valor de pH ótimo de 5,0 para a atividade da inulinase imobilizada de *A. ficuum* em vidro poroso. WENLING *et al.* (1999) encontraram um pH ótimo de 5,0, na temperatura de 50 °C, na atividade da enzima imobilizada de *Kluyveromyces* sp. Y-85. CATANA *et al.* (2005) obtiveram temperatura ótima de 60 °C para a inulinase comercial Fructozyme L imobilizada em alginato de cálcio. ROCHA *et al.* (2006) encontraram atividade máxima da inulinase imobilizada de *A. niger* a uma temperatura de 50 °C.

1.4.4.2 Estabilidade térmica da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada

A viabilidade dos processos de biotransformação é largamente dependente da manutenção da atividade do biocatalisador em função do tempo. A desativação térmica do biocatalisador é uma das principais causas do decaimento da atividade, deste modo, a avaliação da estabilidade térmica do biocatalisador é uma questão fundamental para a efetiva caracterização de

um sistema de bioconversão (CATANA *et al.*, 2007).

A seguir são apresentados os comportamentos de estabilidade da inulinase imobilizada, as quais foram testadas com as enzimas mantidas na solução de tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 e cloreto de cálcio 0,02 M. Amostras de enzimas imobilizadas foram retiradas em determinados intervalos de tempo para determinação da atividade enzimática e do teor de proteína. Os resultados possibilitaram o cálculo da atividade específica.

Nas Tabelas 9, 10, 11, 12, 13 e 14 são apresentados os valores de atividade específica da enzima imobilizada em função do tempo nas temperaturas de geladeira (5 °C), temperatura ambiente (25 °C) e estabilidade térmica a 40, 50, 60 e 70 °C , respectivamente.

Tabela 9 – Estabilidade da inulinase imobilizada a 5 °C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	165,1	0,1861	887,2
2	128,8	0,1860	692,8
4	109,0	0,1666	654,2
6	110,6	0,1634	677,2
12	111,9	0,1486	753,5
24	125,6	0,1912	656,9
36	193,2	0,2034	950,0
48	190,9	0,2011	949,8
72	187,4	0,2000	937,3
96	162,7	0,1968	826,9
144	135,4	0,1756	771,1
192	161,8	0,1981	817,2
360	173,0	0,2154	803,4
528	148,5	0,2475	600,4
696	134,3	0,1630	823,8
1032	162,6	0,1865	872,2
1368	181,0	0,2243	806,8
1824	151,0	0,1972	766,1
2544	155,6	0,1739	894,9
3264	130,3	0,1095	796,2
4704	179,4	0,1949	920,6
9744	140,4	0,1405	999,4
Extrato Bruto	34,9	0,4413	79,1

Tabela 10 – Estabilidade da inulinase imobilizada a 25 °C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	139,5	0,0859	1625,6
2	136,1	0,0984	1383,1
4	163,9	0,1059	1549,2
6	168,7	0,1086	1554,3
12	157,8	0,1057	1493,2
24	136,6	0,1078	1267,8
36	146,3	0,1016	1441,2
48	131,2	0,0953	1376,8
72	158,6	0,1155	1374,0
96	160,1	0,1177	1361,1
144	150,9	0,1146	1317,8
192	151,1	0,0871	1734,8
360	145,9	0,1194	1222,4
528	132,4	0,1073	1234,2
696	167,1	0,1355	1233,3
1032	154,8	0,1258	1231,2
1368	173,5	0,1210	1434,5
1824	148,2	0,1423	1041,7
2544	151,4	0,1318	1148,6
3264	132,9	0,1419	936,6
4704	151,3	0,1603	943,8
9744	178,8	0,1460	1225,4
Extrato Bruto	30,0	0,3264	91,9

Tabela 11 – Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 40 °C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	125,6	0,1565	802,9
2	168,0	0,1726	973,7
4	147,1	0,1585	928,7
6	142,5	0,1446	986,3
12	150,5	0,1617	930,7
24	152,6	0,1546	987,7
36	158,1	0,1707	926,4
48	155,1	0,1779	872,5
72	160,5	0,2079	772,2
96	156,0	0,2053	759,9
144	153,3	0,2229	688,0
192	151,9	0,1942	782,6
360	152,9	0,2058	743,0
528	175,6	0,2764	635,3
696	184,8	0,2395	771,7
1032	190,6	0,2290	832,5
Extrato Bruto	24,6	0,3296	74,7

Tabela 12 – Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 50 °C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	191,0	0,1686	1133,4
2	146,2	0,1444	1013,1
4	106,7	0,1291	826,7
6	112,1	0,1579	710,3
12	115,3	0,1547	745,6
24	99,3	0,1098	904,8
36	99,2	0,0849	1169,6
48	111,0	0,1136	978,0
72	92,7	0,1136	816,4
96	95,8	0,1051	912,2
144	97,9	0,1274	768,6
192	82,9	0,1116	743,6
360	115,7	0,1292	895,8
528	129,8	0,1463	887,3
696	132,4	0,1140	1161,5
1032	154,4	0,1379	1120,4
Extrato Bruto	44,4	0,4959	109,6

Tabela 13– Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 60 °C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	131,1	0,1112	1179,2
2	194,5	0,1312	1483,0
3	100,7	0,1152	874,5
4	107,7	0,0925	1164,5
5	116,2	0,1202	967,0
6	111,7	0,1674	667,5
12	109,5	0,1569	698,2
24	105,6	0,1254	842,0
36	120,7	0,1557	775,3
48	101,9	0,1863	547,2
72	101,0	0,1866	541,5
144	95,8	0,1823	525,7
216	90,3	0,0928	973,9
312	116,4	0,1142	1019,2
384	136,2	0,1379	988,1
Extrato Bruto	33,3	0,2105	158,3

Tabela 14– Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 70 °C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	171,7	0,1321	1300,2
2	57,4	0,0969	593,5
3	44,4	0,1541	288,7
4	47,9	0,1267	378,5
5	44,0	0,0868	507,3
6	47,2	0,1412	334,5
12	45,4	0,1726	263,5
24	45,5	0,2310	197,3
36	44,0	0,1853	237,8
48	39,6	0,1293	306,7
72	42,7	0,1442	296,7
Extrato Bruto	61,6	0,2976	207,2

Observa-se um aumento da atividade da enzima imobilizada em relação ao extrato bruto. Em termos de estabilidade, os ensaios conduzidos entre 5 e 60 °C mantiveram suas atividades estáveis, com valores similares aos iniciais,

durante todo o experimento. A diferença observada em relação ao tempo de estabilidade avaliado deve-se ao fato de ocorrer a degradação do suporte durante o armazenamento, a qual é mais pronunciada nas maiores temperaturas. Para o ensaio conduzido a 70 °C, diferente das demais temperaturas avaliadas, observa-se uma maior perda de atividade nas primeiras horas de armazenamento, reduzindo para menos de 30 % em relação a inicial com 3 horas de armazenamento.

A estabilidade térmica da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* imobilizada em gelatina foi avaliada por PAULA *et al.* (2008), nas temperaturas de 45, 50 e 55 °C, as quais apresentaram, após 24 horas de reação, atividades residuais de 78,0, 79,1 e 60,4 %, respectivamente. BARRANCO-FLORIDO (2001) estudou um sistema de imobilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando como suporte alginato de bário tratado com glutaraldeído, onde a enzima imobilizada foi termoestável em temperaturas entre 45 e 65 °C. BAJPAI e MARGARITIS (1987) relataram estabilidade da atividade enzimática de células imobilizadas de *K. marxianus* nas temperaturas de 50 a 60 °C. O efeito da estabilidade térmica da inulinase imobilizada de *Kluyveromyces* sp. Y-85, em diferentes temperaturas por 24 horas foi relatada por WENLING *et al.* (1999), onde a enzima imobilizada manteve 95 % de sua atividade original a 50 °C.

1.5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

1.5.1 Conclusões

Este trabalho teve como objetivo geral investigar, conforme apresentado anteriormente, um processo para otimização da imobilização da inulinase *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em carvão ativado e alginato de sódio.

A metodologia empregada de imobilização se mostrou eficaz, pois aumentou a atividade específica da inulinase.

O presente trabalho permitiu avaliar a influência da concentração de alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado na imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, podendo-se concluir que:

- A condição otimizada para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, o qual apresentou a maior atividade específica (2063,52 U/mg de proteína) foi de 2 % de alginato de sódio (m/v), 5 % de glutaraldeído (v/v) e 3 % de carvão ativado (m/v).

- No estudo cinético da eficiência do processo de imobilização da inulinase pode ser verificado que toda a enzima livre foi imobilizada no suporte proposto após um tempo de 24 horas de tratamento em geladeira, confirmando que a metodologia foi eficiente no processo de imobilização, conduzindo a rendimentos de imobilização da ordem de 100 %.

- Na avaliação do efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática a maior atividade específica foi alcançada com pH 4,5 e temperatura de 55 °C (1531,71 U/mg de proteína).

- Na avaliação da estabilidade térmica da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada em carvão ativado e alginato de sódio observa-se uma diminuição da atividade para a amostra armazenada a 70 °C. A temperatura também apresentou um efeito negativo na estabilidade estrutural do suporte, proporcionando uma degradação do mesmo, a qual aumenta proporcionalmente com a temperatura na faixa entre 40 e 70 °C.

1.5.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar o efeito de outros suportes no processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571;
- Utilizar a inulinase imobilizada em reações de interesse;
- Avaliar o efeito de diferentes pré tratamentos na inulinase imobilizada, tais como ultrassom.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assis, S.A.; Fernandes, P.; Ferreira, B.S.; Cabral, J.M.S.; Faria Oliveira, O.M.M. Screening of supports for the immobilization of pectinmethylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Oxford, v.79, p.277-280, 2004.

Bajpai, P.; Margaritis, A. Characterization of molecular-sieve bound inulinase. *Journal of Fermentation Technology*, Osaka, v.65, p. 239-242, 1987.

Barranco-Florido, E.; García-Garibay, M.; Gómez-Ruiz, L.; Azaola, A. Immobilization system of *Kluyeromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. *Process Biochemistry*, p. 513-519, 2001.

Betancor L.; Lopez-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; M.; Dellamora-Ortiz Cezar Mateo, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p. 877-882, 2006.

Bradford, M. *Analytical Biochemistry*. v.72, p. 248-254, 1976.

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

Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, p.146-156, 2004.

Catana, R.; Ferreira, B.S.; Cabral, J.M.S.; Fernandes, P. Immobilization of inulinase for sucrose hidrolisis. *Food Chemistry*, v. 91, p. 517-520, 2005.

Catana, R.; Eloy, M.; Rocha, J.R.; Ferreira, B.S.; Cabral, J.M.S.; Fernandes, P. Stability evaluation of a immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, v.101, p.260-266, 2007.

Coghetto, C.C.; Scherer, R.P.; Silva, M.F.; Golunski, S. Pergher, S. B.C.; Oliveira, D.; Oliveira, J.V.; Treichel, H. Natural montmorillonite as support for the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.1, p.284-289, 2012.

Contiero, J. Inulinases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. In: *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 381-398, 2004.

Coutinho Filho, U. Contribuição ao Estudo de Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 1996.

Dalla-Vechia, R.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. Aplicações de Lipases Imobilizadas em Polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

Day, G; Singh, B; Banerjee, R. Immobilization of α -Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, p. 167-177, 2003.

Erginer, R.; Toppare, L.; Alkan, S.; Bakir, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. *Reactive & Functional Polymers*, v.45, p. 227-233, 2000.

Ettalibi, M.; Baratti, J. C., Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 596-601, 2001.

Fernandes, K.F.; Lima, C.S.; Lopes, F.M. Técnicas de imobilização de Enzimas. Revista Processos Químicos, p; 53-58, 2010.

Gaspari, J. W.; Gomes, L.H.; Tavares, F. C.A.; Imobilização da inulinase de *Kulyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. Scientia Agrícola, v.56, n.4, p.1135-1140, 1999.

Gill, P.K.; Manhas, R.K.; Singh, P. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. Journal of Food Engineering, v.76, p. 369-375, 2006.

Girelli, A.M.; Mattei, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. Journal of Chromatography B, p. 3-16, 2005.

Guío, F., Rodríguez, M.A., Alméciga-Díaz, C.J., Sánchez, O.F., Recent trends in fructooligosaccharides production. Recent Pat.Food.Nutr. Agric. v. 1, 221–230, 2009.

Gürsel, A.; Alkan, S.; Toppare, L.; Yaggcl, Y. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. Reactive & Funcional Polymers, v. 57, p. 57-65, 2003.

Haider, T.; Husain, Q. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. International Dairy Journal, v.19, p. 172-177, 2009.

Kochhar, A.; Kaur, N.; Gupta, A.K. Inulinase from *Aspergillus versicolor*. A potent enzyme for producing fructose from inulin. Journal of Scientific and Industrial Research, v.56, p.721-726, 1998.

Kuhn, G. O.; Coghetto, C.; Treichel, H.; Oliveira, D.; Oliveira, J. V. Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite. *Journal of Process Biochemistry*, v. 46, p. 2286-2290, 2011.

Kushi, R.T.; Hojo, O.; Trevisan, H.C.; Monti, R.; Carvalho, A.; Contiero, J. Estudo da Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, São Carlos. *Anais XI SINAFERM*, p. 309, 1996.

Ladero, M.; Santos, A.; Garcia, L. J.; Carrascosa, V.A. Pessela, C. C. B.; Garcia-Ochoa. Studies on the activity and the stability of β -Galactosidases from *Thermus* sp. Strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 392-405, 2002.

Lu, L.; Wu, J.; Song, D.; Zhao, H.; Gu, G.; Guo, Y.; Lan, J.; Xiao, M. Purification of fructooligosaccharides by immobilized yeast cells and identification of ethyl β -D-fructofuranoside as a novel glycoside formed during the process. *Journal of Bioresource Technology*, v. 132, p. 365-369, 2013.

Manzoni, M.; Cavazzoni, V. Hidrólise de Topinambur (Jerusalem Artichoke) Fructans by Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v.54, p. 311-315, 1992.

Mariotti, P. M. Hidrólise de lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

Mateo, C.; Pessela, C.C.B.; Fuentes, M.; Torres, R.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, M.J. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde-dextran. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Second edition, p. 129-136, 2006.

Maugeri F.; Hernalsteens S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. *Journal Mol. Catal B: Enzym.* v.9, p. 49-43, 2007.

Mazutti, M. A.; Zabet, G.; Boni, G.; Skovronski, A.; Oliveira, D.; Luccio, M. DI.; Rodrigues, M. I.; Treichel, H.; Maugeri, F., Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *J Chem Technol Biotechnol*, v.85, p.109-114, 2010.

Mazutti, M.; Bender, J. P.; DI Luccio, M.; Treichel, H., Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugar cane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 56-59, 2006.

Mazutti, M.; Ceni G.; DI Luccio, M.; Treichel, H., Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess Biosyst Engeneering*, v. 30, p. 297-304, 2007.

Medeiros, J.; Kalil, S.J.; Costa, F.; Nakashima, E.B.; Cabral, A.S.; Zavickis, F.P.; Silva, J.A.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Estudo da Influência da Concentração de Substrato, pH e Temperatura na Determinação da Atividade Enzimática da Inulinase, Florianópolis. *Anais ENPROMER*, p.350-351, 1999.

Miller, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-429, 1959.

Mussatto, S. I.; Mancilha, I.M. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, p. 587-597, 2007.

Paiva, A.L.; Balcão, V. M.; Malcata, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microbiol. Technol.* v. 27, p. 187-204, 2000.

Pandey, A. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p.81-84, 2003.

Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R.; Nigam, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzyme. *Current Science*, v.77, p.149-162, 1999.

Paula, A. V.; Barbosa, C. S.; Castro, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Química Nova*, v. 28, p. 792-796, 2005.

Paula, F. C. Imobilização da Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045: Caracterização e Produção de Açúcar Invertido em Biorretor. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2007.

Paula F.C.; Cazetta, M. L.; Monti, R.; Contiero, J. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Food Chemistry*, v.111, p. 691-695, 2008.

Perrin, S.; Warchol, M.; Grill J. P.; Schneider, F. Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batchculture in semi-synthetic medium. *Br Journal Nutr.* v..87, p.247–53, 2005.

Ribeiro, E. J. Estudo Cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), 1989.

Risso, F. V. A. Síntese de oligossacarídeos em meio orgânico e aquoso utilizando-se inulinase livre e imobilizada produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 E NRRL Y-7571. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

Risso F. V.; Mazutti M. A.; Treichel, H.; Costa, F.; Maugeri Filho, F.; Rodrigues M. I.; Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in an organic medium. Braz. Journal Chem. Eng. v. 27, p. 507–516, 2010.

Risso, F.V.A.; Mazutti, M.A.; Treichel, H.; Costa, F.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Effect of Organic Solvent on the Characteristics of Free and Immobilized Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. Food. Technol. Biotechnol. v. 48, p. 143-150, 2010.

Rocha, J.R.; Catana, R.; Ferreira, B.S.; Cabral, J.M.S.; Fernandes, P. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food Chemistry, v. 95, p.77-82, 2006.

Rosevear, A.; Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S. Immobilized enzymes and cells. Bristol, Adam Hilger, 1987.

Said, S.; Pietro, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 1-9, 2004.

Scherer, R.P. Estudo da imobilização de lipase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Ciências Agrárias, 2010.

Segel, I. H. Bioquímica, Teoria e Problemas. Traduzido Grassiano D. M. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora, 1979.

Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

Silva, R.L.F.O.B.; Souza, R.R.; Santana, J.C.C.; Tambourgi, E.B. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 642-648, 2008.

Silva, M.F.; Rigo, D.; Mossi, V.; Golunski, S.; Kuhn, G. O.; Di Luccio, M.; Dallago, R.; Oliveira, D.; Oliveira, J.V.; Treichel, H. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic medium. *Journal Food Chemistry*, v. 138, p.148-153, 2013.

Silva-Santisteban, B.O.Y.; Maugeri, F. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb. Technol.* V. 36, p.717–724, 2005.

Treichel, H.; Oliveira, D.; Lerin, L.; Astolfi, V.; Mazutti, M.A.; Di Luccio, M.; Oliveira, J.V. A review on the production and partial characterization of microbial inulinases. *Global Journal of Biochemistry*, 2011.

Vandame, E.; Derycke, D. Microbial inulinases: Fermentation process, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, San Diego, v. 29, p.139-176, 1983.

Vanková, K.; Polakovic, M. Optimization of single-column chromatographic separation of fructooligosaccharides. *Journal of Process Biochemistry*, v. 45, p.1325-1329, 2010.

Verachtert, H.; De Mot, R. Yeast: biotechnology and biocatalysis. New York: Marcel Decker, Inc, p. 257-296, 1990.

Vicente, A.A. Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica. 2000. 224 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

Vieira, D.C. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, 2009.

Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Haas, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.9, p.113-148, 2000.

Vitolo, M.; Imobilização de Enzimas. IN: Lima, U.A.;Aquarone, E.;Brozani, W.;Schimidell, W.; *Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, SP: Edgard Blücher Ltda, v.3, p. 391-403, 2001.

Wenling, W.; Huiying, W.W.L.; Shiyuan, W. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. *Process Biochemistry*, v. 34, p.643-646, 1999.

Yewale, T.; Singhal, R.S.; Vaidya, A. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Journal of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, p.96-101, 2013.

Yun, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p.107-117, 1996.

Yun, J. W.; Park, J.P.; Song, J.P.; Lee, C.Y.; Kim, J.H.; Song, S.K. Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilized endoinulinase. *Bioprocess Engineering*, New York, v. 22, p. 189-194, 2000.

Zanin, G. M.; Moraes, F. F. Enzimas imobilizadas in: *Enzimas como agentes biotecnológicos*, Said, S. & Pietro, R. C. L. R., Ed. Legis Summa. 2004.

O desenvolvimento desta etapa do trabalho permitiu a publicação do artigo intitulado “Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads”, de autoria de Aline Richetti, Cristiane Brancher Munaretto, Lindomar Alberto Lerin, Luciane Batistella, J. Vladimir Oliveira, Rogério Marcos Dallago, Viviane Astolfi, Marco Di Luccio, Márcio A. Mazzutti, Débora de Oliveira e Helen Treichel no periódico *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012. O artigo completo publicado encontra-se em Anexo III.

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO

2.1 OBJETIVOS

Esta etapa do trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método para análise de frutooligossacarídeos, os quais podem ser sintetizados utilizando enzimas microbianas imobilizadas, empregando para a quantificação a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector por Índice de Refração (CLAE-IR).

Como objetivos específicos pode-se citar:

- ✓ Análise dos efeitos da temperatura da coluna e do detector em relação à análise cromatográfica através de um planejamento fatorial completo.
- ✓ Validação do procedimento analítico avaliando limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), curva analítica e linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez.
- ✓ Avaliação do efeito da matriz.
- ✓ Aplicação do método na quantificação de frutooligossacarídeos em uma reação em sistema orgânico.

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à frutooligossacarídeos (FOS), sua produção, propriedades funcionais, aplicações e métodos analíticos utilizados para sua quantificação. Também será apresentada uma revisão sobre a validação de métodos analíticos, objeto do presente estudo.

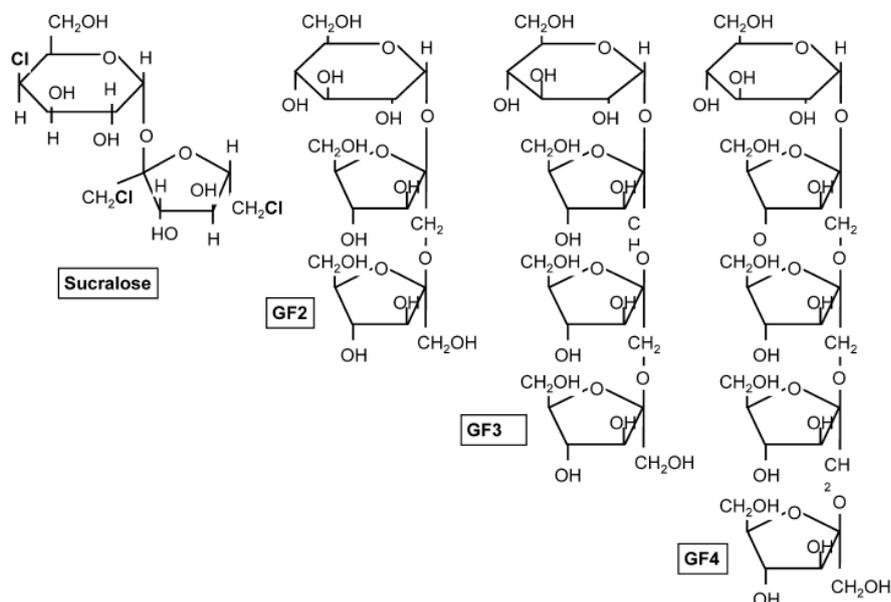
2.2.1 Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos são uma importante classe de moléculas de hidratos de carbono (oligossacarídeos), de ocorrência natural, presentes em uma grande variedade de espécies de plantas economicamente importantes, como alcachofra, aspargo, beterraba, cana-de-açúcar, chicória, banana, alho, cebola e trigo (HARRISON *et al.*, 2009; HARTEMINK, 1997, PASSOS e PARK, 2003).

São considerados açúcares não convencionais e sua crescente utilização na indústria de alimentos deve-se as suas excelentes características funcionais, além de seus aspectos fisiológicos e físicos. São sacarídeos que contribuem para a proliferação de bifidobactérias (não patogênicas), uma vez que alcançam o intestino grosso sem sofrer processos de digestão enzimática (SPIEGEL *et al.*, 1994).

Representam uma das maiores classe de oligossacarídeos bifidogênicos em termos de volume de produção. São compostos por uma molécula de sacarose com uma, duas ou três unidades de frutose unidas mediante ligações β -(1-2) a molécula de sacarose. O grau de polimerização pode variar de 2 a 10 unidades, resultando principalmente nos compostos kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutossilnistose (GF₄) (Figura 8) (EGEA, 2010; FEINBERG *et al.*, 2009).

Figura 8 – Estrutura química da sacarose e dos frutooligossacarídeos: Kestose (GF₂); Nistose (GF₃) e Frutosilnistose (GF₄) – Fonte: FEIBERG *et al.*, 2009.



2.2.2 Produção de Frutooligossacarídeos

A produção, bem como a aplicação de frutooligossacarídeos de grau alimentício, tem aumentado rapidamente durante os últimos anos.

Os frutooligossacarídeos podem ser produzidos comercialmente empregando duas vias metabólicas de síntese que se diferenciam pelo substrato empregado, inulina ou sacarose. A partir da inulina, mediante sua hidrólise enzimática, obtêm-se unidades lineares de frutossil com ou sem uma unidade final de glicose. O grau de polimerização dos FOS obtidos por esta via varia entre 1 e 7 unidades de frutossil. No caso da sacarose, a reação enzimática de transfrutossilacção conduz à produção de FOS tanto de cadeias lineares como de cadeias ramificadas de oligossacarídeos, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades de frutossil (ROBERFROID, 1993; HIDAKA *et al.*, 1996; HARTEMINK *et al.*, 1997).

A transformação enzimática da sacarose pela β -frutofuronosidade ou inulinase é a principal fonte comercial para síntese de frutooligossacarídeos (RISSO *et al.*, 2012; NING *et al.*, 2010; VEGA e ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

As frutossil transferases (Ftses) são as enzimas responsáveis pela produção microbiana de FOS. Elas produzem FOS (GF_n) a partir da sacarose

(GF), formando inicialmente a kestose (GF₂), seguido da nistose (GF₃) e posteriormente, pela 1-frutossilnistose (ou 1-frutofuranosil nistose) (GF₄) (SANGEETHA *et al.*, 2005).

2.2.3 Características e aplicações de Frutooligossacarídeos

Os produtos alimentícios são designados pelo gosto, aparência, custo e aceitação do consumidor. O *design* do produto alimentício que confere benefícios à saúde é uma tendência relativamente nova. No entanto, a crescente aceitação do papel da dieta humana na prevenção e no tratamento de doenças, bem como no seu bem-estar tornou o conceito de formulação de alimentos em benefício da saúde uma tendência que está se tornando rapidamente popular. Esta mudança de atitude tem forçado organizações e indústrias envolvidas com formulações alimentares destinadas ao benefício da saúde, ao desenvolvimento de novos projetos e produtos (SANGEETHA *et al.*, 2005).

Neste contexto destacam-se os frutooligossacarídeos, cujas propriedades funcionais, como baixo valor calórico, sabor doce e propriedades fisiológicas, fazem destes compostos importantes ingredientes alimentares (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Atualmente, o principal interesse de seu emprego como ingredientes nos alimentos é devido às suas propriedades fisiológicas. São considerados prebióticos, ou seja, ingredientes alimentares não digeríveis, que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou mais bactérias no cólon, conferindo assim benefícios para a saúde e bem estar do hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995; LOSADA e OLLEROS, 2002; ROBERFROID *et al.*, 2010).

Eles representam um nutriente seletivo para microrganismos benéficos, potencializando a eficiência dos produtos probióticos, uma vez que promovem o crescimento/proliferação e estabilização de probióticos, como *Acidophiilus*, *Bifidus* e *Faecium*, bactérias benéficas ao trato gastrointestinal do hospedeiro. A incorporação de frutooligossacarídeos na dieta ou uma suplementação

intensificam a viabilidade e adesão dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal, mudando a composição de sua microbiota e promovendo a inibição de bactérias patogênicas (PASSOS e PARK, 2003; CHOQUE-DELGADO *et al.*, 2011).

Muitos produtos alimentares com frutooligossacarídeos têm chegado ao mercado, e são vendidos como alimentos prebióticos, capazes de afetar favoravelmente o metabolismo e a saúde do organismo, e são provavelmente as fibras prebióticas mais comumente usadas na produção de alimentos funcionais. Estudos recentes mostram que a inulina e frutooligossacarídeos exibem efeitos prebióticos (CORRADINI *et al.*, 2004; ROBERFROID *et al.*, 2010).

Seus baixos valores calóricos e sabor doce os tornam atrativos como uma nova alternativa de adoçantes. Apresentam de 0,3 a 0,6 vezes a doçura da sacarose. Seu poder adoçante é dependente da estrutura química e da massa molecular dos oligossacarídeos presentes no produto. O menor poder adoçante, em relação à sacarose, é favorável na produção de alimentos com matriz reduzida de doçura é desejável para evidenciar outros “flavours” (LAMSAL e FAUBION, 2009).

Como aplicações, os frutooligossacarídeos podem ser utilizados em formulações de sorvetes e sobremeses lácteas que contém no rótulo açúcar reduzido, sem adição de açúcar, calorias reduzidas, produto sem açúcar, etc., em formulações para diabéticos, em produtos funcionais que promovam efeito nutricional adicional nas áreas de prebióticos, simbióticos, fibras dietéticas, em iogurtes, promovendo efeito simbiótico (além do próprio efeito probiótico do iogurte), em biscoitos e produtos de panificação, substituindo carboidratos e gerando produtos de teor reduzido de açúcar. Também podem ser utilizados em produtos alimentares para animais (PASSOS e PARK, 2003; STRICKLING *et al.*, 2000).

2.2.4 Determinação de Frutooligossacarídeos

Para se avaliar a eficiência de um processo de produção, bem como a composição de um produto faz-se necessário o emprego de metodologias

analíticas confiáveis. Em relação aos frutooligossacarídeos diferentes metodologias de análise encontram-se disponíveis na literatura, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia Gasosa e a Cromatografia Líquida (CLAE) (TIAN e KARBOUNE, 2012; PARK *et al.*, 2001, TANRISEVEN e ASLAN, 2005, HAYASHI *et al.*, 2000).

Destes, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem se apresentado como uma das técnicas mais populares para análise de frutooligossacarídeos, pois permite uma análise rápida e precisa desses açúcares, sem a necessidade de etapas muito complexas de preparo de amostra.

Quando do emprego da CLAE como metodologia para a determinação de frutooligossacarídeos, destacam os detectores eletroquímicos (PAD) e por Índice de Refração (IR).

O detector eletroquímico foi empregado por SANTOS e MAUGERI (2007), para acompanhar a eficiência da síntese de frutooligossacarídeos utilizando a sacarose como substrato e a inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* (livre e imobilizada em alginato de sódio), como catalisador. RISSO *et al.* (2010), estudaram a síntese de frutooligossacarídeos através da sacarose utilizando inulinase livre de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em sistema aquoso e aquoso-orgânico. Os frutooligossacarídeos foram quantificados através do sistema CLAE-PAD (Dionex) com detector eletroquímico ED-40 e coluna CarboPac PA100.

A fim de determinar sacarose e frutooligossacarídeos em sucos de fruta, FEINBERG *et al.* (2009) estudaram a validação simultânea de dois procedimentos analíticos utilizando CLAE-PAD. A variação de frutooligossacarídeos em diferentes graus de polimerização em raízes de bardana armazenadas sob diferentes temperaturas foi avaliada por ISHIGURO *et al.* (2010), utilizando uma coluna de carboidratos PA1 com detector de amperimetria pulsada. KUHN e FILHO (2010) estudaram a separação de frutooligossacarídeos utilizando coluna de leito fixo com zeólitas, e os açúcares foram identificados e quantificados por CLAE-PAD.

Apesar de sua elevada sensibilidade, a especificidade associada ao elevado custo tornam o detector eletroquímico pouco atrativo, quando comparados a outros sistemas, no momento da aquisição de um equipamento cromatográfico.

Outros detectores, como o índice de refração, um detector universal de baixo custo e sensibilidade moderada, se apresenta como uma alternativa economicamente mais viável, principalmente quando se pretende acompanhar a eficiência de processos de síntese, onde os açúcares de interesse (FOS) encontram-se presentes em concentrações elevadas, normalmente em porcentagem.

Diversos relatos são apresentados na literatura utilizando CLAE-IR para determinação de frutooligossacarídeos. Entre eles podem ser citados o trabalho de VEGA e ZÚNIGA-HANSEN (2011), que estudaram a síntese de frutooligossacarídeos com alta concentração de kestose. As análises foram realizadas por CLAE-IR utilizando uma coluna BP-100 Ag+(USA), com temperaturas da coluna e do detector de 50 e 45 °C, respectivamente. MADLOVÁ *et al.* (2000) investigaram a biotransformação de sacarose em frutooligossacarídeos. A biotransformação foi acompanhada por CLAE-IR, utilizando como fase móvel água destilada a uma taxa de fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e temperaturas da coluna e do detector de 80 e 32 °C, respectivamente. SIRISANSANEEYAKUL *et al.* (2000) estudaram a produção enzimática de frutooligossacarídeos, que foram determinados utilizando uma coluna de carboidratos (Supelcosil LC-NH₂), a temperatura controlada a 30 °C, e uma fase móvel de acetronitrila:água (75:25 v/v), com uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. SHIN *et al.* (2004) utilizaram o sistema CLAE-IR, empregando uma coluna NH₂ (Kromasil 100-10), a 40 °C, e uma fase móvel acetronitrila:água (70:30 v/v), para analisar os frutooligossacarídeos produzidos por células de *Aureobasidium pullulans*, empregando melaço como substrato. HANG E WOODAMS (1996) otimizaram a produção enzimática de FOS analisando os mesmos por CLAE-IR, empregando uma coluna Bio-Rad HPX 87C a 85 °C, e como fase móvel água a uma taxa de fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

2.2.5 Validação de Método Analítico

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método é uma exigência na prática de análises químicas, e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir através de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados (EURACHEM, 1998; ANVISA, 2003).

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

O que se pode observar, contudo, é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. Para cada caso há a necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação (RIBANI *et al.*, 2004; VALENTINI *et al.*, 2007).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Vários autores definem validação de métodos e os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras (RIBANI *et al.*, 2004).

Assim, deve-se selecionar, estudar e monitorar constantemente os parâmetros mínimos necessários para garantir a interpretação inequívoca dos resultados. Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de

métodos analíticos são: Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), curva analítica e linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez. O efeito matriz também pode ser avaliado (PARDO, 2010).

2.2.5.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificado. Já limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis. Em ambos os casos o resultado é usualmente expresso como a concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003; VALENTINI, 2007).

O LD e o LQ podem ser estimados por diferentes meios: pelo método da relação sinal/ruído, do desvio padrão e por processos estatísticos. O método mais utilizado para técnicas analíticas em geral é o da relação sinal-ruído (RIBANI *et al.*, 2004).

A relação sinal-ruído somente pode ser utilizada em métodos que apresentem o ruído da linha de base. A concentração do analito que gere uma resposta do método três vezes superior ao ruído é considerada o LD. Já o LQ é considerado a concentração do analito que gere resposta dez vezes superior ao ruído do método (SHABIR, 2003).

2.2.5.2 Curva analítica e Linearidade

A linearidade de um método analítico é definida como a capacidade do método em fornecer resultados que são diretamente, ou por transformações matemáticas bem definidas, proporcionais à concentração do analito na amostra ao longo de uma faixa de interesse (CHANDRAN e SINGH, 2007).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios (área do sinal) em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

A linearidade é obtida pela padronização interna ou externa e formulada pela equação matemática usada para o cálculo da concentração do analito a

ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é: $y = ax + b$, onde y = resposta medida (área do pico); x = concentração; a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade; b = intersecção com o eixo y , quando $x = 0$ (INMETRO, 2007).

O coeficiente de correlação r permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um r maior que 0,99 é recomendado pela ANVISA e considerado como evidência de ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. O INMETRO recomenda um coeficiente de correlação com valor acima de 0,90 (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

2.2.5.3 Seletividade

A seletividade do método é uma das medidas que garantem a credibilidade das medidas na presença de interferentes, ou seja, é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (EURACHEM, 1998; ANVISA, 2003).

A cromatografia é um poderoso método de separação de compostos, mas não de identificação. A cromatografia apenas fornece dados auxiliares na identificação de compostos, por isso, em métodos cromatográficos, é preciso tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (SOARES, 2001; ANVISA, 2003).

É necessário estabelecer que o sinal produzido durante a análise, o qual foi atribuído ao analito, é realmente devido ao analito e não devido à presença de alguma substância química similar. Isso é a confirmação da identidade (EURACHEM, 1998).

2.2.5.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, e é expressa como desvio padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

A precisão pode ser considerada no nível de repetitividade e de precisão intermediária. Os parâmetros de validação são adequados conforme o uso do método a ser validado (BRITO, 2003).

A repetitividade é expressa à precisão nas mesmas condições de operação (mesmo equipamento, analista, reagentes e dia) em um pequeno intervalo de tempo. De acordo com a ANVISA ela pode ser verificada por, no mínimo nove (9) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três (3) diferentes concentrações com três (3) replicatas cada, ou com no mínimo seis (6) determinações para uma única concentração (a mais elevada da região linear da curva) teste.

A precisão intermediária do método está relacionada às variações dentro de um mesmo laboratório que envolve diferentes dias, diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos, entre outros. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, e como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois (2) dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

2.2.5.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico expressa a proximidade da concordância entre um valor tido como verdadeiro e o valor encontrado na análise. A *International Conference on the Harmonization* (ICH) e a ANVISA determinam que este parâmetro seja avaliado com um mínimo de nove determinações, envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração (baixa, média e alta) (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Este parâmetro é calculado pela porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, conforme Equação 2, ou como a diferença entre a média e o valor aceito como verdadeiro:

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{\text{Concentração experimental média}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

O estudo da exatidão pode ser realizado baseado em diferentes metodologias, entre elas o uso de ensaios de recuperação, o qual constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO *et al.*, 2003).

Em geral, para adição padrão, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz (RIBANI *et al.*, 2004).

O cálculo da exatidão por adição padrão deve considerar *a priori* a concentração da substância na amostra e relacionar sua respectiva área com as áreas resultantes da adição em diferentes níveis da substância na amostra. Assim, é possível encontrar os valores experimentais em termos de concentração dos diferentes níveis adicionados, e desta forma relacionar com a concentração teórica esperada (PARDO, 2010).

2.2.5.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ANVISA, 2003).

Alguns fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico em cromatografia líquida são a influência do pH da fase móvel, a variação da composição da fase móvel e a temperatura e o fluxo da fase móvel (ANVISA, 2003).

2.2.5.7 Efeito Matriz

Uma das competências de um laboratório para produzir dados confiáveis é demonstrada pela validação do método de ensaio. Um dos parâmetros de desempenho que deve ser avaliado cuidadosamente se refere ao efeito da matriz ou efeito da resposta cromatográfica acentuada induzida pela matriz (INMETRO, 2007).

A complexidade das amostras e o número de compostos que co-eluem com elas acabam gerando um problema durante a análise, denominado efeito matriz. Este efeito pode ser notado pela diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz (PRESTES, 2007).

O efeito da matriz pode gerar sérios problemas analíticos, devido à possível super estimação da concentração dos analitos (ZROSTLÌKOVÁ *et al.*, 2001).

Várias precauções podem ser utilizadas para eliminar o efeito matriz, entre elas, o uso de padrões preparados em extratos dos brancos é a opção mais comum utilizada pelos laboratórios pra resolver esse problema (DIAS, 2010).

De acordo com o exposto anteriormente, observa-se diversos estudos relacionados à produção de frutooligossacarídeos, os quais foram conduzidos empregando diferentes métodos analíticos. No entanto, não há estudos na literatura a respeito da validação de metodologia analítica por Cromatografia Líquida Acoplada ao Detector por Índice de Refração (CLAE-IR) para determinação dos mesmos em reações de interesse, o que justifica esta etapa do trabalho.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados nesta etapa do trabalho bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental, relacionados à validação do método analítico para determinação de frutooligossacarídeos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Índice de Refração.

2.3.1 Substâncias Químicas e Reagentes

2.3.1.1 Padrões químicos

Os padrões químicos Kestose (GF₂), Nistose (GF₃) e Frutosilnistose (GF₄) foram obtidos da Wako Pure Chemical Industries, Ltda.

2.3.1.2 Reagentes

Os solventes utilizados como fase móvel foram acetonitrila grau HPLC (Vetec e J.T. Baker) e a água ultra-pura. Para as reações em meio orgânico, foi utilizado como substrato sacarose (Vetec) e como solvente acetato de etila (Vetec).

2.3.1.3 Instrumentação

Foi empregado um cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series equipado com uma bomba quaternária, detector de índice de refração, coluna modelo Luna NH₂ 100A (250 x 4,6 mm, 5 µm - Phenomenex - USA), alça de amostragem de 5 uL, forno marca Agilent série DE43642125, com controle de temperatura até 60 °C. A fase móvel avaliada neste estudo foi uma mistura de acetonitrila e água.

2.3.2 Preparo da Solução Padrão

A solução padrão de Kestose, Nistose e Frutosilnistose foi preparada dissolvendo-se 50 mg de cada padrão na fase móvel, obtendo-se uma solução

estoque de 10.000 mg.L⁻¹. As soluções de trabalho utilizadas na otimização e validação do método foram obtidas a partir da solução estoque por meio de diluições sucessivas.

2.3.3 Validação do Método Analítico

Os parâmetros considerados na validação do método foram: limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), curva analítica e linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez. Também avaliou-se o efeito da matriz (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

2.3.3.1 Otimização das Condições Cromatográficas

Inicialmente foram avaliados os efeitos da temperatura da coluna e do detector em relação à análise cromatográfica.

Para tanto foi realizado um delineamento composto central 2². A Tabela 15 apresenta as faixas de temperatura estudadas e a resposta avaliada foi a intensidade/amplitude do ruído, o qual é empregado para o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), considerando a relação sinal/ruído de 3 e 10 vezes, respectivamente. Os resultados foram analisados utilizando *Statistica 6.0 Statsoft Inc.*

Tabela 15- Variáveis e níveis estudados no delineamento composto central 2² para otimização das condições cromatográficas.

Variáveis/Níveis	Temperatura coluna (°C)	Temperatura Detector (°C)
-1	20	25
0	30	35
1	40	45

Nesta etapa do estudo, com base em ensaios preliminares, a fase móvel utilizada foi uma mistura de acetronitrila:água (70:30), vazão da fase móvel 1 mL.min⁻¹ e volume de injeção 5 µL.

A partir dos resultados do planejamento experimental, as variáveis temperaturas da coluna e do detector foram fixadas para os próximos experimentos de validação.

2.3.3.2 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados segundo o método da relação sinal/ruído (s/n), que estabelece um $s/n \geq 3$ para o LD e $s/n \geq 9$ para o LQ.

2.3.3.3 Curva analítica e Linearidade

A curva analítica foi construída a partir do limite de quantificação do Frutossilnístose, o qual apresentou o maior LD, (100 mg.L^{-1}) até uma concentração de 5.000 mg.L^{-1} . Os níveis de concentração empregados para a construção da curva analítica foram de 100, 250, 500, 1.000, 2.500 e 5.000 mg.L^{-1} . A avaliação da linearidade do método analítico foi efetuada mediante a obtenção de três curvas autênticas. Foram considerados com boa linearidade curvas com valores para o coeficiente de correlação linear (r^2) $> 0,99$ (ANVISA, 2003).

2.3.3.4 Seletividade

O ensaio de especificidade foi realizado através de uma análise de uma solução contendo os padrões Kestose, Nístose e Frutossilnístose, o substrato sacarose, glicose e frutose, todos presentes em uma concentração de 1.000 mg.L^{-1} .

2.3.3.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi avaliada a partir de 6 determinações de uma concentração teórica (5.000 mg.L^{-1}), efetuadas no mesmo dia, executadas pelo mesmo analista, nas mesmas condições cromatográficas. A

precisão intermediária foi avaliada a partir da análise em triplicata de 3 concentrações, contemplando o intervalo linear do método, o qual foi realizado em dias diferentes, resultando em nove injeções para cada composto.

As respostas foram expressas através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR%), segundo a equação 3 (ANVISA, 2003):

$$DPR (\%) = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

DP = desvio padrão,

CMD = concentração média determinada.

2.3.3.6 Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado a partir de uma reação de síntese de frutooligossacarídeos, a qual, após a síntese, foi contaminada com quantidades conhecidas de kestose, nistose e frutossilnistose, empregadas posteriormente para o cálculo da quantidade de recuperação do método.

A reação de síntese empregada neste estudo foi realizada em *shaker* com agitação constante de 150 rpm, utilizando acetato de etila como solvente e sacarose como substrato. Após dissolução completa do substrato no solvente, a inulinase comercial *Aspergillus niger* foi adicionada. Após o término da reação (24 horas) o solvente foi evaporado em rotavapor e a amostra rediluída a 100 mL com água, os quais foram posteriormente divididos em quatro alíquotas de 25 mL. Destas, uma alíquota foi empregada como referência. As outras três foram contaminadas, a partir da solução padrão de 5.000 mg.L⁻¹, com quantidades conhecidas de FOS (500, 1.000 e 2.500 mg.L⁻¹). O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração, permitindo avaliar o percentual de recuperação com maior segurança.

2.3.3.7 Robustez

A robustez do método cromatográfico foi determinada através de análises da solução contendo sacarose, glicose, frutose e os padrões kestose, nistose e frutossilnistose, sobre diferentes condições. Os parâmetros avaliados foram mudanças do fluxo (0,8, 1,0 e 1,2 mL.min⁻¹) e da concentração da fase móvel acetonitrila:água (60:40, 70:30, 80:20). Os parâmetros tempo de retenção e área dos picos foram empregados como critério de análise.

2.3.3.8 Efeito Matriz

A avaliação do efeito matriz foi feita com base na comparação das inclinações das curvas analíticas dos FOS obtidas na fase móvel e no extrato branco da matriz (solvente). Para isso, foram preparadas soluções em seis (6) níveis de concentração no solvente e cinco (5) na matriz, sendo realizadas injeções em triplicata para cada nível de concentração. Como matriz foi empregada uma solução contendo frutose, glicose e sacarose na concentração de 5.000 mg.L⁻¹. A escolha desta matriz deve-se a aplicabilidade do método, o qual será utilizado para acompanhar a produção de FOS empregando sacarose como substrato. Na síntese, parte da sacarose é convertida previamente em frutose e glicose, ou seja, os três açúcares podem encontrar-se presentes como interferentes no meio reacional.

O cálculo para avaliação do efeito matriz foi feito utilizando a Equação 4 (CERQUEIRA *et al.*, 2011):

$$C (\%) = 100 \times 1 - \left(\frac{S_m}{S_s} \right) \quad (4)$$

Onde:

S_m e S_s correspondem às inclinações das curvas analíticas obtidas na matriz e na fase móvel, respectivamente.

2.3.4 Aplicação do método analítico

A aplicação do método analítico foi realizada através de uma reação de síntese de FOS utilizando acetato de etila e tampão acetato como solvente e sacarose como substrato. Após dissolução completa do substrato no solvente, a inulinase comercial *Aspergillus niger* imobilizada, conforme metodologia de RICHETTI *et al.* (2012), foi adicionada no meio reacional. Após o término da reação (24 horas) a inulinase foi filtrada, o solvente foi evaporado em rotavapor e a amostra rediluída a 100 mL com fase móvel e analisada em CLAE-IR, na condição otimizada.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo de validação do método analítico para determinação de frutooligossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando detector por Índice de Refração.

2.4.1 Otimização das condições cromatográficas: Efeito das temperaturas da coluna e do detector

Considerando que a temperatura é um parâmetro que pode interferir tanto na separação cromatográfica quanto na qualidade do sinal, inicialmente avaliou-se os efeitos da temperatura da coluna e do detector em relação à análise cromatográfica. Depois do tipo de fase estacionária, a temperatura da coluna é o fator que mais afeta a separação cromatográfica (COLLINS, 2006).

Em relação às temperaturas da coluna e do detector há diferentes condições descritas na literatura, variando entre 30 e 85 °C (VEGA e ZÚNIGA-HANSEN, 2011; MADLOVÁ *et al.* 2000; SIRISANSANEEYAKUL *et al.* 2000; HANG e WOODAMS, 1996).

Para este estudo, as regiões de temperatura para a coluna e para o detector foram estabelecidas com base na metodologia analítica apresentada por VEGA e ZÚNIGA-HANSEN (2011), que empregam temperaturas da coluna e do detector de 50 e 45° C, respectivamente. Nesta etapa, foi utilizada uma fase móvel de acetronitrila:água (70:30), fluxo da fase móvel 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 5 µL.

A Tabela 16 apresenta a matriz do planejamento, com os valores codificados e reais, e as respostas para o ruído e os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para a Kestose, Nistose e Frutossilnístose, respectivamente. Pode ser observado que foram obtidos diferentes limites de detecção e de quantificação em função dos níveis estudados neste planejamento experimental para cada variável independente avaliada.

Considerando que ambos os limites de detecção e quantificação para os três compostos em estudo foram calculados em função do ruído (expresso na tabela em nRIU), este foi empregado para análise estatística dos dados.

Tabela 16 – Matriz do planejamento 2² (valores codificados e reais) com as respostas em termos de ruído, limite de quantificação e limite de detecção para a Kestose (K), Nistose (N) e Frutossilnístose (F).

Ensaio	T	T	Ruído (nRIU)	LD (mg L ⁻¹)			LQ (mg L ⁻¹)		
	coluna (°C)	detector (°C)		K	N	F	K	N	F
1	20	25	30	19,9	24,7	30,8	59,8	74,2	92,5
2	20	45	190	117,7	149,9	189,9	353,1	449,7	569,8
3	40	25	45	24,6	31,8	37,5	73,9	95,5	112,5
4	40	45	75	38,7	48,0	57,9	116,2	144,1	173,8
5	30	35	55	31,2	40,4	46,3	93,7	121,1	139,0
6	30	35	60	34,1	44,0	50,5	102,2	132,1	151,6
7	30	35	58	32,9	42,6	48,9	98,8	127,7	146,6

Verifica-se que os menores valores para o ruído e, conseqüentemente para os LD e LQ, para os três compostos avaliados foram obtidos no ensaio 1 do planejamento experimental, o qual foi conduzido empregando temperaturas similares entre a coluna e o detector (20 e 25 °C, respectivamente). Esta tendência foi vinculada à proximidade da temperatura da coluna com a temperatura do detector, o qual minimiza alterações bruscas na temperatura da fase móvel, proporcionando uma condição de linha base mais estável e, conseqüentemente, tornando o ruído da linha base menor.

Os resultados obtidos no planejamento experimental foram estatisticamente analisados. Os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de t e p, obtidos a partir desta análise, são apresentados na Tabela 17.

Os resultados obtidos permitiram a obtenção de um modelo codificado otimizado para a intensidade/amplitude do ruído, em função da temperatura do detector, o qual está apresentado na Equação 5.

Para a validação do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 18.

Tabela 17 - Coeficientes de regressão para o intensidade/amplitude do ruído nos limites de detecção e quantificação na otimização das condições cromatográficas em CLAE/IR.

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(3)	P
Média	73,28	7,85	9,33	0,002600*
(1) T coluna	-25,00	10,38	-2,40	0,095186
(2) T detector	47,50	10,38	4,57	0,019596*
Interação 1 x 2	-32,50	10,38	-3,13	0,052049

* efeitos significativos a $p < 0,05$.

$$\text{Intensidade/amplitude do ruído (Limite de Detecção e Limite de Quantificação)}(mgL^{-1}) = 73,28 + 47,50.T \text{ Detector} \quad (5)$$

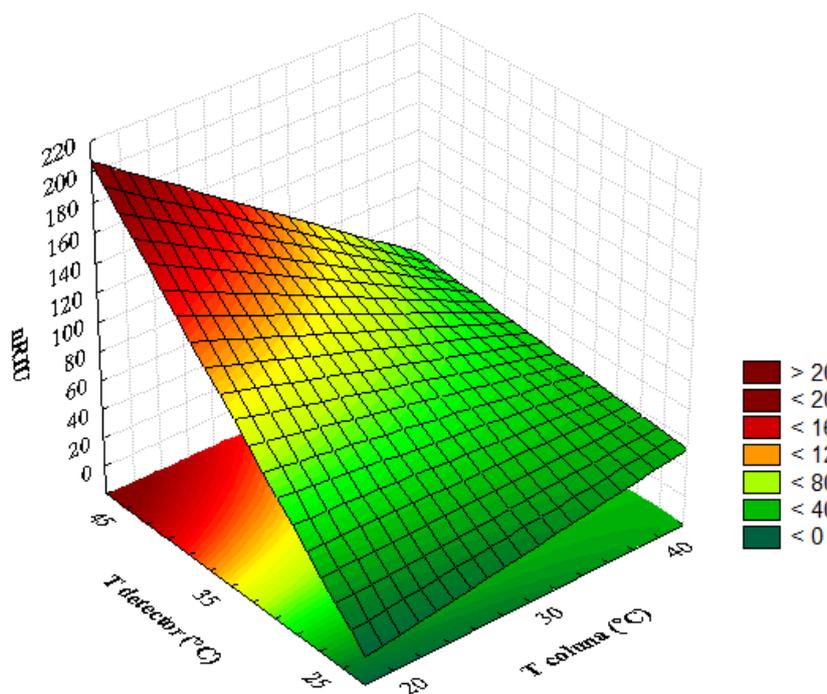
Tabela 18 - Análise de variância para a intensidade/amplitude do ruído dos limites de detecção e quantificação na otimização das condições cromatográficas em CLAE/IR.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	15750,00	3	5250	12,17
Residual	1293,43	3	431,14	
Total	17043,43	6		

$R = 0,96$; $F_{0,05, 3,3} = 9,28$.

Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,96) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validou estatisticamente o modelo ($p < 0,05$), permitindo a construção da superfície de resposta (Figura 9).

Figura 9- Superfície de resposta para a intensidade/amplitude do ruído (limites de detecção e quantificação) na otimização das condições cromatográficas em HPLC/IR em função da temperatura da coluna e do detector.



De acordo com a superfície de resposta, o efeito da temperatura da coluna somente é pronunciado para as maiores temperaturas do detector.

Através da Figura 9 pode ser visualizado que a temperatura do detector influenciou na intensidade/amplitude do ruído, sendo que uma menor temperatura do detector conduziu a menores valores do ruído, ou seja, as quantidades mínimas detectáveis pelo equipamento, melhorando assim a sensibilidade do método, permitindo a detecção de menores quantidades de frutooligossacarídeos. A temperatura da coluna não influenciou na intensidade/amplitude do ruído na faixa estudada.

Cabe destacar que para todas as condições ensaiadas observou-se uma excelente resolução dos frutooligossacarídeos, sem sobreposição de sinais, inclusive quando comparado a sacarose, comumente empregada como substrato, e frutose e glicose, precursores dos frutooligossacarídeos.

Com base nos resultados obtidos, as temperaturas de 20 e 25 °C para a coluna e detector, respectivamente, condição que apresentou o menor ruído, ou seja, menores limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), foram

selecionadas para os demais experimentos de validação da metodologia para quantificação de frutooligossacarídeos.

Os efeitos dos parâmetros de produção para a biotransformação de sacarose em frutooligossacarídeos utilizando cepa de *Aureobasidium pullulans*, através de um planejamento Placket-Burmann, foi estudado por SILVA *et al.* (2011). Os frutooligossacarídeos resultantes foram analisados em CLAE com uma coluna Lichrospher 100 NH₂, fase móvel acetonitrila:água (70:30), fluxo de 1 mL.min⁻¹ e temperatura de 26 °C. DOMINGUEZ *et al.* (2012) também utilizaram os mesmos microrganismos para produzir frutooligossacarídeos, e as análises foram realizadas em uma coluna de carboidratos ES (Alltech), fase móvel acetonitrila e 0,04% de hidróxido de amônio em água (70:30 v/v), a uma taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, com detector de índice de refração. NEMUKULA *et al.* (2009) estudaram a síntese de frutooligossacarídeos utilizando planejamento de experimentos, onde as concentrações dos frutooligossacarídeos produzidas foram quantificadas em CLAE-IR com uma coluna de carboidratos C¹⁸ e fase móvel 73 % (v/v) acetonitrila em água.

2.4.2 Curva analítica e Linearidade

Através da elaboração de curvas de calibração em triplicata (Anexo II), a linearidade do método foi determinada. A partir do método dos mínimos quadrados, com o auxílio do software Excel, foram obtidos a equação da reta da relação entre a área (sinal) e a concentração do composto, e o coeficiente de correlação linear para a Kestose, Nistose e Frutosilnistose (Tabela 19).

Tabela 19 - Valores de faixa linear, r^2 e equação da reta para os açúcares kestose, nistose e frutosilnistose no solvente.

Composto	Faixa linear (mg L ⁻¹)	r^2	Equação da reta
Kestose	100 – 5.000	0,998	$y = 0,022x - 24,07$
Nistose	100 – 5.000	0,998	$y = 0,025x - 18,62$
Frutosilnistose	100 – 5.000	0,998	$y = 0,027x - 25,66$

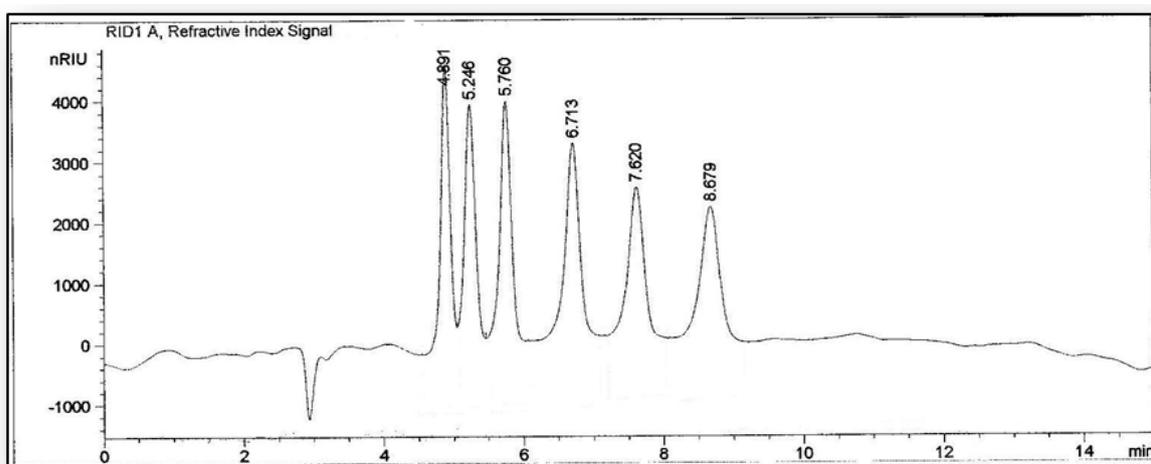
Condições: temperatura da coluna (20 °C) e do detector (25 °C), Fase móvel ACN:H₂O, 70:30 (v/v), vazão: 1,0 mL.min⁻¹, volume de injeção 5 µL.

Através dos valores obtidos, pode-se concluir que as curvas analíticas nas faixas lineares estudadas no solvente apresentaram excelentes valores para os coeficientes de correlação ($r^2 > 0,99$) para os três compostos de interesse. Estes resultados encontram-se dentro dos critérios de aceitação recomendados pela ANVISA e pelo INMETRO. Segundo a ANVISA (2003), o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração é de 0,99. O INMETRO recomenda um coeficiente acima de 0,90.

2.4.3 Seletividade

A seletividade do método foi determinada através da constatação visual da separação dos picos cromatográficos obtidos para uma amostra sintética contendo os padrões e possíveis interferentes. A Figura 10 apresenta o cromatograma obtido para a amostra sintética contendo o substrato sacarose, os compostos frutose e glicose (precursores do FOS) e os padrões de frutooligosacarídeos, kestose, nistose e frutossilnistose, na concentração de 1.000 mg.L^{-1} .

Figura 10 - Cromatograma de uma amostra sintética contendo frutose ($t_R = 4.891 \text{ min}$), glicose ($t_R = 5.246 \text{ min}$), sacarose ($t_R = 5.760 \text{ min}$), kestose ($t_R = 6.713 \text{ min}$), nistose ($t_R = 7.620 \text{ min}$) e frutossilnistose ($t_R = 8.679 \text{ min}$). Fase móvel ACN:H₂O, 70:30 (v/v), vazão: $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, temperatura da coluna: $20 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do detector: $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Alça de $5 \text{ } \mu\text{L}$, tempo de corrida 14 min.



A inexistência de sobreposições de sinais nas condições avaliadas (fase móvel ACN:H₂O, 70:30 (v/v), vazão: 1,0 mL.min⁻¹, Temperatura da Coluna: 20 °C, Temperatura do Detector: 25 °C. Alça de 5 uL), demonstra a seletividade do método para os compostos em estudo, na aplicação de interesse que é a síntese de FOS empregando como substrato a sacarose. O cromatograma mostra ser capaz de determinar quali e quantitativamente cada composto utilizando seus tempos de retenção, garantindo que o pico obtido no cromatograma seja exclusivo ao composto de interesse.

2.4.4 Precisão

A precisão do método foi determinada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, sendo expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR%) . A área do sinal referente à solução de 5.000 mg.L⁻¹, encontram-se apresentadas no Anexo III.

A média com o desvio padrão e o desvio padrão relativo obtidos para uma solução de 5.000 mg.L⁻¹, encontram-se apresentados na Tabela 20.

Tabela 20- Desvio padrão (S) e desvio padrão relativo (DPR%) para a Kestose, Nistose e Frutossilnistose na repetitividade (n=6) de uma solução contendo 5.000 mg.L⁻¹.

Composto	Média e Desvio Padrão (S)	DPR (%)
Kestose	4.257,3 ± 47,2	1,1
Nistose	4.820,1 ± 123,2	2,5
Frutossilnistose	5.182,1 ± 141,8	2,7

Em termos de repetitividade para o método, no nível de concentração de 5.000 mg.L⁻¹, o desvio padrão relativo encontrado para n = 6, foi de 1,1; 2,5 e 2,7 % para a kestose, nistose e frutossilnistose, respectivamente (Tabela 20).

A precisão intermediária do método foi determinada a partir da análise em triplicata de 3 concentrações contemplando o intervalo linear do método (250, 1000 e 5000 mg.L⁻¹), o qual foi realizado em três dias diferentes, resultando em nove (n=9) injeções para cada concentração. Os valores do

desvio padrão relativo (DPR%) obtidos para a kestose, nistose e frutossilnístose estão apresentados na Tabela 21.

A partir dos resultados apresentados pode ser visto que o DPR% variou de 0,6 a 12,0 % para os três compostos.

Os valores de DPR% obtidos para o método, tanto na precisão quanto na precisão intermediária, encontram-se dentro dos limites aceitáveis (DPR% \leq 20 %) para métodos cromatográficos (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 21- Desvio padrão (S) e desvio padrão relativo (DPR%) para a Kestose, Nistose e Frutossilnístose na precisão intermediária.

Composto	Média \pm Desvio Padrão (S)			DPR (%)		
	250	1000	5000	250	1000	5000
Kestose	251,0 \pm 17,4	1.190,3 \pm 130,4	4.796,5 \pm 393,0	6,9	10,9	8,1
Nistose	277,4 \pm 1,6	1.063,5 \pm 56,2	5.141,7 \pm 619,1	0,6	5,2	12,0
Frutossilnístose	277,4 \pm 14,2	1.268,4 \pm 69,5	5.888,3 \pm 570,7	5,1	5,4	9,7

2.4.5 Exatidão

A exatidão foi demonstrada através do percentual de recuperação do método. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Valores de recuperação para a kestose, nistose e frutossilnístose.

Composto	Nível de fortificação mg L ⁻¹	Valor medido mg L ⁻¹	Recuperação (%)
Kestose	0	2.226,9	
	500	2.793,7	113,4
	1.000	3.290,1	106,3
	2.500	4.931,3	108,2
Nistose	0	803,2	
	500	1.345,7	108,5
	1.000	1.787,1	98,4
	2.500	3.349,1	101,8
Frutossilnístose	0	932,3	
	500	1.432,0	99,5
	1.000	1.954,9	102,3
	2.500	3.758,4	113,0

Os valores de recuperação variaram entre 106,3 a 113,4 % para a Kestose, 98,4 a 108,5% para a Nistose e 99,5 a 113 % para Frutosilnistose, na faixa de fortificação avaliada, a qual foi entre 500 e 2.500 mg.L⁻¹. Os valores de recuperação encontrados, os quais nos remetem a exatidão do método, foram considerados satisfatórios, uma vez que estão de acordo com os aceitos pela literatura, entre 70 e 120 % (RIBANI *et al.* 2004; BRITO *et al.* 2003). Neste contexto, os resultados obtidos comprovaram a confiabilidade do método.

2.4.6 Robustez

A avaliação da robustez de um método analítico permite avaliar a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas.

A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos na avaliação da variação da vazão da fase móvel na análise dos frutooligossacarídeos.

Tabela 23 - Variação na vazão da fase móvel na análise de kestose, nistose e frutosilnistose.

Fluxo	0,8 mL min ⁻¹		1,0 mL min ⁻¹		1,2 mL min ⁻¹	
	Área	Tempo de retenção	Área	Tempo de retenção	Área	Tempo de retenção
Kestose	5,08 x 10 ⁴	8,3	4,16 x 10 ⁴	6,71	3,43 x 10 ⁴	5,61
Nistose	5,01 x 10 ⁴	9,5	3,85 x 10 ⁴	7,62	3,39 x 10 ⁴	6,36
Frutosilnistose	4,99 x 10 ⁴	10,8	4,18 x 10 ⁴	8,67	3,67 x 10 ⁴	7,24

- Fase móvel acetonitrila:água (70:30).

Através dos resultados obtidos pode se observar que a variação na vazão da fase móvel não alterou de forma expressiva o tempo de retenção e as áreas dos picos referentes aos frutooligossacarídeos. Observa-se também que quanto maior a vazão, menor foi o tempo de retenção dos frutooligossacarídeos analisados.

A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos na avaliação da variação da composição da fase móvel na análise dos frutooligossacarídeos.

Tabela 24 - Variação da composição da fase móvel na análise de Kestose, nistose e frutossilnistose.

Fase Móvel ACN:Água	60:40		70:30		80:20	
	Área	Tempo de retenção	Área	Tempo de retenção	Área	Tempo de retenção
Kestose	-	-	4,16 x 10 ⁴	6,71	4,14 x 10 ⁴	13,78
Nistose	-	-	3,85 x 10 ⁴	7,62	4,32 x 10 ⁴	14,93
Frutossilnistose	-	-	4,19 x 10 ⁴	8,67	4,13 x 10 ⁴	16,12

- Vazão da FM:1mL.min⁻¹.

Em relação à variação da composição da fase móvel constatou-se uma sobreposição de sinais, prejudicando a análise, para a fase móvel acetronila:água contendo uma proporção de 60:40. Para as demais composições da fase móvel não foram observadas alterações em relação a área dos FOS .

2.4.7 Avaliação do Efeito Matriz

A ocorrência ou não do efeito matriz nos frutooligossacarídeos foi avaliada através das curvas analíticas dos compostos de interesse.

Neste experimento, a intensidade do ruído foi maior que a observada para a solução sem a matriz, a tal ponto que impediu a integração do sinal referente a concentração de 100 mg.L⁻¹. Sendo assim, a faixa linear estudada foi de 250 a 5.000 mg.L⁻¹.

A Tabela 25 apresenta a faixa linear estudada, onde pode ser visualizado que as curvas analíticas (Anexo II) apresentaram boa linearidade na faixa de concentração estudada, com coeficiente de correlação (r^2) variando de 0,984 a 0,989 para os três compostos.

Tabela 25- Valores de faixa linear, r^2 e equação da reta para os açúcares kestose, nistose e frutossilnistose na matriz.

Composto	Faixa linear (mg L ⁻¹)	r^2	Equação da reta
Kestose	250 – 5.000	0,984	$y = 0,026x - 39,04$
Nistose	250– 5.000	0,989	$y = 0,028x - 307,7$
Frutossilnistose	250 – 5.000	0,986	$y = 0,025x - 170,2$

Condições: temperatura da coluna (20 °C) e do detector (25 °C), Fase móvel ACN:H₂O, 70:30 (v/v), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, volume de injeção de 5 µL.

O efeito matriz para a kestose, nistose e frutossilnistose foi de -18,2, 12,0 e 7,4 %, respectivamente. O efeito matriz é considerado baixo para intervalos entre $-20 \% < C \% < 20 \%$, médio para os intervalos $-50 \% < C \% < -20 \%$ ou $20 \% > C \% > 50 \%$ e elevado para os intervalos $C \% < -50 \%$ ou $C \% > 50 \%$ (CERQUEIRA *et al.* 2011). Portanto, pode-se verificar que a ocorrência do efeito matriz na quantificação dos frutooligossacarídeos é baixa para os três compostos avaliados.

A realização da curva analítica realizada na matriz permite a quantificação dos frutooligossacarídeos em reações com concentrações mais elevadas (a partir de 250 mg.L⁻¹).

2.4.8 Aplicação do método analítico

O método empregando CLAE-IR, após ser validado, foi aplicado para quantificação de FOS em uma reação em sistema orgânico utilizando uma inulinase comercial imobilizada em alginato de sódio e carvão ativado (RICHETTI *et al.*, 2012). Os valores obtidos após análise na condição otimizada com temperatura de 20 e 25 °C para a coluna e para o detector, fase móvel acetonitrila/água 70:30, fluxo da fase móvel 1 mL.min⁻¹ foram de 27,7, 21,0 e 3,9 % para a kestose, nistose e frutossilnistose, respectivamente. O rendimento total de FOS foi de 52,6 %.

2.5 CONCLUSÕES

Nesta etapa do trabalho foi estudada a validação de um método analítico para determinação de frutooligossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando Detector por Índice de Refração (CLAE-IR).

A otimização das condições cromatográficas foi realizada, permitindo a identificação e quantificação dos compostos em estudo, e a escolha do detector IR foi satisfatória, podendo-se concluir que:

- Somente a temperatura do detector influenciou na intensidade/amplitude do ruído, sendo que uma menor temperatura do detector conduziu a menores valores do ruído, ou seja, as quantidades mínimas detectáveis pelo equipamento;

- Os menores valores de LD e LQ para a kestose, nistose e frutossilnistose foram obtidos no experimento empregando temperaturas similares entre a coluna e o detector, de 20 e 25 °C, respectivamente.

- As curvas analíticas no solvente apresentaram valores de r maiores que 0,99 para as faixas de concentração estudadas, estando dentro do critério de aceitação.

- A seletividade do método foi assegurada, ou seja, o método mostrou-se seletivo para os compostos em estudo, mostrando-se capaz de determinar cada composto.

- No estudo da precisão do método, em termos de repetitividade e de precisão intermediária os DPR% observados estão dentro dos limites aceitáveis para métodos cromatográficos.

- Os valores de exatidão variaram entre 106,3 a 113,4 % para a Kestose, 98,4 a 108,5% para a Nistose e 99,5 a 113 % para Frutossilnistose.

- Na avaliação da robustez do método analítico pode ser observado que a variação na vazão da fase móvel não alterou de forma significativa o tempo de retenção e as áreas dos picos referentes aos frutooligossacarídeos, e na variação da composição da fase móvel observou-se uma sobreposição de sinais para a fase móvel acetonitrila:água na proporção de 60:40.

- A matriz apresenta um efeito pouco pronunciado na quantificação dos frutooligossacarídeos para os três compostos avaliados.

- Com base nos resultados obtidos, utilizando fase móvel acetronitrila:água (70:30), temperatura da coluna 20 °C e do detector 25 °C, fluxo da fase móvel 1 mL min⁻¹, volume de injeção 5 µL, com detector por índice de refração (IR), conclui-se que o método proposto é confiável e eficiente.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução (RE) n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Ministério da Saúde: Brasil, 2003.

Brito N. M.; Amarante Júnior O. P., Polese L.; Ribeiro M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas*, vol. 13, p. 129-46, 2003.

Cerqueira, M. B. R.; Dias, A. N.; Caldas, S. S.; Santana, F. B.; D'Oca, M. G. M.; Primel, E. G.; Validação de Método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. *Química Nova*, vol. 34, p. 156-159, 2011.

Chandran, S.; Singh, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*, v.62, p.4-14, 2007.

Choque-Delgado, G.T.; Tamashiro, W.M.S.C.; Maróstica-Júnior, M.R.; Moreno, Y. M. F.; Pastore, G. M. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food Research International*. v.43, p.1231-1236, 2011.

Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, p. 456, 2006.

Crittenden, R.G.; Playne, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, v.32, p.353-361, 1996.

Corradini, C.; Bianchi, F.; Matteuzzi, D.; Amoretti, A.; Rossim M.; Zanoni, S. High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection and capillary zone electrophoresis with indirect ultra violet detection as powerful tools to evaluated prebiotic properties od

fructooligosaccharides an inulin. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, p. 165-173, 2004.

Dias, A. N. Determinação simultânea de glicerol livre e total, mono, di e triglicerídeos em biodiesel etílico de girassol, mamona e da mistura sebo e soja empregando GC-FID. Dissertação (Mestrado em Química), FURG – Rio Grande, 2010.

Dominguez, A.; Nobre, C.; Rodrigues, L.R.; Peres, A.M.; Torres, D.; Rocha, I. Lima, N.; Teixeira, J. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, v.89, p. 1174-1179, 2012.

Egea, M.B. Desenvolvimento de produto funcional: maçã desidratada contendo fructooligosacarídeos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2010.

EURACHEM guide. The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. LGC (Teddington) Ltd., 1998. Disponível em: www.eurachem.org/guides/valid.pdf. Acesso em 12.11.2012.

Feinberg, M.; San-Redon, J.; Assié, A. Determination of complex polysaccharides by HPAE-PAD in foods: Validation using accuracy profile. *Journal of Chromatography B*. v. 877, p. 2388-2395, 2009.

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, p. 1401–1412, 1995.

Hang, Y.D. Woodams, E. E. Optimization of enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Lebensm. Wiss. U. Technology*, v. 29, p. 578-580, 1996.

Harrison, S. J.; Fraser, K.; Lane, G. A.; Villas-Boas, S.; Rasmussen, S. A reverse-phase liquid chromatography/mass spectrometry method for the analysis of high-molecular-weight fructooligosaccharides. *Journal Analytical Biochemistry*, v.395, p. 113-115, 2009.

Hartemink, R.; Vanlaere, K.M.J.; Rombouts, F.M. Growth of enterobacteria on fructooligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology, Wageningen*, v.383, p.367-374, 1997.

Hayashi, S.; Yohiyama, T.; Fuji, N.; Shinohara, S. Production of a novel syrup containing neofructooligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. *Biothecnology Letters*, v. 22, p.1465-1469, 2000.

Hidaka, H.; Hirayama, M.; Yamada, k. Fructooligosaccharides, enzymatic preparation and biofunctions. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, v.10, p.509-522, 1991.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, Revisão 01, 2003.

International Conference on the Harmonization (ICH). Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology - Q2 (R1). Geneva, 2005. Disponível em: <www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf>. Acesso em: 10/12/2012.

Kuhn, R.C.; Filho, F.M. Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 2023-2028, 2010.

Lamsal, B.; Faubion, J. The beneficial use of cereal and cereal components in probiotic foods. *Food Reviews International* 25(2):p. 103-114, 2009.

Losada, M. A. Olieros, T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutr. Res*, v. 22, p. 71-84, 2002.

Madlová, A.; Antosová, M.; Baráthová, M.; Polakovi, M. Stefuca, V.; Báles, V. Biotransformation of sucrose to fructooligosaccharides: the choice of microorganisms and optimization of process conditions. *Food Biotechnology*, p. 151-155, 2000.

Nemukula, A.; Mutanda, T.; Wilhelmi, B.S.; Whiteley, C.G. Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Bioresource Technology*, v.100, p. 2040-3045, 2009.

Ning, Y.; Wang, J.; Chen, J.; Yang, N.; Jin, Z.; Xu, X. Production of neofructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technol.* v.101, p.7472–7478, 2010.

Pardo, V.L. Desenvolvimento e validação de método para determinação do perfil graxo do biodiesel de tungue e blendas com soja empregando GC-MS. Dissertação de Mestrado, FURG – Rio Grande, 2010.

Park, J.; Oh, T.; Yun, J.W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Process Biochemistry*, v. 37, p.471-476, 2001.

Passos, L. M. L.; Park, Y.K. Fructooligosaccharides: implications in human health being and use in foods. *Ciência Rural*, v.33, n.2, p.385-390, 2003.

Prestes, O. D. Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QueChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM). Dissertação de Mestrado, UFSM, 2007.

Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p.771-780, 2004.

Richetti, A.; Munaretto, C.B.; Lerin, L. A.; Batistella, L.; Oliveira, J.V.; Dallago, R. M.; Astolfi, V.; Di Luccio, M.; Mazzutti, M. A.; Oliveira, D., Treichel, H. Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, p.383-388, 2012.

Risso, F.V. A.; Mazutti, M. A.; Treichel, H.; Costa, F.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I.; Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose in aqueous & aqueous-organic systems using free inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Industrial Biotechnology*, v.6, p.288-294, 2010.

Risso, F.V.A.; Mazutti, M. A.; Treichel, H.; Costa, F.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I.; Comparison between systems for synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using free inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Food. Bioprocess. Technol.* v.5, p. 331–337, 2012.

Roberfroid, M. Dietary fiber, inulin and oligosaccharides: a review comparin their physiological effects. *Crit Rev Food Science Nutr.*, v.33, p.103.108, 1993.

Roberfroid, M. B.; Gibson, G. R.; Hoyles, L.; McCartney, A.L.; Rastall, R.; Rowland, I.; Wolvers, D. Watzl, B.; Szajewska, H.; Stahl, B.; Guarner, F.; Respondek, F.; Whelan, K.; Coxam, V.; Davicco, M.; Léotoing, L.; Wittrant, Y.; Delzenne, N.; Cani, P.; Neyrinck, A.; Meherust, A. Prebiotics effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, p.1-63, 2010.

Sangeetha, P. T.; Ramesh, M. N.; Prapulla, S. G.; Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. *Journal of food engineering*, v. 68, p.57-64, 2005.

Santos, A. M. P.; Maugeri, F. Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Technol. Biotechnology*, v. 45, p.181-186, 2007.

Shabir, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference on harmonization. *Journal of Chromatography A*, p.57-66, 2003.

Silva, J.B.; Fai, A. E. C.; Santos, R. Basso, L.; Pastore, G.M. Parameters evaluation of fructooligosaccharides production by sucrose biotransformation using osmophilic *Aureobasium pullulans* strain. *Procedia Food Science*, v. 1, p.1547-1552, 2011.

Sirisansaneeyakul, S.; Lertsiri, S.; Tonsagunrathanachai, P.; Luangpituksa, P. Enzymatic production of fructo-Oligosaccharides from sucrose. *Nat. Sci*, v.34, p.262-269, 2000.

Soares, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 60, p. 79-84, 2001.

Spiegel, J.E. et al. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technol, Boston*, v.48, p.85-89, 1994.

Strickling, J.A. et al. Evaluation of oligosaccharides addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. *Animal Feed Science and Technol*, v.86, p.205-219, 2000.

Tanriseven, A.; Aslan, Y. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p.550-554, 2005.

Tian, F.; Karboune, S. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens* : specificity, kinetics, and product characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 82, p. 71-79, 2012.

Valentini, S.R.; Sommer, W.A.; Matioli, G. Validação de métodos analíticos. *Arquivos do Mudi*, v. 11, p. 26-31, 2007.

Vega, R.; Zúniga-Hansen, M.E. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. *Bioresource Technol.* v.102, p.10180–10186, 2011.

ANEXO I

Tabela I.A – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 4 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 4 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1M (pH 4,8) 2 % de sacarose até completar 16 mL, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	1,1396	71,101
20	1,2221	38,124
30	1,2505	26,006
40	1,2577	19,617
50	1,2556	15,667
60	1,2581	13,082

Tabela I.B – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 2 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1M (pH 4,8) 2 % de sacarose até completar 18 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	0,2567	35,035
20	0,4623	32,448
30	0,7388	34,568
40	1,0178	35,719
50	1,1841	33,244
60	1,2036	28,160

Tabela I.C – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 2 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1M (pH 4,8) 2 % de sacarose até completar 25 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	0,2910	56,737
20	0,4879	47,563
30	0,7555	49,102
40	0,9490	46,244
50	1,0416	40,619
60	1,1022	35,818

Tabela I.D – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 1 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 1 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1M (pH 4,8) 2 % de sacarose até completar 50 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	0,131	102,2
20	0,304	118,5
30	0,327	84,9
40	0,586	114,3
50	0,760	118,6
60	0,772	100,3

Tabela I.E – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 2 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato 0,1M (pH 4,8) 2 % de sacarose até completar 50 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	0,142	55,2
20	0,332	64,8
30	0,503	65,4
40	0,648	63,3
50	0,768	59,91
60	0,881	35,6

ANEXO II

Tabela II. A - Valores de área (nRIU) para a kestose, nistose e frutossilnístose no solvente.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Média Área (nRIU)		
	Kestose	Nistose	Frutossilnístose
100	2305	1596	1782
250	10609	9593	8560
500	21593	18904	18140
1.000	51050	44864	41883
2.500	111972	100215	92772
5.000	217598	193390	178908

Figura II.A - Curvas analíticas da Kestose, Nistose e Frutossilnístose no solvente.

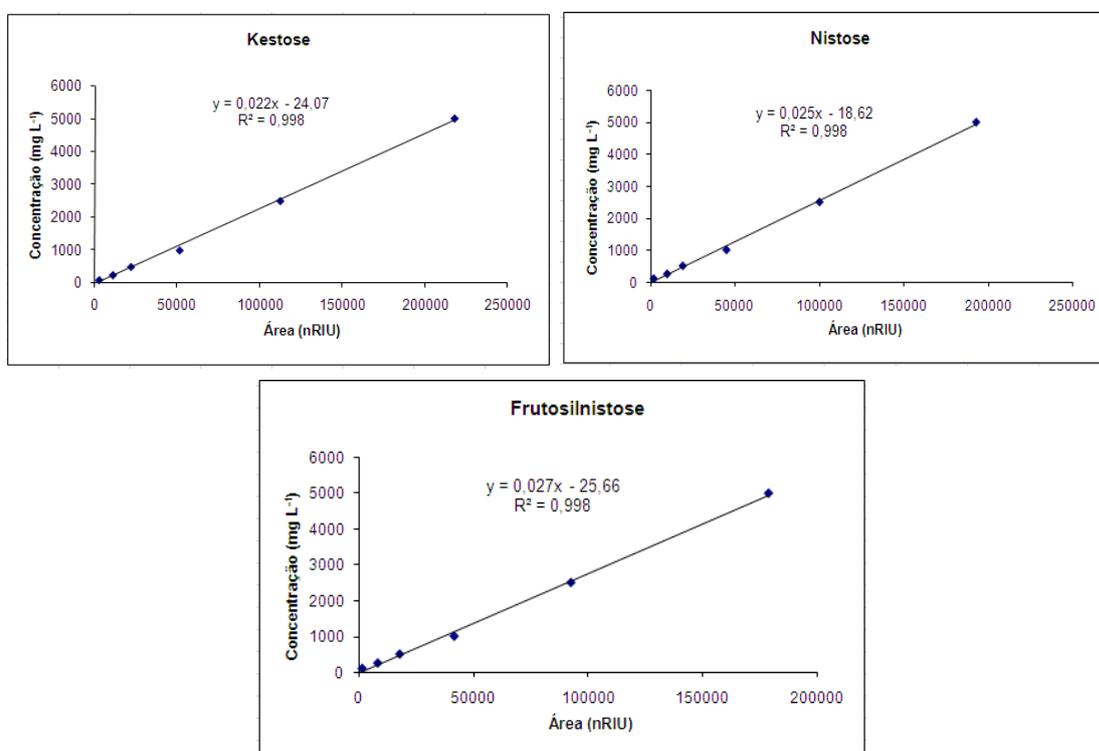


Tabela II.B - Valores de área (nRIU) para a kestose, nistose e frutossilnístose na matriz.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Média da Área (nRIU)		
	Kestose	Nistose	Frutossilnístose
250	3282	10974	13732
500	30214	35768	36006
1.000	45085	43962	47113
2.500	83306	103843	89306
5.000	189028	179298	203123

Figura II.B - Curvas analíticas da Kestose , Nistose e Frutossilnístose na matriz.

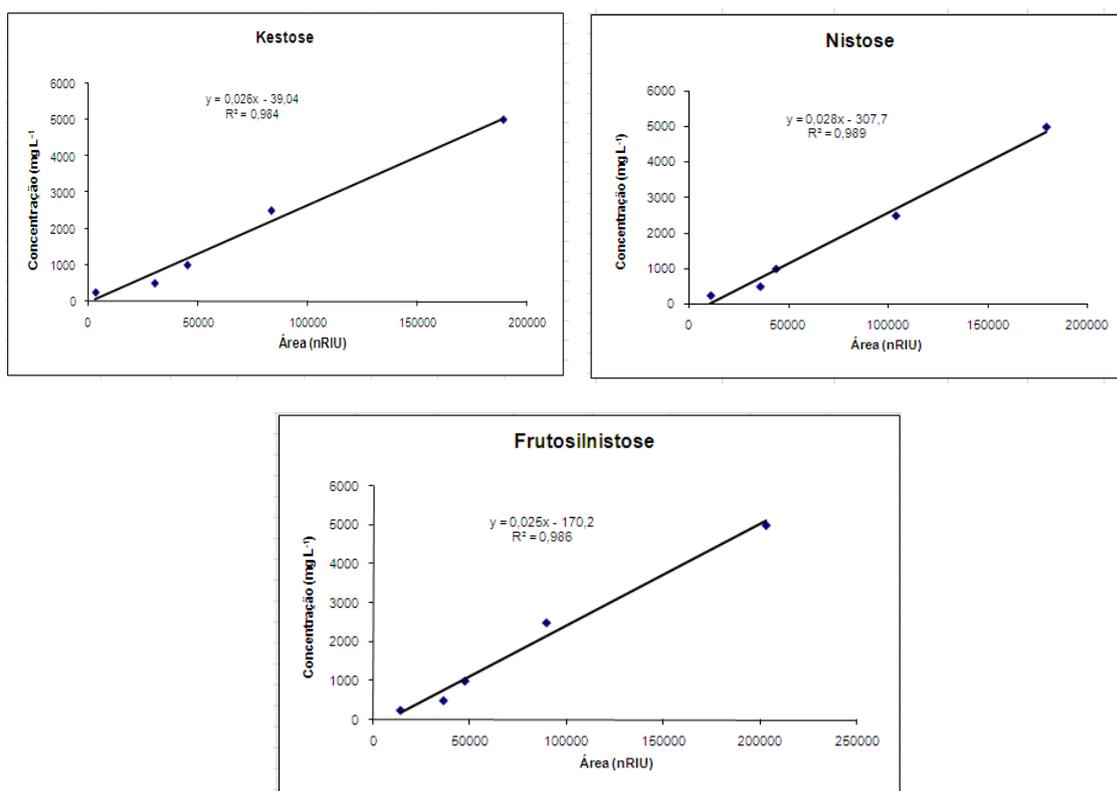


Tabela II.C - Valores de área (nRIU) para a kestose, nistose e frutossilnistose no estudo da repetibilidade (n=6) na concentração de 5.000 mg.L⁻¹.

Concentração (mg.L⁻¹)	Área (nRIU)		
	Kestose	Nistose	Frutossilnistose
5.000	194676	199800	192628
	192955	194449	199428
	199453	183645	197314
	197538	199198	185055
	193637	195180	198713
	189387	189020	184330
Média	194608	193549	192911

Tabela II.D - Valores de área (nRIU) para a kestose, nistose e frutossilnistose no estudo da precisão intermediária

Concentração (mg.L⁻¹)	Média Área (nRIU)		
	Kestose	Nistose	Frutossilnistose
250	12505	11842	11224
1000	55198	43286	47930
5.000	219119	206411	219036

ANEXO III

ARTIGO