v7.n8.2026

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE EM HIDROGÉIS DE PECTINA E ALGINATO DE SÓDIO

IMMOBILIZATION OF INVERTASE IN PECTIN AND SODIUM ALGINATE HYDROGELS

INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA EN HIDROGELES DE PECTINA Y ALGINATO DE SODIO

Haroldo Yukio Kawaguti[1], Livia de Carvalho Fontes Matsumoto[1], Nathalia Ramalho Moreira[1]

e788685
https://doi.org/10.47820/recima21.v7i8.8685

PUBLICADO: 08/2026

RESUMO

A imobilização de enzimas representa uma estratégia eficiente para aumentar a estabilidade operacional, possibilitar a reutilização do biocatalisador e reduzir os custos de processos industriais. Avaliou-se a influência da composição de hidrogéis de pectina e alginato na imobilização de invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como os efeitos do pH e da temperatura sobre sua atividade catalítica na produção de açúcar invertido. A invertase foi imobilizada em diferentes formulações de hidrogéis (pectina 2%, 4% e 5%, e pectina 4% associada a 0,5% de alginato) e aplicada na hidrólise de solução de sacarose em sistema batelada. A formulação contendo 4% de pectina e 0,5% de alginato apresentou o melhor desempenho, alcançando 0,878 mg mL^{-1} de açúcares redutores após 90 minutos e a menor liberação de proteínas para o meio reacional, indicando elevada eficiência de encapsulamento e menor lixiviação da enzima. A atividade máxima da invertase imobilizada foi observada em pH 4,6 e 55 °C, mantendo elevada estabilidade em ampla faixa operacional de pH e temperatura. Os resultados demonstram que a associação entre pectina e alginato proporciona hidrogéis mais estáveis e eficientes para a imobilização da invertase, favorecendo a produção de açúcar invertido.

PALAVRAS-CHAVE: Açúcar invertido. Alginato. Pectina.

ABSTRACT

Enzyme immobilization is an effective strategy for improving operational stability, enabling biocatalyst reuse, and reducing the costs of industrial processes. This study evaluated the influence of pectin- and alginate-based hydrogel compositions on the immobilization of invertase, as well as the effects of pH and temperature on its catalytic activity for invert sugar production. Invertase was extracted from commercial baker's yeast, immobilized in different hydrogel formulations (2%, 4%, and 5% pectin, and 4% pectin combined with 0.5% alginate), and applied to the hydrolysis of sucrose solution in a batch system. The formulation containing 4% pectin and 0.5% alginate exhibited the best performance, reaching 0.878 mg mL^{-1} of reducing sugars after 90 min of reaction and showing the lowest protein release into the reaction medium, indicating high immobilization efficiency and reduced enzyme leaching. The maximum activity of the immobilized invertase was observed at pH 4.6 and 55 °C, while maintaining high stability over a broad operational pH and temperature range. These findings demonstrate that the combination of pectin and alginate produces more stable and efficient hydrogels for invertase immobilization.

KEYWORDS: *Alginate. Invert sugar. Pectin.*

[1] Centro Universitário SENAI São Paulo (UniSENAI-SP), doutorado.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

RESUMEN
La inmovilización de enzimas representa una estrategia eficaz para aumentar la estabilidad operativa, permitir la reutilización del biocatalizador y reducir los costos de los procesos industriales. En este estudio se evaluó la influencia de la composición de hidrogeles de pectina y alginato en la inmovilización de la invertasa, así como los efectos del pH y la temperatura sobre su actividad catalítica en la producción de azúcar invertido. La invertasa se extrajo de levadura prensada comercial, se inmovilizó en diferentes formulaciones de hidrogeles (pectina al 2 %, 4 % y 5 %, y pectina al 4 % combinada con 0,5 % de alginato) y se aplicó a la hidrólisis de una solución de sacarosa en un sistema discontinuo (batch). La formulación que contenía 4 % de pectina y 0,5 % de alginato presentó el mejor desempeño, alcanzando 0,878 mg mL^{-1} de azúcares reductores después de 90 minutos y la menor liberación de proteínas al medio de reacción, lo que indica una elevada eficiencia de encapsulación y una menor lixiviación de la enzima. La máxima actividad de la invertasa inmovilizada se observó a pH 4,6 y 55 °C, manteniendo una elevada estabilidad en un amplio intervalo operativo de pH y temperatura. Los resultados demuestran que la combinación de pectina y alginato proporciona hidrogeles más estables y eficientes para la inmovilización de la invertasa, favoreciendo la producción de azúcar invertido.

PALABRASCLAVE: *Alginato. Azúcar invertido. Pectina.*

INTRODUÇÃO

A invertase (β-frutofuranosidase, EC 3.2.1.26) é uma enzima pertencente à classe das glicosidases que catalisa a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, formando uma mistura conhecida como açúcar invertido. Além da hidrólise da sacarose, determinadas invertases apresentam atividade de transfrutosilação, possibilitando a síntese de frutooligossacarídeos sob condições específicas de reação (Nadeem *et al*., 2015). As invertases encontram-se amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas por plantas, leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Entretanto, as fontes microbianas apresentam maior interesse biotecnológico devido à elevada produtividade, facilidade de cultivo e possibilidade de produção em escala industrial. Entre os microrganismos mais estudados destacam-se *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Candida utilis* e outras espécies fúngicas produtoras de β-frutofuranosidases com diferentes propriedades cinéticas e elevada estabilidade operacional (Nadeem *et al*., 2015). Historicamente, a invertase ocupa posição de destaque na enzimologia. Os experimentos de Eduard Buchner demonstraram que extratos livres de células de leveduras eram capazes de realizar fermentação alcoólica, indicando que os processos bioquímicos poderiam ocorrer na ausência de células vivas. Posteriormente, Leonor Michaelis e Maud Menten utilizaram a reação catalisada pela invertase para desenvolver o modelo cinético que descreve a relação entre a velocidade da reação e a concentração de substrato, conhecido como equação de Michaelis-Menten, um dos principais fundamentos da cinética enzimática (Nadeem *et al*., 2015; Michaelis; Menten, 1913). A imobilização enzimática consiste no confinamento ou ligação de enzimas a um suporte insolúvel, preservando sua atividade catalítica e permitindo sua recuperação e

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

reutilização em sucessivos ciclos de reação. Essa estratégia tem sido amplamente empregada na biocatálise industrial devido às vantagens proporcionadas em relação às enzimas livres, incluindo maior estabilidade térmica, química e operacional, maior resistência a variações de pH e solventes, facilidade de separação do meio reacional e possibilidade de aplicação em processos contínuos. Além disso, a reutilização do biocatalisador contribui significativamente para a redução dos custos operacionais, tornando os processos enzimáticos mais viáveis economicamente (Contesini *et al*., 2013; Datta; Christena; Rajaram, 2013; Sheldon; Van Pelt, 2013; Sheldon, 2007). Neste estudo, avaliou-se o potencial da imobilização de invertase em polímeros naturais, especialmente pectina e alginato de sódio, bem como o efeito do pH e da temperatura sobre a conversão de sacarose em açúcares redutores.

REFERENCIAL TEÓRICO

A invertase é considerada uma das carboidrases de maior importância comercial devido à ampla utilização do açúcar invertido na indústria de alimentos. A hidrólise enzimática da sacarose é empregada na fabricação de chocolates com recheio líquido, balas, *fondants*, geleias, produtos de panificação, bebidas, sorvetes, xaropes e mel artificial. Em comparação com a hidrólise ácida, o processo enzimático apresenta elevada especificidade, reduz a formação de compostos indesejáveis, minimiza alterações sensoriais e pode ser realizado sob condições mais brandas de pH e temperatura, contribuindo para maior qualidade do produto final (Nadeem *et al*., 2015; Kotwal; Shankar, 2009). Além da indústria alimentícia, a invertase tem sido empregada em aplicações farmacêuticas, cosméticas, na produção de biocombustíveis e no desenvolvimento de biossensores para determinação de sacarose. A imobilização dessa enzima representa uma estratégia amplamente estudada para aumentar sua estabilidade operacional, facilitar sua recuperação após o processo, permitir sua reutilização em múltiplos ciclos catalíticos e viabilizar sua aplicação em processos contínuos, reduzindo significativamente os custos industriais (Sheldon; Van Pelt, 2013; Kotwal; Shankar, 2009).

A escolha do método de imobilização e do suporte influencia diretamente as propriedades catalíticas da invertase, podendo alterar parâmetros como atividade específica, estabilidade térmica, faixa ótima de pH e resistência ao armazenamento. Essas modificações decorrem das interações entre a enzima e o suporte, que podem restringir mudanças conformacionais responsáveis pela desnaturação em condições adversas. Dessa forma, a avaliação do comportamento de invertases imobilizadas frente a diferentes valores de pH e temperatura constitui etapa fundamental para sua aplicação em processos industriais,

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

especialmente na produção contínua de açúcar invertido e em biorreatores enzimáticos (Sheldon; Van Pelt, 2013; Kotwal; Shankar, 2009). As propriedades das enzimas imobilizadas diferem daquelas observadas para as enzimas livres em função das interações estabelecidas entre a biomolécula e o suporte. Essas interações podem restringir alterações conformacionais responsáveis pela desnaturação da enzima, aumentando sua estabilidade durante o armazenamento e a operação, bem como prolongando sua vida útil. Em consequência, enzimas imobilizadas vêm sendo empregadas em diversos setores industriais, incluindo a produção de alimentos, fármacos, compostos químicos de alto valor agregado, biocombustíveis, antibióticos e processos de biorremediação e tratamento de efluentes (Sheldon; Van Pelt, 2013; Datta; Christena; Rajaram, 2013; Sheldon, 2007).

Na indústria de alimentos, a imobilização enzimática tem sido amplamente explorada para aumentar a eficiência de processos envolvendo carboidrases, lipases e proteases. Um exemplo é a β-galactosidase imobilizada em hidrogéis poliméricos, cuja aplicação permitiu a hidrólise eficiente da lactose presente em leite UHT e outros produtos lácteos, mantendo elevada atividade catalítica e possibilitando a reutilização do biocatalisador em sucessivos ciclos de operação (Wolf *et al*., 2018; Facin *et al*., 2015). Entre os diversos materiais empregados como suportes para imobilização, os hidrogéis destacam-se por apresentarem elevada biocompatibilidade, hidrofilicidade e capacidade de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos sem perder sua integridade estrutural. Esses materiais são constituídos por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos interligados por ligações físicas ou químicas, formando uma matriz porosa que favorece a difusão de substratos e produtos e proporciona um microambiente adequado para manutenção da conformação nativa e da atividade catalítica das enzimas (Ahmed, 2015; Caló; Khutoryanskiy, 2015).

A capacidade de absorção de água dos hidrogéis está diretamente relacionada à natureza hidrofílica das cadeias poliméricas e ao grau de reticulação da rede tridimensional. Essas características influenciam propriedades importantes, como porosidade, resistência mecânica, permeabilidade e difusão molecular, fatores que exercem impacto direto sobre a eficiência da imobilização e sobre o desempenho catalítico das enzimas incorporadas ao suporte (Ahmed, 2015). Nos últimos anos, hidrogéis produzidos a partir de polímeros naturais, como alginato, quitosana, celulose, pectina, carragenana e goma arábica, têm recebido crescente atenção como suportes para imobilização de enzimas e células microbianas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, facilidade de preparação e baixo custo. Além dessas características, esses biomateriais favorecem a preservação da atividade catalítica, aumentam a estabilidade operacional das enzimas e possibilitam sua reutilização em processos

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

industriais, tornando-se alternativas promissoras para aplicações biotecnológicas (Ahmed, 2015; Facin *et al*., 2015; Datta; Christena; Rajaram, 2013; Kawaguti; Sato, 2011).

Alginato e pectina como suportes para imobilização enzimática

O alginato é um dos biomateriais mais utilizados para a imobilização de enzimas, células microbianas e outros sistemas biológicos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, baixo custo e facilidade de gelificação sob condições brandas. Essas características permitem o aprisionamento de biomoléculas sem comprometer significativamente sua atividade biológica, tornando o alginato um dos suportes mais empregados em processos biotecnológicos, farmacêuticos e alimentícios (Contesini *et al*., 2013; Datta; Christena; Rajaram, 2013; Lee; Mooney, 2012; Kawaguti; Sato, 2011). A imobilização em alginato é geralmente realizada pela mistura de uma suspensão contendo enzimas ou células com uma solução de alginato de sódio, seguida da extrusão dessa mistura em uma solução contendo íons divalentes, normalmente cloreto de cálcio. Os íons Ca^{2+} promovem a reticulação das cadeias poliméricas por interação com blocos ricos em resíduos de ácido gulurônico, formando rapidamente esferas ou grânulos de hidrogel capazes de aprisionar o material biológico. Esse mecanismo de gelificação é descrito pelo modelo "egg-box", proposto por Grant *et al*. (1973), que permanece como a principal teoria para explicar a reticulação iônica de alginatos por cálcio (Lee; Mooney, 2012; Grant *et al*., 1973).

Após a formação das esferas, recomenda-se um período de permanência na solução de cloreto de cálcio para permitir a difusão dos íons para o interior da matriz polimérica e a estabilização da rede tridimensional. O tempo de gelificação e as propriedades finais do hidrogel dependem da concentração do alginato, da concentração de íons cálcio, do diâmetro das partículas e das condições de preparo, fatores que influenciam diretamente a resistência mecânica, a porosidade, a difusão de substratos e a estabilidade operacional do biocatalisador (Lee; Mooney, 2012; Martinsen; Storrø, Skjåk-Bræk, 1992). A elevada hidrofilicidade e a estrutura porosa dos hidrogéis de alginato favorecem a difusão de pequenas moléculas, como substratos e produtos, enquanto mantêm enzimas ou células retidas no interior da matriz. Essas propriedades permitem a reutilização do biocatalisador, facilitam sua aplicação em biorreatores contínuos e contribuem para o aumento da estabilidade operacional quando comparadas às enzimas livres (Datta; Christena; Rajaram, 2013; Lee; Mooney, 2012).

A pectina é outro polissacarídeo natural amplamente empregado na obtenção de hidrogéis para aplicações biotecnológicas. Sua estrutura é constituída predominantemente por unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas α-(1→4), podendo

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

apresentar diferentes graus de esterificação, que influenciam diretamente suas propriedades físico-químicas e sua capacidade de formação de gel (Cao *et al*., 2020). Industrialmente, a pectina é obtida principalmente a partir de subprodutos da indústria de frutas, como cascas de cítricos e bagaço de maçã. As pectinas de baixo grau de metoxilação formam hidrogéis por reticulação iônica na presença de íons cálcio, por um mecanismo semelhante ao observado para o alginato de sódio. Essa propriedade favorece sua utilização como suporte para imobilização de enzimas, proteínas e células, preservando a atividade biológica e permitindo a reutilização do biocatalisador (Cao *et al*., 2020). As características finais do hidrogel dependem da concentração do polímero, do grau de esterificação da pectina, da concentração do agente reticulante e das condições de preparo, fatores que influenciam diretamente a eficiência de imobilização, a difusão de substratos e a estabilidade catalítica do sistema imobilizado (Cao *et al*., 2020).

Invertase imobilizada e influência do pH e da temperatura na atividade enzimática

A invertase possui importância industrial devido a sua capacidade de catalisar a hidrólise da sacarose, produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose conhecida como açúcar invertido. Esse produto apresenta propriedades tecnológicas superiores à sacarose, principalmente devido à maior solubilidade da frutose e à menor tendência de cristalização da glicose, características que favorecem sua aplicação na indústria alimentícia, especialmente na fabricação de confeitos, geleias, produtos de panificação, bebidas e xaropes açucarados (Vujčić *et al*., 2010; Kotwal; Shankar, 2009). A utilização de açúcar invertido na indústria de alimentos apresenta vantagens tecnológicas importantes, pois a presença de glicose e frutose reduz a formação de cristais de sacarose e melhora características como textura, viscosidade e retenção de umidade dos produtos alimentícios. Além disso, devido à elevada solubilidade da frutose, xaropes contendo açúcar invertido podem apresentar maiores concentrações de sólidos solúveis sem ocorrência de cristalização, tornando esse produto de interesse comercial para diversas aplicações industriais (Kotwal; Shankar, 2009).

Apesar da elevada eficiência catalítica da invertase livre, sua aplicação industrial apresenta limitações relacionadas à dificuldade de recuperação da enzima após o processo, à perda progressiva de atividade durante o armazenamento e à necessidade de reposição frequente do biocatalisador. Nesse contexto, a imobilização enzimática apresenta-se como uma estratégia promissora para aumentar a estabilidade operacional, permitir a reutilização da enzima e possibilitar o desenvolvimento de sistemas contínuos de produção, reduzindo custos associados ao processo biotecnológico (Sheldon; Van Pelt, 2013; Datta; Christena, Rajaram, 2013). A imobilização da invertase em suportes poliméricos, principalmente em alginato de sódio,

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

tem sido amplamente estudada para a produção de açúcar invertido (Lee; Mooney, 2012; Smidsrød; Skjåk-Bræk, 1990).

A invertase imobilizada em cápsulas de alginato de cálcio foi avaliada por Çetinus e Öztürk (2001), que demonstraram que a enzima apresentou maior estabilidade operacional quando comparada à forma livre. Os autores observaram que a imobilização permitiu a manutenção da atividade catalítica em diferentes condições de pH e temperatura, evidenciando o potencial do sistema para aplicações industriais envolvendo hidrólise contínua de sacarose. Em outro estudo, Vujčić *et al*. (2010) avaliaram a imobilização de invertase de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* modificada quimicamente e aplicada na produção contínua de açúcar invertido. Os resultados demonstraram que o sistema imobilizado apresentou elevada eficiência catalítica e capacidade de operação contínua, reforçando a importância da imobilização como estratégia para aumentar a viabilidade industrial da produção de xaropes de açúcar invertido. Dessa forma, a imobilização contribui para o desenvolvimento de processos mais econômicos e sustentáveis na indústria alimentícia (Sheldon; Van Pelt, 2013).

Influência do pH na atividade e estabilidade da invertase

A atividade enzimática depende da manutenção da estrutura tridimensional da proteína e do estado de ionização dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo. O pH exerce papel fundamental na catálise enzimática, pois altera a carga elétrica dos grupos funcionais envolvidos na ligação do substrato, na estabilização do complexo enzima-substrato e na etapa catalítica da reação. Alterações extremas de pH podem provocar mudanças conformacionais na proteína e levar à perda parcial ou total da atividade enzimática (Nelson; Cox, 2021). A invertase apresenta atividade ótima geralmente em condições ácidas, característica relacionada ao mecanismo catalítico. Entretanto, o valor de pH ótimo pode variar conforme a origem da enzima, o grau de purificação, a composição do meio reacional e a forma de aplicação, seja como enzima livre ou imobilizada (Cavaille; Combes, 1995).

No caso de enzimas imobilizadas, o comportamento frente ao pH pode ser alterado devido às interações entre a proteína e o suporte. Matrizes poliméricas podem atuar como um microambiente protetor, reduzindo alterações bruscas de pH ao redor da enzima e aumentando sua estabilidade operacional. Para invertase imobilizada em alginato de cálcio, Çetinus e Öztürk (2001) observaram alterações no perfil de atividade e maior resistência da enzima imobilizada em comparação à forma livre. Além do pH, fatores como tipo e concentração do tampão, força iônica do meio, presença de substrato e interações entre enzima e suporte podem influenciar significativamente a atividade catalítica. Dessa forma, a determinação experimental do pH ótimo

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

é fundamental para estabelecer as melhores condições operacionais do processo de hidrólise da sacarose.

Influência da temperatura na atividade e estabilidade da invertase

A temperatura exerce influência direta sobre a velocidade das reações enzimáticas, pois o aumento da temperatura inicialmente promove maior energia cinética das moléculas, aumentando a frequência de colisões entre enzima e substrato. Entretanto, acima de determinada temperatura ocorre aceleração dos processos de desnaturação proteica, resultando na perda progressiva da atividade catalítica (Nelson; Cox, 2021). A temperatura ótima de uma enzima corresponde ao ponto em que a velocidade de reação é máxima antes que os efeitos de desnaturação se tornem predominantes. Portanto, durante processos industriais, deve-se considerar não apenas a maior atividade catalítica, mas também a estabilidade térmica do biocatalisador, pois temperaturas excessivamente elevadas podem reduzir a vida útil da enzima (Cavaille; Combes, 1995).

Estudos sobre estabilidade térmica da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que a exposição prolongada a temperaturas elevadas promove alterações conformacionais responsáveis pela perda da atividade enzimática. A cinética de inativação térmica depende da temperatura aplicada e do tempo de exposição, sendo esses parâmetros fundamentais para o controle do processo industrial (Cavaille; Combes, 1995). A imobilização em matrizes poliméricas pode aumentar a estabilidade térmica da invertase devido à restrição parcial dos movimentos conformacionais da proteína, reduzindo a susceptibilidade à desnaturação (Sheldon; Van Pelt, 2013; Çetinus; Öztürk, 2001).

METODOLOGIA

Extração da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

A extração da enzima invertase foi realizada a partir de 0,5 g de fermento biológico comercial prensado. A biomassa foi transferida para frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,16 M. Adicionaram-se pérolas de vidro ao meio de suspensão para auxiliar na homogeneização e ruptura celular. A mistura foi submetida a agitação constante em agitador rotativo a 200 rpm, sob temperatura controlada de 45°C, durante um período de 2 horas. Após a incubação, a suspensão foi transferida para tubos cônicos e submetida a centrifugação a 3.000 x g durante 20 minutos a 20°C. O sobrenadante, contendo a enzima bruta, foi coletado, tendo seu volume final mensurado. O precipitado foi descartado. O

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

extrato enzimático foi mantido sob refrigeração até a realização das análises subsequentes de quantificação de proteínas solúveis totais e determinação da atividade invertásica.

Determinação da atividade enzimática

A atividade da invertase foi avaliada utilizando sacarose como substrato em solução tamponada de acetato 0,05 M, pH 4,6 e sacarose 0,3 M. Os ensaios foram realizados em triplicata, adicionando-se 1,0 mL do extrato enzimático a 1,0 mL da solução de substrato. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), seguida de aquecimento em banho fervente por 5 minutos para o desenvolvimento da cor. Após o resfriamento, o volume foi completado para 10 mL com água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. A unidade de atividade da invertase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar o equivalente a 1 mg de glicose por minuto, por mL de amostra, sob as condições experimentais descritas (pH 4,6 e 37 °C).

Imobilização da invertase em hidrogel

O processo de imobilização foi realizado a partir de 20 mL do extrato enzimático contendo invertase, aos quais foram adicionados pectina ou alginato, sob agitação constante à temperatura ambiente. Simultaneamente, preparou-se uma solução reticulante de cloreto de cálcio a 3% (m/v) em 200 mL de água destilada, mantida sob agitação à temperatura ambiente. A mistura do extrato enzimático com o polímero foi gotejada na solução de cloreto de cálcio utilizando uma seringa de 20 mL, sob agitação lenta, para a formação das esferas de hidrogel. Após a conclusão do gotejamento, as esferas foram mantidas em repouso na solução por 30 minutos sob refrigeração. Posteriormente, o material foi recuperado por filtração auxiliado por peneira.

Produção de açúcar invertido com enzima imobilizada

Para a reação de hidrólise, prepararam-se 500 mL de tampão acetato 0,05 M, pH 5,0, utilizado para dissolver 0,5% (m/v) de sacarose. A dissolução completa do substrato foi conduzida a 45°C sob agitação, até a obtenção de uma solução translúcida. Uma vez atingida a temperatura de 45°C e mantida a agitação de 150 rpm, 20 g de esferas de invertase imobilizada foram adicionadas ao meio reacional. Os ensaios foram realizados em duplicata. Amostras de 10 mL foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados, incluindo a amostra sem a adição das esferas, considerada como controle. As amostras foram imediatamente transferidas

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

para tubos cônicos e estocadas em congelador para posterior quantificação da produção de açúcares redutores.

Quantificação de açúcares redutores

A determinação da concentração de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Os ensaios foram realizados em triplicata. Para cada ensaio, 1,0 mL da alíquota da reação foi misturado a 1,0 mL de solução de DNS em tubo de ensaio. A mistura foi submetida a aquecimento em banho fervente por 5 minutos. Após o resfriamento, o volume de cada tubo foi completado para 10 mL com água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de açúcares redutores foi calculada por meio de curva-padrão de glicose, sendo expressa como equivalentes de glicose.

Avaliação do efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da invertase

A influência do pH na atividade da invertase imobilizada foi avaliada utilizando-se diferentes soluções-tampão com concentração 0,05 M: citrato (pH 3,0 a 4,0), acetato (pH 4,0 a 5,6) e fosfato (pH 6,0 a 7,0). Os ensaios foram realizados em duplicata. As soluções foram preparadas em béquer e o pH final foi aferido em pHmetro. O substrato sacarose foi dissolvido em cada uma das soluções-tampão para atingir a concentração final de 0,3 M. A reação consistiu na adição de 2 g de invertase imobilizada na solução de sacarose tamponada (50 mL), mantida sob incubação a 37 °C por 10 minutos. O efeito da temperatura, ensaios em duplicata, foi determinado variando-se o parâmetro experimental nos seguintes níveis: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65 °C. A reação foi conduzida utilizando-se sacarose 0,3 M em 50 mL de tampão acetato 0,05 M, pH 4,6. Adicionaram-se 2 g da enzima imobilizada, mantendo-se a reação sob a temperatura específica por 10 minutos. Após a incubação, o método do DNS foi aplicado para a quantificação dos açúcares redutores, como descrito anteriormente. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de açúcar redutor (expresso em miligramas de glicose) liberada por minuto de reação por mL de amostra, sob as respectivas condições de pH e temperatura avaliadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência dos polímeros utilizados na imobilização de invertase e o efeito do pH e da temperatura na conversão de sacarose em açúcares redutores foram avaliados. A Figura 1 mostra esferas contendo invertase imobilizada em hidrogéis.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

Figura 1. Esferas contendo enzima imobilizada em hidrogéis

Fonte: do Autor

Tabela 1. Cinética da formação de açúcares redutores (glicose e frutose), em processo em batelada simples, a partir de solução de sacarose 0,5% (m/v) utilizando extrato enzimático imobilizado em hidrogel e detecção de proteína solúvel (invertase) no filtrado e na solução de sacarose 0,5% (m/v), liberada das esferas de hidrogel durante o processo de produção de açúcar invertido

Tempo de reação (min)	**Açúcar redutor (mg/mL)**				**Proteína solúvel (mg/mL)**			
	Pectina (2%)	**Pectina (4%)**	**Pectina (5%)**	**Pectina (4%) e alginato (0,5%)**	**Pectina (2%)**	**Pectina (4%)**	**Pectina (5%)**	**Pectina (4%) e alginato (0,5%)**
0	0	0	0	0	0,155	0,087	0,075	0,018
15	0,088	0,143	0,449	0,279	0,083	0,088	0,084	0,024
30	0,055	0,128	0,502	0,681	0,111	0,055	0,091	0,019

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

45	0,010	0,119	0,588	0,719	0,129	0,010	0,094	0,017
60	0,044	0,111	0,632	0,827	0,148	0,044	0,097	0,017
75	0,012	0,133	0,677	0,870	0,186	0,116	0,100	0,022
90	0,024	0,203	0,682	0,878	0,182	0,243	0,111	0,027

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que a composição do hidrogel exerceu influência significativa tanto sobre a produção de açúcares redutores quanto sobre a retenção da invertase durante o processo de hidrólise da sacarose. De maneira geral, observou-se que hidrogéis contendo maiores concentrações de pectina, bem como a formulação combinando pectina e alginato, apresentaram maior eficiência catalítica quando comparados às formulações contendo apenas 2% ou 4% de pectina. Esse comportamento está de acordo com estudos recentes que demonstram que as propriedades físico-químicas do suporte exercem papel determinante sobre a estabilidade, retenção e eficiência catalítica de enzimas imobilizadas (Meyer; Meyer; Kara, 2022; Sheldon; Basso; Brady, 2021).

A produção de açúcares redutores aumentou progressivamente ao longo do tempo para as formulações contendo pectina a 5% e pectina 4% associada a 0,5% de alginato, mostrando que essas matrizes proporcionaram maior retenção da atividade catalítica da invertase durante o período experimental. Após 90 minutos de reação, as concentrações de açúcares redutores atingiram aproximadamente 0,682 mg mL^{-1} para pectina 5% e 0,878 mg mL^{-1} para a mistura pectina/alginato, indicando que a associação dos dois biopolímeros promoveu maior eficiência na conversão da sacarose em glicose e frutose. Esse comportamento poderia ser explicado pelas propriedades estruturais dos hidrogéis. O aumento da concentração de pectina favoreceria a formação de uma rede tridimensional mais densa, aumentando a estabilidade mecânica das esferas e reduzindo a perda de enzima para o meio reacional. Além disso, a presença de alginato na formulação mista provavelmente promoveu maior densidade de reticulação com íons cálcio, originando uma matriz mais resistente e estável (Meyer; Meyer, Kara, 2022). A formulação contendo apenas 2% de pectina apresentou o menor desempenho catalítico durante praticamente todo o experimento. A concentração de açúcares redutores permaneceu inferior a 0,10 mg mL^{-1} durante a maior parte do período experimental, apresentando inclusive redução entre 15 e 45 minutos. Embora pequenas oscilações sejam esperadas devido às leituras espectrofotométricas, esse comportamento poderia sugerir que hidrogéis contendo menor concentração de polímero apresentariam estrutura menos resistente, favorecendo deformações, aumento da porosidade e possível perda da enzima.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

A formulação contendo 4% de pectina apresentou comportamento intermediário. Apesar da menor produção inicial de açúcares redutores em relação à formulação contendo 5% de pectina, observou-se aumento gradual da atividade ao longo do tempo, atingindo aproximadamente 0,203 mg mL^{-1} após 90 minutos. Esses resultados poderiam sugerir que o aumento da concentração do polímero melhoraria a retenção da enzima, embora ainda não proporcione a mesma estabilidade estrutural observada para hidrogéis mais concentrados ou contendo alginato. Por outro lado, a fórmula composta por 4% de pectina e 0,5% de alginato apresentou o melhor desempenho durante todo o experimento. A produção de açúcares redutores aumentou continuamente desde os primeiros 15 minutos, alcançando aproximadamente 0,878 mg mL^{-1} ao final da reação, valor aproximadamente cinco vezes superior ao observado para o hidrogel contendo apenas 4% de pectina e quase treze vezes superior ao obtido para pectina 2%. Esses resultados indicariam o efeito sinérgico entre os dois biopolímeros na formação do hidrogel. A combinação de pectina e alginato provavelmente originou uma rede polimérica mais homogênea, com melhor distribuição dos poros, favorecendo simultaneamente a retenção da enzima e a difusão da sacarose até o sítio catalítico.

A análise da concentração de proteínas solúveis presentes no filtrado fornece informações adicionais sobre a eficiência da imobilização. Esperava-se que hidrogéis mais eficientes apresentem menor liberação de proteína para o meio reacional, indicando maior retenção da invertase no interior das esferas. Observa-se que o hidrogel contendo 4% de pectina associado a 0,5% de alginato apresentou as menores concentrações de proteína solúvel durante todo o experimento, variando apenas entre aproximadamente 0,017 e 0,027 mg mL^{-1}. Esses valores são cerca de seis a oito vezes inferiores aos observados para a formulação contendo apenas 2% de pectina ao final do experimento, demonstrando elevada eficiência de encapsulamento da enzima. Esse resultado reforça a hipótese de que a combinação entre pectina e alginato aumentaria a estabilidade da matriz polimérica, reduzindo significativamente a perda da invertase. Por outro lado, o hidrogel contendo 2% de pectina apresentou aumento progressivo da concentração de proteínas no meio reacional, atingindo aproximadamente 0,182 mg mL^{-1} após 90 minutos. Esse comportamento indicaria perda contínua da enzima durante a reação, provavelmente decorrente da baixa densidade de reticulação da matriz e da elevada permeabilidade do hidrogel. A perda de enzima explicaria, pelo menos em parte, a reduzida produção de açúcares redutores observada para essa formulação. A formulação contendo 5% de pectina apresentou comportamento intermediário quanto à retenção enzimática. Embora a concentração de proteínas livres tenha permanecido relativamente baixa durante todo o ensaio (0,075–0,111 mg mL^{-1}), os valores ainda foram superiores aos observados para a formulação

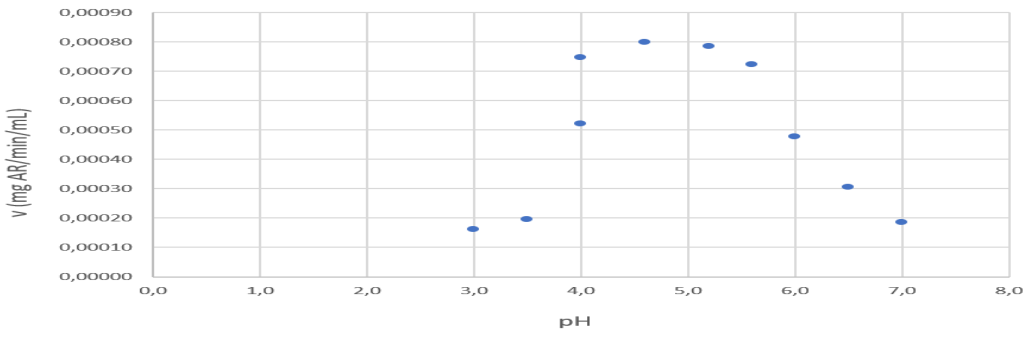
Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

mista contendo alginato. Esses resultados poderiam sugerir que o aumento da concentração de pectina melhoraria a retenção da invertase, porém a presença do alginato proporcionaria efeito adicional na estabilização da matriz.

Um aspecto importante observado nos resultados foi a relação inversa entre concentração de proteína solúvel e produção de açúcares redutores. De maneira geral, as formulações que apresentaram menor perda de proteína foram justamente aquelas que produziram maiores concentrações de glicose e frutose. Essa correlação reforça que a eficiência do sistema imobilizado depende diretamente da capacidade do hidrogel em reter a enzima durante o processo catalítico. Entretanto, deve-se considerar que a proteína quantificada corresponde à proteína total presente na solução, não sendo possível afirmar que toda proteína detectada corresponda exclusivamente à invertase. Dessa forma, a determinação da atividade enzimática residual do filtrado constitui abordagem complementar mais específica para avaliar perdas do biocatalisador (Rodrigues *et al*., 2021).

Os resultados obtidos concordam com a literatura recente, que demonstra que a eficiência da imobilização depende fortemente da composição do suporte, da densidade de reticulação e da estabilidade mecânica da matriz. Além disso, hidrogéis constituídos por misturas de polímeros naturais apresentam maior estabilidade operacional e melhor desempenho catalítico em comparação com sistemas preparados com um único polímero (Sheldon; Basso; Brady, 2021; Meyer; Meyer; Kara, 2022). Em conjunto, os resultados indicam que a formulação contendo 4% de pectina associada a 0,5% de alginato apresentou o melhor desempenho entre os sistemas avaliados, reunindo elevada produção de açúcar invertido e baixa liberação de proteínas para o meio reacional. Esses resultados evidenciam o potencial dessa matriz para aplicações em processos de hidrólise de sacarose utilizando invertase imobilizada.

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



Fonte: do autor

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

A Figura 2 apresenta o perfil da atividade da invertase imobilizada em função do pH. Observa-se que a atividade aumentou progressivamente entre os valores de pH 3,0 e 4,5, atingindo seu máximo valor em pH 4,6, com velocidade de reação próxima de $8,0 \times 10^{-4}$ mg AR min^{-1} mL^{-1}. A partir desse ponto, ocorreu redução gradual da atividade enzimática, tornando-se menores em valores de pH superiores a 6,0. Esse comportamento caracteriza uma curva típica, frequentemente observada para hidrolases glicosídicas, incluindo as invertases de origem microbiana (Alonso-Estrada *et al*., 2024; Manoochehri *et al*., 2020).

O aumento da atividade entre pH 3,0 e 4,6 pode estar relacionado à ionização adequada dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da invertase. A hidrólise da sacarose depende da manutenção do estado de protonação dos resíduos catalíticos, principalmente ácido aspártico e ácido glutâmico, que atuam como doadores e aceptores de prótons durante o mecanismo de catálise. Em valores de pH muito ácidos ou próximos da neutralidade, alterações no estado de ionização desses resíduos comprometem a formação do complexo enzima-substrato e reduzem a velocidade da reação. Embora o mecanismo catalítico tenha sido elucidado em estudos estruturais clássicos, revisões recentes confirmam que esse comportamento permanece característico das invertases utilizadas em aplicações biotecnológicas (Alonso-Estrada *et al*., 2024; Manoochehri *et al*., 2020). O valor de pH ótimo observado neste estudo está de acordo com a literatura para invertases produzidas por *Saccharomyces cerevisiae*, cujo máximo de atividade normalmente é encontrado entre pH 4,0 e 5,0. Estudos recentes envolvendo invertases livres e imobilizadas demonstram que a maioria dessas enzimas mantém elevada atividade em meio levemente ácido, podendo ocorrer pequenos deslocamentos do pH ótimo em função do método de imobilização, da natureza do suporte e das interações entre a enzima e a matriz polimérica (Alonso-Estrada *et al*., 2024; Manoochehri *et al*., 2020).

A redução da atividade em valores de pH superiores a 5,5 pode ser atribuída à modificação do estado de ionização dos grupos funcionais envolvidos na catálise. Em meios menos ácidos ocorre diminuição da protonação dos resíduos catalíticos, reduzindo a eficiência da transferência de prótons necessária para a clivagem da ligação glicosídica da sacarose. Além disso, alterações conformacionais induzidas pelo pH podem modificar a geometria do sítio ativo e diminuir a afinidade da enzima pelo substrato, refletindo na redução da velocidade de reação. Esse comportamento tem sido amplamente descrito em revisões recentes sobre invertases e constitui uma das principais limitações para sua aplicação fora da faixa ótima de pH (Alonso-Estrada *et al*., 2024; Manoochehri *et al*., 2020).

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

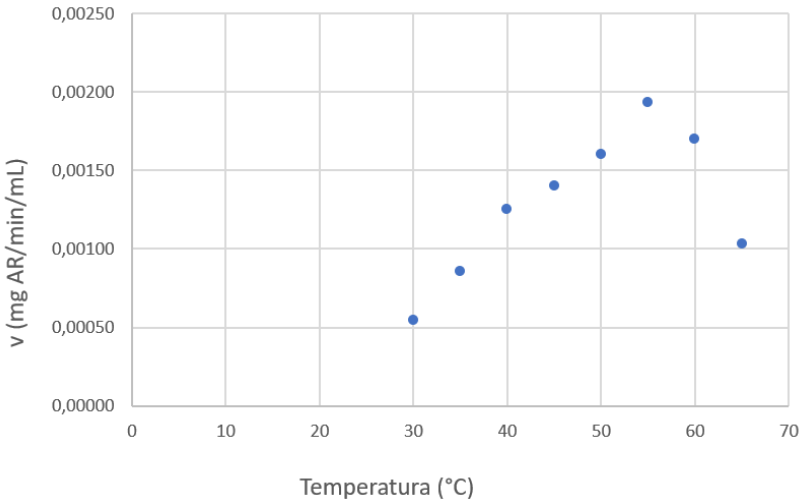
Um aspecto relevante é que a enzima permaneceu ativa em uma faixa relativamente ampla de pH, aproximadamente entre 4,0 e 5,6, mantendo valores próximos ao máximo de atividade. Essa característica é particularmente importante para aplicações industriais, uma vez que pequenas variações de pH durante o processamento dificilmente comprometem significativamente a eficiência catalítica. A ampla faixa operacional é desejável em processos de produção de açúcar invertido, nos quais oscilações no pH do meio podem ocorrer em função da composição da matéria-prima ou das condições operacionais do reator (Manoochehri *et al*., 2020).

A imobilização da invertase provavelmente contribuiu para essa estabilidade operacional. A matriz polimérica pode atuar como um microambiente protetor ao redor da enzima, atenuando as alterações bruscas de pH e reduzindo mudanças conformacionais da proteína. Esse efeito tem sido amplamente demonstrado em estudos recentes sobre imobilização enzimática, nos quais a interação entre a enzima e o suporte aumenta a estabilidade estrutural, melhora a resistência frente às variações ambientais e, em muitos casos, amplia a faixa operacional de pH. No presente estudo, embora não tenham sido avaliadas diretamente a enzima livre e a enzima imobilizada nas mesmas condições, a manutenção de elevada atividade entre pH 4,0 e 5,6 sugere que a matriz de hidrogel exerceu efeito estabilizante sobre a invertase (Sheldon; Basso, Brady, 2021; Liu *et al*., 2021).

Observa-se ainda um aumento acentuado da atividade entre pH 3,5 e 4,0, seguido por um platô entre aproximadamente pH 4,5 e 5,2. Esse comportamento poderia indicar que, após atingir o estado ideal de ionização do sítio catalítico, a enzima mantém elevada eficiência em uma faixa relativamente estreita de acidez antes que a atividade passe a declinar. Esse perfil é consistente com o mecanismo catalítico das invertases e confirma que a determinação experimental do pH ótimo constitui uma etapa fundamental para otimizar processos de hidrólise enzimática da sacarose (Alonso-Estrada *et al*., 2024). Sob o ponto de vista tecnológico, os resultados indicam que a utilização da invertase imobilizada em processos de produção de açúcar invertido deve ser conduzida preferencialmente em torno de pH 4,5–5,0, faixa em que foi observada a maior velocidade de reação. Operar fora dessa condição poderia reduzir significativamente a produtividade do processo, principalmente em valores de pH próximos da neutralidade, nos quais a atividade enzimática foi reduzida em mais de 70% em relação ao valor máximo observado. Além disso, estudos recentes destacam que a elevada estabilidade operacional conferida pela imobilização constitui um dos principais fatores responsáveis pela crescente aplicação industrial de invertases em processos contínuos, biorreatores e sistemas reutilizáveis (Alonso-Estrada *et al*., 2024; Sheldon; Basso, Brady, 2021).

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade da invertase imobilizada.



Fonte: do autor

A Figura 3 apresenta o efeito da temperatura sobre a atividade da invertase imobilizada. Observa-se que a atividade aumentou continuamente entre 30 e 55 °C, atingindo velocidade máxima de aproximadamente 1,94 × 10^{-3} mg AR min^{-1} mL^{-1} a 55 °C. Acima dessa temperatura, verificou-se diminuição gradual da atividade catalítica, com redução para aproximadamente 1,70 × 10^{-3} mg AR min^{-1} mL^{-1} a 60 °C e 1,03 × 10^{-3} mg AR min^{-1} mL^{-1} a 65 °C. Esse comportamento é característico de invertases microbianas empregadas em processos biotecnológicos e tem sido descrito em estudos recentes sobre invertases livres e imobilizadas (Alonso-Estrada *et al*., 2024; Manoochehri *et al*., 2020).

O aumento inicial da atividade enzimática poderia ser explicado pelo efeito da temperatura sobre a energia cinética das moléculas. À medida que a temperatura aumenta, ocorre maior frequência e energia das colisões entre as moléculas de sacarose e os sítios ativos da invertase, favorecendo a formação do complexo enzima-substrato e aumentando a velocidade da reação. Além disso, temperaturas moderadamente elevadas reduzem a viscosidade do meio reacional e aumentam a difusão do substrato através da matriz polimérica do hidrogel, contribuindo para maior eficiência catalítica (Liu *et al*., 2021; Alonso-Estrada *et al*., 2024).

A temperatura ótima observada (55 °C) está de acordo com diversos estudos envolvendo invertases de *Saccharomyces cerevisiae*, nos quais os valores normalmente variam entre 50 e 60 °C, dependendo da origem da enzima, do método de extração e, principalmente, da técnica de imobilização empregada. Revisões recentes demonstram que a imobilização aumenta a

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

estabilidade térmica da invertase e pode deslocar a temperatura ótima para valores ligeiramente superiores aos observados para a enzima livre, preservando sua atividade catalítica durante o processo (Alonso-Estrada *et al*., 2024; Manoochehri *et al*., 2020). A proximidade entre os resultados obtidos neste estudo e aqueles descritos na literatura demonstra que o processo de extração e imobilização preservou adequadamente as propriedades catalíticas da enzima.

Outro aspecto importante é que a atividade permaneceu elevada entre aproximadamente 45 e 60 °C, indicando uma ampla faixa operacional. Essa característica possui grande relevância industrial, pois permite que pequenas oscilações de temperatura durante o processo de produção de açúcar invertido não provoquem perdas significativas de produtividade. Em aplicações industriais, essa robustez operacional representaria uma vantagem importante, reduzindo a necessidade de controle extremamente rigoroso da temperatura e aumentando a confiabilidade do processo (Manoochehri *et al*., 2020).

A redução da atividade observada acima de 55 °C poderia ser atribuída ao início da desnaturação térmica da proteína. Embora o aumento da temperatura continue favorecendo a cinética molecular, a estabilidade estrutural da enzima passa a ser comprometida. Alterações nas estruturas secundária, terciária e quaternária da proteína modificam a conformação do sítio ativo, reduzindo sua afinidade pela sacarose e, consequentemente, diminuindo a velocidade da reação. Assim, acima da temperatura ótima, a velocidade de inativação térmica torna-se superior ao ganho proporcionado pelo aumento da energia cinética, resultando na queda da atividade observada experimentalmente. Esse comportamento tem sido amplamente descrito em revisões recentes sobre estabilidade térmica de enzimas imobilizadas (Sheldon, Basso & Brady, 2021; Liu *et al*., 2021).

A manutenção de atividade relativamente elevada até 60 °C poderia sugerir que a imobilização conferiu maior estabilidade térmica à invertase. A interação entre a enzima e a matriz polimérica restringe parcialmente os movimentos conformacionais responsáveis pela desnaturação, aumentando a resistência da proteína ao aquecimento. Esse efeito estabilizante tem sido amplamente descrito para enzimas imobilizadas em hidrogéis naturais, especialmente alginato e pectina, que proporcionam um microambiente hidratado capaz de preservar a conformação nativa da proteína e prolongar sua estabilidade operacional (Sheldon; Basso, Brady, 2021; Liu *et al*., 2021). Além da estabilização estrutural, a matriz polimérica poderia atuar como uma barreira física que reduz alterações bruscas no microambiente da enzima, diminuindo os efeitos deletérios provocados pelo aumento da temperatura. Esse comportamento explica por que enzimas imobilizadas frequentemente apresentam maior meia-vida térmica e maior estabilidade operacional quando comparadas às suas formas livres. Revisões recentes

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

demonstram que suportes poliméricos naturais apresentam elevada capacidade de proteger a estrutura terciária das enzimas, favorecendo sua reutilização em processos industriais contínuos (Sheldon; Basso, Brady, 2021; Liu *et al*., 2021).

Do ponto de vista cinético, o perfil observado demonstra claramente a existência de dois processos simultâneos e antagônicos. Em temperaturas inferiores ao ótimo predomina o aumento da velocidade catalítica decorrente do incremento da energia cinética das moléculas. Em temperaturas superiores ao ótimo, entretanto, passa a predominar a desnaturação térmica da proteína, reduzindo progressivamente a atividade enzimática. Esse comportamento corresponde ao modelo cinético amplamente aceito para enzimas industriais e continua sendo confirmado por estudos recentes envolvendo biocatalisadores imobilizados (Sheldon, Basso & Brady, 2021; Alonso-Estrada et al., 2024). Sob a perspectiva tecnológica, os resultados indicam que a operação do processo de hidrólise da sacarose utilizando invertase imobilizada deve ser realizada preferencialmente entre 50 e 55 °C, faixa em que foi observada a maior atividade catalítica. A utilização de temperaturas superiores a 60 °C, embora ainda permita atividade residual, tende a reduzir a eficiência do biocatalisador. Esse comportamento está em concordância com os avanços recentes na aplicação industrial de enzimas imobilizadas para a produção de ingredientes alimentícios de alto valor agregado (Sheldon; Basso, Brady, 2021; Manoochehri *et al*., 2020).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que a imobilização da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* em hidrogéis de pectina e alginato constitui uma estratégia eficiente para a produção de açúcar invertido. Entre as formulações avaliadas, o hidrogel contendo 4% de pectina associado a 0,5% de alginato apresentou o melhor desempenho, proporcionando maior produção de açúcares redutores e menor liberação de proteínas para o meio reacional, indicando maior eficiência de retenção da enzima. A invertase imobilizada apresentou máxima atividade em pH 4,6 e temperatura de 55 °C, mantendo elevada atividade em uma ampla faixa de condições operacionais. Em conjunto, os resultados demonstram que a combinação de pectina e alginato representa um suporte promissor para a imobilização de invertase, podendo contribuir para o desenvolvimento de processos mais eficientes e economicamente viáveis para a produção de açúcar invertido. Estudos futuros envolvendo a reutilização das esferas, a estabilidade operacional em múltiplos ciclos e a aplicação em sistemas contínuos poderão ampliar o conhecimento sobre o desempenho desse biocatalisador em escala industrial.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Centro Universitário SENAI São Paulo (UniSENAI-SP), especificamente ao SENAI - Biotecnologia “Dr. Celso Charuri, unidade Bom Retiro, pelo fornecimento de insumos e equipamentos para a realização dos ensaios.

REFERÊNCIAS

AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. Journal of Advanced Research, Cairo, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. Acesso em: 11 jul. 2026.

ALONSO-ESTRADA, D. et al. An overview of the β-fructofuranosidase with a focus on enzyme immobilization. In: Enzymatic Processes for Food Valorization. Amsterdam: Elsevier, 2024. cap. 18. DOI: 10.1016/B978-0-323-95996-4.00018-6. Acesso em: 11 jul. 2026.

BUCHNER, E. Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, Berlin, v. 30, p. 117-124, 1897.

CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products. European Polymer Journal, v. 65, p. 252-267, 2015. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024. Acesso em: 11 jul. 2026.

CAO, L.; LU, W.; MATA, A.; NISHINARI, K.; FANG, Y. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: a review. Carbohydrate Polymers, v. 242, 116389, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116389. Acesso em: 11 jul. 2026.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. Effect of temperature and pressure on yeast invertase stability: a kinetic and conformational study. Journal of Biotechnology, v. 43, n. 3, p. 221-228, 1995. DOI: 10.1016/0168-1656(95)00145-X. Acesso em: 11 jul. 2026.

ÇETINUS, Ş. A.; ÖZTÜRK, B. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. Process Biochemistry, v. 36, n. 11, p. 1081-1083, 2001. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00146-7. Acesso em: 11 jul. 2026.

CONTESINI, F. J.; ALENCAR FIGUEIRA, J. de; KAWAGUTI, H. Y.; BARROS FERNANDES, P. C. de; OLIVEIRA CARVALHO, P. de; GRAÇA NASCIMENTO, M. da; SATO, H. H. Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n. 1, p. 1335-1369, 2013. DOI: 10.3390/ijms14011335. Acesso em: 11 jul. 2026.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech, v. 3, p. 1-9, 2013. DOI: 10.1007/s13205-012-0071-7. Acesso em: 11 jul. 2026.

FACIN, B. R. et al. Immobilization and controlled release of β-galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. Food Chemistry, v. 179, p. 44-51, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.088. Acesso em: 11 jul. 2026.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. FEBS Letters, v. 32, n. 1, p. 195-198, 1973. DOI: 10.1016/0014-5793(73)80770-7. Acesso em: 11 jul. 2026.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Production of isomaltulose obtained by Erwinia sp. cells submitted to different treatments and immobilized in calcium alginate. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 31, n. 1, p. 257-263, jan./mar. 2011. DOI: 10.1590/S0101-20612011000100039. Acesso em: 11 jul. 2026.

KOTWAL, S. M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. Biotechnology Advances, v. 27, n. 4, p. 311-322, 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.009. Acesso em: 11 jul. 2026.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. Progress in Polymer Science, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003. Acesso em: 11 jul. 2026.

LIU, S. et al. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices. International Journal of Biological Macromolecules, v. 190, p. 396-408, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.006. Acesso em: 11 jul. 2026.

MANOOCHEHRI, H. et al. A review on invertase: its potentials and applications. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 29, 101599, 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101599. Acesso em: 11 jul. 2026.

MEYER, J.; MEYER, L. E.; KARA, S. Enzyme immobilization in hydrogels: a perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. Engineering in Life Sciences, v. 22, p. 165-177, 2022. DOI: 10.1002/elsc.202100087. Acesso em: 11 jul. 2026.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochemische Zeitschrift, Berlin, v. 49, p. 333-369, 1913.

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H. et al. Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics and physicochemical properties. Process Biochemistry, v. 50, n. 8, p. 1202-1210, 2015. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.04.015. Acesso em: 11 jul. 2026.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. 8. ed. New York: W. H. Freeman, 2021.

RODRIGUES, R. C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; CARBALLARES, D.; MORELLON-STERLING, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of enzymes via immobilization: multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. Biotechnology Advances, v. 52, 107821, 2021. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107821. Acesso em: 11 jul. 2026.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced Synthesis & Catalysis, v. 349, p. 1289-1307, 2007. DOI: 10.1002/adsc.200700082. Acesso em: 11 jul. 2026.

SHELDON, R. A.; BASSO, A.; BRADY, D. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. Chemical Society Reviews, v. 50, p. 5850-5862, 2021. DOI: 10.1039/D1CS00015B. Acesso em: 11 jul. 2026.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chemical Society Reviews, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. DOI: 10.1039/C3CS60075K. Acesso em: 11 jul. 2026.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology, v. 8, n. 3, p. 71-78, 1990. DOI: 10.1016/0167-7799(90)90139-O. Acesso em: 11 jul. 2026.

VUJČIĆ, Z. et al. Immobilization of cell wall invertase modified with glutaraldehyde for continuous production of invert sugar. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 22, p. 11896-11900, 2010. DOI: 10.1021/jf101836r. Acesso em: 11 jul. 2026.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Hydrolysis of lactose using β-D-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. International Journal of Biological Macromolecules, v. 115, p. 157-164, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.058. Acesso em: 11 jul. 2026.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.