

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI ERECHIM
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ROBERTA CRISTINA DE SOUZA

**IMOBILIZAÇÃO DE *Zymomonas mobilis* EM POLIURETANO PARA PRODUÇÃO
DE ÁCIDO MALTOBIÔNICO E MALTOBIONATO DE SÓDIO E
POTENCIALIDADES DE APLICAÇÃO**

ERECHIM, RS

2021

ROBERTA CRISTINA DE SOUZA

**IMOBILIZAÇÃO DE *Zymomonas mobilis* EM POLIURETANO PARA PRODUÇÃO
DE ÁCIDO MALTOBIÔNICO E MALTOBIONATO DE SÓDIO E
POTENCIALIDADES DE APLICAÇÃO**

**Tese apresentada como quesito para à
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de
Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos, Departamento Ciências Agrárias
da Universidade Regional do Alto Uruguai e
das Missões - URI Erechim.**

Orientadoras: Eunice Valduga

Jamile Zeni

Eloane Malvessi

ERECHIM, RS

2021

ROBERTA CRISTINA DE SOUZA

**IMOBILIZAÇÃO DE *Zymomonas mobilis* EM POLIURETANO PARA PRODUÇÃO
DE ÁCIDO MALTOBIÔNICO E MALTOBIONATO DE SÓDIO E
POTENCIALIDADES DE APLICAÇÃO**

**Tese apresentada como quesito para à
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de
Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos, Departamento Ciências Agrárias
da Universidade Regional do Alto Uruguai e
das Missões - URI Erechim.**

_____, _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Eunice Valduga
Orientadora - URI Erechim

Prof. Dra. Jamile Zeni
Orientadora - URI Erechim

Prof. Dra. Eloane Malvessi
Orientadora - UCS

Prof. Dra. Mirian Salvador
UCS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
UFRGS

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
URI Erechim

Dra. Rosicler Colet
URI Erechim

S729i Souza, Roberta Cristina de

Imobilização de *Zymomonas mobilis* em poliuretano para produção de ácido maltabiônico e maltabionato de sódio e potencialidades de aplicação / Roberta Cristina de Souza. - 2021.

127 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2021.

“Orientação: Prof^ª Dra Eunice Valduga, Prof^ª Dra Jamile Zeni, Por^ª Dra. Eloane Malvessi”

1.Imobilização celular 2. Filmes ativos 3. Antioxidante 4. Estabilidade operacional 5. Ácidos aldônicos I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Gratidão à minha mãe Márcia, pelo amor incondicional;

Ao meu marido e companheiro Diego, pelo amor, alegrias e apoio em todos os dias, noites e madrugadas;

Ao meu pai Jorge e meu irmão Leonardo, pelo carinho e apoio constantes;

Às amigas Morgana De Marco, Sandra Palavicini e Bruna Saorin Puton, que fizeram os dias no laboratório mais leves;

Às amigas de vida Bruna Guardiano, Viviane Maragno e Francieli Kaufmann, pelo ombro amigo e cumplicidade;

Às parceiras de todas as horas Rosicler Colet e Ilissandra Fernandes, pelos conhecimentos, disponibilidade e amizade nos momentos bons e ruins no laboratório;

Aos bolsistas do projeto, em especial ao Leonardo Meirelles, pela dedicação e trabalho;

Às minhas orientadoras Jamile Zeni, Eunice Valduga e Eloane Malvessi, pelo apoio, conhecimentos compartilhados e missões de estudos;

Aos colegas da Universidade de Caxias do Sul (UCS), em especial a Sabrina Carra e Maicon Flores, por terem me recebido e compartilhado seu tempo e conhecimentos, fazendo toda a diferença neste projeto;

À banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições;

Ao grupo Boss, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial ao Professor Rodrigo de Souza e colegas Marcelo Avelar e Laís Duarte, por terem me recebido e proporcionado uma experiência enriquecedora;

Aos Professores Rogério Cansian e Rogério Dallago, pelas contribuições;

Ao Professor Cláudio Zakrzewski, por todas as ajudas com os equipamentos;

Ao Professor Alexander Junges, por ter contribuído com os aparatos experimentais no início desta caminhada;

À Professora Mirian Salvador pela atenção, valiosas contribuições e análises prestadas;

Ao Professor Frances Moreira, pela disponibilidade e análises prestadas;

À Rositânia Frozza e Vera Frozza da Central de Materiais, pelas ajudas prestadas;

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, URI Erechim, por disponibilizar a estrutura física e recursos para a realização deste trabalho;

Às agências de fomento que financiaram a execução deste trabalho, em especial a CAPES e PROCAD;

E à todas as forças do universo...minha gratidão!

*“Locura es hacer lo mismo una y otra vez
esperando obtener resultados diferentes”*

(Albert Einstein)

RESUMO

O ácido maltobiônico é produzido pela ação do complexo enzimático periplasmático glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis* e possui aplicações de interesse industrial como antioxidante, umectante e intensificador de sabor de alimentos temperados. Entretanto, os estudos biotecnológicos para produção e a aplicação deste polihidroxiácido e seus sais são escassos na literatura. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar estratégias de imobilização de células de *Zymomonas mobilis* contendo o complexo enzimático periplasmático GFOR/GL em espuma de poliuretano flexível (PU) e fazer o uso do sistema imobilizado na produção de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio, assim como indicar potencialidades de aplicação em filmes. A imobilização celular foi realizada em espuma de poliuretano flexível por contato, avaliando diferentes tamanhos do suporte e o uso combinado de alginato de cálcio e *in situ*, variando-se as concentrações de poliol, isocianato, silicone e biomassa, frente a atividade enzimática, capacidade de reuso e estabilidade de estocagem a 4 e 22 °C. O sistema imobilizado *in situ* de 0,125 e 0,355 mm foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e submetido à bioconversão de maltose a maltobionato de sódio, variando-se a concentração celular (7,0 - 9,0 g_{imobilizado} L_{meio_reacional}⁻¹); a temperatura (30,54 - 47,46 °C), o pH (5,55 - 7,25) e a concentração de substrato (0,7; 1,0 e 1,3 mol L⁻¹). O ácido maltobiônico e o maltobionato de sódio purificados foram avaliados quanto as atividades antioxidante e antibacteriana (*Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*). O ácido maltobiônico foi avaliado quanto a potencialidade de aplicação em filmes de fécula de mandioca, quitosana e de acetato de celulose. No MEV foi evidenciadas células típicas de *Z. mobilis* aderida no PU. Na imobilização *in situ* (7 g de poliol; 3,5 g de isocianato; 0,02 g de silicone e 7 g de biomassa a 210 g_{célula_seca} L⁻¹) obteve-se atividade enzimática inicial de 19,40 U g_{célula_seca}⁻¹ e 15 reusos, em ensaios de 1 h, utilizando concentração equimolar de glicose/frutose de 0,7 mol L⁻¹. Nos ensaios de bioconversões, a maior produção de maltobionato de sódio foi alcançada utilizando 8,5 g_{célula_seca} L_{meio_reacional}⁻¹ e concentração equimolar de maltose/frutose de 1,0 mol L⁻¹. A máxima concentração de maltobionato de sódio foi de 648,61 mmol L⁻¹, produtividade mássica de 5,05 mmol h⁻¹, produtividade específica de 2,97 mmol g⁻¹ h⁻¹ e velocidade específica de 8,62 mmol g⁻¹ h⁻¹ em 34,34 h de processo, a 39 °C e pH a 6,30. O sistema imobilizado apresentou estabilidade em 19 ciclos operacionais de bioconversão e uma estabilidade de estocagem de 6 meses, a 4 e 22 °C. O ácido maltobiônico, com pureza de 98,1%, apresentou concentração inibitória mínima de 8,5; 10,5; 8,0 e 8,0 mg mL⁻¹ para *S. choleraesuis*, *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. O maltobionato de sódio apresentou atividade antioxidante, expressa pela habilidade quelante de ferro de aproximadamente 50% na concentração entre 15 e 20 mg mL⁻¹. Considerando a incorporação do ácido maltobiônico em filmes de fécula de mandioca ou quitosana na concentração 7,5%, evidenciou-se halos (15,67 a 22,33 mm) de inibição de crescimento microbiano, espessura de 0,17 e 0,13 mm, solubilidade em água de 62,68 e 78,85% e em óleo de 6,23 e 11,91%, respectivamente. Este trabalho fornece informações relevantes para processos de imobilização de *Z. mobilis*, principalmente para a produção de ácido maltobiônico, visto que não há informações na literatura sobre a imobilização *in situ* de *Z. mobilis* em PU. O ácido maltobiônico, com atividade antibacteriana, indicou potencialidade de aplicação em filmes ativos, com importante relevância na área de alimentos.

Palavras-chave: Ácidos aldônicos. Imobilização celular. Estabilidade operacional. Filmes ativos. Antimicrobiano. Antioxidante.

ABSTRACT

Maltobionic acid is produced by the action of the periplasmatic enzyme complex glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucone- δ -lactonase (GL) of *Zymomonas mobilis* and has applications of industrial interest as an antioxidant, humectant and flavor enhancer of seasoned foods. However, biotechnological studies for the production and application of this polyhydroxy acid and its salts are scarce in the literature. Thus, the aim of this work was to evaluate *Zymomonas mobilis* immobilization strategies containing periplasmic enzyme complex GFOR/GL in flexible polyurethane foam (PU) and to use the immobilized system in the production of maltobionic acid and sodium maltobionate, as well as indicating potential applications in films. Cellular immobilization was performed in flexible polyurethane foam by contact, evaluating different support sizes and combined use of calcium alginate and *in situ*, evaluating different formulations of polyol, isocyanate, silicone and biomass, in view of the enzymatic activity, reuse and storage stability at 4 and 22 °C. *In situ* immobilized system of 0.355- and 0.125-mm range was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and submitted to the bioconversion of maltose to sodium maltobionate, varying cell concentration (7.0 - 9.0 g_{immobilized} L_{reaction_medium}⁻¹); process temperature (30,54 - 47,46 °C) and pH (5,55 - 7,25) and substrate concentration (0.7; 1.0 and 1.3 mol L⁻¹). Purified maltobionic acid and sodium maltobionate were evaluated for antioxidant and antibacterial activities (*Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*). Maltobionic acid was evaluated for its potential application in films of cassava starch, chitosan and cellulose acetate. In the SEM, typical *Z. mobilis* cells adhered to the PU were found. *In situ* immobilization (7 g of polyol, 3.5 g of isocyanate, 0.02 g of silicon and 7 g of biomass at 210 g_{dry_cell} L⁻¹) obtained an initial enzymatic activity of 19.40 U g_{dry_cell}⁻¹ and 15 reuses, in 1 h tests, using equimolar glucose/fructose concentration of 0.7 mol L⁻¹. In the bioconversion assays, the highest production of sodium maltobionate was achieved using 8.5 g_{dry_cell} L_{reaction_medium}⁻¹ and equimolar maltose/fructose concentration of 1.0 mol L⁻¹. The maximum sodium maltobionate concentration was of 648.61 mmol L⁻¹, molar productivity of 5.05 0.08 mmol h⁻¹, specific productivity of 2.97 mmol g⁻¹ h⁻¹ and maximum specific production rate of 8.62 mmol g⁻¹ h⁻¹ in 34.34 h of process time, at 39 °C and pH at 6,3. Immobilized biocatalyst showed stability in 19 operational cycles of bioconversion and storage stability of 6 months, at 4 and 22 °C. Maltobionic acid, with 98.1% purity, had a minimum inhibitory concentration of 8.5, 10.5, 8.0 and 8.0 mg mL⁻¹ for *S. choleraesuis*, *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively. Sodium maltobionate showed antioxidant activity, expressed by iron chelating ability of approximately 50% at a concentration between 15 and 20 mg mL⁻¹. Regarding 7.5% maltobionic acid incorporation in films of cassava starch or chitosan in the concentration, there were halos (15.67 to 22.33 mm) of microbial growth inhibition, thickness of 0.17 and 0.13 mm, solubility in water of 62.68 and 78.85% and in oil of 6.23 and 11.91%, respectively. This work provides relevant information for *Z. mobilis* immobilization processes, mainly for maltobionic acid production, since there is no information in the literature on *Z. mobilis in situ* immobilization in PU. Maltobionic acid, with antibacterial activity, indicated the potential for application in active films, with important relevance in the food area.

Keywords: Aldonic acids. Cell immobilization. Operational stability. Active films. Antimicrobial. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do ácido maltobiônico.....	18
Figura 2 - Vias metabólicas de formação de produtos da fermentação de carboidratos por <i>Zymomonas mobilis</i>	28
Figura 3 - Conversão de maltose e frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, respectivamente, via ação catalítica de glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de <i>Zymomonas mobilis</i>	30
Figura 4 - Estrutura molecular de um poliuretano genérico.....	36
Figura 5 - Classificação dos poliuretanos em função da densidade de <i>crosslink</i> e rigidez.	36
Figura 6 - Hipotética estrutura reticulada (<i>crosslinked</i>) de uma espuma de poliuretano flexível a partir de oligo-triol (de 3000-6500 daltons) e um diisocianato.	37
Figura 7 - Hipotética estrutura de alta reticulação de uma espuma de poliuretano rígido.	37
Figura 8 - Etapas da formação de espuma flexível convencional: (a) ar; (b) polioliol, água e aditivos; (c) isocianato; (d) matérias primas; (e) mistura e nucleação; (f) creme e início do crescimento; (g) crescimento; (h) separação de fase, suspiro e geleificação; (i) cura.....	38
Figura 9 – Esquema representativo das estratégias de imobilização celular, do processo de produção e purificação de maltobionato de sódio e ácido maltobiônico e de potencialidades de aplicação.	45
Figura 10 - (a) Sistema para preparo do inóculo; e sistema para produção de biomassa: (b) reator encamisado, (c) banho ultratermostato, (d) Controlador de pH, (e) bomba peristáltica.	47
Figura 11 - Imobilização <i>in situ</i> de células de <i>Zymomonas mobilis</i> : 1. Adição do polioliol e da biomassa. 2. Mistura do polioliol e da biomassa. 3. Adição e mistura do silicone. 4. Adição do isocianato. 5. Polimerização e crescimento da espuma. 6. Cura da espuma.	49
Figura 12 - Sistema para medição de atividade enzimática e de bioconversão.....	52
Figura 13 – Aspecto visual da suspensão de biomassa de <i>Zymomonas mobilis</i>	69
Figura 14 - Dimensões das espumas utilizadas como suporte na imobilização por contato: (a) cubos 125 mm ³ (5 mm de aresta); (b) espumas com mesh 9 (2 mm) e (c) espumas com mesh 16 (1 mm).....	70
Figura 15 - Aspecto visual das espumas de poliuretano flexível contendo células de <i>Z. mobilis</i> imobilizadas por contato, após 12 h: (a) cubos 125 mm ³ (5 mm de aresta); (b) espumas com mesh 9 (2 mm) e (c) espumas com mesh 16 (1 mm).....	70
Figura 16 – Aspectos visuais dos sistemas imobilizados <i>in situ</i> : (a) espumas com características consideradas aceitáveis para uso; e espumas consideradas não aceitáveis para uso por motivo	

de (b) encolhimento, (c) acúmulo de biomassa interna, (d) acúmulo de biomassa externa, (e) desuniformidade, (f) aspecto de escama, (g) seca e rígida e (h) porosidade elevada. (i) Espuma padrão (sem micro-organismo e conforme fabricante).....	72
Figura 17 – Aspecto visual das espumas de poliuretano em cubos (5 mm) (a) isentas de biomassa e (b) com o sistema imobilizado <i>in situ</i> (ensaio 15) antes e após tratamento com glutaraldeído 0,5%.....	74
Figura 18 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do sistema imobilizado <i>in situ</i> - 5.000x e 10.000x.....	80
Figura 19 - Aspecto visual dos sistemas imobilizados <i>in situ</i> com (a) 1, (b) 3, (c) 5, (d) 6, (e) 7, (f) 8, (g) 9 e (h) 10 g de biomassa (210 g L ⁻¹)......	81
Figura 20 – Cinética de produção de maltobionato de sódio em diferentes concentrações de células no meio reacional.	83
Figura 21 - Superfícies de resposta (I) e curva de contorno (II) para (a) tempo de bioconversão, (b) produtividade mássica, (c) produtividade específica e (d) velocidade específica de formação de produto em função da temperatura e pH.....	87
Figura 22 – Cinética de bioconversão de maltobionato de sódio nas condições 39 °C e pH 6,4 empregando o sistema imobilizado <i>in situ</i> com 8,5 g L ⁻¹ de massa celular de <i>Z. mobilis</i>	88
Figura 23 – Cinética de produção de maltobionato de sódio utilizando concentração equimolar de maltose e frutose de 1,0 mol L ⁻¹ e células de <i>Zymomonas mobilis</i> livres (△) e imobilizadas <i>in situ</i> em espuma de poliuretano flexível (Δ), respectivamente.	91
Figura 24 – Estabilidade operacional do sistema imobilizado em ciclos de bioconversão: (a) Produtividade mássica e (b) concentração máxima de maltobionato de sódio e seus respectivos valores residuais.	92
Figura 25 - Estabilidade de estocagem do sistema imobilizado a (a) 22 ± 2 °C e (b) 4 ± 2 °C, expressa em produtividade mássica e valores residuais de produtividade.	95
Figura 26 - Aspecto visual dos produtos de bioconversão (a) maltobionato de sódio e (b) ácido maltobiônico após purificação.....	96
Figura 27 - Perfil da separação cromatográfica da amostra de (a) caldo de bioconversão e (b) maltobionato de sódio purificado.	97
Figura 28 - Aspecto visual de filmes de (a) fécula de mandioca puro, (b) fécula de mandioca incorporado com 7,5% de ácido maltobiônico, (c) quitosana puro e (d) quitosana incorporado com 7,5% de ácido maltobiônico.	102
Figura 29 - Aspecto visual do filme de acetato de celulose puro (a) e incorporado com 2,5% de ácido maltobiônico (b).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes do meio líquido para ativação e conservação de <i>Zymomonas mobilis</i> , obtenção do inóculo e cultivo em biorreator.	46
Tabela 2 - Atividade enzimática e residual após reuso do sistema imobilizado por contato. .	71
Tabela 3 - Atividade enzimática e aspecto visual dos sistemas imobilizados <i>in situ</i> com diferentes concentrações de polioliol, isocianato, silicone e biomassa.	73
Tabela 4 - Perda de massa dos sistemas imobilizados <i>in situ</i> tratados com glutaraldeído 0,5%.	75
Tabela 5 - Aspecto visual e temperatura reacional de formação do suporte variando a concentração de polioliol e isocianato.	76
Tabela 6 - Aspecto visual e descritor do sistema imobilizado <i>in situ</i> para uso do suporte particulado.	77
Tabela 7 - Atividade enzimática, rendimento e estabilidade operacional dos sistemas imobilizados <i>in situ</i> com 5 g de biomassa.	78
Tabela 8 - Atividade enzimática, rendimento e estabilidade operacional dos sistemas imobilizados <i>in situ</i>	81
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioconversão em termos de concentração máxima de maltobionato de sódio ($P_{m\acute{a}x}$); tempo de bioconversão ($t_{bioconv.}$); produtividade mássica (P); produtividade específica (q); maltose final (S_f) e velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p.m\acute{a}x}$), utilizando diferentes concentrações celulares.	83
Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em tempo de bioconversão ($t_{bioconv.}$), produtividade mássica (P), produtividade específica (q) e velocidade específica ($\mu_{p.m\acute{a}x}$), utilizando o sistema imobilizada <i>in situ</i>	85
Tabela 11 - Concentração de maltobionato de sódio ($P_{m\acute{a}x}$), tempo de bioconversão ($t_{bioconv.}$), produtividade mássica (P), produtividade específica (q), residual de maltose (S_f) e velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p.m\acute{a}x}$) empregando diferentes concentrações equimolares de maltose e frutose na produção de maltobionato de sódio.	89
Tabela 12 - Parâmetros de bioconversão em termos de concentração máxima de maltobionato de sódio ($P_{m\acute{a}x}$); tempo de bioconversão ($t_{bioconv.}$); produtividade mássica (P); produtividade específica (q); fator de conversão substrato/produto (Y_{P/S_0}); substrato maltose final (S_f); velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p.m\acute{a}x}$) e atividade enzimática frente a maltose (U_M g _{célula_seca} ⁻¹), utilizando células livres e imobilizadas <i>in situ</i>	90

Tabela 13 - Parâmetros de bioconversão em função do tempo de estocagem do sistema imobilizado <i>in situ</i> , a 22 ± 2 °C.....	94
Tabela 14 - Parâmetros de bioconversão em função do tempo de estocagem do sistema imobilizado <i>in situ</i> , a 4 ± 2 °C.....	94
Tabela 15 – Habilidade quelante do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio em diferentes concentrações.....	98
Tabela 16 – Concentração inibitória mínima (CIM) do maltobionato de sódio e ácido maltobiônico.....	99
Tabela 17 - Atividade antibacteriana de filmes de fécula de mandioca e quitosana incorporados com diferentes concentrações de ácido maltobiônico.	101
Tabela 18 - Solubilidade em água e óleo e aspecto visual de filmes de fécula de mandioca e quitosana incorporados com 7,5% de ácido maltobiônico.	104
Tabela 19 - Análise de variância para tempo de bioconversão, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto em função do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.....	124
Tabela 20 - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para tempo de bioconversão, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto em função de temperatura e pH ótimos.....	125
Tabela 21 – Efeitos estimados de temperatura e pH para tempo de bioconversão, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto em função de temperatura e pH ótimos.....	126

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Ácidos aldônicos e sorbitol	18
3.2 Bioprodução de ácidos aldônicos e sorbitol	22
3.3 <i>Zymomonas mobilis</i> : características e bioprodução de ácidos aldônicos e sorbitol	26
3.4 Imobilização de células e enzimas	32
3.4.1 Imobilização em suporte de poliuretano	35
3.4.1.1 Características e propriedades do polímero	35
3.4.1.2 Imobilização de micro-organismos em espuma de poliuretano para a produção de ácidos aldônicos	39
3.5 Recuperação e purificação de ácidos aldônicos	40
3.6 Aplicação de compostos bioativos em filmes	42
3.7 Estado da arte	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Cultivo de <i>Zymomonas mobilis</i> para produção de biomassa e enzimas	45
4.2 Imobilização celular em espuma de poliuretano flexível	47
4.2.1 Imobilização por contato	48
4.2.2 Imobilização <i>in situ</i>	49
4.3 Rendimento de imobilização	51
4.4 Ensaio de bioconversão	51
4.4.1 Avaliação de diferentes concentrações de células imobilizadas	53
4.4.2 Avaliação de diferentes condições de temperatura e pH	53
4.4.3 Avaliação de diferentes concentrações de substratos	53
4.5 Determinação do desprendimento celular do sistema imobilizado	54
4.6 Estabilidade operacional do sistema imobilizado	54
4.7 Estabilidade de estocagem do sistema imobilizado	55
4.8 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioconversão	55
4.9 Separação e purificação do produto de bioconversão	57
4.10 Conversão de maltobionato de sódio em ácido maltobiónico e cristalização	58

4.11 Aplicação do ácido maltobiônico em filmes a base de fécula de mandioca, quitosana e acetato de celulose	59
4.11.1 Filmes de fécula de mandioca	59
4.11.2 Filmes de quitosana.....	60
4.11.3 Acetato de celulose.....	60
4.11.4 Avaliação visual e espessura dos filmes	60
4.11.5 Solubilidade dos filmes	61
4.12 Atividade antibacteriana do ácido maltobiônico, do maltobionato de sódio e dos filmes incorporados com ácido maltobiônico	61
4.13 Atividade antioxidante do ácido maltobiônico e do maltobionato de sódio	62
4.13.1 Método do radical DPPH	62
4.13.2 Método do radical ABTS ^{•+}	63
4.13.3 Habilidade quelante.....	64
4.14 Metodologia analítica	64
4.14.1 Determinação da concentração celular.....	64
4.14.2 Atividade enzimática.....	65
4.14.3 Determinação de açúcar redutor.....	66
4.14.4 Determinação de sorbitol	66
4.14.5 Análise cromatográfica do maltobionato de sódio.....	67
4.14.6 Análise de microscopia eletrônica de varredura do sistema imobilizado	67
4.14.7 Análise textural do sistema imobilizado	67
4.15 Tratamento estatístico	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 Biomassa de <i>Zymomonas mobilis</i> e complexo enzimático GFOR/GL	69
5.2 Imobilização de <i>Zymomonas mobilis</i> e complexo enzimático em espuma de poliuretano	70
5.2.1 Imobilização por contato.....	70
5.2.2 Imobilização <i>in situ</i>	72
5.3 Bioconversão de maltose em maltobionato de sódio	82
5.3.1 Definição da concentração celular na bioconversão	82
5.3.2 Definição de temperatura e pH no processo reacional de bioconversão.....	83
5.3.3 Definição da concentração de substrato na bioconversão	89
5.4 Estabilidade operacional	92
5.5 Estabilidade de estocagem	94

5.6 Purificação e conversão de maltobionato de sódio em ácido maltobiônico	96
5.5 Atividade antioxidante de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio	97
5.6 Atividade antibacteriana de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio	99
5.7 Filmes incorporados com ácido maltobiônico	100
6 CONCLUSÕES.....	106
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	108
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
APÊNDICE	123
APÊNDICE A – Definição de temperatura e pH no processo reacional de bioconversão	124

1 INTRODUÇÃO

A produção de ácidos aldônicos, como ácido maltobiônico, ácido glicônico e ácido lactobiônico, assim como seus respectivos sais, por rota enzimática apresenta inovações tecnológicas, caracterizadas por tecnologias limpas, de menor consumo energético e de reduzida geração de resíduos de processo, quando comparadas com as via químicas, eletroquímicas ou catalíticas (CAÑETE-RODRÍGUEZ et al., 2016; MINAL et al., 2017).

Os ácidos aldônicos, denominados por serem ácidos de açúcar obtidos pela oxidação do grupo aldeído de uma aldose a ácido carboxílico, e seus sais podem ser produzidos pela ação enzimática de micro-organismos ou suas enzimas purificadas (GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012; ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013a; CAÑETE-RODRÍGUEZ et al., 2016; MINAL et al., 2017).

Na literatura há relatos de utilização de carboidrato oxidases, como lactose oxidase e glicose oxidase de *Pseudomonas taetrolens* (ALONSO, RENDUELES E DÍA, 2011, 2013a,b,c, 2015a, 2017), *Burkholderia cepacia* (MURAKAMI et al., 2002, 2003, 2006), *Acetobacter orientalis* (MUKHOPADHYAY et al., 2005; KIRYU et al., 2012), *Microdochium nivale* (HUA et al., 2007; NORDKVIST; NILESEN; VILLADSEN, 2007), e do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*, complexo este presente no periplasma celular (SATORY et al., 1997; MALVESSI et al., 2010; CARRA, 2012; MALVESSI et al., 2013; DELAGUSTIN et al., 2017; FOLLE et al., 2018, FLORES, 2019).

As condições de um processo biotecnológico, como temperatura, pH, agitação, modo de operação, preparo do biocatalisador e substratos utilizados devem ser avaliados objetivando a otimização do processo, a ampliação de escala e futuras aplicações de produção industrial. Nesta área de estudo, o preparo do biocatalisador (micro-organismo e enzimas) recebe destaque, devido as possibilidades de ampliação das aplicações, através da imobilização celular.

Normalmente, estes estudos são realizados com células microbianas livres ou imobilizadas em poucos tipos de suportes, oportunizando a exploração do uso de outros materiais para a imobilização. Na literatura há relatos de imobilização celular, visando a produção de ácidos aldônicos, com alginato de cálcio (CHUN; ROGERS, 1988; BERTASSO et al., 1996; MALVESSI et al., 2010; FOLLE et al., 2018; CARRA et al., 2020), esferas magnéticas de quitosana (YANG et al., 2021), k-carragena (REHR; WILHEM; SAHM et al., 1991; JANG et al., 1996), espuma de poliuretano (KOEHNTOPP et al., 1996;

MUKHOPADHYAY et al., 2005), membrana de fibra oca (FERRAZ; BORGES; ALVES, 2000) e bucha vegetal (VIGNOLI et al., 2006), objetivando uma maior estabilidade, facilidade de separação do meio reacional e a possibilidade de reutilização. Porém, não há informações da imobilização *in situ* de *Z. mobilis* em espuma de poliuretano flexível, salvo um estudo preliminar imobilizando-a *in situ* em pré-polímeros de expansão livre (KOEHNTOPP et al., 1996). O poliuretano é um suporte em potencial, destacando-se pela sua facilidade de preparo, versatilidade de síntese, durabilidade e baixo custo.

Os ácidos aldônicos possuem propriedades para a aplicação em distintas áreas, como alimentos, farmacêutica, biomédica, química, têxtil etc. Na área de alimentos, o ácido maltobiônico pode ser usado como agente acidificante (MIYAKE, SATO; 1975), intensificador de sabor (YUEN, 1974) e agente antioxidante (NIELSEN, 2010). Todavia, o estudo das propriedades do ácido maltobiônico e a sua aplicação apresentam relevantes oportunidades de investigação, pois a maioria das pesquisas são aplicadas no campo farmacêutico e de cosméticos, resultando em lacunas na área de alimentos, como a aplicação em filmes com propriedades ativas.

Desta maneira, avaliar estratégias de imobilização de células/enzimas de *Z. mobilis* em poliuretano para a maximização da produção de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio, assim como indicar potencialidades de aplicação destes produtos apresentam inovações tecnológicas e relevância para distintas áreas.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar estratégias de imobilização de células de *Zymomonas mobilis* contendo o complexo enzimático periplasmático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) em espuma de poliuretano flexível e fazer o uso do sistema imobilizado na produção de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio, assim como indicar potencialidades de aplicação em filmes.

2.2 Objetivos específicos

- investigar estratégias de imobilização de células *Z. mobilis* contendo o complexo enzimático GFOR/GL em espuma de poliuretano flexível pelas técnicas *in situ* e por contato;
- avaliar a atividade enzimática do sistema imobilizado obtido;
- maximizar a bioconversão de maltose em maltobionato de sódio;
- determinar a estabilidade operacional e de estocagem do sistema imobilizado, visando a bioconversão de maltose em maltobionato de sódio;
- converter maltobionato de sódio em ácido maltobiônico;
- avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio purificados;
- realizar um estudo preliminar de aplicação do ácido maltobiônico, incorporando-o em filmes e caracterizando-os em relação ao aspecto visual, espessura e solubilidade;
- avaliar a atividade antibacteriana dos filmes obtidos, indicando potencialidades de aplicação como filmes ativos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

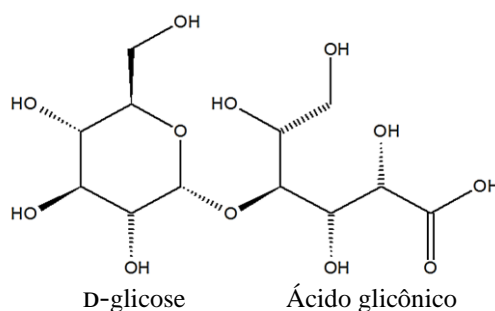
Esta revisão bibliográfica abordou os principais aspectos relacionados à produção, propriedades e aplicações dos ácidos aldônicos e do sorbitol, assim como dos micro-organismos utilizados para a obtenção destes produtos, com destaque para o ácido maltobiônico e a produção por *Z. mobilis*. Além disso, destacaram-se os métodos de imobilização celular e de enzimas com diferentes micro-organismos/enzimas para a produção de ácidos aldônicos e seus respectivos sais, assim como, a aplicação de compostos bioativos em filmes para uso em alimentos. Devido à escassez de informações sobre o ácido maltobiônico, os ácidos glicônico e lactobiônico e a sua biocatálise foram referenciados, oferecendo suporte a esta pesquisa. O sorbitol foi igualmente abordado, pois é produzido concomitantemente ao ácido maltobiônico pela via metabólica de *Z. mobilis*, conforme apresentado nesta revisão bibliográfica.

3.1 Ácidos aldônicos e sorbitol

Os ácidos aldônicos ou ácidos biônicos são ácidos de açúcar obtidos pela oxidação do grupo aldeído de uma aldose, como maltose, glicose e lactose, a ácido carboxílico. Entre esses ácidos destacam-se o ácido maltobiônico, glicônico e lactobiônico, assim como os seus sais (GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012; ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013a; CAÑETE-RODRÍGUEZ et al., 2016; MINAL et al., 2017).

O ácido maltobônico ($C_{12}H_{22}O_{12}$) ou ácido 4-O- α -D-glicopiranosil-D-glicônico é composto por uma unidade de D-glicose quimicamente ligada a uma molécula de ácido glicônico (Figura 1), integra o grupo da terceira geração dos hidroxiácidos e possui massa molecular de $358,3 \text{ g mol}^{-1}$ (NEOSTRATA COMPANY, 2010; OPEN CHEMISTRY DATABASE, 2021).

Figura 1 - Estrutura molecular do ácido maltobiônico.



Fonte: Flores (2019).

O estudo da aplicação e propriedades do ácido maltobiônico e seus sais ainda é escassa na literatura. Na área de alimentos, Miyake e Sato (1975) estudou o uso de ácido maltobônico em produtos alimentício, ao qual é adicionado de maneira única ou acrescida de outros compostos usuais, como ácido cítrico e ácido acético, para proporcionar um sabor ácido em maionese, suco de laranja e produtos açucarados (*candy*).

Yuen (1974) verificou que o ácido maltobiônico melhora ainda mais o sabor do alimento temperado com glutamato monossódico ou com misturas destes com inosinato de sódio e/ou guanilato de sódio, mas é também um agente de tempero útil quando utilizado sozinho, sendo os seus efeitos potencializados pela presença simultânea de maltose. Em um painel de provadores treinados, houve preferência de salada, sopa e macarrão tipo *somen* temperados com ácido maltobiônico. Segundo o autor, resultados promissores foram obtidos em testes realizados em alimentos prontos para consumo e alimentos que exigem cozimento ou outros tratamentos térmicos, como sopa instantânea, presunto, salsichas e outros produtos cárneos, peixe fresco e enlatado, ketchup de tomate, geleia de frutas e doces.

O ácido maltobiônico apresenta também ação antioxidante, impedindo reações de oxidação em rações ou alimentos. Um processo enzimático pode ser integrado no processo de produção, transformando o amido ou maltose naturalmente presentes em maltobionato, ou alternativamente, adicionando-o ao alimento ou produto final (NIELSEN, 2010). A atividade antioxidante também é relatada na área de cosméticos (BRIDEN; GREEN, 2005; GREEN; SCOTT; YU, 2010; BROUDA et al., 2010; NEOSTRATA COMPANY, 2010).

A produção de maltobionato integrado no processo de produção de alimentos, através da adição de uma oxidoredutase ou uma desidrogenase foi aplicada na produção de cerveja e de *snacks*. Este processo pode ser ou não precedida por uma reação de degradação do amido, catalisada, por uma amilase fornecida endógena ou exogenamente. Na produção de cerveja a conversão de maltose em maltobionato ocorre preferencialmente na etapa de sacarificação (degradação de amido) entre 55 e 66 °C. Na produção de *snacks*, caracterizado por ter um elevado teor de amido, as enzimas podem ser adicionadas juntamente com os ingredientes naturais, podendo, até certo ponto, substituir o uso de antioxidantes convencionais, tais como ácido ascórbico, bromato de potássio, iodato de potássio, azodicarbonamida (ADA) ou persulfato de amônio (NIELSEN, 2010).

A caracterização do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio obtidos da bioconversão de maltose, utilizando células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, foi realizada por Flores (2019). Segundo o autor, o ácido maltobiônico é um ácido fraco, com constante de dissociação ácida (pK_a) de 3,54, é solúvel em água (3,3 g 100 mL⁻¹, 22 °C), possui

poder rotatório específico ($[\alpha]_D^{20}$) de $+83,2^\circ$ e ponto de fusão de $97,3^\circ\text{C}$. O maltobionato de sódio é pouco solúvel em água ($0,22\text{ g } 100\text{ mL}^{-1}$), apresenta um $[\alpha]_D^{20}$ de $+93,43^\circ$ e ponto de fusão de 87°C . Ressalta-se que esses produtos não apresentam padrões primários comerciais.

Na literatura especializada também são poucos os estudos referentes à bioprodução de ácido maltobiônico (STODOLA; LOCKWOOD, 1947; KLUYVER; DE LEY; RIJVEN, 1951; MEIBERG; BRUINENBERG; SLOOTS, 1990; MALVESSI, 2008; NIELSEN, 2010; GARIN, 2016; MAO et al., 2018; FLORES, 2019; OH et. al., 2020).

Em contra partida, o processo de biotransformação do ácido glicônico é relatado em artigos científicos há décadas, por micro-organismos (fungos ou bactérias) ou suas enzimas, como glicose oxidase e glicose desidrogenase (REHR; WILHEM; SAHM, 1991; ERZINGER et al., 2003; MUKHOPADHYAY et al., 2005; MALVESSI et al., 2010; HUSTEDE; HABERSTROH; SCHINZIC, 2012) e é produzido em escala industrial, sendo empregados os micro-organismos *Aspergillus niger* e *Gluconobacter suboxydans* (HUSTEDE; HABERSTROH; SCHINZIC, 2012).

O ácido glicônico apresenta fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$, massa molecular $196,16\text{ g mol}^{-1}$ e é um ácido fraco, não volátil, não tóxico, solúvel em água, insolúvel em solventes não polares e facilmente biodegradável (RAMACHANDRAN et al., 2006; HUSTEDE; HABERSTROH; SCHINZIC, 2012; CAÑETE-RODRÍGUEZ et al., 2016). Este ácido e seus sais apresentam aplicações na indústria de alimentos, como acidulante, agente de firmeza e estabilizante, sendo considerado seguro para consumo (GRAS – *Generally Recognized as Safe*), pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2021).

Igualmente ao ácido glicônico, diversos processos são investigados para a produção de ácido lactobiônico, tais como oxidação catalítica, química, eletroquímica, biocatalítica e heterogênea (GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012; ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013a). Porém, a produção industrial do ácido lactobiônico por biocatálise ainda não é relatada na literatura especializada. Stodola e Lockwood (1947) referiram pela primeira vez a bioprodução do ácido lactobiônico e realizaram uma ampla triagem de espécies de *Pseudomonas*, evidenciando a capacidade dessas bactérias de oxidar a lactose e produzir este ácido.

Na literatura especializada há diversos estudos referentes à bioprodução de ácido lactobiônico (STODOLA; LOCKWOOD, 1947; KLUYVER; DE LEY; RIJVEN, 1951; MEIBERG; BRUINENBERG; SLOOTS, 1990; MIYAMOTO; OOI; KINOSHITA, 2000; HUA et al., 2007; NORDKVIST; NILESEN; VILLADSEN, 2007; KIRYU et al., 2012; ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2011, 2012, 2013b, 2015a, 2017; MURAKAMI et al., 2003,

2006; MALVESSI et al., 2006a, 2013; PEDRUZZI; SILVA; RODRIGUES, 2011; CARRA, 2012; ZAGONEL, 2013; GODERSKA et al., 2015; GARIN, 2016; DELAGUSTIN et al., 2017; FOLLE et al., 2018; MAO et al., 2018; CARRA et al., 2020).

O ácido lactobiônico é composto por uma unidade de galactose quimicamente ligada por um éter a uma molécula de ácido glicônico (BUDAVARI et al., 1996). Este ácido possui propriedades físicas muito semelhantes ao ácido maltobiônico, consistindo em um pó branco, cristalino, com massa molecular de 358,3 g mol⁻¹, fórmula molecular C₁₂H₂₂O₁₂, ponto de fusão de 115 °C, sendo solúvel em água e ligeiramente solúvel em ácido acético glacial, em etanol anidro e metanol (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

As aplicações do ácido lactobiônico e seus sais nas indústrias de alimentos, medicamentos, farmacêutica, cosmética e química são diversas, devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, propriedades quelantes, anfífilas e antioxidantes (TASIC-KOSTOV et al., 2012; GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012; ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013a; GODERSKA, 2019).

Na indústria de alimentos, o ácido lactobiônico ou os seus sais podem servir como agente de firmeza em produtos de sobremesa (lactobionato de cálcio, FDA, 2021); agente acidificante em produtos lácteos fermentados (ácido lactobiônico, FAERGEMAND; GILLELADEN; QVIST, 2012); inibidor do envelhecimento para o pão (ácido lactobiônico, OE; KIMURA, 2011); na suplementação de cálcio em novas bebidas não lácteas, bebidas à base de leite e queijos (lactobionato de cálcio, BALDWIN et al., 2007; NIELSEN; VILLADSEN, 2007; NIELSEN; HOEIER, 2009); ser também adicionado diretamente (10% da mistura) ou indiretamente (uma lactose oxidase adicionada), visando melhorar os rendimentos de produção, reduzir o tempo de processamento e os custos com ingredientes na fabricação de queijo, incluindo queijos cremosos e queijos duros (lactobionato de cálcio e ácido lactobiônico, KOKA et al., 2005). O leite funcional contendo ácido lactobiônico, que pode ajudar a combater a deficiência de cálcio, foi lançado no mercado de alimentos por uma empresa de laticínios japonesa, 'Megmilk Snow' (MINAL et al., 2017).

Além disso, é relatado o uso de ácido lactobiônico devido a propriedades funcionais e atributos sensoriais, através da redução dos efeitos da Reação de Maillard indesejável em queijos (MERRILL; SINGH, 2011); como intensificador de sabor para alimentos ou bebidas (WALTER; BEGLI, 2011); como elemento-chave para retardar a oxidação lipídica em produtos alimentícios, como por exemplo óleos poli-insaturados, apresentando efeito sinérgico com sideróforos (BALDWIN et al., 2009); como agente de capacidade de retenção de água em

produtos cárneos submetidos a processos de descongelamento e/ou cozimento, resultando em maiores rendimentos de produtos industriais e conteúdo de água após o tratamento dos produtos cárneos com ácido lactobiônico (NIELSEN, 2009). Ainda, tem sido proposto como um aditivo tecnológico de rações para aves de postura para melhorar as qualidades da casca do ovo, aumentando a absorção de cálcio (KIMURA, 2006).

Mais recentemente, Marques et al. (2020) estudaram o ácido lactobiônico, como conservante de sucos e bebidas por suas capacidades como acidulante e antioxidante. Os autores afirmaram que 1% de ácido lactobiônico e 10 min de branqueamento a vapor das raízes do yacon mantiveram os compostos bioativos no suco de yacon durante o armazenamento (8 °C, 48 h), reduziu seu pH a um nível desejável e que aproximadamente 80% das polifenoloxidasas foram desativadas pelo ácido lactobiônico, mantendo a cor do suco.

Com relação ao sorbitol, este apresenta fórmula molecular $C_6H_{14}O_6$, massa molecular de $182,2 \text{ g mol}^{-1}$ e é amplamente encontrado na natureza, em várias espécies vegetais, principalmente em frutas como pêra, maçã, pêssego e ameixa. Este poliálcool consiste em um pó branco, cristalino com ponto de fusão de 90 a 96 °C, sendo muito solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol 96% (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). A produção industrial de sorbitol é tradicionalmente realizada por hidrogenação catalítica de xarope de D-glicose com uso de catalisadores de níquel sob condições de alta temperatura e pressão. Todavia, a rota biotecnológica é também estudada na literatura (SILVEIRA; JONAS, 2002; MALVESSI, 2008; PARK et al., 2016).

O sorbitol é aplicado na indústria de alimentos como edulcorante e substituto do açúcar para alimentos diabéticos e para itens sem açúcar e não cariogênico, como chocolates, bebidas, tabletes e chicletes, sendo também utilizado como condicionador de umidade, inibidor da cristalização de açúcares e para soluções de infusão utilizadas na nutrição parenteral (BIRKHED et al., 1984; BUDAVARI et al., 1996; SILVEIRA; JONAS, 2002; JONAS; SILVEIRA, 2004; SCHIWECK et al., 2011).

3.2 Bioprodução de ácidos aldônicos e sorbitol

A bioprodução de ácidos aldônicos e de sorbitol são sumarizados, em artigos de revisão bibliográfica, via diversos micro-organismos ou suas enzimas purificadas, sendo os principais citados *Pseudomonas* sp, *B. cepacia*, *M. nivale*, *A. niger*, *A. orientalis* e *Z. mobilis*, com destaque para esta última (SILVEIRA; JONAS, 2002; RAMACHANDRAN et al., 2006;

GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012; ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013a; CAÑETE-RODRÍGUEZ et al., 2016; MINAL et al., 2017).

Em processos biotecnológicos, a realização de um estudo cinético para a obtenção da constante de Michaelis-Menten (K_M) revela a afinidade das enzimas em relação as aldoses utilizadas como substrato, comportamento este que influencia diretamente os ensaios de bioprodução. Malvessi (2008), utilizando células permeabilizadas de *Z. mobilis* livres, em solução equimolar de maltose e frutose a $0,7 \text{ mol L}^{-1}$, a 39 °C e pH 6,4, obteve um K_M de 2 mol L^{-1} , superior ao substrato glicose ($K_M = 0,68 \text{ mol L}^{-1}$), comprovando a maior afinidade das enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Z. mobilis* pela aldose glicose. Igualmente investigando *Z. mobilis*, Garin (2016) relatou um K_M de $0,19 \text{ mol L}^{-1}$ para maltose, e Carra (2012) descreveu um valor de K_M de $0,019 \text{ mol L}^{-1}$ para o par glicose/frutose, em ensaios realizados nas mesmas condições.

Outros estudos cinéticos foram também realizados. A oxidação da lactose a ácido lactobiônico pela ação da enzima carboidrato oxidase purificada do fungo *M. nivale* foi estudada por Nordkvist, Nilesen e Villadsen (2007), em um processo em batelada, a 38 °C , pH 6,4 e com 98% de conversão. O valor de K_M para lactose obtido no ensaio enzimático foi de $0,066 \text{ mmol L}^{-1}$, valor este, segundo os autores, significativamente inferior aos obtidos para outras enzimas capazes de oxidar lactose a ácido lactobiônico, tais como K_M de $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ com glicose-frutose oxidoreductase de *Z. mobilis* (SATORY et al., 1997), 11 mmol L^{-1} com lactose desidrogenada de *Pseudomonas graveolens* (NISHIZUKA; HAYAISHI, 1962), $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ com celobiose desidrogenase de *Sclerotium rolfsii* (LUDWIG et al., 2004) ou 97 e $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ com hexose oxidase de *Chondus crispus*, relatados por Savary, Hicks e O'Connor (2001) e Groen, De Wries e Duine (1997), respectivamente.

Considerando os estudos de bioprodução de ácidos aldônicos, Stodola e Lockwood (1947) investigaram a capacidade de várias espécies de *Pseudomonas* em metabolizar lactose e maltose. Os autores destacaram a *P. graveolens*, devido a capacidade de oxidar lactose a lactobionato de cálcio e maltose a maltobionato de cálcio, com rendimentos de 75 e 77%, em 165 e 50 h, respectivamente. *P. fragi* também oxidou maltose em uma boa taxa, porém, de acordo com os autores, isto poderia estar ocorrendo não exclusivamente pela formação dos ácidos aldônicos, visto os altos valores de cálcio utilizados para neutralizar a formação do ácido, ainda presentes no meio. Estes processos foram conduzidos em tambores rotativos 9,5 rpm e a 25 °C .

Alguns anos depois, Kluyver, De Ley e Rijven (1951) estudaram o crescimento também de espécies de *Pseudomonas* e formação de ácido maltobiônico. Os autores destacaram a cepa

de *Pseudomonas quercito-pyrogallica*, que em um meio com 10% maltose, a 30 °C e com adições de carbonato de cálcio, apresentou o seguinte comportamento: nos primeiros dias foi observado que a quantidade de cálcio dissolvido foi inferior a quantidade de maltose consumida, indicando que parte da maltose foi metabolizada em uma outra conversão, que não a de uma oxidação em ácido maltobiônico. Após 8 dias de processo, esta discrepância não foi mais observada e o autor afirmou ter ocorrido uma conversão de 68% maltose em ácido maltobiônico (na forma de maltobionato). Mas, após 23 dias ocorreu o consumo deste produto formado, sugerindo que possa ter sido dividido em gliconato e glicose, sendo esta última novamente oxidada, devido ao novo consumo de cálcio.

Algumas década depois, Meiberg, Bruinenberg e Sloots (1990) estudaram a produção de ácido maltobiônico e lactobiônico por *P. cepacia*, em batelada alimentada, a 30 °C, pH 7 ajustado com hidróxido de sódio (NaOH), em meio sintético contendo lactose (560 g L⁻¹) e glicose (10 g L⁻¹) ou maltose (600 g L⁻¹) e glicose (30 g L⁻¹), e relataram uma conversão de 85 e 72% em ácido lactobiônico e ácido maltobiônico (na forma de sais de sódio), em 50 e 72 h de processo, respectivamente.

Alonso, Rendueles e Díaz (2011) também avaliaram a produção de ácido lactobiônico, porém com soro de leite (100 mL, diluído em água destilada 1:1 v/v), em cultivo de *P. taetrolens*, a 30 °C e com o pH do cultivo em 6,5, controlado com NaOH. Segundo os autores, foram obtidos 42,4 g L⁻¹ de ácido lactobiônico, em 32 h de processo em batelada e 100% de conversão. Valores semelhantes foram relatados por Alonso, Rendueles e Díaz (2012).

Complementarmente, Alonso, Rendueles e Díaz (2013b) estudaram diferentes modos operacionais e concentrações de substrato, a 30 °C, com *P. taetrolens* e condição de controle de pH das pesquisas anteriores, e observaram 78,4 g L⁻¹ de ácido lactobiônico em batelada com soro de leite concentrado por microfiltração (1 L), em 48 h, com 100% de conversão. Em batelada alimentada com soro de leite concentrado (4,2 mL h⁻¹, concentrado com microfiltração), em batelada alimentada com multipulsos de solução de lactose concentrada (0,1 L de lactose a 275 g L⁻¹) e em batelada alimentada com soro de leite diluído (4,2 mL h⁻¹, diluído em água destilada 1:1 v/v) relataram as quantidades de ácido lactobiônico de 148 g L⁻¹ em 72 h, 144 g L⁻¹ em 80 h e 81 g L⁻¹ em 72 h, e conversões de 82, 94 e 90%, respectivamente.

Na continuação de suas investigações, Alonso, Rendueles e Díaz (2015a) reportaram a obtenção de ácido lactobiônico, também com *P. taetrolens*, em um sistema de substratos combinados em batelada alimentada (16,8 mL h⁻¹ ou 3,36 g L⁻¹ h⁻¹), porém empregando soro do leite juntamente com glicose, glicerol ou lactose (200 g L⁻¹, 0,1 L). Diferentes substratos empregados juntamente com o soro de leite, resultaram em diferentes comportamentos ao final

da fermentação realizada por *P. taetrolens*, a 30 °C e pH 6,5. Utilizando-se soro de leite e glicose, o resultado da fermentação foi a produção simultânea de ácido lactobiônico (78 g L⁻¹) e glicônico (8,8 g L⁻¹), com 98% de conversão total de substratos a ácidos aldônicos. Com o uso de soro do leite com glicerol, maior biomassa foi obtida em detrimento do ácido lactobiônico (65 g L⁻¹) formado, com 82% de conversão. E, utilizando soro do leite e lactose, a fermentação resultou em maior quantidade de ácido lactobiônico (100 g L⁻¹) formado, com 100% de conversão.

Mais recentemente, Alonso, Rendueles e Díaz (2017), em condições otimizadas e em batelada com permeado de soro de leite (1 L, diluído em água destilada 1:1 v/v) relatam a produção de aproximadamente 49 g L⁻¹ de ácido lactobiônico em menor tempo (24 h), com 98% de bioconversão, quando conduzidos a temperatura de 28 °C e pH 6,5, com *P. taetrolens*.

O soro de leite desproteínizado (1 L, contendo 9,5% de lactose e 0,5% de glicose) foi utilizado também como substrato para a obtenção de ácido glicônico, utilizando o fungo *A. niger*, em batelada a 30 °C e pH 6 (MUKHOPADHYAY et al., 2005). Os autores declararam a obtenção de 69 g L⁻¹ de ácido glicônico em aproximadamente 48 h e cerca de 60% de conversão. O mesmo micro-organismo quando imobilizado por contato em espuma de poliuretano rígida produziu, no mesmo período de processo, 92 g L⁻¹ de ácido glicônico.

Outros micro-organismos foram investigados para a produção de ácidos aldônicos. O estudo de Murakami et al. (2002), a partir de uma seleção de micro-organismos do solo evidenciou uma cepa de *B. cepacia* N° 216 que oxidou lactose e acumulou ácido lactobiônico no meio, na presença de oxigênio e na ausência de outros aceptores de hidrogênio. Este resultado sugeriu que o oxigênio funcionou como um aceptor de hidrogênio na reação, sendo a enzima classificada como uma oxidase. Embora, tenha oxidado a lactose, maltose e outras aldoses, a D-glicose foi o substrato mais eficiente para a enzima, o que sugeriu que a mesma era uma glicose oxidase.

Esta mesma linhagem selvagem (*B. cepacia* N° 216) foi comparada com uma linhagem mutante (*B. cepacia* N° 24) na bioprodução de ácido lactobiônico, a 28 °C, pH 7, em dois modos de operação, obtendo 100% de conversão. No modo batelada, com lactose a 150 g L⁻¹, o metabolismo da linhagem selvagem produziu 150 g L⁻¹ de ácido lactobiônico, em 10 dias de processo, frente a 200 g L⁻¹ em 4 dias da linhagem mutante. No modo batelada alimentada, após seis alimentações de solução de lactose (80 g L⁻¹), a partir de 24 h de cultivo, o processo de bioconversão da linhagem *B. cepacia* N° 24 resultou em 400 g L⁻¹, em 10 dias de processo (MURAKAMI et al., 2003).

Adicionalmente, Murakami et al. (2006) otimizaram as condições de processo em pH 7, a 30 °C, com 15% (m/v) de lactose e 2 U mL⁻¹ de células. Segundo os autores, o processo em batelada, a partir da linhagem mutante *B. cepacia* N° 24, obteve uma conversão de 100% e uma produção de 150 g L⁻¹ de lactobionato de cálcio, em 27 h de processo. Os autores observaram, também, que as células obtidas se mostraram estáveis entre pH 5,0 e 9,0 e entre 30 e 40 °C e que era possível conduzir o processo para total conversão do substrato em cinco bateladas sucessivas com as mesmas células, com um acréscimo do período reacional para 54 h.

Ademais, um estudo de otimização foi realizado por Kiryu et al. (2012), com a bactéria *A. orientalis*, isolada de leite fermentado “Caspian Sea Yogurt”. Os resultados apontaram uma conversão de 98% e 49 g L⁻¹ de ácido lactobiônico, em 91 h de processo em batelada, com meio contendo 5% de lactose, pH 5,5 e a 35 °C. A oxidação da lactose (50 g L⁻¹) a ácido lactobiônico foi possível ser realizada também pela ação da enzima lactose oxidase de *M. nivale* em escala piloto de 600 L, a 38 °C e pH 6,4 (HUA et al., 2007). A conversão de 98% foi realizada utilizando um *rotary jet head system*, o qual proporcionou eficiente mistura e transferência de massa. No processo o oxigênio funcionou como um aceptor de hidrogênio na reação e foi necessário o uso de catalase para eliminar a formação de peróxido de hidrogênio.

As características e os principais estudos de bioconversão utilizando *Z. mobilis* e o seu complexo enzimático periplasmático (GFOR/GL) serão apresentados a seguir, cujas as elevadas produtividades de ácidos aldônicos produzidos e as particularidades do metabolismo celular e de ação dessas enzimas destacam-se e apresentam potencialidades frente a outras enzimas e micro-organismos.

3.3 *Zymomonas mobilis*: características e bioprodução de ácidos aldônicos e sorbitol

Z. mobilis é uma bactéria Gram-negativa, na forma de bastonete com dimensões que variam de 1 a 6 µm de comprimento e 1 a 1,4 µm de diâmetro, podendo estar isolada, aos pares ou em cadeia, não formam cápsulas nem esporos e em sua grande maioria, não possui mobilidade. *Z. mobilis* é uma bactéria anaeróbia, todavia apresenta aerotolerância (SWINGS; DE LEY, 1977; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

Esta bactéria é encontrada no meio ambiente, associada a plantas com alto teor de açúcares nas seivas, em áreas tropicais da América, África e Ásia, sendo originalmente isolada de bebidas alcoólicas como o vinho de palma africano e o *pulque* mexicano e também identificada como um contaminante de cidra e cerveja nos países europeus (SWINGS; DE LEY, 1977). *Z. mobilis* não é patogênica para seres humanos e animais, porém apresenta efeito

antagônico contra muitas espécies de bactérias e fungos, como por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans* (WANICK et al., 1970; LIMA; SCHUMACHER; ARAÚJO, 1972). A resistência a grande variedade de antibióticos por várias linhagens de *Z. mobilis* foi relatada por Swings e De Ley (1977).

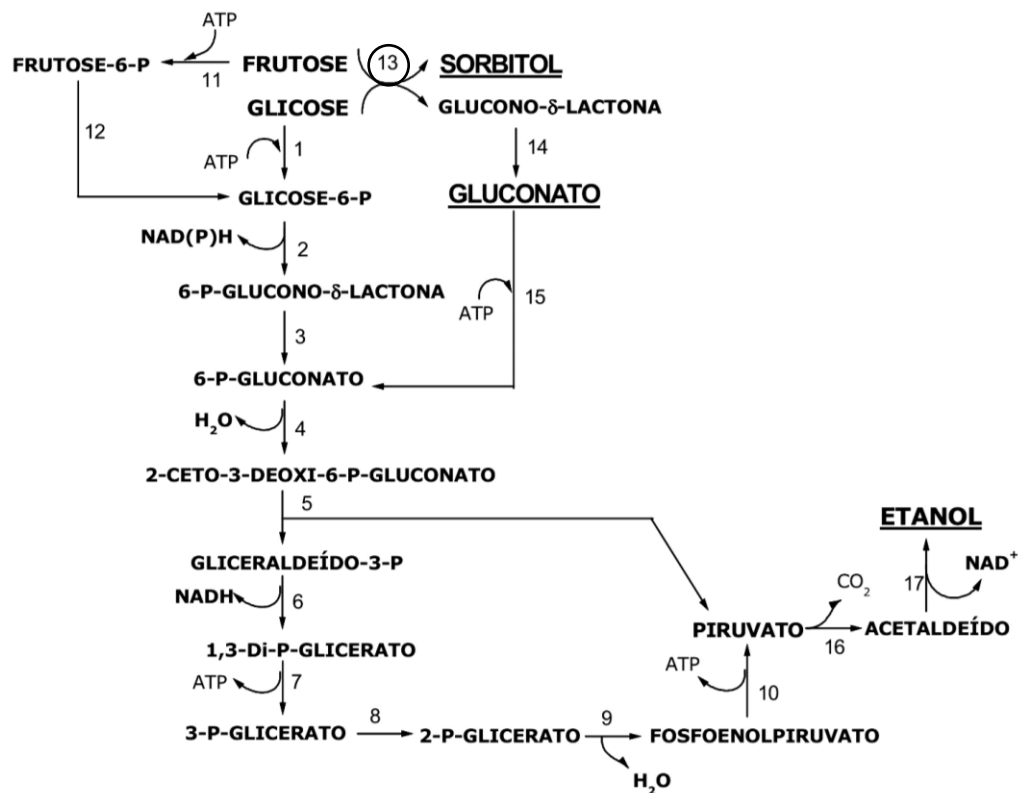
Z. mobilis é um micro-organismo quimiorganotrófico, utilizando como fontes de carbono glicose, frutose e sacarose, as quais são metabolizadas pela via de Entner-Doudoroff, com rendimentos aproximadamente equimolares de etanol e CO₂ (SWINGS; DE LEY, 1977; VIKARI, 1984a; DOELLE et al., 1993). O gênero *Zymomonas* é o único anaeróbio a seguir esta rota metabólica, despertando o interesse de pesquisadores (GIBBS; DE MOSS, 1954; SWINGS; DE LEY, 1977).

Viikari (1984a, 1984b) verificou a presença de sorbitol e ácido glicônico quando eram utilizadas na fermentação sacarose ou uma mistura de frutose e glicose. Posteriormente, o mecanismo bioquímico deste processo foi elucidado e descrito por Zachariou e Scopes (1986). Os autores identificaram a presença de GFOR (E.C. 1.1.1.99), enzima presente no periplasma das células de *Z. mobilis*, responsável pela oxidação de glicose à glicono- δ -lactona e redução de frutose a sorbitol. A glicono- δ -lactona é, então, convertida a ácido glicônico (gliconato) pela enzima GL (E.C. 3.1.1.17).

Dependendo das condições do meio, o gliconato retorna à via de Entner-Doudoroff por ação da gliconato quinase. Este processo catalítico de GFOR opera num clássico mecanismo *ping-pong*, onde duas meias-reações são envolvidas. Com a oxidação da glicose à glicono- δ -lactona a coenzima NADP⁺ é reduzida a NADPH, que é posteriormente reoxidada em função da redução da frutose a sorbitol (HARDMAN; SCOPES, 1988). As vias metabólicas de formação de produtos da fermentação de carboidratos por *Z. mobilis* é apresentada na Figura 2.

Diferentes autores desenvolveram processos utilizando células de *Z. mobilis* previamente cultivadas e tratadas com agentes permeabilizantes, a fim de evitar o retorno do gliconato a esta via, e conseqüente formação de etanol (CHUN; ROGERS, 1988; REHR; WILHEM; SAHM, 1991; JANG et al., 1996). Assim, altos rendimentos em ácido glicônico e sorbitol foram alcançados. Segundo estes autores, esta permeabilização é causada pelo extravasamento de compostos intracelulares, tais como compostos fosforilados necessários para a formação de etanol.

Figura 2 - Vias metabólicas de formação de produtos da fermentação de carboidratos por *Zymomonas mobilis*.¹



Fonte: Malvessi (2008) adaptado de Sprenger (1996).

Chun e Rogers (1988) relataram o impedimento do consumo de ácido glicônico formado com a permeabilização de células previamente cultivadas de *Z. mobilis* com tolueno 10% (v/v), sem exercer efeito negativo sobre a atividade de GFOR, uma vez que o NADPH, cofator essencial para a enzima, permanece ligado à proteína.

Para o mesmo propósito, segundo Malvessi et al. (2010), Malvessi et al. (2013) e Delagustin et al. (2017), ácidos aldônicos e/ou seus respectivos sais podem ser produzidos utilizando células permeabilizadas com 0,2% de brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB). Ademais, trabalhos do mesmo grupo de pesquisadores evidenciaram que é possível inibir o metabolismo fermentativo de carboidratos pela bactéria, a partir da reticulação de células imobilizadas com alginato de cálcio, com o uso de 0,5% de glutaraldeído, eliminando a etapa

¹ 1 - Glicoquinase; 2 - Glicose-6-P-desidrogenase; 3 - 6-Pgliconolactonase; 4 - 6-P-gliconato desidratase; 5 - Aldolase; 6 - Gliceraldeído-Pdesidrogenase; 7 - fosfoglicerato quinase; 8 - Fosfoglicerato mutase; 9 - Enolase; 10 - Piruvato quinase; 11 - Frutoquinase; 12 - Glicose 6-P isomerase; 13 - Glicose-frutose oxidorreductase GFOR; 14 - Glicono-δ-lactonase (GL); 15 - Gliconato quinase; 16 - Piruvato descarboxilase; 17 - Álcool desidrogenase.

de permeabilização celular. Os autores observaram que o rendimento do processo não foi afetado (FOLLE et al., 2018).

O uso de células não permeabilizadas de *Z. mobilis* também foi descrito por Silveira et al. (1999). Os autores desenvolveram um processo com células não permeabilizadas de *Z. mobilis*, em que a conversão do ácido glicônico produzido em etanol era evitada com o uso de altas concentrações iniciais de glicose e frutose no meio de bioconversão.

A composição do meio de cultura é fator determinante no crescimento celular, consumo de substrato, produção de etanol e consequente bioconversão dos compostos de interesse por *Z. mobilis*, no qual alguns fatores de crescimento são requeridos. A dependência de vitaminas, como biotina e ácido pantotênico é bem conhecida. A inclusão de extrato de levedura no meio de cultivo apresentou-se necessária para suprir essa demanda (SWINGS; DE LEY, 1977). Do mesmo modo, de acordo com Fein et al. (1983), o uso de extrato de levedura no meio de cultivo fornece as vitaminas necessárias para o crescimento de *Z. mobilis*.

O uso de extrato de levedura no meio de cultura de *Z. mobilis*, limita a utilização deste componente à escala laboratorial, devido ao seu preço elevado, sendo um problema relacionado ao uso industrial. Como alternativa, Malvessi et al. (2006a) destacaram a utilização de uma fonte comercial, de menor custo, de extrato de levedura bruto (hidrolisado de levedura, Prodex Lac®), na concentração otimizada de 7,5 g L⁻¹, usado como fonte de nitrogênio orgânico e vitaminas para o crescimento de *Z. mobilis*, em substituição ao extrato purificado.

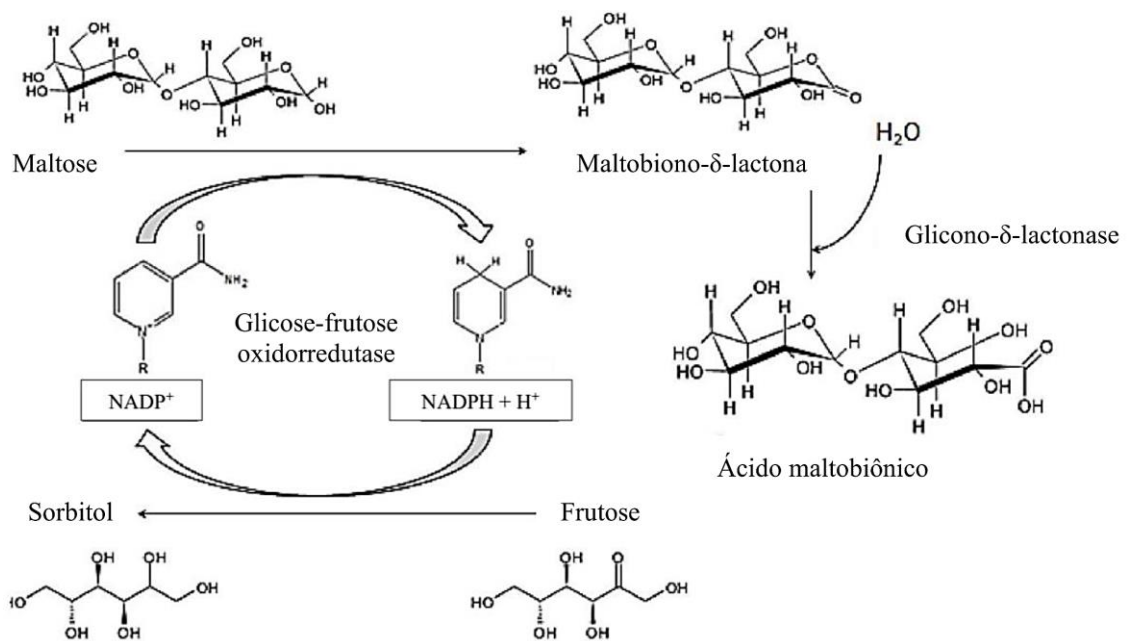
A água de maceração de milho (milhocina), um resíduo agroindustrial de baixo custo, pôde ser usada também no processo fermentativo de *Z. mobilis*, em substituição ao extrato de levedura purificado, conforme demonstrado por Lawford e Rousseau (1997) e Silveira et al. (2001). Observa-se que a milhocina necessita de cuidados na sua estocagem, pois é uma matéria-prima de fácil contaminação por micro-organismos.

Em estudos comparativos de diferentes cepas de *Zymomonas*, Swings e De Ley (1977) apontaram que a maioria apresentava capacidade de crescer em altas concentrações de glicose (30 a 40% (m/v)), a uma faixa de temperatura de 25 a 42 °C, com total inativação do micro-organismo a 60 °C por 5 min. A bactéria *Z. mobilis* foi também caracterizada por possuir uma relativa tolerância a meios ácidos e por crescer na ampla faixa de pH de 3,5 a 7,5.

A ação do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* resulta na formação equimolar de seus produtos de oxidação e redução, fato este que inviabiliza seu uso industrial, visto que há menor demanda comercial de ácido glicônico em relação ao sorbitol (JONAS; SILVEIRA, 2004). Todavia, o complexo GFOR/GL pode ser usado na produção de outras aldonolactonas, e consequentemente na produção de outros ácidos aldônicos, como o ácido maltobiônico

(Figura 3) e ácido lactobiônico, com maior valor agregado, a partir da frutose como substrato aceptor de elétrons e de outros carboidratos redutores, em substituição à glicose, como maltose e lactose, e com altas produtividades em condições otimizadas de processo (ZACHARIOU; SCOPE, 1986; SATORY et al., 1997; MALVESSI et al., 2013; GARIN, 2016; FLORES, 2019).

Figura 3 - Conversão de maltose e frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, respectivamente, via ação catalítica de glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*.



Fonte: Flores (2019) adaptado de Zachariou & Scopes (1986).

Malvessi et al. (2010) estudaram o efeito da concentração de substrato, pH e temperatura na atividade do complexo enzimático GFOR/GL de células permeabilizadas de *Z. mobilis*, imobilizadas com alginato de cálcio, para a obtenção de ácido glicônico. Os autores observaram que os valores de pH de 7,8 e de temperatura de 47 °C, apresentam atividade enzimática otimizada em teste de 1 h de bioconversão. A atividade relativa da GFOR/GL de 183% em relação as condições padrões (pH 6,4 e 39 °C) foi explicada devido ao um melhor fluxo difusivo através das esferas de alginato de cálcio com o aumento da temperatura e do acúmulo de ácido glicônico dentro das mesmas, resultando na redução do pH interno. Porém, em testes de estabilidade em quatro ciclos de bioconversão de 3 h cada, observaram menor estabilidade nessas condições. Os autores sugeriram uma solução de substrato inicial de concentração

equimolar de $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ de glicose/frutose, variar o pH de 7,8 para 6,4 e manter temperatura constante de $47 \text{ }^\circ\text{C}$, visando otimização do rendimento de conversão e de produtividade.

A bioprodução e a caracterização de diferentes sais de lactobionato por *Z. mobilis* permeabilizadas e imobilizadas com alginato de cálcio, foram estudadas por Delagustin et al. (2017), utilizando concentração inicial de substrato de $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ de lactose e $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de frutose, concentração celular de 20 g L^{-1} , pH 6,4, temperatura de $39 \text{ }^\circ\text{C}$ e 24 h de processo. A partir de diferentes bases utilizadas para o controle do pH reacional, os autores observaram que não houve diferença significativa entre os rendimentos de conversão e produtividade molar do lactobionato de sódio e potássio, os quais foram maiores do que os de lactobionato de cálcio. Eles concluíram que a estequiometria de formação dos sais (razão lactose consumida/sal formado) foi de 2:1, 1:1 e 1:1 para lactobionato de cálcio, de sódio e potássio, respectivamente, e que o lactobionato de cálcio apresentou baixa solubilidade em água, devendo a base hidróxido de cálcio ser adicionado ao processo em pequenas frações. Após purificação, os três sais estudados apresentaram alta pureza ($>90\%$), porém o lactobionato de potássio apresentou maior concentração final de lactose e menor de sorbitol.

Folle et al. (2018) estudaram diferentes modos de operações e de agitação, para a obtenção de ácido lactobiônico e ácido glicônico a uma temperatura $39 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6,4 e concentração inicial de células imobilizadas em alginato de cálcio de 20 g L^{-1} . A agitação mecânica de 100 rpm e fluxo de ar de 1 L min^{-1} não apresentou diferença significativa na integridade do suporte da imobilização. Ambos os sistemas de agitação apresentaram maiores resultados de concentração de produtos finais em modo de batelada alimentada ($\sim 0,75 \text{ mol L}^{-1}$, 40 h), do que batelada simples ($\sim 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 24 h), embora tenha maior tempo de processo. No modo batelada, a agitação mecânica apresentou produção de ácido lactobiônico igual a $0,532 \text{ mol L}^{-1}$.

Ademais, diferentes concentrações de maltose ($0,7$, $1,0$ e $1,5 \text{ mol L}^{-1}$) como substrato de bioconversão, a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 6,4 foram avaliadas por Flores (2019). A concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de maltose apresentou os melhores resultados com uma produtividade específica de $0,91$ e $2,06 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para maltobionato de cálcio e de sódio, respectivamente. O mesmo autor também estudou o substrato xarope de maltose nas concentrações de $0,3$ a $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ e temperaturas de 32 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH de $5,5$ a $7,5$, sendo que os melhores resultados foram obtidos na concentração de $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ de xarope de maltose, a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH de 6,4, com produtividade específica de $1,40 \text{ mmol}^{-1} \text{ g h}^{-1}$ de ácido maltobiônico e concentração máxima de ácido de 615 mmol L^{-1} .

A quantificação desses ácidos aldônicos, seus sais e sorbitol é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Pedruzzi et al. (2007) estudaram a quantificação de ácido lactobiônico e sorbitol por CLAE com diferentes colunas e condições operacionais e obtiveram melhores separações e picos mais simétricos com a coluna utilizando resina de troca iônica de cátions de hidrogênio, eluente ácido sulfúrico (H_2SO_4) a $0,450 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 3,1, $75 \text{ }^\circ\text{C}$ e $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (bomba isocrática e coluna IC Sep ICE-ION-300, 300 mm por 7,8 mm, diâmetro de partícula $7 \text{ }\mu\text{m}$, Transgenomic, USA). Os autores afirmam também que os cristais de ácido lactobiônico necessitam ser dissolvidos em um solvente alcalino com hidróxido de cálcio (ou em hidróxido de sódio ou potássio) em razão equimolar, para prevenir a formação de lactona.

Folle et al. (2018) evidenciaram uma relação estequiométrica entre consumo de álcali consumido e de bioprodução de ácido glicônico por *Z. mobilis* imobilizadas com alginato de cálcio. A quantificação de ácido lactobiônico e de ácido glicônico via CLAE foi idêntica à obtida pelo consumo da base hidróxido de sódio (7 mol L^{-1}) usada no controle de pH.

Indubitavelmente, a bioconversão desses ácidos aldônicos podem ocorrer pela ação de enzimas purificadas ou presentes células microbianas, e é notável neste processo que a imobilização enzimática ou celular apresenta potencialidades.

3.4 Imobilização de células e enzimas

Os principais aspectos a ser considerado em um sistema imobilizado são o biocatalisador (células microbianas ou enzimas), o suporte e o método de imobilização (modo de ligação ao suporte), podendo ser utilizada em diversos processos, tanto em laboratório como em escala industrial. A imobilização pode ser realizada por diferentes métodos, tais como separação por membranas, entrelaçamento/confinamento em polímeros, adsorção e formação de ligação covalente, sendo empregados inúmeros materiais inertes para este fim. A escolha do método e do tipo de suporte dependerá essencialmente das características peculiares do biocatalisador e das condições de uso do sistema imobilizado (LIMA et al., 2013).

Na imobilização por adsorção (também conhecida como por contato) ocorre a adesão de células/enzimas em suportes previamente formados, por meio do contato entre estes e em condições controladas. Nesse método predominam interações eletrostáticas e de ligações iônicas entre parede celular/enzimas e o suporte (SCHMIDELL et al., 2001). Esta estratégia de imobilização difere-se do método por confinamento, ou também chamada *in situ*, na qual ocorre a imobilização de células/enzimas durante a etapa de síntese do suporte, permitindo uma maior

agregação de biocatalisador, tanto por confinamento, como pela possibilidade de ocorrência de ligações químicas covalente ou iônicas entre as células/enzimas e o suporte (NYARI et al., 2016; NYARI, 2017).

Embora a imobilização resulte na maior estabilidade da enzima, na possibilidade de reaproveitamento do biocatalisador e no uso em processos contínuos, aumentando a sua viabilidade econômica, é notável que alguns efeitos estéricos e conformacionais, de microambiente e difusionais resultem em uma redução da atividade catalítica da mesma (LIMA et al., 2013). Estes efeitos podem ser evitados ou diminuídos pela escolha criteriosa do suporte, pelo método de imobilização ou pelas condições de operação do biorreator (ZANIN; MORAES, 2004). O emprego de diferentes configurações e regimes de operação de biorreatores utilizando sistemas imobilizados foi relatado por Jang et al. (1996), Ferraz, Borges e Alves (2000) e Folle et al. (2018).

Na literatura há estudos utilizando o complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* e outras enzimas/micro-organismos imobilizados com diferentes suportes, como alginato de cálcio (MALVESSI et al., 2010; FOLLE et al., 2018), esferas magnéticas de quitosana (YANG et al., 2021), k-carragena (REHR; WILHEM; SAHM et al., 1991; JANG et al., 1996), espuma de poliuretano (VASSILEV; VASSILEVA; SPASSOVA, 1993; KOEHNTOPP et al., 1996; MUKHOPADHYAY et al., 2005), membrana de fibra oca (FERRAZ; BORGES; ALVES, 2000; SEVERO JÚNIOR, 2008) e bucha vegetal (VIGNOLI et al., 2006).

Rehr, Wilhem e Sahn (1991) usando células de *Z. mobilis*, permeabilizadas com brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB) e imobilizadas em esferas de k-carragena, na concentração final de 4% (m/v), em processo descontínuo, a 30 °C e pH 5, obtiveram valores de produtividades específicas de produção de sorbitol e de ácido glicônico de 1,8 e 2,1 g g⁻¹ h⁻¹, para células livres, e de 1,4 e 1,8 g g⁻¹ h⁻¹, para células imobilizadas em k-carragena, respectivamente. Os autores sugerem haver a inativação de uma pequena quantidade de enzimas durante a imobilização ou que houve limitações difusionais após imobilização. Em ensaio em biorreator de leito fluidizado, as esferas de k-carragena foram tratadas com glutaraldeído e polietilamina, com o objetivo de estabilizar a atividade da enzima e reforçar a reticulação das esferas de k-carragena, prevenindo o extravasamento das células, sendo observado apenas 3,5% de perda de atividade em um período de 75 dias de processo contínuo.

Igualmente imobilizadas em k-carragena, Jang et al. (1996) estudaram a produção de sorbitol por células permeabilizadas em CTAB. No trabalho foi evidenciado a melhoria da estabilidade operacional e aumento da rigidez com a secagem das esferas de k-carragena por duas semanas, a 20 °C e 60% de umidade, e com a adição de polióis 40% (m/v), como glicerol

e propilenoglicol. Os autores afirmaram que esse resultado é interessante para aplicações em processos contínuos, com incremento no período de trabalho. O tratamento com polióis permitiu a obtenção de 90% de conversão de frutose em sorbitol em 10 h de bioprocessamento, a 39 °C e pH 6,2.

Bertasso et al. (1996), usando células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, relatam a viabilidade do uso de sistemas imobilizados no processo de bioconversão de glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol, tendo sido constatado a manutenção da atividade de GFOR em cerca de 80% da atividade inicial, após cerca de 350 h de processo em batelada.

A técnica de imobilização de células permeabilizadas com CTAB de *Z. mobilis* em microporos de membranas de fibras ocas e de imobilização em alginato de cálcio foram comparadas por Ferraz, Borges e Alves (2000). O uso de células permeabilizadas no orifício de fibras ocas, as quais possuem poros menores que as células, apresentou melhor desempenho em termos de taxa de reação específica ($33,2 \text{ g}_{\text{gliconato}} \text{ g}_{\text{proteína}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), com uma reduzida resistência à transferência de massa. Por outro lado, o método por aprisionamento das células em gel de alginato de cálcio apresentou desvantagem na difusão através do gel, reduzindo a taxa de reação ($4,2 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em processo conduzido a 39 °C e pH 6,2.

As células de *Z. mobilis* imobilizadas também em alginato de cálcio foram estudadas por Malvessi et al. (2006b), avaliando, preliminarmente, diferentes configurações de biorreatores (mistura completa, de coluna com leito fixo e leito fluidizado) para a bioprodução de ácido lactobiônico. Valores superiores de máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico foram obtidos com o emprego de reator de mistura completa, pois proporcionou um melhor contato da enzima com o substrato, além de facilitar o controle do pH.

A imobilização de células de *Z. mobilis* em módulos de membranas do tipo fibras ocas para a produção de ácido lactobiônico foi avaliado por Severo Júnior (2008). O autor constatou que as melhores condições foram para as células confinadas no exterior das fibras com uma vazão de circulação de 20 L h^{-1} , e uma taxa de $1,37 \text{ mmol g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Foi demonstrado que a taxa específica de formação de ácido lactobiônico no sistema imobilizado foi de aproximadamente metade da taxa obtida com a utilização de células livres. Todavia, analisando o ponto de vista de integração do processo de reação enzimática e de separação de produtos por eletrodialise, esta imobilização celular seria mais conveniente, visando esta integração.

Outro suporte utilizado para a imobilização de *Z. mobilis* foi a bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), proposto por Vignoli, Celligoi e Silva (2006), para a produção de sorbitol. A *Z. mobilis* foi previamente tratada com solução de quitosana ($10 \text{ mg}_{\text{solução de quitosana}} \text{ g}_{\text{célula}}^{-1}$), composta por 1% de quitosana em 2% de ácido acético (v/v), visando a floculação das células

a partículas de maiores diâmetros e assim maior imobilização por contato com o suporte. Para isso, 5 pedaços de esponja com 5 cm de aresta foram inoculados com as células floculadas (2 g L^{-1}), com posterior agitação em solução salina durante 30 min. Transcorrido o período, as esponjas foram transferidas para meio de cultura por 36 h, apresentando produção máxima de sorbitol. A produção com células imobilizadas (50 g L^{-1}) foi o dobro da obtida com células livres (25 g L^{-1}).

Recentemente, Yang et al. (2021) imobilizaram separadamente celobiose desidrogenase e lacase em esferas magnéticas de quitosana modificadas com glutaraldeído, e utilizaram juntas em um sistema para bioprodução de ácido lactobiônico. Os autores confirmaram maior estabilidade térmica e a pH das enzimas imobilizadas, sendo capaz de converter completamente lactose (100 g L^{-1}) em ácido lactobiônico, a 30 °C e pH 5,5, com um rendimento de $7,14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e mantendo 70% da atividade enzimática inicial após 10 ciclos de reutilização.

3.4.1 Imobilização em suporte de poliuretano

3.4.1.1 Características e propriedades do polímero

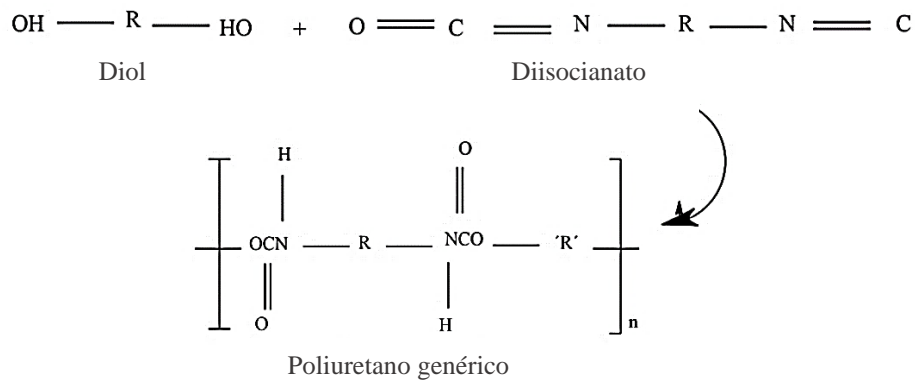
O poliuretano (PU), primeiramente sintetizado por Otto Bayer em 1937, é considerado um dos principais polímeros sintéticos, devido a suas propriedades físicas e químicas e amplas aplicações, como por exemplo em colchões, estofamentos, esponjas para lavar louça e para isolamento térmico de geladeiras, caminhões frigoríficos, painéis divisórios, criogenia etc. (MANO; MENDES, 1999; VILAR, 1999; IONESCU, 2005).

Outra aplicação da espuma de PU é na área de biotecnologia, sendo utilizada para a imobilização de enzimas e células microbianas, como já citado no presente trabalho. As principais características que tornam esse suporte atrativo para esta aplicação são resistência, versatilidade, facilidade de preparo, durabilidade, bioestabilidade, poder de sorção, porosidade, controle de poros durante a síntese, área superficial, permeabilidade, facilidade do transporte de massa, baixa toxicidade e preço (ORY et al., 2004; GUNCHEVA et al., 2014; GROVER et al., 2016).

O poliuretano, formado por grupos uretanos ($-\text{NHCOO}-$), é possível de ser obtido por vários métodos, sendo o mais importante o da reação entre um isocianato e um álcool (IONESCU, 2005). A reação química de uma molécula contendo o grupo isocianato ($-\text{N}=\text{C}=\text{O}$) (di ou polifuncional e disponível nas formas aromáticas ou alifática) com um polioliol, possuindo hidroxilas ($-\text{OH}$) (com variação desde massa molecular, natureza química e funcionalidade)

pode ocorrer por poliadição, sendo uma reação exotérmica com rápido aumento da viscosidade do meio reacional. Esse processo de polimerização pode ocorrer também na presença de outros reagentes, como catalisadores, agentes de expansão, surfactantes, retardantes de chama, agentes antienvelhecimento, corantes, agentes de cura e cargas (MANO; MENDES, 1999; VILAR, 1999). A estrutura de um poliuretano genérico é apresentada na Figura 4.

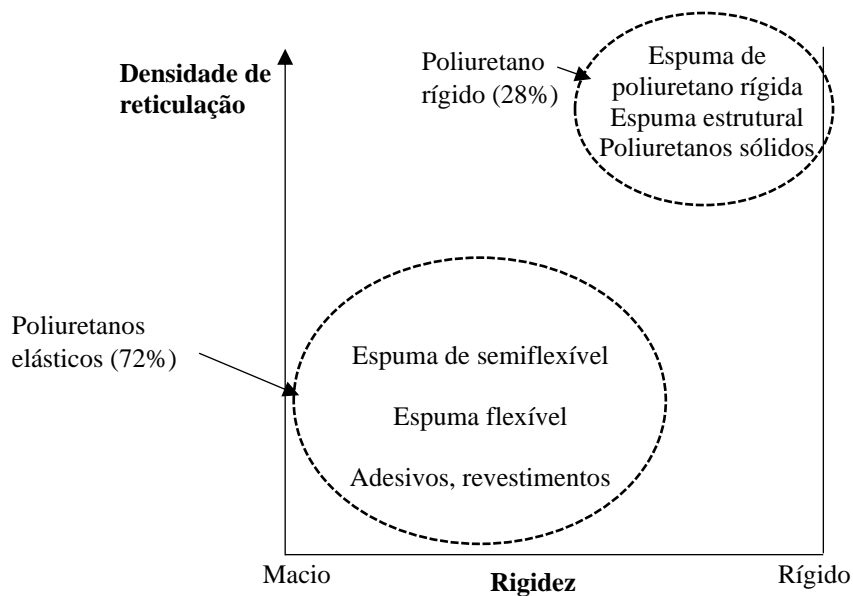
Figura 4 - Estrutura molecular de um poliuretano genérico.



Fonte: Mano e Mendes (1999), com adaptações.

Os poliuretanos são um grupo extremamente versátil de polímeros, produzidos em uma ampla gama de densidades, reticulados e rigidez, de estruturas muito moles a muito duras, como mostra a Figura 5.

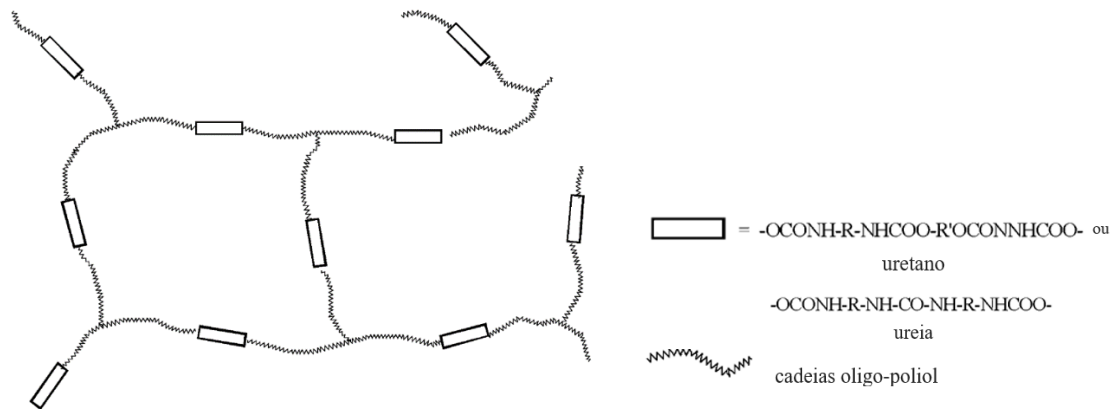
Figura 5 - Classificação dos poliuretanos em função da densidade de *crosslink* e rigidez.



Fonte: Ionescu (2005), com modificações.

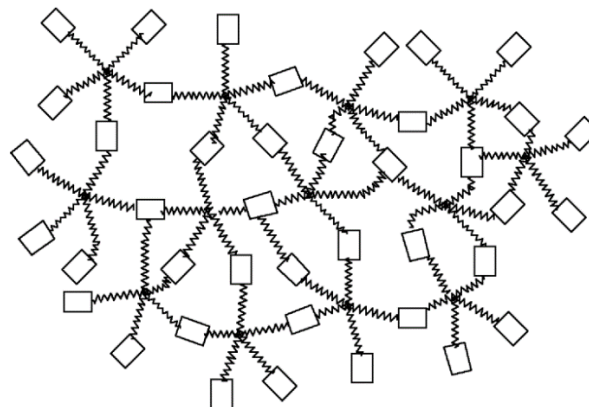
Os poliuretanos podem ser divididos em duas categorias principais: poliuretanos elásticos, por exemplo, espumas flexíveis (Figura 6), elastômeros, revestimentos, adesivos, fibras etc., e poliuretanos rígidos, por exemplo, espumas rígidas de poliuretano (Figura 7) e espumas estruturais. Esta classificação comum de poliuretanos em poliuretanos rígidos e elásticos baseia-se principalmente na estrutura do oligo-poliol. (IONESCU, 2005). Durante a reação de polimerização, apresentam dispersão de gás dando origem à formação de pequenos bulbos ou células abertas, interligadas em uma estrutura tridimensional, permeáveis ao ar e reversíveis à deformação (IONESCU, 2005; VILAR, 1999).

Figura 6 - Hipotética estrutura reticulada (*crosslinked*) de uma espuma de poliuretano flexível a partir de oligo-triol (de 3000-6500 daltons) e um diisocianato.



Fonte: Ionescu (2005).

Figura 7 - Hipotética estrutura de alta reticulação de uma espuma de poliuretano rígido.



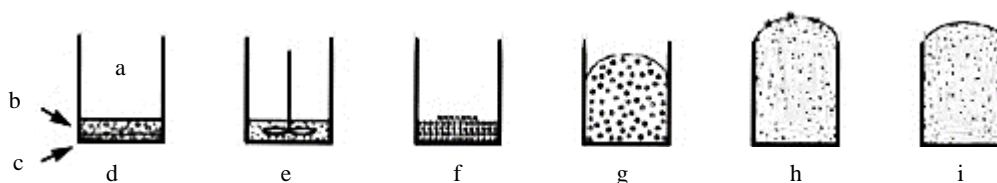
Fonte: Ionescu (2005).

É conhecido que uma espuma é um compósito com uma fase contínua (polímero de poliuretano) e uma fase descontínua (fase gasosa). Assim, a formação de espuma de poliuretano

segue algumas etapas, conforme apresentado na Figura 8. A primeira etapa é a dosagem e a mistura, onde em um recipiente ocorre a mistura do polioliol, catalisador, surfactante etc. (exceto isocianato), com auxílio de misturador mecânico. Essa mistura é responsável pela formação de microbolhas de ar dentro da massa polimérica, as quais são estabilizadas pelo surfactante. Após, adiciona-se o isocianato e realiza-se uma nova agitação, visando promover uma homogeneização do meio e uma maior nucleação (VILAR, 1999).

Após essa etapa, a massa polimérica fica saturada com o dióxido de carbono, dando ao líquido uma aparência cremosa, sendo então denominada de etapa de creme, a qual ocorre em aproximadamente 10 s após a mistura dos componentes. Logo em seguida, ocorre a etapa de crescimento, na qual a concentração do gás carbônico aumenta no interior das microbolhas formadas durante a etapa inicial de homogeneização (nucleação) e a massa da espuma começa a expandir em volume. O gás difunde das bolhas menores, de maior pressão interna, para as bolhas maiores de menor pressão, causando um crescimento das bolhas maiores e um consumo das bolhas menores. Este processo se completa em aproximadamente 60 s após a mistura dos componentes. Finalmente, na etapa de cura, a matriz polimérica, já estruturada permanece por um período que pode variar entre horas a dias antes de ser manuseada, finalizando sua reticulação (VILAR, 1999).

Figura 8 - Etapas da formação de espuma flexível convencional: (a) ar; (b) polioliol, água e aditivos; (c) isocianato; (d) matérias primas; (e) mistura e nucleação; (f) creme e início do crescimento; (g) crescimento; (h) separação de fase, suspiro e geleificação; (i) cura.



Fonte: Vilar (2019).

No processo de obtenção de espumas de poliuretano é possível a utilização de aditivos, como os surfactantes, visando melhorar as propriedades da espuma. Os surfactantes são moléculas com características estruturais que permitem compatibilizar materiais com propriedades diferentes, devido à presença de componentes hidrofóbicos e hidrofílicos. Essas substâncias na produção de espumas de poliuretano desempenham importantes funções, como abaixamento da tensão superficial; emulsificação dos componentes líquidos incompatíveis da formulação; regulação de tamanhos de células; promoção da nucleação das bolhas de ar durante

a mistura dos reagentes; estabilização da espuma em crescimento, pela redução dos pontos de tensão e redução da espessura das paredes das células, estabilizando as estruturas celulares e evitando o colapso; e contrabalanço do efeito danoso de qualquer sólido adicionado ou formado durante a reação (AKINDOYO et al., 2016; VILAR, 2019). Todas estas funções têm grande impacto nas propriedades físicas da espuma final.

3.4.1.2 Imobilização de micro-organismos em espuma de poliuretano para a produção de ácidos aldônicos

Na literatura especializada são escassos os estudos utilizando espuma de PU como suporte para imobilização celular, visando à produção de ácidos aldônicos.

Mukhopadhyay et al. (2005) imobilizaram *A. niger* por contato, através da inoculação de solução de esporos do fungo em cubos de espuma de poliuretano (2 mm de aresta), sob agitação a 250 rpm e 3 dias de contato. Os autores relataram a utilização de soro de leite desproteínizado suplementado (9,5% lactose + 0,5% glicose) na produção de ácido glicônico por *A. niger* e obtiveram uma maior produção de ácido glicônico em células imobilizadas (92 g L⁻¹) do que livres (69 g L⁻¹), em aproximadamente 48 h de processo.

Semelhantemente, células de *A. niger* foram imobilizadas por contato em espumas de PU por Vassilev, Vassileva e Spassova (1993), inoculando suspensão de esporos em cubos de 1 e 0,3 cm³ por 24 h de contato. Os autores obtiveram a melhor produção de ácido glicônico (120,2 g L⁻¹), durante 14 h de processo, utilizando cubos de 0,3 cm³. Para os cubos de 1 cm³ foram obtidos 105,1 g L⁻¹, nas mesmas condições.

Koehntopp et al. (1996) imobilizaram *in situ* células de *Z. mobilis* em espuma de poliuretano com os pré-polímeros de expansão livre HYPOL X2002, HYPOL X4300 e HYPOL X6300. Após moagem em moinho doméstico das espumas a um diâmetro médio de 2 mm, obtiveram atividade enzimática (3,94 g g⁻¹ h⁻¹) apenas com HYPOL X-4300 (suspensão celular de 180 g L⁻¹ e proporção 1:1 de suspensão celular e pré-polímero) e com um rendimento em torno de 100% na formação de ácido glicônico e sorbitol, após 24 h de processo, uma produtividade específica de 2,3 g g⁻¹ h⁻¹ e uma velocidade específica de formação de ácido glicônico de 7,5 g L⁻¹ h⁻¹. Os substratos utilizados foram glicose e frutose a 150 g L⁻¹. Segundo os autores este método de oclusão proporciona alta resistência mecânica e boa difusão no meio reacional, devido à grande porosidade, embora tenha sido observado a liberação de células para a fase líquida do sistema. Este foi o único estudo encontrado na literatura imobilizando *in situ* *Z. mobilis* em espuma de PU.

Embora não seja para a produção de ácidos aldônicos, a possibilidade de utilização de espuma de PU como suporte para a imobilização por aprisionamento (contato) de células de *Z. mobilis* para a conversão de sacarose em etanol foi investigada por Amin, Doelle e Greenfield (1987). Segundo os autores, o poliuretano foi escolhido devido ao seu baixo custo e à compatibilidade geral com o sistema de produção de etanol. Para a imobilização, aproximadamente 200 cubos de espuma (1 cm³) foram fixados em hastes de aço (400 x 1,5 mm) e então introduzidas em um reator de coluna de vidro, contendo meio de cultura. A cultura ativa de *Z. mobilis* foi então adicionada e permaneceu por 8 h para imobilização por contato. Segundo os autores, um rápido crescimento celular dentro do suporte foi observado e as espumas de PU contendo as células imobilizadas apresentaram alta eficiência de hidrólise da sacarose (90%).

3.5 Recuperação e purificação de ácidos aldônicos

Após o processo de bioconversão, para a purificação dos ácidos aldônicos ou seus respectivos sais é necessária a separação destes produtos de interesse do meio contendo concentrações residuais dos substratos (frutose e aldoses) e sorbitol, quando catalisada por *Z. mobilis*. Esta separação pode ser realizada por precipitação, a partir do uso de solventes orgânicos, como etanol, metanol, ácido acético glacial (SILVEIRA et al., 2007; CARRA, 2012; GARIN, 2016; DELAGUSTIN et al., 2017; FLORES, 2019; CARRA, 2020). Destaque é dado para a utilização de etanol, uma vez que este solvente é o produto principal da fermentação de glicose de alguns micro-organismos, como por *Z. mobilis* (SILVEIRA et al., 2007). De acordo com Valle et al. (2013), a utilização desta técnica de recuperação proporciona a obtenção de elevada pureza do lactobionato de sódio.

O ácido lactobiônico é praticamente insolúvel em etanol, diferindo do sorbitol e da lactose que são levemente solúveis, e da frutose que é solúvel em etanol (95% v/v), sendo assim, a precipitação é aplicável como forma de separação (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; CARRA, 2012). Da mesma maneira, há relatos do emprego de etanol para a precipitação dos sais de sódio ou de cálcio do ácido lactobiônico e maltobiônico, como forma de recuperação desses produtos produzidos por diferentes micro-organismos (MEIBERG; BRUINENBERG; SLOOTS, 1990; BYFORD; STODOLA, 2011). Carra (2012) destacou a utilização de sucessivas precipitações para recuperação de lactobionato de sódio com etanol 75% (v/v). Ao final destas etapas, o precipitado foi seco em estufa 30 °C e o etanol foi recuperado por destilação fracionada. Silveira et al. (2007) também destacaram o uso de sucessivas precipitações para separar os produtos finais da reação.

Da mesma forma, para a purificação de lactobionato de sódio, Carra et al. (2016) avaliaram os parâmetros temperatura, teor do solvente na mistura e vazão específica de adição ($\text{mL}_{\text{solvente}} \text{mL}_{\text{caldo}}^{-1} \text{min}^{-1}$), visando otimizar a etapa de recuperação. Os parâmetros ideais para a precipitação de lactobionato de sódio com etanol, foram definidos como uma vazão específica de $0,5 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e teor do solvente em água de 65% (v/v), obtendo na primeira, na segunda e na terceira precipitação uma pureza de 75, 88 e 100% do lactobionato de sódio, respectivamente.

A purificação do maltobionato de cálcio e maltobionato de sódio utilizando diferentes solventes foi avaliada por Flores (2019). O autor verificou que os solventes etanol e metanol foram os mais promissores para o processo, visto que a utilização da acetona resultou em um precipitado e duas fases líquidas distintas; o isopropanol resultou em uma precipitação com recuperação inferior; e os demais solventes avaliados (butanol, 4-metil-2-pentanol, acetilacetona, ácido acético glacial, clorofórmio) não ocasionaram diferença visual, sendo totalmente miscíveis com o caldo da bioconversão. De acordo com os resultados apresentados, a otimização da separação e purificação do maltobionato de sódio ocorreu após três precipitações com metanol (80% v/v), em temperatura ambiente ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), obtendo-se um sal com pureza superior a 98%.

Outra técnica de recuperação e purificação foi proposto por Severo Junior, Alves e Ferraz (2014). Os autores estudaram a separação do ácido lactobiônico do meio de bioconversão por eletrodialise e evidenciaram que as únicas variáveis que influenciam a taxa de remoção desse ácido aldônico foram a concentração de cloreto de sódio (NaCl) na corrente do concentrado e a voltagem, uma vez que com aumento destas variáveis há um aumento da força motriz, facilitando, assim a remoção. O autor obteve como a melhor condição para a separação do ácido, dentro da faixa estudada, uma tensão de 60 Volts, 3 g L^{-1} de NaCl na corrente do concentrado e 25 g L^{-1} de NaCl no compartimento dos eletrodos. Em todos os experimentos foi possível remover mais de 95% de ácido latobiônico.

Quando obtido o ácido aldônico na forma de sal e tendo-se o interesse em sua forma ácida, torna-se necessária uma etapa de conversão. Para este fim, a utilização de resinas de troca iônica foi relatada por Jones e Ho (2001) como um processo de baixo custo para a conversão de lactobionato de cálcio em ácido lactobiônico, com quantidades insignificantes de impurezas. Para a cristalização, a solução de ácido lactobiônico foi concentrada por evaporação e submetida a secagem à vácuo. Com o emprego dessa técnica, os autores relatam a obtenção de grande quantidade de cristais puros de ácido lactobiônico a um custo relativamente baixo.

Carra (2012) relata a utilização de cromatografia de troca iônica, com resina catiônica ácido forte Amberlite IRA-120 (Vetec Química Fina), para a conversão do lactobionato de sódio em ácido lactobiônico, com recuperação aproximada de 80%. Após a liofilização, o autor destaca a recuperação média de 98% em produto. Anos depois, Carra (2020) utilizou a resina de troca iônica H⁺ (AMBERLITE 120, SigmaAldrich, EUA) na conversão de lactobionato de sódio em ácido lactobiônico, relatando 98% de conversão - por meio da variação do pH e baseada em pKa (ácido lactobiônico = 3,8) e equação de Henderson-Hasselbalch - ao utilizar $1 \frac{\text{g}_{\text{resina}}}{\text{g}_{\text{lactobionato_sódio}}^{-1}}$.

Além da liofilização, as técnicas de secagem em estufa e por *spray dryer* foram investigadas por Flores (2019), após a conversão de maltobionato em ácido maltobiônico, utilizando resina catiônica. O autor observou que a secagem em estufa resultou em um ácido com um aspecto de matriz gelatinosa e coloração caramelo após 7 dias de exposição a 60 °C. Por *spray dryer*, houve a necessidade de adjuvantes (1% (m/m) de maltodextrina, 1% (m/m) de lactose ou 1% (m/m) de maltose), mas mesmo sendo observada a completa secagem do ácido maltobiônico nas três misturas propostas, com aparência final na forma de pó branco cristalino, a recuperação das amostras foi desfavorecida, uma vez que a maior parte do material ficou retida nas paredes do equipamento. A secagem por liofilização, embora necessário 48 h de secagem, apresentou-se como a melhor forma de secagem, obtendo o ácido maltobiônico em pó com alto grau de pureza e sem a necessidade de incorporação de adjuvantes na amostra.

3.6 Aplicação de compostos bioativos em filmes

Novas tecnologias e materiais de embalagens estão sendo desenvolvidos visando obter embalagens ativas, embalagens inteligentes, revestimentos/filmes comestíveis, embalagens biodegradáveis e embalagens de nanomateriais com potencial de garantir a qualidade, segurança e maior vida útil dos alimentos. Estas tecnologias consistem, entre outros, em incluir compostos antimicrobianos, antioxidantes e de retenção de líquidos na superfície ou diretamente na estrutura de polímeros ou em *saches/pads* que ficarão em contato com os alimentos (KERRY et al., 2006; SUN; HOLLEY, 2012; LEE et al., 2015; GHAANI, et al., 2016; KAPETANAKOU; SKANDAMIS, 2016; MAISANABA et al., 2016; FANG et al, 2017; DEGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018; KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018).

Uma embalagem ativa, conceito desenvolvido pelas áreas de ciência e engenharia de materiais, visa auxiliar na manutenção da qualidade e aumentar a segurança alimentar,

estendendo a vida útil de produtos alimentares embalados em polímeros naturais ou sintéticos. Propõem-se com o uso destas embalagens ativas, suprir as limitações das embalagens convencionais, as quais não podem controlar ativamente as reações dentro do produto alimentício (MASTROMATTEO et al., 2010; HOSSEINNEJAD, 2014; KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018).

Na literatura, observam-se três conceitos principais para as embalagens ativas: i) as não migratórias, que pode atuar sem migração deliberada; ii) embalagens de liberação ativa, que permite a migração controlada de compostos não voláteis ou a liberação de agentes voláteis para a atmosfera em torno do produto alimentar, evitando efeitos adversos nas propriedades sensoriais e toxicológicas; iii) embalagens baseadas em mecanismos de disparo específicos, um novo conceito onde a liberação de uma substância no alimento embalado pode ser ativada por mudanças químicas, bioquímicas ou biológicas, ou seja, desencadeada por uma mudança no produto alimentar ou ambiente de embalagem (MASTROMATTEO et al., 2010; HOSSEINNEJAD, 2014; KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018).

O interesse nessas embalagens para uso em alimentos é expressivo. Na literatura especializada encontram muitas pesquisas com diversas substâncias bioativas, materiais de embalagem e estratégias para reter o agente ativo na rede polimérica, manter essas propriedades bioativas e controlar sua liberação. São relatados *reviews* resumizando trabalhos incorporando óleos essenciais (canela, orégano, alecrim, cravo), nanopartículas (prata, óxido de zinco), ácidos orgânicos (benzoico, láctico, sórbico, acético), extratos de plantas, polipeptídeos e bacteriocinas (peroxidase, nisina) (SÁNCHEZ-ORTEGA et al., 2014; MAISANABA et al., 2016; FANG et al., 2017; KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018; DEGHANI; HOSSEINI; REGENSTEIN, 2018). Os autores relatam alguns materiais potenciais, para a substituição de materiais poliméricos à base de petróleo e plásticos, para a incorporação desses compostos bioativos e elaboração de filmes e embalagens de alimentos, como sendo a base de lipídeos, hidrocolóides e proteínas. Os lipídios, por exemplo, acilglicerol, ácidos graxos e ceras seriam utilizados como revestimentos ou incorporados em outros biopolímeros para a obtenção de filmes compostos, aumentando a barreira contra a migração de umidade e a flexibilidade. Os hidrocolóides, por exemplo, polissacárideos (celulose, amidos, derivados da pectina, quitosana, extratos de algas marinhas, como alginato), embora tenham efeito de barreira à umidade desprezível, possuem permeabilidade seletiva para O₂ e CO₂, e resistem à migração de lipídios. As proteínas, por sua vez, como gelatina, caseína, soro de leite e queratina, apresentam caráter anfifílico e boas propriedades de formação de filmes.

O estudo e a obtenção de filmes biodegradáveis com alterações nas propriedades mecânicas ou de barreira também são explorados, nas quais agente formador, plastificantes e aditivos adicionados na matriz são investigados (KANATT et al., 2012; MORAES; MULLER; LAURINDO, 2012; GUTIÉRREZA et al., 2015; JUNLAPONG et al., 2019; BALLESTEROS-MÁRTINEZ; PÉREZ-CERVERA; ANDRADE-PIZARRO, 2020; CHEN et al., 2020; LIM et al., 2020).

Com relação aos ácidos aldônicos, são escassas as investigações destes compostos como substâncias bioativas para aplicação em embalagens de alimentos. É relatado na literatura alguns estudos avaliando as propriedades antibacterianas (CHEN; ZHONG, 2017; CAO et al., 2019; KANG et al., 2020) e antioxidantes (BALDWIN et al., 2009; MARQUES et al., 2020) do ácido lactobiônico e as propriedades antioxidantes do ácido maltobiônico (NIELSEN, 2010). Todavia são inexistentes estudos da atividade antimicrobiana para o ácido maltobiônico e seus sais, assim como a aplicação em filmes.

3.7 Estado da arte

O complexo enzimático periplasmático GFOR/GL de *Z. mobilis* destaca-se frente às enzimas de outros micro-organismos pelas altas produções de ácidos aldônicos e por apresentar um cofator essencial ligado à proteína (NADPH), não sendo necessário outros aceptores de hidrogênio ou outras enzimas para manutenção da ação catalítica.

A imobilização de células de *Z. mobilis* também é vantajosa, principalmente visando uma maior estabilidade do complexo enzimático GFOR/GL e a possibilidade de reuso do biocatalisador no processo, em escala piloto ou industrial.

Na literatura são escassos os estudos da imobilização de *Z. mobilis* em espuma de poliuretano flexível para a produção de ácidos aldônicos. Ressalta-se que este polímero é um suporte em potencial, pois é de fácil preparo, durável e de baixo custo.

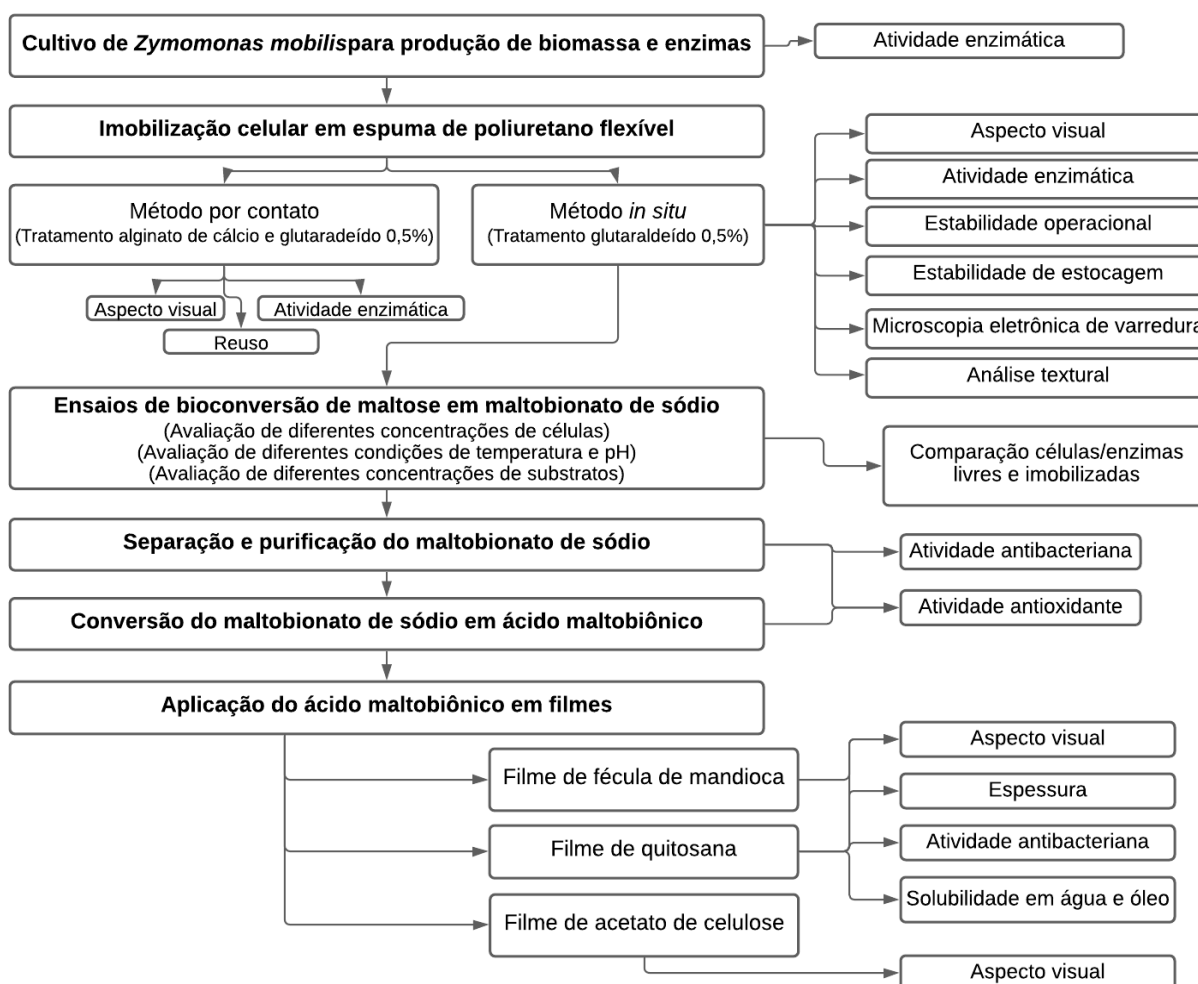
Adicionalmente, do ponto de vista do estudo dos ácidos aldônicos e seus sais na área de alimentos, há indícios de potencialidades de aplicações, tais como a utilização do ácido maltobiônico e seus sais em filmes com propriedades ativas, além da aplicação em outras áreas de interesse, como farmacêutica e cosméticas.

À vista destas características citadas e nas lacunas observadas na literatura, insere-se a presente proposta que visa à imobilização de células de *Z. mobilis* em espuma de poliuretano flexível para a produção de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio, bem como indicar potencialidades de aplicação destes produtos na área de alimentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentadas as metodologias utilizadas na pesquisa para a imobilização de células de *Z. mobilis* e complexo enzimático periplasmático GFOR/GL, produção de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio, purificação e potencialidades de aplicação destes produtos, conforme sintetizadas na Figura 9.

Figura 9 – Esquema representativo das estratégias de imobilização celular, do processo de produção e purificação de maltobionato de sódio e ácido maltobiônico e de potencialidades de aplicação.



4.1 Cultivo de *Zymomonas mobilis* para produção de biomassa e enzimas

Para a produção de biomassa de *Z. mobilis* (ATCC 29191) e enzimas GFOR/GL três etapas foram necessárias: ativação, preparo de inóculo e cultivo em biorreator.

O meio líquido para ativação e conservação da bactéria, obtenção do inóculo e cultivo em biorreator, descritos em Malvessi et al. (2006a), são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Componentes do meio líquido para ativação e conservação de *Zymomonas mobilis*, obtenção do inóculo e cultivo em biorreator.

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2,00
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	1,00
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	3,50
Sulfato de ferro heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,01
Extrato levedura bruto (Prodex Lac [®])	7,50

Soluções de glicose nas concentrações de 100 e 150 g L⁻¹ para preparo de inóculo e cultivo em biorreator, respectivamente, foram preparadas separadamente dos componentes apresentados na Tabela 1. Os materiais foram esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 min e misturados nas devidas proporções no momento do uso. Para ativação/conservação foi utilizado uma solução de glicose de 20 g L⁻¹ previamente misturada aos demais componentes (Tabela 1) e esterilizada nas mesmas condições.

A ativação da cultura foi realizada com a adição de 2 mL da suspensão bacteriana aos tubos contendo 18 mL de meio de ativação (10% de suspensão bacteriana) e incubados a 30 °C em estufa (Biomatic, Brasil), por 12 h, sem agitação.

O preparo de inóculo foi realizado em frasco de vidro de 500 mL, contendo 315 mL de meio e 90 mL de solução de glicose - ambos com massas de substratos e nutrientes necessárias para um volume final de 450 mL - e 45 mL da cultura previamente ativada (Figura 10A), sendo mantido em anaerobiose pela adição de nitrogênio gasoso durante 30 min. Posteriormente, com o pH inicial de 5,5 ajustado com carbonato de cálcio (CaCO₃) na concentração de 5 g L⁻¹, foram incubados a 30 °C, 200 rpm em agitador orbital (Excella E25R, New Brunswick Scientific Co., INC, EUA), por aproximadamente 10 h (MALVESSI et al., 2006a). Esse frasco foi dotado de uma tampa acoplado com dois filtros de algodão, com o intuito de proporcionar a injeção inicial de nitrogênio gasoso e para a liberação de dióxido de carbono resultante do metabolismo fermentativo, conforme Figura 10A.

Figura 10 - (a) Sistema para preparo do inóculo; e sistema para produção de biomassa: (b) reator encamisado, (c) banho ultratermostato, (d) Controlador de pH, (e) bomba peristáltica.



Fonte: Autor (2020).

O cultivo para produção de biomassa e complexo enzimático periplasmático GFOR/GL foi realizado em batelada, conforme Malvessi et al. (2006a), com modificações (Figura 10B, C, D, E), em reator encamisado de bancada (B. Braun Biotech International Biostat® B, Holanda), com volume total de 2 L e volume de trabalho de 1,5 L, agitação mecânica de 450 rpm e 30 °C, mantidos com auxílio de banho ultratermostato (Nova Ética, Brasil). O pH foi mantido a 5,4 pela adição de NaOH 5 mol L⁻¹, com auxílio de um controlador de pH (DosaTronic pH 2900, Provitec, Brasil) acoplado a uma bomba peristáltica (DosaMini 100, Provitec, Brasil). O meio de cultivo foi inoculado com o volume necessário para obter-se uma suspensão celular de 20 unidades de absorvância, a 560 nm. A anaerobiose foi mantida com adição de nitrogênio gasoso ao reator nos primeiros 45 min de cultivo. Para a obtenção final da biomassa e complexo enzimático, o meio fermentado foi recolhido e centrifugado (Centrifuge MPW-351R, MPW® Med. Instruments, Polônia), por 10 min a 6000 rpm e foi realizada a avaliação de massa seca, para obter-se as concentrações de trabalhos (g L⁻¹) da biomassa.

Após a produção de biomassa e complexo enzimático, a atividade enzimática de GFOR/GL frente à glicose e frutose foi determinada.

4.2 Imobilização celular em espuma de poliuretano flexível

Para a imobilização de células de *Z. mobilis* e GFOR/GL em espuma de poliuretano flexível foram utilizados dois métodos, por contato e *in situ*.

4.2.1 Imobilização por contato

Inicialmente, preparou-se o polímero seguindo os procedimentos do fabricante (Dim Clay, Brasil), utilizando a proporção de 10:3 m/m do reagente A (poliol):B (isocianato). Na sequência, 10 g da espuma de poliuretano flexível formada foi fracionada em 3 diferentes dimensões: cubos 125 mm³ (5 mm de aresta), espumas com tamanho selecionado em peneira de mesh 16 (1 mm) e espumas com tamanho selecionado em peneira em mesh 9 (2 mm).

Após o fracionamento, as frações de espumas foram lavadas em água destilada, durante 15 min, sob agitação magnética e secas em papel filtro (qualitativo 80 g, JProLab, Brasil), por aproximadamente 24 h, a 22 ± 2 °C, e utilizadas na produção de biomassa e enzimas em biorreator (Item 4.1) para imobilização por contato (10 g de espuma em 1,5 L de cultivo). Transcorrido o período de 12 h, as espumas foram removidas do meio fermentativo com auxílio de peneira e deixadas sob repouso por 30 min para remoção do excesso de líquido (meio líquido e células não incorporadas).

Posteriormente, submetem-se as espumas a dois tratamentos distintos:

1) As espumas com as células imobilizadas por contato foram tratadas com glutaraldeído 0,5% (m/v) por 15 min sob agitação magnética – com o intuito de inibir o metabolismo das células, sem afetar a atividade enzimática (FOLLE et al., 2018) -, seguido de duas lavagens em água destilada, sob agitação magnética, por 15 min, para remoção do glutaraldeído. As espumas, após remoção do excesso de água, foram secas em capela (Quimis 0216-21, Brasil) com fluxo de ar ligado e em contato com papel filtro (JProLab, Brasil), durante 24 h, sendo posteriormente mantidas em recipiente fechado e sob refrigeração até o momento do uso. Esta etapa de lavagem também foi realizada para a remoção de células/enzimas não ligadas.

2) As espumas com as células imobilizadas por contato foram previamente mantidas em solução de alginato de sódio (0,25; 0,5 e 1% (m/v)), por 2 min sob agitação magnética, seguido de banho em cloreto de cálcio (0,05; 0,1 e 0,2 mol L⁻¹) por 30 min, conforme Devi e Sridhar (2000), com modificações, visando uma maior imobilização por aprisionamento das células no alginato de cálcio formado na espuma. Após este procedimento, os materiais obtidos passaram pelo mesmo tratamento em glutaraldeído e armazenamento.

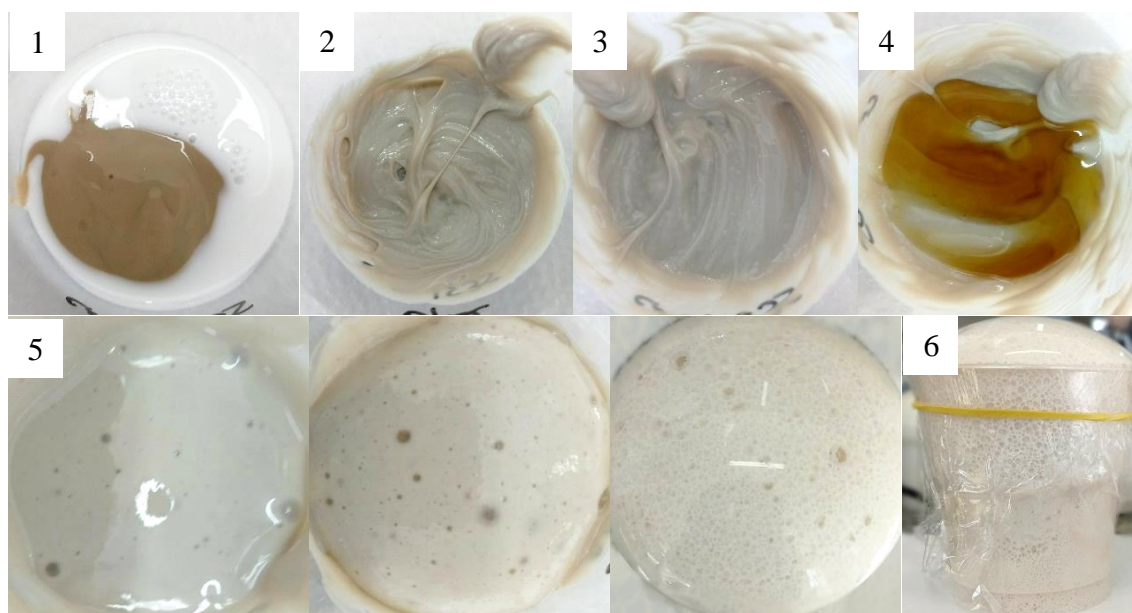
Após os tratamentos 1 e 2, as espumas com células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas foram analisadas em atividade enzimática (U g_{célula_seca}⁻¹), frente a glicose e frutose 0,7 mol L⁻¹, a 39 °C e pH 6,4, e em atividade enzimática residual após um reuso.

4.2.2 Imobilização *in situ*

A imobilização *in situ* foi realizada pela mistura dos reagentes, denominados pelo fabricante, como A (poliol) e B (isocianato) (Dim Clay, Brasil), em recipiente plástico, acrescida de surfactante silicone (Tasca Estofados e Cia, Brasil) e de material celular (células de *Z. mobilis* e complexo enzimático periplasmático GFOR/GL), o qual foi diluído em diferentes concentrações com água destilada após etapa de centrifugação e determinação de massa seca.

O material celular e o silicone foram sempre adicionados no poliol e homogeneizados para posterior adição do isocianato à mistura. Transcorrido o período de expansão e formação da espuma, sendo utilizado um filme plástico na parte superior do recipiente para contenção desta expansão e melhor uniformidade da espuma, as mesmas permaneceram em repouso durante 24 h para cura, em temperatura ambiente (22 ± 2 °C). O procedimento de imobilização *in situ* está sintetizada na Figura 11.

Figura 11 - Imobilização *in situ* de células de *Zymomonas mobilis*: 1. Adição do poliol e da biomassa. 2. Mistura do poliol e da biomassa. 3. Adição e mistura do silicone. 4. Adição do isocianato. 5. Polimerização e crescimento da espuma. 6. Cura da espuma.



Fonte: Autor (2020).

Após transcorrido o período de cura, o sistema imobilizado obtido – constituído de células, enzimas e suporte de poliuretano - foi removido do recipiente, fracionado (bisturi e

ultra mix Britânia, 180 W, Brasil), submetido ao peneiramento para padronização de tamanho e tratado com glutaraldeído 0,5% (m/v), conforme descrito anteriormente no processo de imobilização por contato. Todos os sistemas imobilizados *in situ* foram mantidos em recipiente fechado e sob refrigeração em geladeira (Electrolux, Brasil, 4 ± 2 °C), até o momento do uso.

Em um primeiro momento, visando conhecer o comportamento da reação de formação da espuma de poliuretano flexível quando adicionada a biomassa, realizou-se ensaios, a partir da proporção indicada pelo fabricante, (10:3 m_{polio}/m_{isocianato}), variando-se as quantidades de polioliol (10 a 20 g), isocianato (3 a 7 g), silicone (0 a 0,04 g), quantidade de biomassa (0,5 a 10 g) e concentração (70, 140 e 210 g L⁻¹). Neste estudo, utilizou-se um sistema imobilizado na dimensão de cubos de 5 mm de aresta. Na etapa de expansão com e sem o uso de banho de gelo avaliou-se o aspecto visual das espumas com as células imobilizadas e a atividade enzimática ($U_{g_{célula_seca}^{-1}}$), frente a glicose e frutose 0,7 mol L⁻¹, a 39 °C, pH 6,4 e 4 g de sistema imobilizado.

A influência da biomassa na resistência mecânica do suporte utilizado para a imobilização (cubos de 5 mm) também foi avaliada, com diferentes quantidades de polioliol (10 a 14 g), isocianato (3 a 6 g), silicone (0,01 a 0,04 g) e biomassa a 210 g L⁻¹ (1, 3 e 10 g). Para isto, a massa do sistema imobilizado foi determinada antes do tratamento em glutaraldeído 0,5% e após o tratamento, sendo que a remoção de água (secagem do suporte) foi realizada em capela (Quimis 0216-21, Brasil), com fluxo de ar ligado e em contato com papel filtro (JProLab, Brasil), durante 24 h, sendo então determinada a perda de massa do suporte.

Posteriormente, visando eliminar totalmente a necessidade do uso de banho de gelo no processo, variou-se o volume reacional da espuma (sem micro-organismo) e manteve-se constante a proporção de polioliol: isocianato (20:6; 10:3; 6,67:2; 5:1,5 m/m), conforme fabricante. Para isto, foi introduzido um termômetro de bulbo na mistura reacional durante fase de expansão e avaliou-se a temperatura máxima de reação.

A partir dos comportamentos observados, novos ensaios foram realizados, avaliando-se a influência de polioliol (6 a 9 g) e isocianato (3 a 4 g) e do surfactante silicone (0,01 e 0,02 g) na imobilização *in situ* de 5 g de biomassa de *Z. mobilis* e complexo enzimático, na concentração de 210 g L⁻¹ e sem o uso de banho de gelo. Nos ensaios foram avaliados o aspecto visual das espumas com as células/enzimas imobilizadas, a atividade enzimática ($U_{g_{célula_seca}^{-1}}$ e $U_{g_{imobilizado}^{-1}}$), frente a glicose e frutose 0,7 mol L⁻¹, a 39 °C e pH 6,4, o rendimento de imobilização e a capacidade de reutilização (estabilidade operacional). Para cada teste de atividade enzimática foram utilizados 4 g do sistema imobilizado na dimensão de particulado,

com granulometria na faixa de 0,850 e 0,355 mm (peneiras de 20 e 42 mesh, respectivamente, Bertel Indústria Metalúrgica Ltda, Brasil).

A partir dos melhores resultados das etapas descritas, visou-se maximizar a quantidade de biomassa (1 a 10 g), a 210 g L⁻¹, a ser incorporada na espuma de poliuretano, sendo realizados novos ensaios.

Os critérios de avaliação do aspecto visual das espumas de poliuretano flexível com células de *Z. mobilis* imobilizadas *in situ* foram encolhimento, acúmulo de biomassa interna ou externa, desuniformidade, porosidade elevada, aspecto de escama, seco e/ou rígido. As espumas que não apresentaram nenhuma dessas características foram classificadas como “Aceitável” para uso, e as que apresentaram uma ou mais foram classificadas como “Não aceitável” para uso e descartadas.

4.3 Rendimento de imobilização

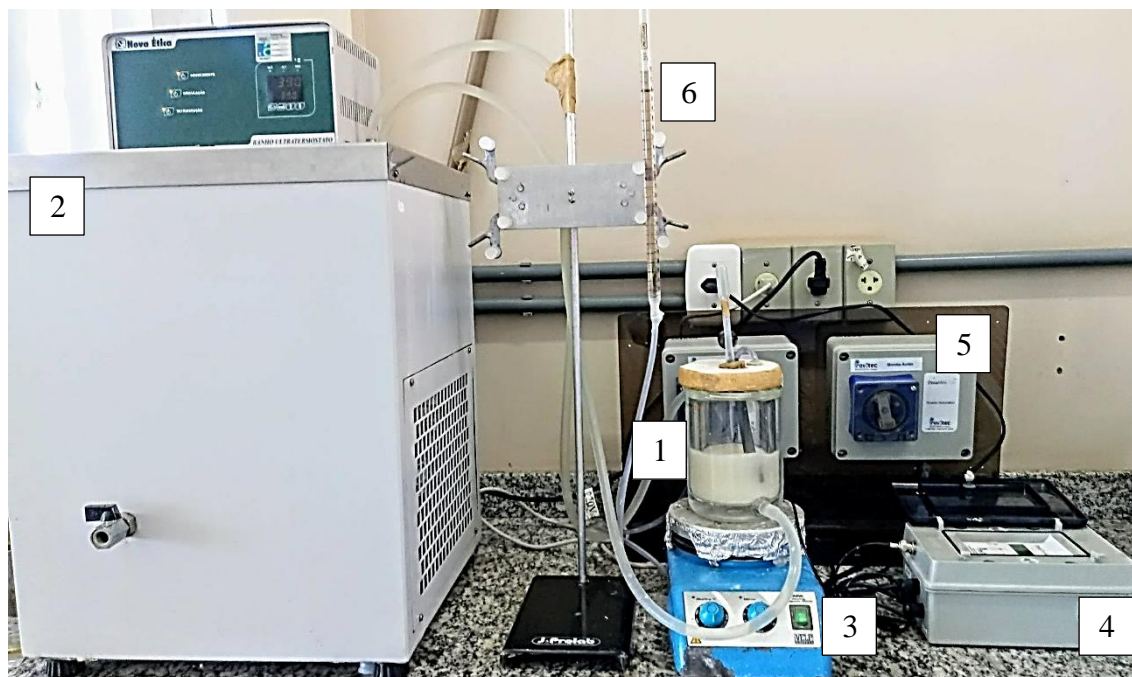
O rendimento de imobilização (RI) foi determinado pela razão entre a atividade enzimática de GFOR/GL de células de *Z. mobilis* imobilizadas ($U_{\text{imobilizado}}$) pela atividade enzimática de GFOR/GL da bactéria livre (U_{livre}) e o resultado expresso em percentual (%), conforme Equação 1 (NYARI, 2017).

$$\text{RI} = \frac{U_{\text{imobilizado}}}{U_{\text{livre}}} \times 100 \quad (1)$$

4.4 Ensaio de bioconversão

Os ensaios de bioconversão foram realizados em batelada, conforme sistema apresentado na Figura 12, visando a produção maltobionato de sódio. A bioconversão ocorreu em reator encamisado com 500 mL de volume total e 200 mL de volume de trabalho, em meio reacional contendo células/enzimas livres, previamente tratada com glutaraldeído 0,5%, ou imobilizadas em espuma de poliuretano flexível, e solução equimolar de maltose e frutose como substrato. Para estes testes foi utilizado o sistema imobilizado na forma de particulados de menor dimensão, com granulometria na faixa de 0,125 e 0,355 mm (peneiras de 115 e 42 mesh, respectivamente, Bertel Indústria Metalúrgica Ltda, Brasil). Essa reduzida dimensão permitiu uma maior adição do sistema imobilizado no meio reacional, mantendo-se a agitação, a qual foi a menor possível de ser obtida a partir do equipamento disponível para a pesquisa.

Figura 12 - Sistema para medição de atividade enzimática e de bioconversão.²



Fonte: Autor (2020).

Todos os experimentos foram realizados sob agitação magnética, com a temperatura do meio reacional mantida com uso de banho ultratermostato (Nova Ética, Brasil) e o pH mantido com solução de NaOH 2,5 mol L⁻¹, com auxílio de um controlador de pH (DosaTronic pH 2900, Provitec, Brasil) acoplado a uma bomba peristáltica (DosaMini 100, Provitec, Brasil). Os parâmetros operacionais avaliados foram escolhidos baseados em estudos de Carra (2012), Garin (2016) e Flores (2019), os quais utilizaram células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.

As concentrações de substratos e de produtos, nos ensaios de bioconversão, foram estimadas pelo volume e concentração de NaOH utilizado para neutralizar o ácido formado e controlar o pH (PEDRUZZI et al, 2007). Os produtos da reação, ácido maltobiônico na forma de sal e o sorbitol são formados em base equimolar (1:1), desta forma os substratos utilizados são consumidos na mesma proporção. O tempo de reação foi estabelecido pela conversão de 90% de maltose em maltobionato de sódio, constatado pelo consumo de base.

² 1. Reator encamisado. 2. Banho ultratermostato. 3. Agitador magnético. 4. Controlador de pH. 5. Bomba peristáltica. 6. Bureta com NaOH 0,1 a 2,5 mol L⁻¹.

Os ensaios de bioconversão foram divididos em três etapas, visando avaliar as melhores condições de concentração celular no meio reacional, temperatura, pH e concentração de substrato, a fim de otimizar a produção de maltobionato de sódio.

4.4.1 Avaliação de diferentes concentrações de células imobilizadas

Os ensaios de bioconversão com diferentes quantidades do sistema imobilizado, expressas em concentrações de células de *Z. mobilis* no meio reacional, foram realizados a 39 °C, pH 6,4 e 0,7 mol L⁻¹ de maltose e frutose, visto que foram descritas na literatura como condições ótimas de trabalho (ZACHARIOU; SCOPES, 1986; CARRA et al., 2003; MALVESSI, 2008 e GARIN, 2016). Nestes ensaios foram avaliadas as quantidades de 16,75; 17,94; 19,14; 20,41 e 21,53 g de sistema imobilizado, os quais equivalem as concentrações celulares em meio reacional de 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0 g_{célula_seca} L_{meio_reacional}⁻¹, respectivamente.

4.4.2 Avaliação de diferentes condições de temperatura e pH

O estudo da influência das condições de temperatura (30,54 a 47,46 °C) e pH (5,55 a 7,25) no processo reacional, durante os ensaios de bioconversão foi realizado através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² completo, mantendo-se constante a concentração equimolar de maltose e frutose de 0,7 mol L⁻¹. Como variáveis dependentes (respostas) avaliaram-se o tempo de bioconversão, a produtividade mássica, a produtividade específica e a velocidade específica de formação de produto.

4.4.3 Avaliação de diferentes concentrações de substratos

Para a avaliação de diferentes concentrações de substratos foram utilizadas a melhor condição de concentração celular e de temperatura e pH obtidos no planejamento experimental e avaliada a bioconversão nas concentrações equimolares de maltose e frutose de 0,7; 1,0 e 1,3 mol L⁻¹. A utilização dessas concentrações baseia-se nos estudos realizados anteriormente (GARIN, 2016; FLORES, 2019), nos quais limitaram-se na quantidade máxima de 1,5 mol L⁻¹ de maltose, pela alta viscosidade da solução, o que envolveria problemas de transferência de massa, considerando o uso do sistema imobilizado na reação.

Nos ensaios de bioconversão, a concentração de maltose residual e de maltobionato de sódio foram estimados, e os parâmetros tempo de bioconversão, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto foram determinados.

4.5 Determinação do desprendimento celular do sistema imobilizado

Os ensaios para a determinação da quantidade de células desprendidas do suporte (células livres) foram realizados com 50 mL de água destilada e 5,1 g de sistema imobilizado e em mesmo aparato experimental (reator encamisado, com banho ultratermostato e agitador magnético), condições (39 °C, por 24 h) e com uma mesma proporção volume/quantidade de sistema imobilizado dos ensaios de bioconversão, porém na ausência de substratos. Os ensaios foram realizados em triplicatas e o reator foi fechado com papel filme para evitar a evaporação da água.

Ao final do processo, foi separado o material líquido por filtração a vácuo e centrifugado Centrifuge MPW-351R, MPW® Med. Instruments, Polônia), a 7000 rpm por 20 min. Os tubos utilizados na centrifugação foram previamente mantidos em estufa de secagem a 105 °C, por 24 h, e após 15 min em dessecador, foram pesados. Após centrifugação e descarte do líquido sobrenadante, os tubos com o material celular foram novamente mantidos em estufa a 105 °C, 24 h, deixados esfriar no dessecador e pesados novamente. A quantidade de célula desprendida do sistema imobilizado foi determinada como a diferença de massa dos tubos, sendo apresentado em percentual. Esta metodologia foi proposta pelo próprio autor, após testes preliminares, sendo o resultado uma aproximação do que ocorre em meio reacional com substratos (maltose e frutose).

4.6 Estabilidade operacional do sistema imobilizado

A estabilidade operacional foi avaliada em dois momentos da pesquisa. A primeira durante a etapa de imobilização e a segunda nos ensaios de bioconversão.

A estabilidade enzimática de GFOR/GL de *Z. mobilis*, durante os ensaios de imobilização, foi avaliada pelo reuso em ciclos repetidos, de 1 h, de atividade enzimática frente a glicose e frutose (0,7 mol L⁻¹), nas mesmas condições operacionais dos ensaios de atividade enzimática padrão (39 °C, pH 6,4).

No intervalo entre cada batelada, a espuma de poliuretano flexível contendo células de *Z. mobilis* imobilizadas foi removida do meio, lavada – para remoção de substrato residual na

espuma, com 350 mL de água destilada, em agitação magnética por 5 min -, filtrada em papel filtro (JProlab, Brasil) com uso de bomba a vácuo (Marte[®] modelo 131, Brasil) e adicionada ao novo meio para nova medição. Este procedimento foi realizado em cada reuso e até verificação de 50% de atividade enzimática inicial.

A estabilidade operacional durante os ensaios de bioconversão para produção de maltobionato de sódio, utilizando a melhor condição de concentração celular, temperatura, pH e concentração de maltose e frutose, foi avaliada em bateladas de 24 h de processo, e seguiu os mesmos procedimentos de preparo do sistema imobilizado entre cada batelada. A estabilidade operacional foi determinada quando alcançado 50% do valor de produtividade mássica inicial.

4.7 Estabilidade de estocagem do sistema imobilizado

Para avaliar a estabilidade do sistema imobilizado, as amostras (20,42 g) foram acondicionadas em embalagem de polietileno transparente (camada interna) e polietileno tereftalato metalizado (camada externa) com Zip Lock (8 cm de largura x 12,5 cm de altura, espessura de 220 μm - Saco metalizados Stand Up Pouch, NZB Embalagens, Brasil) e armazenadas a 22 ± 2 °C, em câmara de germinação (Modelo 347 CDG, Fanem[®], Brasil), e a 4 ± 2 °C, em refrigerador doméstico (Electrolux, Brasil, Brasil), por um período de 6 meses.

As amostras foram submetidas ao processo de bioconversão por 24 h, nas condições de temperatura, pH e concentração de maltose e frutose maximizadas. Durante o armazenamento das amostras, também se acompanhou a umidade dos sistemas imobilizados e avaliou-se os parâmetros cinéticos e estequiométricos do processo (concentração máxima de produto, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto, fator de conversão de substrato em produto e concentração residual de substrato).

O teor de umidade foi determinado através de balança de infravermelho ID 200 (Marconi, Brasil), onde 3 g de amostra foram mantidas a 105 °C até atingir massa constante, de acordo com instruções do fabricante. O teor de umidade foi dado em % pelo equipamento, sendo resultado da diferença de massa da amostra entre o tempo inicial e o final.

4.8 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioconversão

Os parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioconversão foram determinados conforme descrito por Flores (2019). O ácido maltobiônico (na forma de sal de sódio) e o sorbitol foram formados em base equimolar durante o processo de bioconversão, e sendo estes

os únicos produtos da reação, os substratos maltose e frutose foram consumidos na mesma proporção. Desta forma, durante a bioconversão, os substratos e os produtos foram quantificados pelo método indireto, pela determinação do volume e da concentração da base adicionada (NaOH) para controlar o pH reacional (MALVESSI, 2008; PEDRUZZI et al., 2011; FLORES, 2019).

Para determinar a quantidade de produtos da reação foi utilizada a Equação 2.

$$C_p = \frac{V_b \times M \times M_M}{(V_T + V_b)} \quad (2)$$

Onde: C_p : concentração de produto formado (g L^{-1}); V_b : volume de base (mL); M : concentração de base (mol L^{-1}); M_M : massa molar do produto (ácido maltobiônico = $358,3 \text{ g mol}^{-1}$; maltobionato de sódio = $380,3 \text{ g mol}^{-1}$ ou sorbitol = $182,17 \text{ g mol}^{-1}$); V_T : volume total da bioconversão.

Para a determinação da quantidade de substrato consumido durante a bioconversão foi empregada a Equação 3.

$$C_{S,f} = C_{S,i} - \frac{V_b \times M \times M_{MS}}{(V_T + V_b)} \quad (3)$$

Onde: $C_{S,f}$: concentração de substrato consumido (g L^{-1}); $C_{S,i}$: concentração de substrato inicial (g L^{-1}); V_b : volume de base (mL); M : concentração de base (mol L^{-1}); M_{MS} : massa molar do substrato (maltose = 360 g mol^{-1} ou frutose = 180 g mol^{-1}); V_T : volume total da bioconversão.

É importante destacar que os procedimentos de determinação de substratos e produtos pelo volume e concentração de álcali empregado para controle do pH reacional no processo também foram utilizados por outros autores (SEVERO JUNIOR, 2008; PEDRUZZI et al., 2011), sendo observada equivalência deste método e por determinação por cromatografia líquida (FOLLE et al., 2018).

O fator de conversão de substrato em produto (Y_{P/S_0}) foi determinada pela relação entre o maltobionato de sódio formado e a concentração de maltose inicial, segundo a Equação 4.

$$Y_{P/S_0} = \frac{P_f}{S_0} \quad (4)$$

Onde: Y_{P/S_0} , conversão de substrato em produto (mmol mmol^{-1}); P_f , concentração de ácido maltobiônico formado (mmol); S_0 , concentração de maltose inicial (mmol).

A produtividade mássica foi calculada a partir da Equação 5.

$$P_m = \frac{P_f - P_i}{t} \quad (5)$$

Onde: P_m , produtividade mássica (mmol h^{-1}); P_i , massa inicial de produto (mmol); P_f , massa final de produto (mmol); t , tempo de processo (h).

Para determinar a produtividade específica nos ensaios de bioconversão foi empregada a Equação 6.

$$q = \frac{p}{g} \quad (6)$$

Onde: q , produtividade específica ($\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$); p , produtividade mássica (mmol); g , massa seca de *Z. mobilis* em gramas de (g).

A velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p.máx}$) foi determinada conforme equação 7.

$$\mu_{p.máx} = \frac{1}{M_x} \times \frac{dM_p}{dt} \quad (7)$$

Onde: $\mu_{p.máx}$, velocidade específica de formação de produto ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$); M_x , massa de células (g); dM_p/dt , derivada do produto em função do tempo (g h^{-1}).

4.9 Separação e purificação do produto de bioconversão

Para a separação e purificação do produto de interesse da bioconversão, o maltobionato de sódio, foram realizadas sucessivas precipitações utilizando metanol, conforme descrito por Flores (2019). À solução resultante do processo de bioconversão – contendo maltobionato de sódio, sorbitol e concentrações residuais de frutose e maltose – foi adicionado metanol com concentração final de solvente de 80% (m/v), sob agitação magnética. A adição de metanol foi realizada com auxílio de uma bomba (Cartridge Pump, Masterflex® L/S™ model 7519-15, Alemanha) a 9 mL min^{-1} . Posteriormente, esta solução foi mantida em temperaturas inferiores a 0°C , em congelador (Electrolux, Brasil), por no mínimo 12 h. Após este período, o sobrenadante foi removido e os cristais precipitados foram ressolubilizados em água destilada, visando manter a concentração de metanol em 80% no meio. Para a obtenção de um elevado grau de pureza de maltobionato de sódio, os procedimentos de precipitação e ressolubilização foram repetidos até a totalização de três precipitações (FLORES, 2019).

O processo de recuperação e purificação de ácidos orgânicos e seus sais, por precipitação utilizando solventes, foi depositado em patente de invenção (SILVEIRA et al., 2007), e foi posteriormente aperfeiçoado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprocessos, da Universidade de Caxias do Sul (CARRA, 2012; GARIN, 2016; DELAGUSTIN et al., 2017; FLORES, 2019; CARRA, 2020).

Após a etapa de separação, foram determinadas as quantidades de açúcar redutor (maltose e frutose) e sorbitol para avaliar a eficiência da purificação do maltobionato de sódio. Para o mesmo fim, foi também realizada a análise cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de uma solução (caldo) de bioconversão e de um produto final em pó, após etapa de purificação.

4.10 Conversão de maltobionato de sódio em ácido maltobiônico e cristalização

Para a conversão de maltobionato de sódio à sua forma ácida – ácido maltobiônico – foi utilizado o método de troca iônica, conforme Jones e Ho (2001), com algumas modificações, conforme propostas por Flores (2019), utilizando resina troca iônica H⁺ Amberlite 120 (Sigma-Aldrich, EUA).

A resina foi mantida por aproximadamente 24 h em água destilada para uma lavagem inicial, seguida de ativação. Para isto, 100 mL de ácido clorídrico (HCl) 1,0 mol L⁻¹ foram adicionados na resina drenada e mantidos sob agitação magnética por 20 min. A resina foi então lavada com água destilada, com o intuito de retirar o excesso de HCl, até ser atingido o pH aproximado de 4,7.

A amostra de maltobionato de sódio (5 g) em solução aquosa (100 mL) foi introduzida no recipiente contendo a resina (30 g), sob agitação magnética, sendo o processo finalizado após a queda do pH a aproximadamente 2, sendo mantida nesta condição por 20 min. Ao final do processo, a fração líquida, contendo o ácido formado, foi removida e novas adições de água destilada na resina foram realizadas, para auxiliar na remoção do ácido maltobiônico residual, sendo a coleta cessada quando observado o aumento do pH para aproximadamente 3,4 (FLORES, 2019). A conversão total do sal do ácido maltobiônico para sua forma ácida, comprovada pela mudança do pH da amostra, foi estudada por Flores (2019), estando fundamentada no valor de pKa do ácido.

A solução de ácido maltobiônico obtida, após remoção da resina, foi liofilizada (Edwards, Brasil), a pressão de vácuo abaixo de 500 mmHg e temperatura de -45 °C, por 36 h,

macerada, com auxílio de um almofariz e pistilo, e o pó resultante armazenado em dessecador, contendo sílica gel, até posterior utilização.

O ácido maltobiônico e o maltobionato de sódio foram avaliados em atividade antibacteriana e atividade antioxidante.

4.11 Aplicação do ácido maltobiônico em filmes a base de fécula de mandioca, quitosana e acetato de celulose

O ácido maltobiônico foi incorporado em filmes de fécula de mandioca, quitosana ou acetato de celulose pela técnica *casting* e utilizando o ácido maltobiônico nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% ($m_{\text{ácido}}/m_{\text{sf}}$), de acordo com ensaios preliminares. Os filmes obtidos isentos de ácido (0%) foram utilizados como controle e denominados como filmes puros.

Os filmes foram avaliados quanto ao aspecto visual, espessura, atividade antibacteriana e solubilidade em água e em óleo. Para padronização da espessura foram utilizados, para filmes de fécula de mandioca ou quitosana uma solução filmogênica de 39 g em placas de acrílico de 15 cm de diâmetro, e para acetato de celulose 10 mL de solução filmogênica em placas de vidro de 9 cm de diâmetro, a partir de testes preliminares.

4.11.1 Filmes de fécula de mandioca

Os filmes de fécula de mandioca foram obtidos a partir de uma solução filmogênica (SF) com 3% de fécula de mandioca ($m_{\text{fécula}}/m_{\text{sf}}$) suspenso em água destilada, e 30% de glicerol ($m_{\text{glicerol}}/m_{\text{fécula}}$) como agente plastificante. Após os componentes foram misturados e aquecidos gradualmente sob agitação manual em banho maria, até atingir a temperatura de 70 °C, sendo a mesma mantida por 10 min, para assegurar a gelatinização térmica do amido (UGALDE, 2014, com modificações). Em seguida, os filmes foram resfriados a 40 °C, o ácido maltobiônico foi adicionado, homogeneizado e posteriormente o material foi vertido em placas de Petri. A solidificação da solução filmogênica e a evaporação do solvente foi realizada com a placa aberta, em estufa sem circulação de ar (Tecnal, TE-393/2, Brasil), a 40 °C, por aproximadamente 24 h.

4.11.2 Filmes de quitosana

Os filmes de quitosana foram preparados a partir de uma solução contendo 2% de quitosana ($m_{\text{quitosana}}/m_{\text{sf}}$), 30% de glicerol ($m_{\text{glicerol}}/m_{\text{quitosana}}$) como agente plastificante, suspensos em uma solução aquosa de ácido acético 1%. A mistura foi homogeneizada, autoclavada a 121 °C por 10 min e filtrada (UGALDE, 2014, com modificações). Após o resfriamento a 40 °C, foi adicionado o ácido maltobiônico, vertida em placas de Petri e mantidos em estufa a 40 °C, sem circulação de ar (Tecnal, TE-393/2, Brasil.), com a placa aberta, para completa solidificação e evaporação do solvente, por aproximadamente 24 h.

4.11.3 Acetato de celulose

Os filmes de acetato de celulose foram produzidos a partir de uma solução contendo 10% de acetato de celulose (m/v) suspenso em acetona P.A. Após completa dissolução do acetato de celulose (UGALDE, 2014), foi adicionado o ácido maltobiônico. O material foi vertido em placas de Petri e mantido a 22 °C para completa solidificação e evaporação do solvente, com a placa fechada, visando uma reduzida velocidade de evaporação e maior homogeneidade do filme, a partir de observações de testes preliminares.

4.11.4 Avaliação visual e espessura dos filmes

Os filmes foram avaliados subjetivamente e apenas aqueles que apresentaram continuidade (ausência de rupturas e fraturas), homogeneidade (ausência de partículas ou bolhas visíveis a olho nu, zonas de opacidade ou cores diferenciadas) e manuseabilidade (possibilidade de ser manuseado sem risco de ruptura) foram submetidos aos testes de atividade antibacteriana e, posteriormente, de solubilidade.

A espessura dos filmes foi determinada com auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo, Japão), com resolução de $\pm 0,001$ mm, a partir da média aritmética de cinco pontos aleatórios de cada filme, distantes a pelo menos 6 mm da borda (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.11.5 Solubilidade dos filmes

Os filmes foram avaliados quanto a solubilidade em água e óleo (SOL%), segundo Gontard et al. (1994) e Malherbi (2018), com adaptações. Para isso, filmes com 2 cm de diâmetro foram secos a 50 °C, por 24 h e pesados (M_{inicial}). Posteriormente, os discos de filmes foram imersos em 50 mL de água destilada ou azeite de oliva extra virgem, por 24 h, a 50 °C e 50 rpm em agitador orbital (Excella E25R, New Brunswick Scientific Co., INC, EUA).

Para a solubilidade em água, após o período de imersão, as amostras foram novamente secas a 50 °C, até completa evaporação do solvente (verificada pela massa constante das amostras), as mesmas foram pesadas (M_{final}) e a solubilidade determinada pela perda de massa do disco dos filmes na imersão e expressa de acordo com a Equação 8.

$$\text{SOL}\% = \frac{(M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}})}{M_{\text{inicial}}} * 100 \quad (8)$$

Para a solubilidade em óleo, após o período de imersão, as amostras foram retiradas com pinça e inseridas em papel filtro qualitativo com uma área de 24 cm², onde permaneceram durante 2 h para absorção do óleo, para posteriormente ocorrer a secagem a 50 °C, por 24 h e a pesagem da massa não solubilizada (M_{final}). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.12 Atividade antibacteriana do ácido maltobiônico, do maltobionato de sódio e dos filmes incorporados com ácido maltobiônico

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos produtos da bioconversão de *Z. mobilis* foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), utilizando o método indireto de crescimento bacteriano, mediante a densidade ótica em meio de cultura líquido (PIEROZAN et al., 2009). A CIM foi determinada como a menor concentração de amostra que não gerou alteração na turbidez, após 24 h de incubação.

A determinação da CIM foi realizada sobre as bactérias patogênicas e de preocupação de saúde pública Gram-negativas (*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Choleraesuis - ATCC 10708 e *Escherichia coli* - ATCC 25922) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* - ATCC 7644), as quais foram previamente crescidas em caldo Luria Bertani (LB – 10 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ extrato de levedura, 5 g L⁻¹ NaCl), a 37 °C por 24 h.

Para a determinação atividade antibacteriana dos produtos da bioconversão (ácido maltobiônico e maltobionato de sódio), 10 µL de culturas ativas (10^8 UFC mL⁻¹) foram inoculadas em poços de microplacas de fundo chato, contendo caldo LB (mínimo 75 µL) e diferentes concentrações das amostras (50 a 0,4 mg mL⁻¹), ressuspensas em água Milli-Q, totalizando um volume final de 310 µL por poço. Cada concentração de amostra foi avaliada em triplicata e como branco e controle foram avaliados poços contendo apenas meio de cultura e meio de cultura com o micro-organismo, respectivamente. Posteriormente, as microplacas foram incubadas em estufa (modelo 320-SE, Fanem[®], Brasil), a 37 °C por 24 h. Antes e após o período de incubação, 0 e 24 h, respectivamente, foi realizada a leitura da microplaca, utilizando-se o leitor automático de microplacas (modelo EL800, Bio-Tek Instruments Inc., EUA), com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm.

Para avaliar a atividade antibacteriana dos filmes de fécula de mandioca e quitosana, foi utilizado o método de difusão em ágar, através da fixação de amostras de filmes, de 10 mm de diâmetro, em placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton previamente inoculado com 0,1 mL da bactéria teste, na concentração de 10^5 UFC mL⁻¹, pela técnica de plaqueamento em superfície (BOSCHETTO et al., 2012). O controle negativo foi o filme sem tratamento (filme puro). O resultado foi analisado através da presença ou ausência de um halo de inibição de crescimento microbiano em torno do filme, cujo diâmetro varia de acordo com a velocidade de difusão do antimicrobiano testado e a sensibilidade da bactéria. O resultado foi expresso pelo diâmetro do halo de inibição (mm), sem subtrair o diâmetro do filme.

4.13 Atividade antioxidante do ácido maltobiônico e do maltobionato de sódio

A atividade antioxidante foi determinada por três técnicas (I) capacidade antioxidante contra o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina), (II) radical ABTS^{•+} ([2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]) e (III) por habilidade quelante. O ácido maltobiônico e o maltobionato de sódio foram avaliados nas concentrações entre 0,01 e 20 mg mL⁻¹ e em triplicata.

4.13.1 Método do radical DPPH

Na determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH, 500 µL de uma solução etanólica de DPPH (0,1 mmol L⁻¹) com 500 µL de amostra foram incubados por 30 min, sobre o abrigo de luz e em repouso, seguida de leitura da absorbância a

515 nm, em espectrofotômetro (Pró-Análise, Modelo: UV-1600, Brasil), segundo Hamann et al. (2018). No total, quatro amostras foram analisadas, sendo estas soluções contendo concentrações crescentes de ácido maltobiônico em etanol e em água ultrapurificada (Milli-Q® Academic, Millipore Corporation, EUA) e maltobionato de sódio em etanol e em água ultrapurificada (Milli-Q® Academic, Millipore Corporation, EUA).

Procedeu-se da mesma forma para a preparação da solução denominada “controle” (Abs.amostra), porém substituindo 500 µL da amostra por 500 µL de solvente (etanol e água ultrapurificada). As soluções denominadas “branco” (Abs.branco) foram preparadas usando diferentes concentrações do etanol e água ultrapurificada, sem DPPH. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação 9:

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs.amostra} - \text{Abs.branco})}{\text{Abs.controle}} * 100 \quad (9)$$

4.13.2 Método do radical ABTS^{•+}

Para a determinação de atividade antioxidante pela técnica do radical ABTS^{•+} foi realizado o preparo prévio (16 h antes da análise da amostra) da solução com o radical ABTS^{•+}, a partir da mistura de 1 mL de uma solução estoque de ABTS (7 mmol L⁻¹) com 17,6 µL de uma solução estoque de persulfato de potássio (140 mmol L⁻¹), seguido de diluição com água destilada até uma absorção em espectrofotômetro (Pró-Análise, Modelo: UV-1600, Brasil) de 0,700 nm, no comprimento de onda de 734 nm (BOROSKI, 2015). As amostras de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio foram diluídas em água destilada, 20 µL de cada amostra foram adicionadas a 2 mL da solução do radical ABTS^{•+} e, após 6 min de repouso ao abrigo de luz, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 734 nm. O radical ABTS^{•+} forma um cromóforo verde e a adição de um antioxidante resulta na neutralização desse radical, causando o desaparecimento desta coloração. Assim, quanto menor a absorbância obtida, maior a capacidade antioxidante da amostra analisada, sendo calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação 10.

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs.amostra} - \text{Abs.branco})}{\text{Abs.ABTS}} * 100 \quad (10)$$

4.13.3 Habilidade quelante

Na técnica de habilidade quelante dos íons Fe^{2+} , 3,7 mL de amostras diluídas em água destilada foram misturadas a 0,1 mL de cloreto de ferro (FeCl_2 , 2 mmol L^{-1}), sendo realizada a leitura em espectrofotômetro (Pró-Análise, Modelo: UV-1600, Brasil) a 562 nm (A_0), seguido de posterior adição de 0,2 mL ferrozina (5 mmol L^{-1}), agitação vigorosa por 1 min, repouso de 10 min ao abrigo de luz e nova leitura a 562 nm (A_1). Como branco foi utilizado água destilada (Abs_{branco}). A habilidade quelante (%) foi determinada segundo a Equação 11. A metodologia proposta utiliza o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, massa molar 292,24 g mol^{-1}) como controle positivo (BOROSKI, 2015).

$$\text{Habilidade quelante} = \frac{[Abs_{\text{branco}} - (A_1 - A_0)]}{Abs_{\text{branco}}} * 100 \quad (11)$$

4.14 Metodologia analítica

4.14.1 Determinação da concentração celular

Nas etapas de produção de inóculo e de biomassa e enzimas em biorreator foi determinado a concentração celular. Para o inóculo foi estimada, por método indireto, por densidade óptica a 560 nm. Para isto, 1 mL da amostra de inóculo foi adicionada a 0,2 mL de HCl 2 mol L^{-1} , visando a solubilização do CaCO_3 presente no meio, e posteriormente diluída em 8,8 mL de água destilada, obtendo-se a diluição de 10% (inóculo/água). Uma adicional diluição foi realizada, com adição de 1 mL da diluição inicial, em 5 mL de água destilada, seguida da leitura de densidade óptica em espectrofotômetro (UV-1600, Pro-Análise, Brasil). As medidas de absorvância foram realizadas em duplicata (CARRA, 2012).

No cultivo em biorreator, a quantificação foi realizada por gravimetria e a massa seca celular determinando em g L^{-1} , conforme Carra (2012), com modificações. Para isto, 3 mL de meio fermentativo (triplicata) foram centrifugados (Modelo 206 BL, Excelsa[®] II, Brasil), a 3500 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado de massa celular foi adicionada 3 mL de água destilada e centrifugada novamente nas mesmas condições. Após descarte do novo sobrenadante, a massa celular foi ressuspensa em 3 mL de água destilada e o conteúdo final transferido para cadinhos previamente pesados e mantido em estufa (Modelo EL – 1.3, Odontobrás Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda, Brasil), a 90-95 °C, por 24 h. Posteriormente, os cadinhos foram mantidos em dessecador, à temperatura ambiente, por

20 min, para resfriamento e foi mensurada a massa final em balança analítica (Ay220, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, Brasil). A concentração celular foi determinada pela razão entre massa seca de células (g) pelo volume de meio utilizado nesta análise (mL) e convertida para g L^{-1} .

Na etapa de imobilização, a massa de células imobilizadas por contato foi também determinada. Esta massa celular foi quantificada por gravimetria, pela diferença de massa observada entre as espumas previamente secas e pesadas antes da imobilização e as que continham células imobilizadas por contato, após desidratação em estufa (Modelo EL – 1.3, Odontobrás Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda, Brasil), a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

4.14.2 Atividade enzimática

Os ensaios de atividade enzimática do complexo enzimático GFOR/GL foram realizados após a produção das células de *Z. mobilis* e após a imobilização celular, conforme metodologia proposta por Malvessi et al. (2006), com modificações. Nas células livres, a atividade enzimática foi determinada em solução equimolar $0,7\text{ mol L}^{-1}$ de glicose e frutose, 4 g L^{-1} de células de *Z. mobilis*, reação em 100 mL de volume de trabalho, por 1 h e utilizando solução de NaOH 1 mol L^{-1} para controle do pH a 6,4.

Para os ensaios com células imobilizadas em espuma de poliuretano, foi realizado os mesmos procedimentos, porém utilizando 4 g do sistema imobilizado, reação em 200 mL de volume de trabalho e NaOH $0,1 - 0,35\text{ mol L}^{-1}$. A concentração da solução de NaOH empregada foi dependente da velocidade reacional.

O substrato glicose foi escolhido para a determinação da atividade enzimática por ser a aldose com maior afinidade a enzima GFOR (ZACHARIOU e SCOPES, 1986; MALVESSI, 2008) e é comumente utilizada como referência para efetivação da presença do complexo enzimático GFOR/GL pela biomassa de *Z. mobilis* (CARRA, 2012; GARIN, 2016; DELAGUSTIN, 2017; FLORES, 2019).

A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de ácido glicônico, em mmol, formado por hora e por grama de célula seca ($\text{mmol h}^{-1}\text{ g}_{\text{célula_seca}}^{-1} = U\text{ g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$). Este valor foi estimado pelo coeficiente angular da reta obtida pela relação entre o tempo e o volume consumido de NaOH, necessário para neutralizar o ácido formado e controlar o pH em 6,4; volume este multiplicado pela concentração desta base (CARRA, 2012; FLORES, 2019).

A atividade enzimática do complexo GFOR/GL também foi determinada frente a maltose e frutose, durante a primeira hora dos ensaios de bioconversão, no estudo comparativo

das células livres e imobilizadas, sendo definido com a quantidade de ácido maltobiônico, em mmol, formado por hora e por grama de célula seca ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}_{\text{célula_seca}}^{-1} = U_M \text{g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$) e estimado da mesma forma que para o ácido glicônico, acima mencionado.

4.14.3 Determinação de açúcar redutor

Após a etapa de purificação do maltobionato de sódio, os carboidratos solúveis redutores (maltose e frutose) foram analisados pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Em tubo de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de amostra, numa diluição conhecida, a 0,75 mL de solução DNS. Os tubos foram colocados em banho a 100 °C por 5 min, e em seguida, resfriados em banho de gelo por 2 min. Após adição de 4 mL de água destilada às preparações, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (UV-1600, Pro-Análise, Brasil), a 545 nm e a concentração de açúcares redutores presente determinada através de curva de calibração construída com soluções de maltose e frutose entre 0,1 e 1,0 g L⁻¹, submetidas ao mesmo procedimento. O branco foi feito substituindo-se o volume de amostra diluída por água destilada.

4.14.4 Determinação de sorbitol

A determinação de sorbitol, também após a etapa de purificação do maltobionato de sódio, foi realizada seguindo o método proposto por Venzon e Miron (2008). Para tanto, a 0,2 mL de amostra previamente diluída foram adicionados 1 mL de formiato de potássio 0,7 mol L⁻¹ e 2,0 mL de periodato de potássio 3,5 mmol L⁻¹. Após transcorrido 1 min, foi adicionado 1,5 mL do Reagente I. Os tubos contendo a mistura reacional foram mantidos a 100 °C por 2 min e, na sequência, colocados em banho de gelo por 2 min. Após adicionado 5 mL de água destilada, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (UV-1600, Pro-Análise, Brasil), a 412 nm, e convertida em concentração com o uso de curva padrão de sorbitol entre 0,010 – 0,018 mg mL⁻¹.

O preparo do Reagente I constituiu na mistura de 7 g de acetato de amônio dissolvido em 20 mL de água destilada e 0,160 g de tiosulfato de sódio dissolvido em 10 mL de água. Foi então acrescentado 0,5 mL de acetilacetona à mistura e, após, o volume da solução foi completado para 50 mL com água destilada.

4.14.5 Análise cromatográfica do maltobionato de sódio

Para a confirmação da pureza do maltobionato de sódio, foi realizada também a análise de cromatografia líquida de alta eficiência em um caldo de bioconversão e no produto após etapa de purificação. A análise foi realizada em cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Japão, modelo LC-20AD), com coluna Aminex HPX-87H (BioRad, EUA), com dimensões de 300 mm x 7,8 mm, 9 μm , controle CMB-20A, bomba isocrática LC-20AD, CTO-20A *column over* e um detector de índice de refração (RID-20A). Como fase móvel utilizou-se ácido sulfúrico (previamente filtrada com um filtro de poliamida, 0,22 μm), com vazão de 0,6 mL min^{-1} , temperatura de trabalho de 60 °C e volume de amostra injetado de 5 μL . Para a análise, as amostras foram diluídas na faixa linear de análise, entre 0,5 e 10 g L^{-1} , com água ultrapurificada (Milli-Q[®] Academic, Millipore Corporation, EUA), e filtradas em filtro de 0,2 μm (FLORES, 2019).

4.14.6 Análise de microscopia eletrônica de varredura do sistema imobilizado

O sistema imobilizado foi analisado em microscópio eletrônico de varredura (MEV). O preparo da amostra foi realizado com a fixação do sistema imobilizado particulado em um suporte metálico, por meio de uma fita adesiva dupla face de carbono e recoberta em metalizadora (SC 7620, Quorum, UK) com uma fina camada de ouro (20 nm), sob vácuo. A amostra foi analisada em MEV (ZEISS - EVO LS 25, Alemanha), com ampliação de 5.000 e 10.000 vezes e tensão de 10 kV.

4.14.7 Análise textural do sistema imobilizado

O sistema imobilizado foi caracterizado em área superficial, volume e tamanho de poro pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller) por adsorção/dessorção de nitrogênio (N_2). As amostras foram previamente tratadas a 50 °C, por 12 h e sob pressão reduzida, antes da realização da análise em equipamento Nova 2200e (QuantaChrome, EUA). Depois do pré-tratamento foram realizadas as medidas de adsorção de N_2 na temperatura do nitrogênio líquido (-196 °C) e determinadas as características textural do sistema imobilizado.

4.15 Tratamento estatístico

Os resultados foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamento experimental, análise de variância (ANOVA) ou diferenças das médias pelo teste de Tukey, com auxílio do *software* Statistica 5.0., ou *t-student*, com auxílio do *software* SASM – Agri, versão 4, com nível de significância de 95% de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussão das estratégias de imobilização por contato e *in situ* de células de *Z. mobilis* e complexo enzimático GFOR/GL em espuma de poliuretano flexível (PU), dos ensaios de bioconversão para produção de maltobionato de sódio e da estabilidade operacional e de estocagem do sistema imobilizado. Ademais, da separação, purificação e conversão do sal em ácido maltobiônico e da atividade antibacteriana e antioxidante destes produtos. As potencialidades de aplicação do ácido maltobiônico em filmes de fécula de mandioca, quitosana e de acetato de celulose também serão sugeridas e discutidas.

5.1 Biomassa de *Zymomonas mobilis* e complexo enzimático GFOR/GL

Após o período de ativação, desenvolvimento de inóculo, produção de biomassa e complexo enzimático, centrifugação e ressuspensão em água destilada estéril, na concentração de $210 \text{ g}_{\text{célula_seca}} \text{ L}^{-1}$, obteve-se a suspensão de biomassa com aspecto brilhante, pastoso e homogêneo, conforme Figura 13.

Figura 13 – Aspecto visual da suspensão de biomassa de *Zymomonas mobilis*.



Fonte: Autor (2020).

Na determinação da atividade enzimática do complexo enzimático, valores entre 26 - 38 $\text{U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$ foram obtidos, sendo utilizadas para a imobilização apenas aqueles cultivos com atividade de $34 \pm 4 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$, para favorecer a padronização dos testes posteriores de bioconversão.

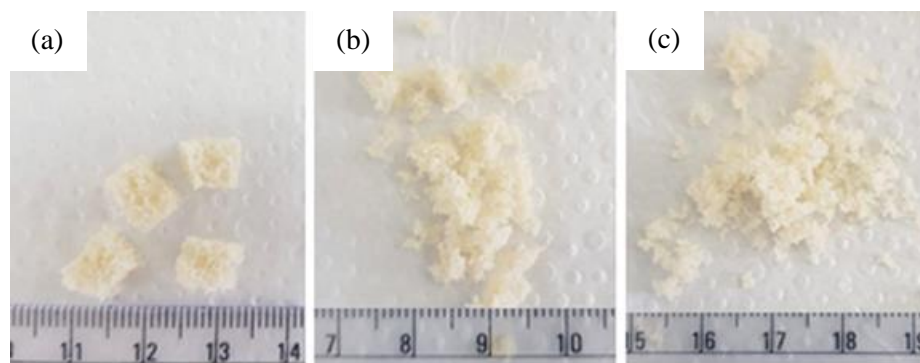
5.2 Imobilização de *Zymomonas mobilis* e complexo enzimático em espuma de poliuretano

Para a avaliação das estratégias de imobilização de células de *Z. mobilis* e complexo enzimático GFOR/GL em PU serão apresentados os resultados de ambos os métodos, por contato e *in situ*.

5.2.1 Imobilização por contato

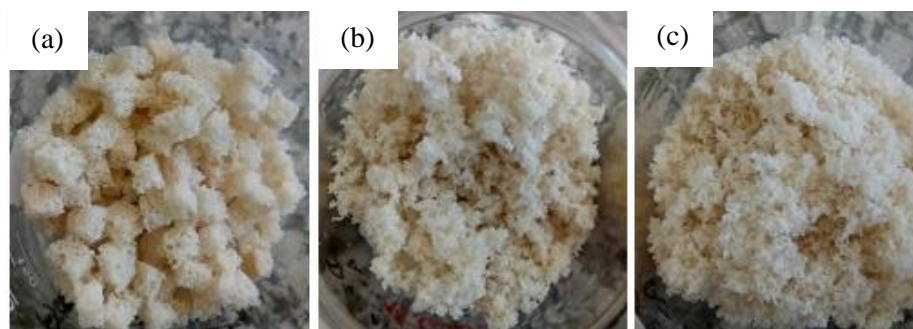
O aspecto visual do suporte e da espuma de poliuretano flexível contendo células de *Z. mobilis* imobilizadas por contato são apresentados na Figura 14 e 15, onde é possível observar as três dimensões avaliadas, e após imobilização por 12 h de contato em reator, um leve escurecimento da espuma (Figura 15).

Figura 14 - Dimensões das espumas utilizadas como suporte na imobilização por contato: (a) cubos 125 mm³ (5 mm de aresta); (b) espumas com mesh 9 (2 mm) e (c) espumas com mesh 16 (1 mm).



Fonte: Autor (2020).

Figura 15 - Aspecto visual das espumas de poliuretano flexível contendo células de *Z. mobilis* imobilizadas por contato, após 12 h: (a) cubos 125 mm³ (5 mm de aresta); (b) espumas com mesh 9 (2 mm) e (c) espumas com mesh 16 (1 mm).



Fonte: Autor (2020).

Na Tabela 2 são apresentados os valores de atividade enzimática e residual de atividade enzimática após um reuso. A maior atividade enzimática obtida foi de $1,95 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$ (ensaio 6), inferior ao valor das células/enzimas livres ($34 \pm 4 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$), sugerindo baixa imobilização celular por contato e/ou limitações difusionais imposta pelo suporte.

Tabela 2 - Atividade enzimática e residual após reuso do sistema imobilizado por contato.

Ensaio	Espuma	Alginato de sódio (%)	Cloreto de cálcio (mol L^{-1})	Atividade enzimática ($\text{U}_{\text{inicial}} \text{ g}^{-1}$)	Atividade enzimática ($\text{U}_{\text{reuso}} \text{ g}^{-1}$)	Residual de atividade enzimática (%)
1		0,00	0,00	0,16	0,06	36,38
2	Cubos	0,25	0,05	0,07	0,05	67,27
3	(5 mm)	0,50	0,10	0,24	0,17	72,86
4		1,00	0,20	0,00	-	-
5		0,00	0,00	0,12	0,08	66,89
6	Média	0,25	0,05	1,95	1,71	87,91
7	(2 mm)	0,50	0,10	1,11	1,07	96,39
8		1,00	0,20	0,00	-	-
9		0,00	0,00	0,26	0,10	40,43
10	Fina	0,25	0,05	0,47	0,36	74,85
11	(1 mm)	0,50	0,10	1,02	0,92	89,84
12		1,00	0,20	0,00	-	-

O uso da espuma de 2 mm tratada com alginato de sódio 0,25% e cloreto de cálcio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (ensaio 6) apresentou maior atividade ($1,95 \text{ U}_{\text{inicial}} \text{ g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$), seguida da espuma 2 mm ou 1 mm com alginato de sódio 0,50% e cloreto de cálcio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (ensaios 7 e 11).

Na análise dos resultados (Tabela 2) observou-se que o tratamento das espumas com alginato de cálcio (exceto ensaios 1, 5 e 9) influenciou no residual de atividade enzimática. É possível sugerir que este tratamento aumentou a capacidade de retenção de células no suporte nas três dimensões (1, 2 e 5 mm), sendo diretamente proporcional às concentrações do alginato de sódio e do cloreto de cálcio utilizadas. Com o uso de alginato de sódio 1%, não observou-se atividade enzimática, sugerindo elevadas limitações difusionais.

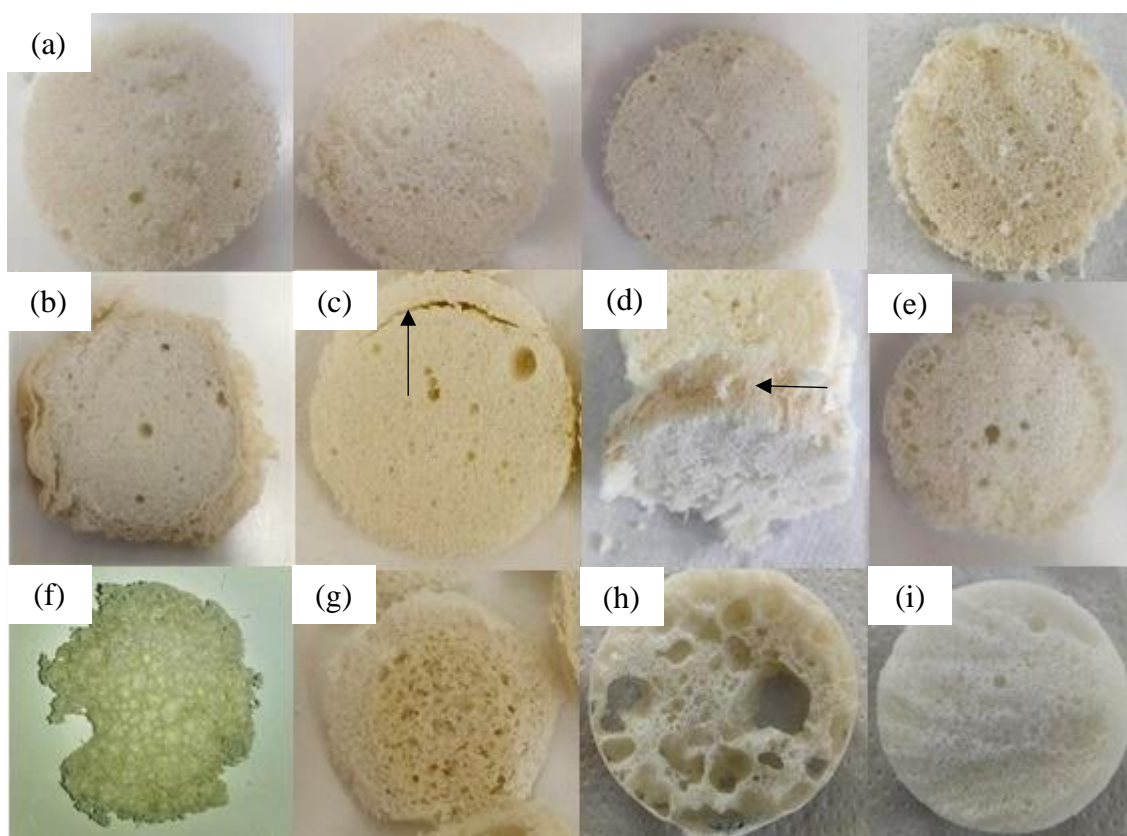
Neste método de imobilização incorporou-se por contato uma concentração celular de $0,02$ a $0,09 \text{ g}_{\text{célula_seca}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$. As estratégias de imobilização por contato não foram

consideradas para os ensaios de bioconversão, devido aos baixos valores de atividade enzimática quando comparadas com as células/enzimas livres.

5.2.2 Imobilização *in situ*

Os sistemas imobilizados *in situ* foram classificados como “Aceitável” ou “Inaceitável” para o uso, conforme Figura 16, quanto ao aspecto visual.

Figura 16 – Aspectos visuais dos sistemas imobilizados *in situ*: (a) espumas com características consideradas aceitáveis para uso; e espumas consideradas não aceitáveis para uso por motivo de (b) encolhimento, (c) acúmulo de biomassa interna, (d) acúmulo de biomassa externa, (e) desuniformidade, (f) aspecto de escama, (g) seca e rígida e (h) porosidade elevada. (i) Espuma padrão (sem micro-organismo e conforme fabricante).



Fonte: Autor (2020).

A Tabela 3 apresenta os resultados da atividade enzimática e aspecto visual dos sistemas imobilizados *in situ* variando a concentração de reagentes (poliol e isocianato), silicone e biomassa. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 14 e 15 g de poliol, 6 e 7 g

de isocianato, 0,02 e 0,04 g de silicone e 8 a 10 g de biomassa (210 g L^{-1}), com valor máximo de atividade enzimática de $8,01 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$ (ensaio 36).

Tabela 3 - Atividade enzimática e aspecto visual dos sistemas imobilizados *in situ* com diferentes concentrações de polioliol, isocianato, silicone e biomassa.

Ensaio	Poliol (g)	Isocianato (g)	Silicone (g)	Massa de biomassa (g)	Concentração de biomassa (g L^{-1})	Aspecto visual	Atividade enzimática ($\text{U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$)
1 ^A	10	3	0	1	70	Aceitável	n.d.
2 ^A	10	3	0	1	70	Aceitável	n.d.
3 ^A	10	3	0	1	70	Aceitável	n.d.
4 ^A	10	3	0	1	70	Aceitável	n.d.
5 ^A	10	3	0	2	70	Aceitável	n.d.
6 ^A	10	3	0	3	70	Não aceitável	-
7 ^A	10	3	0	1	140	Não aceitável	-
8	10	3	0	1	140	Aceitável	n.d.
9	10	3	0	0,5	210	Aceitável	n.d.
10	10	3	0	0,75	210	Não aceitável	-
11	10	3	0	1	210	Não aceitável	-
12	15	4,50	0	1	210	Aceitável	n.d.
13	15	4,50	0	1	210	Aceitável	n.d.
14	15	4,50	0	2	210	Aceitável	n.d.
15	15	4,50	0	2,5	210	Aceitável	n.d.
16	15	4,50	0	3	210	Não aceitável	n.d.
17	20	6	0	3	210	Aceitável	0,29
18	20	6	0	4	210	Aceitável	0,67
19	20	6	0	5	210	Aceitável	1,05
20	20	6	0	6	210	Não aceitável	-
21	19	6	0	6	210	Não aceitável	-
22	18	6	0	6	210	Não aceitável	-
23	17	6	0	6	210	Não aceitável	-
24	16	6	0	6	210	Não aceitável	-
25	15	6	0	6	210	Não aceitável	-
26	14	6	0	6	210	Não aceitável	-
27	15	6	0,02	6	210	Aceitável	2,68
28	15	7	0,04	6	210	Aceitável	1,21
29	15	6	0,01	8	210	Não aceitável	-

Tabela 3 - Continuação

Ensaio	Poliol (g)	Isocianato (g)	Silicone (g)	Massa de biomassa (g)	Concentração de biomassa (g L ⁻¹)	Aspecto visual	Atividade enzimática (U g _{célula_seca} ⁻¹)
30	15	6	0,02	8	210	Aceitável	7,82
31	14	6	0,02	8	210	Não aceitável	-
32	14	6	0,02	9	210	Aceitável	3,87
33	14	6	0,04	9	210	Aceitável	7,60
34	14	6	0,02	10	210	Não aceitável	-
35	14	6	0,03	10	210	Aceitável	6,10
36	14	6	0,04	10	210	Aceitável	8,01
37	13	6	0,03	10	210	Não aceitável	-
38	12	6	0,03	10	210	Não aceitável	-

n.d. Não determinável, devido à ausência de variação significativa do pH no meio reacional.

Testes realizados com ajuste de concentração celular (g L⁻¹) com água destilada e expansão da espuma com banho de gelo, exceto: ^A Nesses testes não foi utilizado banho de gelo durante expansão da espuma.

Dimensão: cubos de 5 mm de aresta.

O aspecto visual e os resultados da perda de massa dos sistemas imobilizados são apresentados na Figura 17 e Tabela 4, evidenciando que a imobilização da biomassa afetou a resistência mecânica das espumas em cubos, com perdas de massa de até 30%. A análise desses resultados indica que haveria um comprometimento na reutilização do sistema imobilizado em cubos, e desta maneira, sugere-se como alternativa a utilização da espuma na forma de particulados.

Figura 17 – Aspecto visual das espumas de poliuretano em cubos (5 mm) (a) isentas de biomassa e (b) com o sistema imobilizado *in situ* (ensaio 15) antes e após tratamento com glutaraldeído 0,5%.



Fonte: Autor (2020).

Tabela 4 - Perda de massa dos sistemas imobilizados *in situ* tratados com glutaraldeído 0,5%.

Ensaio	Poliol (g)	Isocianato (g)	Silicone (g)	Massa de biomassa (g)	Perda de massa (%)
Padrão	7	3	0	0	1,71
1	10	3	0,01		11,14
2	10	3	0,02		8,78
3	10	3,50	0,01		6,06
4	10	3,50	0,02		7,74
5	10	3,75	0,01	1	Descartada*
6	10	3,75	0,02		6,47
7	9	3	0,01		8,28
8	9	3,50	0,02		Descartada*
9	9	3	0,01		19,13
10	9	3,50	0,02		15,85
11	8	3	0,01		12,95
12	8	3	0,02	3	21,43
13	8	3,50	0,01		12,74
14	8	3,50	0,02		9,49
15	14	6	0,04	10	30,16





Biomassa na concentração de 210 g L⁻¹.

* Descartada devido a aspecto visual não aceitável para uso.

Dimensão: cubos de 5 mm de aresta.

A temperatura reacional foi também avaliada, conforme observado nos resultados apresentados na Tabela 5. Pode ser observado que com o aumento da quantidade de polioliol e isocianato - mesmo mantendo a proporção, conforme fabricante - maior foi a temperatura da reação para a formação da espuma, o que, em certo grau, poderia afetar a atividade enzimática. Assim, seguiu-se o estudo com a eliminação do uso de banho de gelo no processo e com a utilização de uma menor proporção de polioliol e isocianato na formulação.

Tabela 5 - Aspecto visual e temperatura reacional de formação do suporte variando a concentração de polioliol e isocianato.

Ensaio	Quantidade de reagente		Temperatura (°C)	Aspecto visual
	Poliol (g)	Isocianato (g)		
1	20	6	63	
2	10	3	58	
3	6,67	2	54	
4	5	1,50	46	

Nos ensaios posteriores, entre as 14 formulações avaliadas, 6 foram classificadas como não aceitáveis para uso e, portanto, descartadas e 8 formulações foram consideradas aceitáveis. Os aspectos visuais, a atividade enzimática, o rendimento de imobilização e a estabilidade operacional em ensaios de 1 h desses sistemas imobilizados são apresentados na Tabela 6 e Tabela 7. Os melhores resultados foram observados nas formulações com 7 a 8 g de polioliol, 3 a 3,5 g de isocianato, e 0,01 e 0,02 g de silicone, com 5 g biomassa a 210 g L^{-1} .

As atividades enzimáticas (Tabela 7) variaram entre 5,31 e $18,13 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$ ($1,33$ e $4,52 \text{ U g}_{\text{imobilizado}}^{-1}$) e a estabilidade operacional foi de até 15 reusos (atividade residual média de $8,84 \pm 0,94 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$), ou seja, foi possível utilizar o sistema imobilizado em até 16 ciclos operacionais, mantendo-se até 50% da atividade enzimática inicial. No ensaio 10 observa-se baixa atividade enzimática ($5,31 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$) e não foi avaliado quanto a estabilidade operacional. Os ensaios 3, 6 e 12 resultaram em sistemas imobilizados com maiores atividades enzimáticas e número de reusos, não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Aspecto visual e descritor do sistema imobilizado *in situ* para uso do suporte particulado.










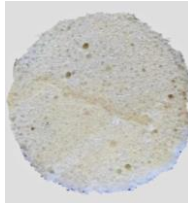




Ensaio	Aspecto visual	Descritor	Ensaio	Aspecto visual	Descritor
1		Não aceitável para uso por acúmulo de biomassa externa	8		Aceitável para uso
2		Não aceitável para uso por acúmulo de biomassa externa	9		Não aceitável para uso por rigidez e porosidade elevada
3		Aceitável para uso	10		Aceitável para uso
4		Não aceitável para uso por encolhimento	11		Aceitável para uso
5		Aceitável para uso	12		Aceitável para uso
6		Aceitável para uso	13		Não aceitável para uso por acúmulo de biomassa interna
7		Aceitável para uso	14		Não aceitável para uso por acúmulo de biomassa interna

Tabela 7 - Atividade enzimática, rendimento e estabilidade operacional dos sistemas imobilizados *in situ* com 5 g de biomassa.

Ensaio	Poliol/Isocianato/ Silicone (g)	Atividade enzimática (U g _{célula_seca} ⁻¹)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade enzimática (U g _{imobilizado} ⁻¹)	Estabilidade operacional (ciclos)
1	6/3/0,01	-	-	-	-
2	6/3,50/0,02	-	-	-	-
3	7/3/0,01	18,13 ^a ± 2,55	56,52 ^a ± 2,98	4,52 ^a ± 0,64	16 ^a
4	7/3/0,02	-	-	-	-
5	7/3,50/0,01	11,49 ^{abc} ± 0,38	37,06 ^b ± 1,73	2,87 ^{abc} ± 0,13	9 ^{cd}
6	7/3,50/0,02	16,35 ^a ± 0,66	51,48 ^a ± 1,22	4,08 ^a ± 0,23	16 ^a
7	7/3,75/0,01	9,23 ^{bc} ± 0,31	29,77 ^b ± 1,41	2,30 ^{bc} ± 0,11	9 ^d
8	7/3,75/0,02	9,03 ^{bc} ± 0,47	28,41 ^{bc} ± 1,12	2,25 ^{bc} ± 0,16	11 ^b
9	7/4/0,01	-	-	-	-
10	7/4/0,02	5,31 ^c ± 0,62	16,69 ^c ± 2,20	1,33 ^c ± 0,22	-
11	8/3/0,01	12,47 ^{ab} ± 1,88	38,18 ^b ± 5,69	3,11 ^{ab} ± 0,66	10 ^{bc}
12	8/3,50/0,02	17,01 ^a ± 1,81	52,20 ^a ± 4,48	4,25 ^a ± 0,64	15 ^a
13	9/3/0,01	-	-	-	-
14	9/3,50/0,02	-	-	-	-

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Os valores de atividade enzimática não apresentados foram devido ao descarte da espuma. Todos os testes realizados com 5 g de biomassa na concentração de 210 g L⁻¹, sem banho de gelo e com particulados (0,850 a 0,355 mm).

As atividades enzimáticas de GFOR/GL no sistema imobilizado (Tabela 7) foram inferiores às observadas quando utilizado o biocatalisador livre (31,80 ± 1,29 U g_{célula_seca}⁻¹). Este comportamento foi observado também por outros autores (FERRAZ; BORGES; ALVES, 2000; MALVESSI et al., 2010; CARRA, 2012; FLORES, 2019), podendo ser causados por efeitos difusionais e/ou aumento da resistência à transferência de massa imposta pelo suporte empregado ou, ainda, em decorrência de efeitos conformacionais da enzima ou de condições adversas no microambiente do suporte. Todavia, a menor atividade enzimática seria compensada pela possibilidade de reutilização do sistema imobilizado.

Considerando os resultados obtidos, sugerem-se algumas hipóteses: (I) com o aumento da concentração de isocianato, menores foram as atividades enzimáticas obtidas, provavelmente devido ao aumento da temperatura da reação e possível desnaturação de

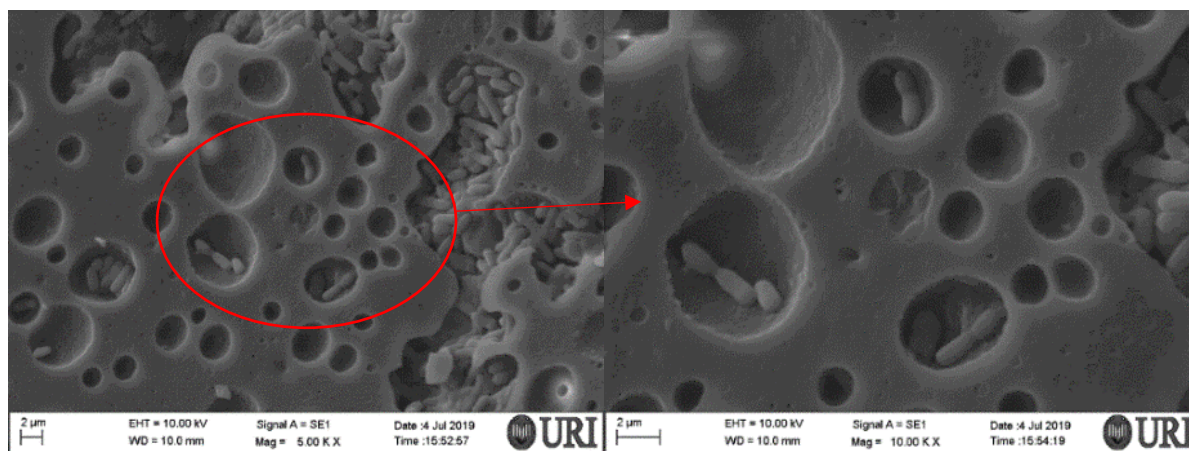
enzimas, além da possibilidade de grupos reativos do isocianato reagirem com grupos funcionais das enzimas, comprometendo a ação catalítica; (II) para maiores quantidades de silicone, mantendo-se os demais reagentes, tendem-se a um maior número de reusos, devido ao fato que quanto maior a quantidade de silicone, menores são os poros da espuma, diminuindo perdas de células/enzimas que poderiam estar fracamente aderidas ao suporte; (III) o excesso de silicone na formulação resulta em encolhimento do sistema imobilizado a um nível inaceitável para uso; e (IV) a falta ou excesso de algum reagente na formulação tornam o aspecto da espuma contendo células e enzimas imobilizadas inaceitável para uso, devido a porosidade, textura ou ausência de uniformidade.

Segundo Vilar (2019), na formação das espumas de poliuretano de baixa densidade, o surfactante de silicone atua na dispersão dos reagentes da formulação e na estabilização das células da espuma em crescimento. Adicionalmente, auxilia a nucleação, pela redução da tensão superficial, permitindo a introdução do ar que irá formar os núcleos das células da espuma. O uso adequado do surfactante de silicone promove a estabilidade, tornando mais difícil a coalescência das bolhas e o seu aumento resulta na diminuição do tamanho das células da espuma e no aumento do seu número. Por outro lado, o excesso estabiliza o sistema, podendo evitar a abertura dessas células.

Durante os testes de reuso (Tabela 7) também foram observadas perdas de suporte na etapa de filtração. Isto foi evidenciado pela pesagem dos filtros utilizados, com perdas médias de até 0,05 g por ciclo ou perdas médias totais entre 0,09 e 0,3 g de sistema imobilizado por amostra, equivalente a perdas totais entre 2,25 e 7,5%, respectivamente. Estes dados indicam que a diminuição da atividade enzimática em cada ciclo pode ter sido causada também pela redução da quantidade do sistema imobilizado. Outras possíveis causas seriam a liberação, no meio reacional, de células fracamente aderidas ao suporte, e possíveis efeitos desnaturantes ou de modificação dos sítios ativos das enzimas, causadas pelas condições operacionais impostas (KOEHNTOPP et al., 1996; LIMA et al., 2013; ALONSO, RENDUELES e DÍAZ, 2015b).

A reutilização do sistema imobilizado em até 15 vezes (Tabela 7), sugere que o micro-organismo ficou fortemente aderido ao suporte. A imobilização celular pôde ser evidenciada pelas imagens das micrografias do MEV, nas quais é possível observar claramente a presença de células microbianas, em forma de bastonete, no suporte (Figura 18). Complementarmente, os ensaios de desprendimento celular, em ensaios simulando uma bioconversão de 24 h, evidenciaram uma pequena perda de células do suporte, com valor de $1,17 \pm 0,17\%$.

Figura 18 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do sistema imobilizado *in situ* - 5.000x e 10.000x.



Fonte: Autor (2020).

Os resultados (Tabela 7) também mostram que a incorporação de 5 g de biomassa mostrou-se promissora em testes de curta duração (1 h). Todavia, foram necessários estudos adicionais para determinar a quantidade máxima de sistema imobilizado por este método, visando obter a maior concentração de produtos na etapa de bioconversão.

O aspecto visual e os resultados dos sistemas imobilizados preparados com diferentes quantidades de biomassa são apresentados na Figura 19 e Tabela 8. A atividade enzimática por quantidade de célula seca utilizando de 5 a 9 g de biomassa (ensaios 3-7), a atividade enzimática por quantidade de sistema imobilizado utilizando de 7 a 10 g de biomassa (ensaios 5-8) e a estabilidade operacional (ensaios 3-5) não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). Pode-se observar também, que com o aumento da quantidade de biomassa (8, 9 e 10 g) o aspecto do sistema imobilizado foi úmido, quebradiço e com encolhimento gradual, sendo não indicadas para uso (Figura 19F, G, H). Além disso, com o uso de amostras preparadas com 8 g ou mais de biomassa (ensaios 6-8) foi observada instabilidade durante a etapa de imobilização, sendo mais sensíveis as condições ambientais, resultando, em alguns ensaios, um encolhimento prejudicial durante o período de cura, sendo, portanto, descartadas.

De acordo com a Tabela 8, no ensaio 5 (7 g de biomassa a 210 g L^{-1} ; 7 g de polioli; 3,5 g de isocianato e 0,02 g de silicone) observa-se os melhores resultados com 60,29% de rendimento de imobilização, atividade enzimática de $19,40 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$ ($1,61 \text{ U g}_{\text{imobilizado}}^{-1}$), correspondendo a $0,083 \text{ g}_{\text{célula_seca}} \text{ g}_{\text{imobilizado}}^{-1}$ e com possibilidade de 15 reusos (16 ciclos ou bateladas de 1 h). Portanto, foram estas as condições definidas para a sequência dos estudos.

Figura 19 - Aspecto visual dos sistemas imobilizados *in situ* com (a) 1, (b) 3, (c) 5, (d) 6, (e) 7, (f) 8, (g) 9 e (h) 10 g de biomassa (210 g L⁻¹).



Fonte: Autor (2020).

Tabela 8 - Atividade enzimática, rendimento e estabilidade operacional dos sistemas imobilizados *in situ*.

Ensaio	Biomassa (g)	Formulação (Poliol/ Isocianato/ Silicone) (g)	Atividade enzimática (U g _{célula_seca} ⁻¹)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade enzimática (U g _{imobilizado} ⁻¹)	Estabilidade operacional (ciclos)
1	1	10/3,50/0,02	1,04 ^c ± 0,30	3,23 ^c ± 0,94	0,01 ^d ± 0,01	n.d.
2	3	9/3,50/0,02	3,16 ^c ± 0,40	9,81 ^c ± 1,25	0,13 ^d ± 0,02	n.d.
3	5	8/3,50/0,02	17,01 ^{ab} ± 2,56	52,86 ^{ab} ± 7,96	1,07 ^c ± 0,17	15 ^a
4	6	7,50/3,50/0,02	19,42 ^a ± 0,33	60,34 ^a ± 1,03	1,40 ^{bc} ± 0,07	16 ^a
5	7	7/3,50/0,02	19,40 ^a ± 0,42	60,29 ^a ± 1,31	1,61 ^{ab} ± 0,04	16 ^a
6	8	6,50/3,50/0,02	17,51 ^{ab} ± 0,75	54,42 ^{ab} ± 2,32	1,61 ^{ab} ± 0,07	n.d.
7	9	6/3,50/0,02	18,45 ^{ab} ± 1,52	57,33 ^{ab} ± 4,72	1,85 ^a ± 0,14	n.d.
8	10	5,50/3,50/0,02	14,71 ^b ± 0,32	45,71 ^b ± 1,00	1,61 ^{ab} ± 0,03	n.d.

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey. n.d. – não determinado. Todos os testes foram realizados com biomassa na concentração de 210 g L⁻¹, sem banho de gelo e com particulados (0,355 a 0,850 mm).

O sistema imobilizado (Tabela 8 - ensaio 5) foi caracterizado como partículas de área superficial de $119,69 \pm 38,06 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, volume de $0,02 \pm 0,01 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ e tamanho de poro de $1,72 \pm 0,00 \text{ nm}$. A natureza física do suporte, como o tamanho do poro, pode influenciar no rendimento de imobilização. Se os poros são muito pequenos a fixação de células/enzimas ocorrem predominantemente na superfície externa do suporte e se os poros forem muito grandes pode ocorrer lixiviação dessas células e enzimas (ISPAS, SOKOLOV, ANDREESCU, 2009; LIESE, HILTERHAUS, 2013). Estas características texturais também influenciam na transferência de massa, visto que menores áreas podem minimizar as limitações internas de transferência de massa, porém a dimensão do suporte não pode ser muito pequena a ponto de dificultar a separação do sistema imobilizado do meio reacional (PILKINGTON, MARGARITIS, MENSOUR, 1998).

5.3 Bioconversão de maltose em maltobionato de sódio

Os ensaios de bioconversão para a produção de maltobionato de sódio foram conduzidos com diferentes concentrações de células em meio reacional, condições de temperatura, pH e concentrações de substrato.

5.3.1 Definição da concentração celular na bioconversão

Na Tabela 9 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos das bioconversões de maltose em maltobionato de sódio, utilizando diferentes quantidades do sistema imobilizado (16,75-21,53 g), em termos de concentrações de células de *Z. mobilis* ($7-9 \text{ g}_{\text{célula_seca}} \text{ L}_{\text{meio_reacional}}^{-1}$) no meio reacional. Na Figura 20 são apresentadas as cinéticas destas produções de maltobionato de sódio.

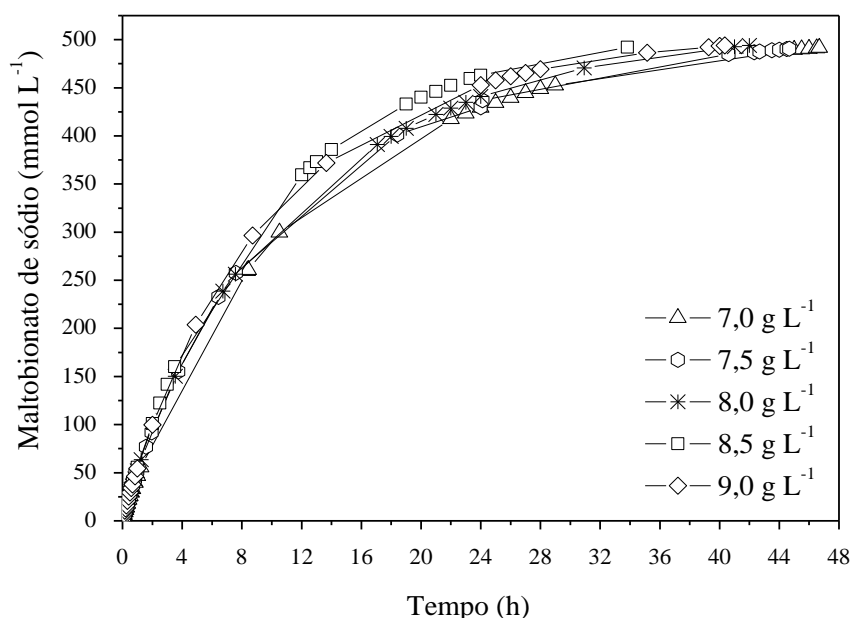
De acordo com a Tabela 9 e Figura 20, a bioconversão foi mais eficiente quando utilizado 8,5 g de células secas por litro de meio reacional, com menor tempo de processo (33,94 h), maior produtividade mássica ($3,62 \text{ mmol h}^{-1}$) e produtividade específica ($2,13 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). Desta forma, $8,5 \text{ g L}^{-1}$, equivalente a 20,41 g de sistema imobilizado, foi a concentração celular definida para os ensaios posteriores.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioconversão em termos de concentração máxima de maltobionato de sódio ($P_{\text{máx}}$); tempo de bioconversão ($t_{\text{bioconv.}}$); produtividade mássica (P); produtividade específica (q); maltose final (S_f) e velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p.\text{máx}}$), utilizando diferentes concentrações celulares.

Parâmetros da bioconversão*						
Concentração ($\text{g}_{\text{célula,seca}} \text{L}^{-1}$)	$P_{\text{máx}}$ (mmol L^{-1})	$t_{\text{bioconv.}}$ (h)	P (mmol h^{-1})	q ($\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	S_f (mmol L^{-1})	$\mu_{p.\text{máx}}$ ($\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
7	$491,42^a \pm 1,10$	$47,56^a \pm 2,14$	$2,58^c \pm 0,11$	$1,81^b \pm 0,14$	$69,55^a \pm 0,38$	$6,25^a \pm 0,82$
7,5	$490,90^a \pm 0,21$	$44,17^{ab} \pm 0,50$	$2,78^c \pm 0,03$	$1,85^b \pm 0,02$	$69,88^a \pm 0,04$	$6,44^a \pm 0,02$
8	$492,29^a \pm 1,47$	$42,27^{bc} \pm 1,12$	$2,90^{bc} \pm 0,08$	$1,82^b \pm 0,05$	$69,71^a \pm 0,13$	$6,19^a \pm 0,22$
8,5	$492,11^a \pm 0,00$	$33,94^d \pm 1,66$	$3,62^a \pm 0,17$	$2,13^a \pm 0,10$	$70,02^a \pm 0,00$	$6,32^a \pm 0,12$
9	$493,07^a \pm 0,96$	$37,92^{cd} \pm 2,43$	$3,25^b \pm 0,21$	$1,80^b \pm 0,11$	$69,77^a \pm 0,25$	$6,04^a \pm 0,13$

Média \pm desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey. $Y_{P/S_0} = 0,88$. *Variáveis fixas: sistema imobilizado (dimensão: 0,125 e 0,355 mm) com 7 g de biomassa a 210 g L^{-1} ; 7 g de polioliol; 3,5 g de isocianeto e 0,02 g de silicone, temperatura $39 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 6,4.

Figura 20 – Cinética de produção de maltobionato de sódio em diferentes concentrações de células no meio reacional.



Fonte: Autor (2020).

5.3.2 Definição de temperatura e pH no processo reacional de bioconversão

A Tabela 10 apresenta a matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , com os valores codificados e reais das variáveis independentes estudadas e as respostas em

tempo de bioconversão ($t_{\text{bioconv.}}$), produtividade mássica (P), produtividade específica (q) e velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p,\text{máx}}$), utilizando o sistema imobilizado *in situ* (0,125 a 0,355 mm).

Verificou-se que o menor tempo de bioconversão e a máxima produtividade mássica e específica ocorreu a 39 °C e pH 6,4 (Ensaio 9, 10 e 11), com valores médios de 32,96 h, 3,72 mmol h⁻¹ e 2,19 mmol g⁻¹ h⁻¹, respectivamente. A máxima velocidade específica, 7,23 mmol g⁻¹ h⁻¹, foi atingida a 45 °C e pH 5,8 (Ensaio 2). Os resultados dos ensaios retratam baixos desvios relativos, inferiores à 16%, comprovando o ajuste adequado dos modelos para o tempo de bioconversão (Equação 12), produtividade mássica (Equação 13), produtividade específica (Equação 14) e velocidade específica de formação de produto (Equação 15).

$$t(h) = 32,95 - 16,78 T + 11,28 T^2 - 13,04 pH + 13,55 pH^2 + 15,90 T pH \quad (12)$$

$$P(\text{mmol h}^{-1}) = 3,72 + 0,65 T - 0,57 T^2 + 0,37 pH - 0,70 pH^2 - 0,36 T pH \quad (13)$$

$$q(\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}) = 2,19 + 0,38 T - 0,34 T^2 + 0,21 pH - 0,41 pH^2 - 0,21 T pH \quad (14)$$

$$\mu_{p,\text{máx}}(\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}) = 6,35 + 1,37 T - 0,70 T^2 + 0,26 pH - 0,52 pH^2 - 0,29 T pH \quad (15)$$

Onde: t (h) é o tempo de bioconversão; P é produtividade mássica; q é produtividade específica; $\mu_{p,\text{máx}}$ é velocidade específica de formação de produto; T é temperatura e pH é o pH do meio reacional.

Os modelos foram validados pela análise de variância (Tabela 19 – Apêndice A) e o coeficiente de correlação foi de 0,97; 0,99; 0,99 e 0,97 e com F calculado 3,56; 11,39; 11,39 e 2,78 vezes maiores que o valor do F tabelado para tempo de bioconversão, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto, respectivamente. A Tabela 20 (Apêndice A) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2).

Verifica-se que houve efeito ($p < 0,05$) negativo para as variáveis temperatura e pH e efeitos positivos para os efeitos quadráticos e de interação das variáveis, para a resposta tempo de bioconversão. Para produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto as variáveis temperatura e pH apresentaram efeito ($p < 0,05$) positivo e os efeitos quadráticos e de interação das variáveis apresentaram efeitos negativos (Tabela 21 – Apêndice A).

Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial completo 2² (valores codificados e reais) e resposta em tempo de bioconversão ($t_{\text{bioconv.}}$), produtividade mássica (P), produtividade específica (q) e velocidade específica ($\mu_{\text{p.máx}}$), utilizando o sistema imobilizada *in situ*.

Variáveis Independentes*			Respostas															
Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Tempo de bioconversão (h)				Produtividade mássica (mmol h ⁻¹)				Produtividade específica (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)				Velocidade específica de formação de produto (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)			
			Experimental	Prevista	Desvio	Desvio relativo (%)	Experimental	Prevista	Desvio	Desvio relativo (%)	Experimental	Prevista	Desvio	Desvio relativo (%)	Experimental	Prevista	Desvio	Desvio relativo (%)
1	33 (-1)	5,8 (-1)	113,67	103,50	-10,17	-8,94	1,08	1,07	-0,01	-0,77	0,63	0,64	0,01	0,90	3,39	3,21	-0,18	-5,38
2	45 (+1)	5,8 (-1)	37,30	38,14	0,84	2,25	3,29	3,09	-0,20	-5,96	1,93	1,82	-0,11	-5,84	7,23	6,53	-0,70	-9,72
3	33 (-1)	7 (+1)	51,50	45,62	-5,88	-11,42	2,38	2,53	0,15	6,31	1,40	1,48	0,08	5,72	4,08	4,31	0,23	5,64
4	45 (+1)	7 (+1)	38,73	43,86	5,13	13,24	3,16	3,11	-0,05	-1,71	1,86	1,82	-0,04	-2,22	6,77	6,47	-0,30	-4,38
5	30,54 (-1,41)	6,4 (0)	68,70	79,04	10,34	15,04	1,78	1,67	-0,11	-6,37	1,05	0,98	-0,07	-6,78	3,15	3,03	-0,12	-3,77
6	47,46 (+1,41)	6,4 (0)	37,00	31,72	-5,28	-14,28	3,31	3,50	0,19	5,76	1,95	2,05	0,10	5,20	6,27	6,89	0,62	9,86
7	39 (0)	5,554 (-1,41)	72,72	78,28	5,56	7,64	1,69	1,81	0,12	7,19	0,99	1,08	0,09	8,81	4,42	4,95	0,53	12,10
8	39 (0)	7,246 (+1,41)	42,00	41,50	-0,50	-1,18	2,92	2,85	-0,07	-2,33	1,72	1,67	-0,05	-2,65	5,73	5,68	-0,05	-0,91
9	39 (0)	6,4 (0)	32,73	32,95	0,22	0,66	3,75	3,72	-0,03	-0,72	2,20	2,19	-0,01	-0,64	6,33	6,35	0,02	0,35
10	39 (0)	6,4 (0)	32,33	32,95	0,62	1,91	3,79	3,72	-0,07	-1,86	2,23	2,19	-0,04	-1,78	6,27	6,35	0,08	1,25
11	39 (0)	6,4 (0)	33,83	32,95	-0,88	-2,61	3,62	3,72	0,10	2,69	2,13	2,19	0,06	2,77	6,46	6,35	-0,11	-1,76

*Variáveis Fixas: concentração de maltose e frutose equimolar de 0,7 mol L⁻¹, concentração celular em meio reacional de 8,5 g L⁻¹. $P_{\text{máx}} = 492,11$ mmol L⁻¹; $S_f = 70,02$ mmol L⁻¹; $Y_{\text{P}/\text{So}} = 0,88$.

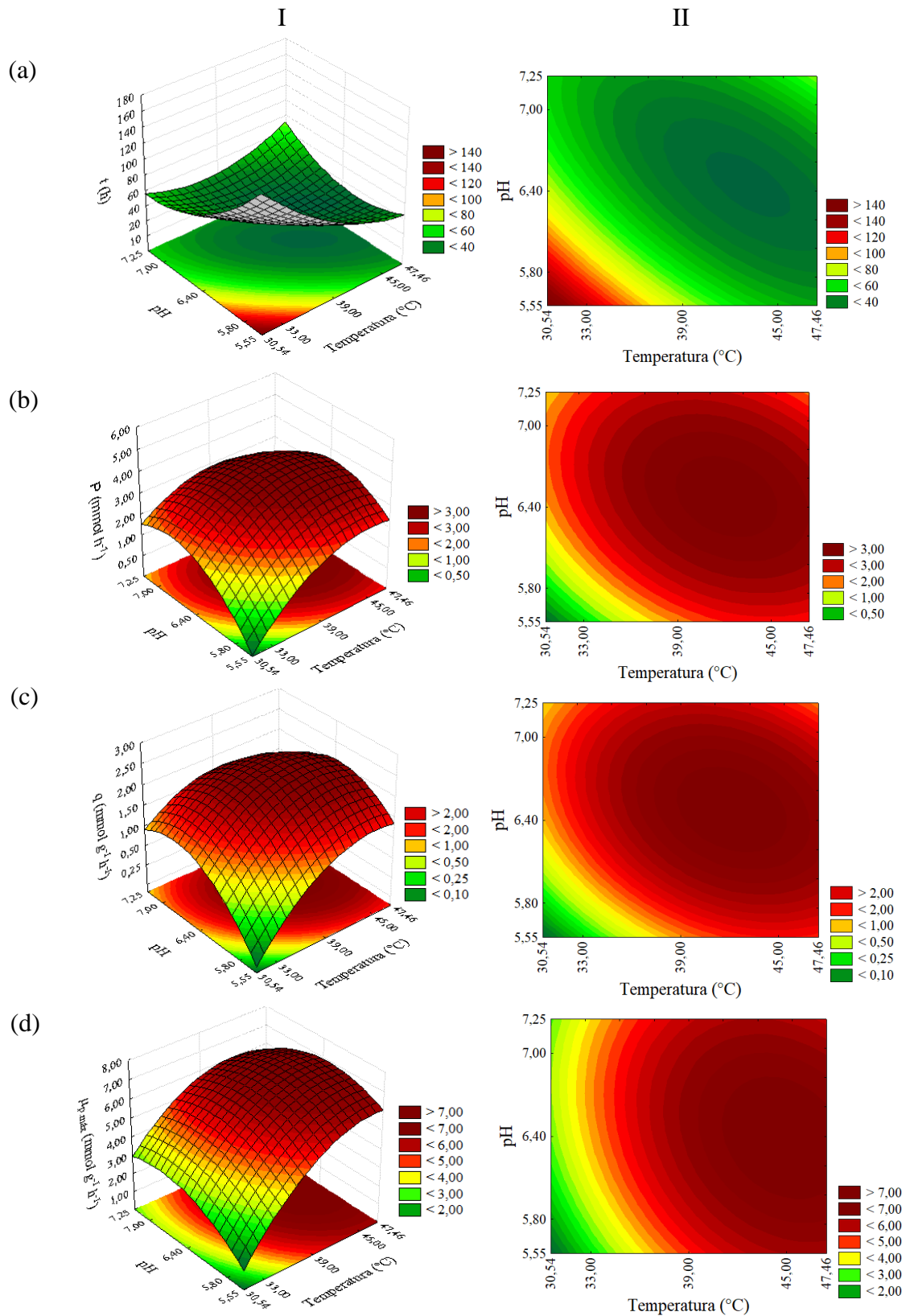
A análise de variância permitiu também a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno, apresentadas na Figura 21, as quais demonstram a otimização do processo de bioconversão, onde o menor tempo de bioconversão, a máxima produtividade mássica e específica e a velocidade específica encontram-se em faixa de temperatura e pH próximos ao ponto central (39 ± 1 °C e pH a $6,30 \pm 0,10$).

Estes resultados sugerem que o efeito das condições de temperatura e pH no processo é característico do complexo enzimático GFOR/GL, sendo pouco influenciado pelo tipo de suporte de imobilização ou o substrato utilizado, visto que resultados semelhantes foram obtidos na literatura.

Garin (2016), na produção de ácido maltobiônico, utilizando maltose e frutose $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ e concentração celular no meio reacional de 20 g L^{-1} , avaliou diferentes condições de temperatura (36, 39, 43 e 47 °C) e de pH (6,0; 6,4; 6,8 e 7,2). O autor evidenciou que os melhores resultados para produtividade mássica ($2,68 \text{ mmol h}^{-1}$) e produtividade específica ($1,34 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foram também a 39 °C e em pH 6,4 e para a velocidade específica de formação de produto ($5,63 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a 47 °C e pH 6,4. O processo de bioconversão foi realizado em 24 h e utilizou células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio. Flores (2019), utilizando o mesmo sistema imobilizado e xarope de maltose (com 12% de glicose) e frutose a $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ para a produção de ácido maltobiônico, avaliou diferentes condições de temperatura (32, 36, 39, 45 e 50 °C) e de pH (5,5; 6,0; 6,4; 7,0 e 7,5), em 24 h de processo. O autor relatou que a condição mais favorável da ação de GFOR/GL foi também a 39 °C e pH 6,4, em termos de produtividade mássica ($5,62 \text{ mmol h}^{-1}$), e a 45 °C e pH 6,4 em relação a velocidade específica de formação de produto ($4,70 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Carra et al. (2020), realizou um desenho experimental completo 2^2 para avaliar os efeitos de temperatura (39 e 43 °C), pH (6,4 e 6,8) e sua interação, na bioconversão de lactose em ácido lactobiônico, utilizando células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio. Os autores concluíram que a temperatura influenciava significativamente ($p < 0,05$) e positivamente na velocidade específica de formação de produto, porém para a produtividade, não houve influência nas condições avaliadas. Além disso, concluíram que altas temperaturas tem efeito positivo apenas no início do processo, devido as elevadas atividades enzimáticas de GFOR/GL e a transferência de massa através do suporte. Carra et al. (2014) relataram que em temperaturas superiores a 47 °C ocorria a desnaturação do complexo enzimático GFOR/GL imobilizado. Carra et al. (2015) destacaram que a condução do processo na faixa entre pH 6,4 e 7,0 e temperatura de 39 °C dispensaria a necessidade de um controle mais acurado do pH durante a bioconversão.

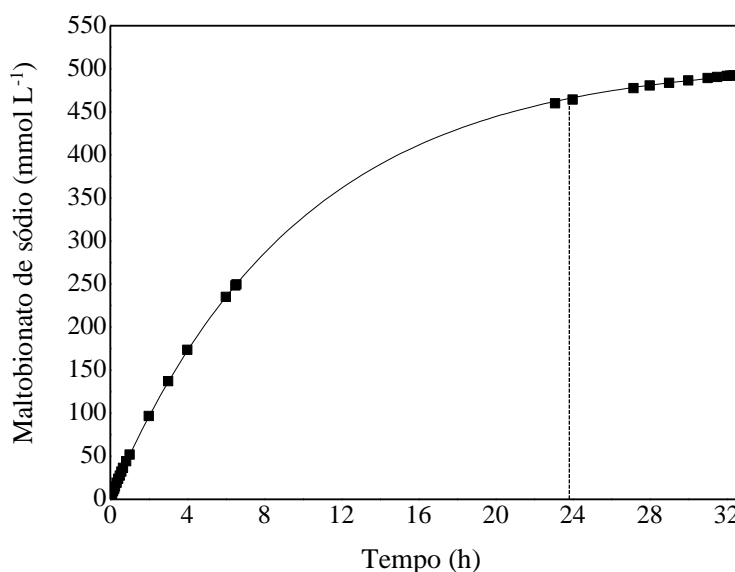
Figura 21 - Superfícies de resposta (I) e curva de contorno (II) para (a) tempo de bioconversão, (b) produtividade mássica, (c) produtividade específica e (d) velocidade específica de formação de produto em função da temperatura e pH.



Fonte: Autor (2020).

Os parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioconversão (Tabela 10) foram determinados quando alcançada a conversão de 90% do substrato em produto. Porém, é importante ressaltar que um valor muito próximo da máxima concentração de maltobionato de sódio foi obtido em 24 h de processo. Para evidenciar este comportamento, a Figura 22 apresenta a cinética de produção de maltobionato de sódio, na condição do ponto central (39 °C e pH de 6,4) (Ensaio 10), utilizando concentrações de maltose e frutose de 0,7 mol L⁻¹. Os parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioconversão durante 32,33 h e 24 h foram para concentração máxima de maltobionato de sódio de 492,11 e 463 mmol L⁻¹, produtividade mássica de 3,79 e 4,73 mmol h⁻¹, produtividade específica de 2,23 e 2,79 mmol g⁻¹ h⁻¹, velocidade específica de formação de produto de 6,27 e 6,38 mmol g⁻¹ h⁻¹, fator de conversão substrato em produto de 0,88 e 0,81 e concentração de substrato residual de 70,02 e 107,49 mmol L⁻¹, respectivamente.

Figura 22 – Cinética de bioconversão de maltobionato de sódio nas condições 39 °C e pH 6,4 empregando o sistema imobilizado *in situ* com 8,5 g L⁻¹ de massa celular de *Z. mobilis*.



Fonte: Autor (2020).

Este comportamento é justificável, pois é comum em reações enzimáticas que a velocidade de conversão seja reduzida quando a concentração do substrato esteja muito baixa no meio reacional (MALVESSI, 2008). Por este motivo, para os testes de estabilidade operacional em bioconversão e de estabilidade a estocagem os ensaios foram padronizados em 24 h de processo.

5.3.3 Definição da concentração de substrato na bioconversão

Na Tabela 11 encontram-se os parâmetros de bioconversão empregando diferentes concentrações equimolares de maltose e frutose. Observou-se que a concentração máxima de maltobionato de sódio e o tempo de bioconversão foram proporcionalmente maiores com o aumento da concentração de substratos, considerando 90% de conversão de substrato em produto. A maior produtividade mássica ($5,05 \text{ mmol h}^{-1}$) e específica ($2,97 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi obtida na concentração equimolar de maltose e frutose de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, estes parâmetros diferem estatisticamente ($p < 0,05$) dos obtidos nas demais concentrações. Para a velocidade específica de formação de produto não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas concentrações de $0,7$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 11 - Concentração de maltobionato de sódio ($P_{\text{máx}}$), tempo de bioconversão ($t_{\text{bioconv.}}$), produtividade mássica (P), produtividade específica (q), residual de maltose (S_f) e velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p.\text{máx}}$) empregando diferentes concentrações equimolares de maltose e frutose na produção de maltobionato de sódio.

Concentração (mol L^{-1})	Parâmetros de bioconversão*					
	$P_{\text{máx}}$ (mmol L^{-1})	$t_{\text{bioconv.}}$ (h)	P (mmol h^{-1})	q ($\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	S_f (mmol L^{-1})	$\mu_{p.\text{máx}}$ ($\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
0,70	$495,49^c \pm 0,00$	$28,81^a \pm 0,81$	$4,26^b \pm 0,12$	$2,51^b \pm 0,07$	$69,98^a \pm 0,00$	$8,73^a \pm 0,14$
1,00	$648,61^b \pm 0,00$	$34,34^b \pm 0,56$	$5,05^a \pm 0,08$	$2,97^a \pm 0,05$	$99,83^b \pm 0,00$	$8,62^a \pm 0,14$
1,30	$777,80^a \pm 0,00$	$50,84^c \pm 0,36$	$4,38^b \pm 0,03$	$2,58^b \pm 0,02$	$129,96^c \pm 0,00$	$7,11^b \pm 0,06$

Média \pm desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey. *Variáveis Fixas: temperatura $39 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, pH $6,30 \pm 0,10$, concentração celular em meio reacional de $8,5 \text{ g L}^{-1}$. $Y_{P/S_0} = 0,88$.

A redução da produtividade mássica e específica na maior concentração de substratos ($1,3 \text{ mol L}^{-1}$) pode estar vinculada a limitações na transferência de massa, pois foi evidenciado uma dificuldade inicial de homogeneização do sistema imobilizado no meio reacional, devido ao aumento da viscosidade. Outra possível explicação, são os efeitos da relação enzima/substrato, com possível inibição por substrato. Este resultado corrobora com o estudo de Flores (2019), o qual relatou o mesmo comportamento na concentração de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, sendo evidenciada uma maior produção de maltobionato de sódio na concentração equimolar de maltose e frutose de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

5.3.3 Produção de maltobionato de sódio com células de *Zymomonas mobilis* livres e imobilizadas

A Tabela 12 apresenta os parâmetros de bioconversão, em termos de concentração máxima de maltobionato de sódio ($P_{\text{máx}}$), tempo de bioconversão ($t_{\text{bioconv.}}$), produtividade mássica (P), produtividade específica (q), fator de conversão substrato/produto (Y_{P/S_0}), substrato maltose final (S_f), velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p.\text{máx}}$) e atividade enzimática frente a maltose ($U_M \text{ g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$), empregando concentrações equimolares de maltose e frutose de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e células de *Z. mobilis* livres e imobilizadas *in situ* em PU.

Tabela 12 - Parâmetros de bioconversão em termos de concentração máxima de maltobionato de sódio ($P_{\text{máx}}$); tempo de bioconversão ($t_{\text{bioconv.}}$); produtividade mássica (P); produtividade específica (q); fator de conversão substrato/produto (Y_{P/S_0}); substrato maltose final (S_f); velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p.\text{máx}}$) e atividade enzimática frente a maltose ($U_M \text{ g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$), utilizando células livres e imobilizadas *in situ*.

Parâmetros de bioconversão*	Células livres	Células imobilizadas
$P_{\text{máx}}$ (mmol L ⁻¹)	647,63 ^a ± 0,95	648,61 ^a ± 0,00
$t_{\text{bioconv.}}$ (h)	40,84 ^a ± 1,75	34,34 ^b ± 0,56
P (mmol h ⁻¹)	4,25 ^b ± 0,19	5,05 ^a ± 0,08
q (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	2,50 ^b ± 0,11	2,97 ^a ± 0,05
Y_{P/S_0}	0,87 ^a ± 0,00	0,87 ^a ± 0,00
S_f (mmol L ⁻¹)	99,87 ^a ± 0,07	99,83 ^a ± 0,00
$\mu_{p.\text{máx}}$ (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	12,60 ^a ± 0,28	8,62 ^b ± 0,13
Atividade enzimática ($U_M \text{ g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$)	13,49 ^a ± 0,30	8,70 ^b ± 0,09

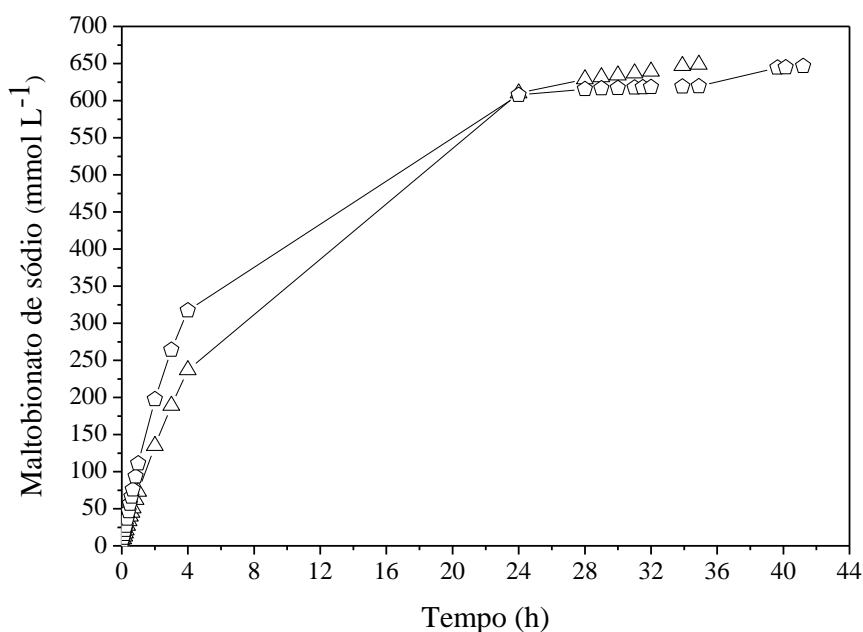
Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma linha em uma mesma concentração de substrato correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de *t* de student.

*Variáveis fixas: 39 ± 1 °C, pH 6,30 ± 0,10, concentração equimolar de maltose e frutose de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e celular em meio reacional de $8,5 \text{ g L}^{-1}$.

A análise dos resultados evidencia que a bioconversão de 90% de maltose em maltobionato de sódio, utilizando o sistema imobilizado, ocorreu em um menor tempo de processo e com maior produtividade mássica e específica, quando comparada às células/enzimas livres. Isto sugere que a imobilização celular favorece o uso de uma maior concentração de substrato, com redução dos efeitos substrato/enzima ao longo do processo. Por outro lado, a velocidade específica de formação de produto e a atividade enzimática frente a

maltose foram maiores na bioconversão utilizando células de *Z. mobilis* livres, isto provavelmente devido a significativas limitações difusionais impostas pelo suporte de imobilização. A Figura 23 apresenta a cinética de produção do maltobionato de sódio destas bioconversões, utilizando células de *Z. mobilis* livres e imobilizadas *in situ* em PU.

Figura 23 – Cinética de produção de maltobionato de sódio utilizando concentração equimolar de maltose e frutose de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e células de *Zymomonas mobilis* livres (Δ) e imobilizadas *in situ* em espuma de poliuretano flexível (\triangle), respectivamente.



Fonte: Autor (2020).

A atividade enzimática de GFOR/GL presente nas células livres de *Z. mobilis*, também foi estudada por Garin (2016) e Malvessi (2008), a qual evidenciou um valor de 17 e 18 $\text{U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$, respectivamente, em solução equimolar de maltose e frutose a $0,7 \text{ mol L}^{-1}$, a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 6,4. Adicionalmente, em ensaios de bioconversão de 24 h, nas mesmas condições operacionais, Garin (2016) e Malvessi (2008) relataram concentração máxima de ácido maltobiônico de 550 e 570 mmol L^{-1} , conversão de 84 e 88%, e produtividade específica de 1,24 e 0,95 $\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Garin (2016) ainda relatou uma produtividade mássica de 2,47 mmol h^{-1} e velocidade específica de formação de produto de 11,16 $\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

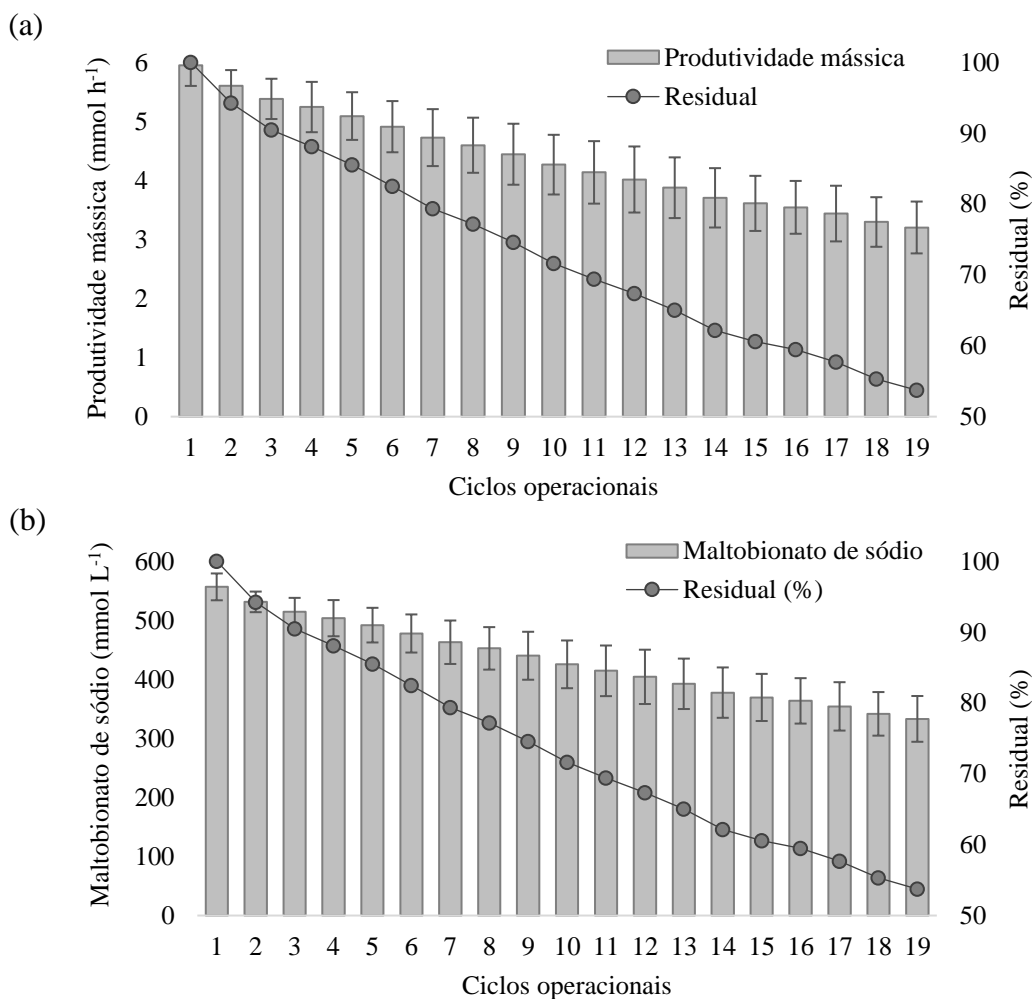
Oh et al. (2020) também investigaram a produção de ácido maltobiônico, porém utilizando células livres de uma bactéria aeróbica, uma cepa recombinante de *P. taetrolens* (ATCC 4683). Entre uma faixa de temperatura (20 a $35 \text{ }^\circ\text{C}$) e de concentração de maltose

(50 a 500 g L⁻¹, equivalentes a aproximadamente 0,14 a 1,39 mol L⁻¹), os autores obtiveram os melhores resultados a 25 °C, 200 g L⁻¹ de maltose inicial (~0,55 mol L⁻¹), com uma concentração e produtividade de ácido maltobiônico de 200 g L⁻¹ (~558,19 mmol L⁻¹) e 9,52 g L⁻¹ h⁻¹ (~26,57 mmol L⁻¹ h⁻¹), respectivamente, em reator com volume de trabalho de 2 L.

5.4 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi avaliada em ciclos de bioconversão de 24 h, utilizando concentração equimolar de maltose e frutose de 1,0 mol L⁻¹, temperatura de 39 °C e pH 6,3. Na Figura 24 é apresentada os resultados de produtividade mássica e concentração de maltobionato de sódio obtido em cada batelada.

Figura 24 – Estabilidade operacional do sistema imobilizado em ciclos de bioconversão: (a) Produtividade mássica e (b) concentração máxima de maltobionato de sódio e seus respectivos valores residuais.



Fonte: Autor (2020).

Os ensaios de estabilidade operacional revelaram que o sistema imobilizado preservou 53,73% da produtividade mássica após 19 ciclos de bioconversão, ou seja, foi possível a realização de até 18 reusos do mesmo, sem a necessidade de qualquer tratamento adicional.

A concentração de maltobionato de sódio foi diminuindo gradativamente em cada ciclo operacional. Isto pode ser explicado pelo desprendimento de células livres (1, 17%, em ensaios de simulação em água) ou possíveis efeitos de desnaturantes ou de modificação dos sítios ativos das enzimas, causadas pelas condições operacionais impostas (LIMA et al., 2013; ALONSO, RENDUELES e DÍAZ, 2015b). Outra possível causa são as perdas do sistema imobilizado durante a separação e filtração nos reciclos, sendo evidenciado perdas totais de aproximadamente 0,5 g de sistema imobilizado ($0,025 \text{ g ciclo}^{-1}$), equivalente a 2,45% da quantidade inicial utilizada nos ensaios de estabilidade.

É interessante observar que não houve diferença significativa entre a estabilidade operacional em ciclos curtos de atividade enzimática (1 h, com glicose e frutose, 16 ciclos) (Tabela 8) e de bioconversões (24 h, com maltose e frutose, 19 ciclos) (Figura 24), sugerindo que o suporte de PU mantém a estabilidade catalítica do complexo enzimático GFOR/GL em longos processos.

A produção semicontínua de ácido maltobiônico, usando *P. fragi* TCCC11892, 10% de maltose, temperatura de 37 °C, pH 6,5 e agitação de 180 rpm, foi investigada por Mao et al. (2018) em biorreator equipado com uma membrana de microfiltração para reciclagem de células. Neste estudo, observou-se que o rendimento do ácido maltobiônico e a produtividade foram preservados em cerca de 63%, após 12 ciclos de 24 h de bioconversão, resultando em valores próximos de 60 g L^{-1} ($\sim 167,46 \text{ mmol L}^{-1}$) e $2,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($\sim 6,98 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), respectivamente.

A estabilidade operacional foi também avaliada por Carra et al. (2020), porém para a produção de ácido lactobiônico, utilizando células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, a 39 °C, pH 6,4 e concentração de frutose e lactose de 0,6 e 0,7 mol L^{-1} , respectivamente. Os autores relataram que nos 23 ciclos de bioconversões de 24 h, manteve-se a produção de aproximadamente 500 mmol L^{-1} de ácido lactobiônico, porém com a necessidade de tratamento com a adição contínua de cloreto de cálcio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para manter a integridade do sistema imobilizado. Este mesmo sistema imobilizado teve a ação catalítica do GFOR/GL preservada por até 120 dias de armazenamento, estocadas em água destilada, pH 7,0 e a 4 °C.

5.5 Estabilidade de estocagem

A estabilidade de estocagem do sistema imobilizado foi avaliada a 22 ± 2 °C e 4 ± 2 °C e os resultados dos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioconversão em cada tempo e temperatura de estocagem são sintetizados nas Tabelas 13 e 14 e Figura 25.

Tabela 13 - Parâmetros de bioconversão em função do tempo de estocagem do sistema imobilizado *in situ*, a 22 ± 2 °C.

Parâmetros de bioconversão	Tempo de estocagem (meses)				
	0	1	2	4	6
$P_{m\acute{a}x}$ (mmol L ⁻¹)	549,85 ^a ± 1,12	494,20 ^b ± 0,74	473,43 ^c ± 1,06	452,44 ^d ± 8,50	429,94 ^e ± 1,65
P (mmol h ⁻¹)	5,83 ^a ± 0,02	5,10 ^b ± 0,01	4,84 ^c ± 0,01	4,61 ^d ± 0,11	4,33 ^e ± 0,02
q (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	3,43 ^a ± 0,01	3,00 ^b ± 0,01	2,84 ^c ± 0,01	2,71 ^d ± 0,06	2,55 ^e ± 0,01
Y_{P/S_0}	0,70 ^a ± 0,00	0,61 ^b ± 0,00	0,58 ^c ± 0,00	0,55 ^d ± 0,01	0,52 ^e ± 0,00
S_f (mmol L ⁻¹)	236,39 ^a ± 1,56	313,68 ^b ± 1,03	342,53 ^c ± 1,47	365,14 ^d ± 11,93	396,72 ^e ± 2,31
$\mu_{p.m\acute{a}x}$ (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	6,40 ^a ± 0,00	5,02 ^b ± 0,00	4,53 ^c ± 0,02	4,04 ^d ± 0,02	3,93 ^e ± 0,01

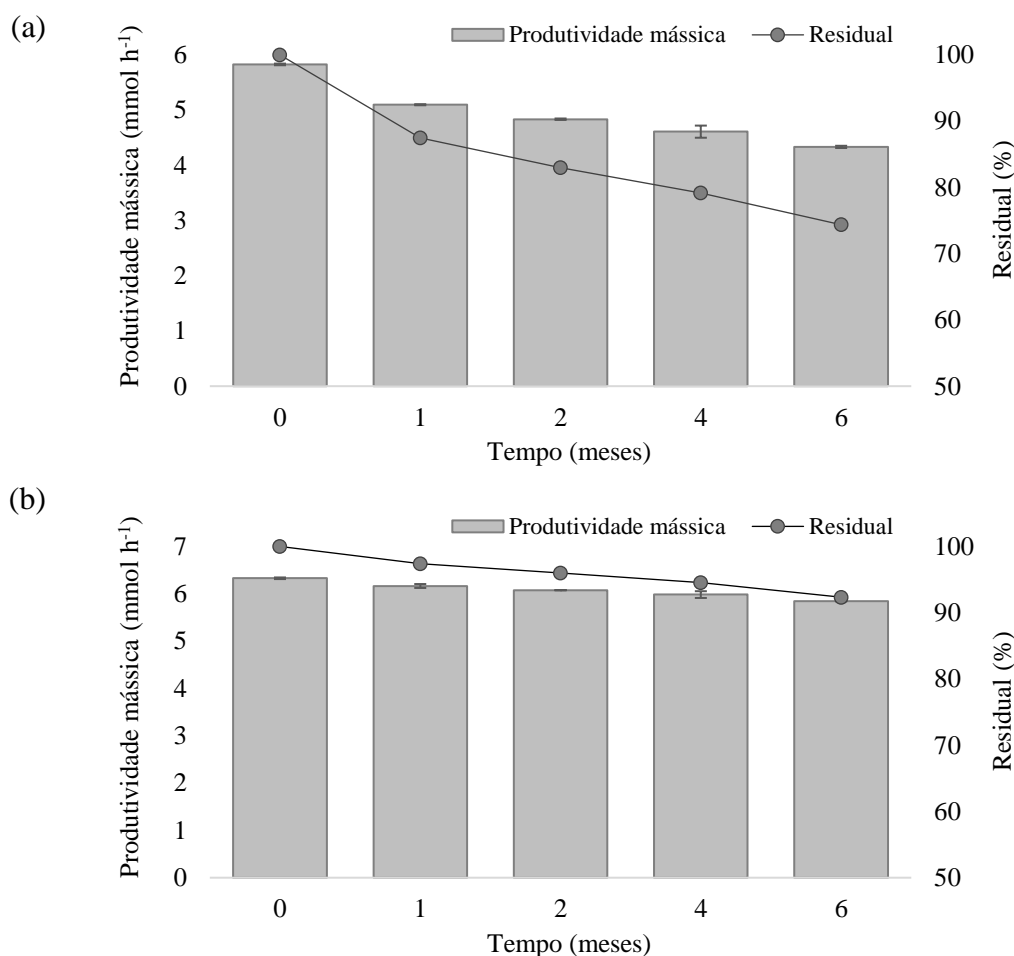
Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 14 - Parâmetros de bioconversão em função do tempo de estocagem do sistema imobilizado *in situ*, a 4 ± 2 °C.

Parâmetros de bioconversão	Tempo de estocagem (meses)				
	0	1	2	4	6
$P_{m\acute{a}x}$ (mmol L ⁻¹)	586,26 ^a ± 1,22	571,49 ^b ± 1,53	563,44 ^{bc} ± 0,13	556,74 ^c ± 5,14	546,63 ^d ± 0,13
P (mmol h ⁻¹)	6,33 ^a ± 0,02	6,16 ^b ± 0,04	6,08 ^{bc} ± 0,00	5,98 ^{cd} ± 0,07	5,84 ^d ± 0,00
q (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	3,72 ^a ± 0,01	3,63 ^b ± 0,02	3,57 ^{bc} ± 0,00	3,52 ^{cd} ± 0,04	3,44 ^d ± 0,00
Y_{P/S_0}	0,76 ^a ± 0,00	0,74 ^b ± 0,00	0,73 ^b ± 0,00	0,72 ^c ± 0,01	0,70 ^d ± 0,00
S_f (mmol L ⁻¹)	185,83 ^d ± 1,69	201,13 ^{cd} ± 4,64	209,40 ^{bc} ± 0,18	218,79 ^{bc} ± 7,22	232,99 ^a ± 0,19
$\mu_{p.m\acute{a}x}$ (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	7,60 ^a ± 0,08	7,04 ^{ab} ± 0,22	6,91 ^{abc} ± 0,08	6,64 ^{bc} ± 0,14	6,27 ^c ± 0,27

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Figura 25 - Estabilidade de estocagem do sistema imobilizado a (a) $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e (b) $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, expressa em produtividade mássica e valores residuais de produtividade.



Fonte: Autor (2020).

A análise dos resultados revela que o sistema imobilizado estocado a 22 e $4 \text{ }^\circ\text{C}$ preservou 74,37 e 92,34% da produtividade mássica, respectivamente, após 6 meses de estocagem. A umidade inicial do sistema imobilizado foi de 6,67% e a final de 3,33 e 5%, quando armazenados a 22 e $4 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Possivelmente esta perda de umidade está relacionada com a reorganização das moléculas do poliuretano e evaporação da água adicionada para ressuspensão da biomassa a $210 \text{ g}_{\text{célula_seca}} \text{ L}^{-1}$. Estes resultados indicam que a preservação da ação catalítica do complexo enzimático GFOR/GL é favorecida a baixas temperaturas, mas que a estocagem em temperatura ambiente não inviabiliza o uso deste sistema imobilizado.

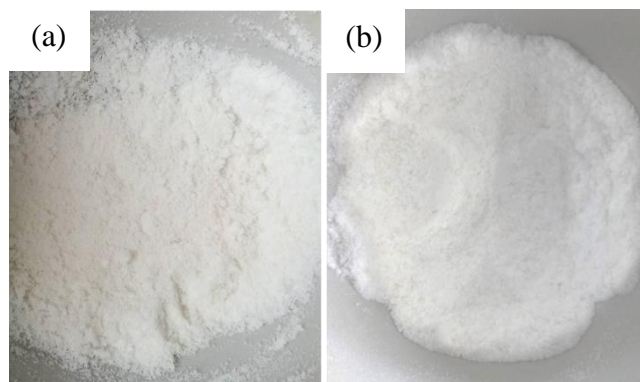
Este estudo indicou a viabilidade de estocagem do sistema imobilizado *in situ* em PU, em embalagem de polietileno transparente com polietileno tereftalato metalizado, sem vácuo e sem a necessidade de tratamento para manutenção do suporte. Adicionalmente, os resultados

de estabilidade operacional e os elevados valores de produtividades de maltobionato de sódio em cada bioconversão fornecem informações relevantes para aplicações potenciais.

5.6 Purificação e conversão de maltobionato de sódio em ácido maltobiônico

A etapa de bioconversão, conduzida com células de *Z. mobilis* imobilizadas em PU, resultou em maltobionato de sódio, sorbitol e residuais de maltose e frutose. A separação e purificação do maltobionato de sódio e a sua conversão para a ácido maltobiônico resultaram em produtos com aspecto visual de pó fino e esbranquiçado, de acordo com a Figura 26.

Figura 26 - Aspecto visual dos produtos de bioconversão (a) maltobionato de sódio e (b) ácido maltobiônico após purificação.



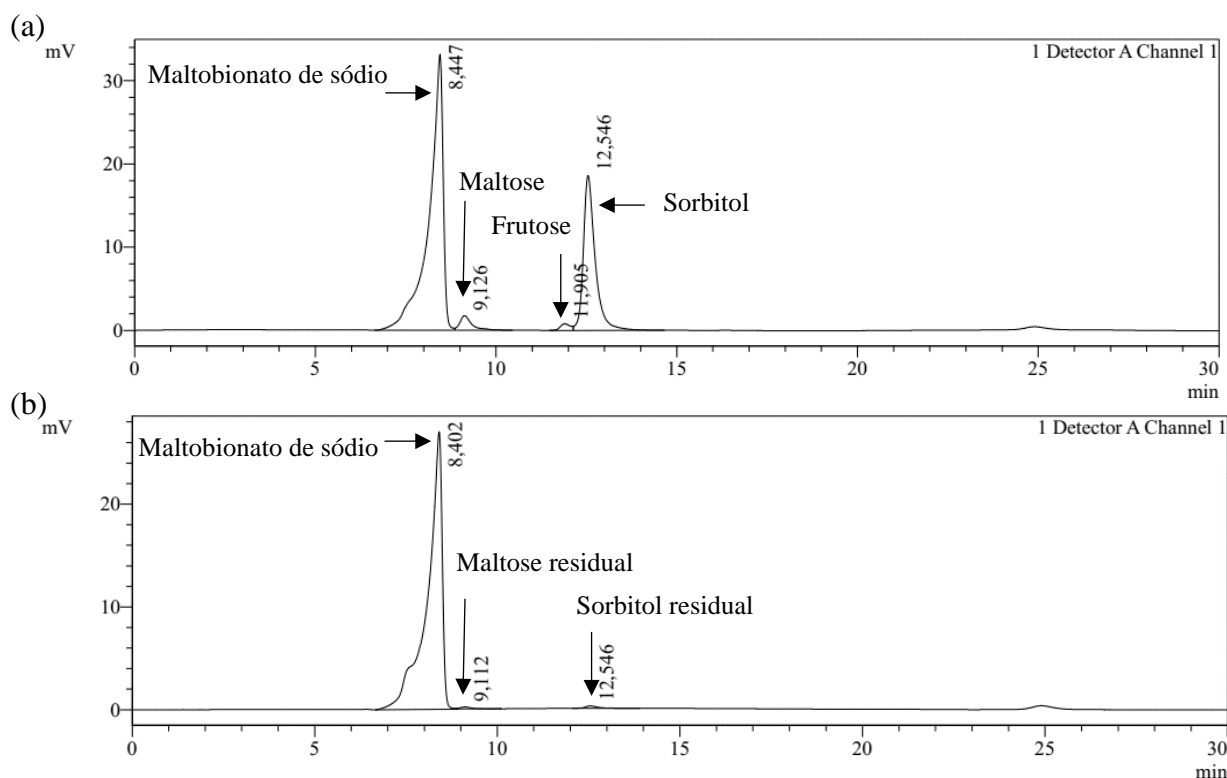
Fonte: Autor (2020).

O maltobionato de sódio e o ácido maltobiônico obtidos apresentaram pureza superior a 97%. A Figura 27A apresenta o cromatograma da amostra (caldo) final de bioconversão, contendo maltobionato de sódio, sorbitol e maltose e frutose residuais. Na Figura 27B é apresentada a mesma amostra após a etapa de purificação, sendo evidenciada a eficiência desta etapa, predominando, como esperado, o maltobionato de sódio. Ressalta-se que não há a presença de metanol, utilizado na etapa de purificação do maltobionato de sódio, nestes cromatogramas, e, portanto, pode-se afirmar que não há residual deste álcool nas amostras obtidas.

Resultados semelhantes foram observados por Garin (2016), que ao purificar maltobionato de sódio, utilizando etanol, obteve uma pureza de 90%; e por Flores (2019), utilizando metanol e obtendo maltobionato de sódio com pureza de 98%.

A elevada pureza do ácido maltobiônico e do maltobionato de sódio é indicada para aplicações na área de alimentos e padroniza as amostras para os estudos de atividade antibacteriana, atividade antioxidante e incorporação em filmes ativos.

Figura 27 - Perfil da separação cromatográfica da amostra de (a) caldo de bioconversão e (b) maltobionato de sódio purificado.



Fonte: Autor (2020).

5.5 Atividade antioxidante de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio

O ácido maltobiônico e maltobionato de sódio, nas concentrações de 0,01 a 20 mg mL⁻¹ não apresentou atividade antioxidante pelos métodos dos radicais DPPH e ABTS^{•+}, ademais observou-se a precipitação destes produtos na presença da solução etanólica do DPPH.

Em relação a habilidade quelante (Tabela 15), apenas o maltobionato de sódio apresentou valores próximos a 50% nas maiores concentrações (15 e 20 mg mL⁻¹). Este valor foi inferior ao apresentado pelo EDTA (50 μmol L⁻¹ ~ 0,015 mg mL⁻¹), o qual apresentou 79,83% de habilidade quelante.

Tabela 15 – Habilidade quelante do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio em diferentes concentrações.

Concentração (mg mL ⁻¹)	Habilidade quelante (%)	
	Ácido maltobiônico	Maltobionato de sódio
20	20,71 ^{aB} ± 0,33	49,42 ^{aA} ± 1,53
15	15,55 ^{bB} ± 0,42	45,47 ^{aA} ± 2,44
10	14,14 ^{bB} ± 0,47	31,92 ^{bA} ± 2,34
5	12,48 ^{cA} ± 0,15	16,11 ^{cA} ± 3,21
1	6,95 ^{dB} ± 0,97	10,96 ^{cA} ± 0,40

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey; letras maiúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de *t* de *student*, utilizando o *software* SASM – Agri, versão 4.

Sugere-se que os efeitos antioxidantes do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio sejam melhores explorados por outras técnicas ou em maiores concentrações, visto que foi relatada, na literatura especializada, uma expressiva atividade antioxidante para estes produtos.

Na área de cosmetologia, é relatado que o ácido maltobiônico é um antioxidante natural, ajudando a prevenir danos celulares de radicais livres, detém metais promotores de oxidação na pele, preserva a matriz dérmica, reduzindo a atividade das enzimas de metaloproteinase de matriz destrutivas e previne (antioxidante) e corrige os sinais de fotoenvelhecimento, além de formar um filme de gel transparente contendo água complexada com suas moléculas (GREEN; SCOTT; YU, 2010; NEOSTRATA COMPANY, 2010). Complementarmente, Brouda et al. (2010) afirma que o ácido maltobiônico é um ingrediente antienvhecimento poderoso, mas suave, que oferece benefício antioxidante. Os autores relatam que o ácido maltobiônico é um inibidor moderado da peroxidação lipídica induzida por radiação ultravioleta, podendo atuar como um antioxidante protetor na pele humana; além de inibir fortemente a atividade da metaloproteinase da matriz, podendo ajudar a prevenir a degradação do colágeno em pele humana.

Segundo Briden e Green (2005), a propriedade antioxidante de ácidos aldônicos, como do ácido maltobiônico, pode ser também determinada usando os métodos de prevenção ou retardamento da oxidação do ar de antralina, hidroquinona ou casca de banana, pela mudança de cor após oxidação. Nielsen (2010) demonstra que o efeito antioxidante de maltobionato de sódio pode ser medido pelo ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP), na qual o complexo Fe³⁺-tripiridiltriazina (TPTZ) é reduzido a Fe²⁺-TPTZ, em pH baixo. A forma ferro (Fe) é de cor azul e pode ser medida espectrofotometricamente (593 nm), onde quanto mais alta

a absorvância, maior é a atividade antioxidante. Segundo o autor, o maltobionato apresenta capacidade antioxidante em termos de redução de Fe (III), na qual apresentou absorvância de 0,236; 0,170 e 0,112 nas concentrações de 5; 2,5 e 1%, respectivamente. O branco (sem atividade antioxidante) apresentou absorvância de 0,0257.

5.6 Atividade antibacteriana de ácido maltobiônico e maltobionato de sódio

Os resultados da atividade antibacteriana do maltobionato de sódio e ácido maltobiônico frente a *S. choleraesuis*; *E. coli*; *S. aureus* e *L. monocytogenes* é apresentada na Tabela 16. O ácido maltobiônico apresentou atividade antibacteriana, com concentração inibitória mínima (CIM) entre 8 e 10,5 mg mL⁻¹, equivalentes a 0,8 e 1,05% de ácido maltobiônico (m:v). Porém, este produto na forma de sal, não apresentou atividade antibacteriana nas condições estudadas.

Tabela 16 – Concentração inibitória mínima (CIM) do maltobionato de sódio e ácido maltobiônico.

Micro-organismos	CIM (mg mL ⁻¹)	
	Maltobionato de sódio	Ácido maltobiônico
<i>Salmonella choleraesuis</i>	n.d.	8,50
<i>Escherichia coli</i>	n.d.	10,50
<i>Staphylococcus aureus</i>	n.d.	8,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	n.d.	8,00

n.d. – não determinado, valores superiores a 50 mg mL⁻¹.

Não há relatos da atividade antimicrobiana de ácido maltobiônico e seus respectivos sais na literatura. Alguns estudos avaliaram os mecanismos de ação antibacteriana do ácido lactobiônico frente a *Pseudomonas fluorescens* (KANG et al., 2020) e *Staphylococcus aureus* (MRSA) (KANG et al., 2020; CAO et al., 2019), e observaram danos à integridade da parede celular e da membrana celular e mudanças nos padrões de conteúdo e atividade de proteínas.

O mecanismo de ação de ácidos orgânicos, como o ácido láctico e o ácido cítrico, em células microbianas também foi estudado. Cherrington et al. (1991) e Mani-López et al. (2012) relataram que a forma não dissociada destes ácidos se difundiria através da membrana microbiana, e se dissociariam no interior da célula, alterando o pH citoplasmático, e conseqüentemente, danificando ou modificando a funcionalidade de enzimas, proteínas estruturais e DNA. Tomalok et al. (2020) avaliaram a CIM de ácidos orgânicos, utilizando as

mesmas cepas microbianas e metodologia desta tese, e relataram um valor de 0,125; 0,094; 0,094 e 0,094% de ácido láctico e 0,125; 0,094; 0,125 e 0,125% de ácido acético frente a *E. coli*, *S. choleraesuis*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. Para o ácido cítrico a CIM foi de 0,375% e para o ácido ascórbico foi de 0,75% para todas as bactérias avaliadas.

Chen e Zhong (2017) avaliaram a atividade antibacteriana do ácido lactobiônico, frente a *L. monocytogenes* e *E. coli*, e obtiveram uma CIM de 10 mg mL⁻¹. Os autores ainda sugerem que combinações binárias e ternárias com concentrações apropriadas de nisina, timol e ácido lactobiônico permitiram atividades sinérgicas frente *L. monocytogenes*. As CIM's utilizando ácido lactobiônico frente a *P. fluorescens* e MRSA foram também avaliadas, obtendo-se os valores de 12,50 e 18,75 mg mL⁻¹ (KANG et al., 2020). Cao et al. (2019) reportou, também utilizando o ácido lactobiônico, uma CIM de 15 mg mL⁻¹ frente a *S. aureus*.

Wojciechowska, Klewicki e Klewicka (2020), igualmente com ácido lactobiônico, porém a 35,8 mg mL⁻¹, observaram ação antibacteriana em testes de difusão em discos, com halos de inibição (já subtraído do tamanho dos discos de 5 mm) de 6,33 ± 0,47 mm para *S. choleraesuis* ATCC 1402; 6,66 ± 1,70 mm para *S. aureus* ATCC 27734; 4,00 ± 0,82 mm para *E. coli* ATCC 10536 e ausência para *L. monocytogenes* ATCC 19111.


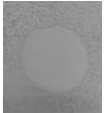

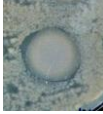

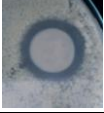

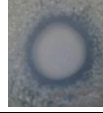
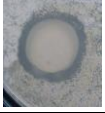
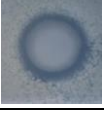


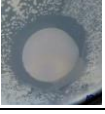



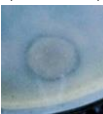
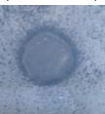
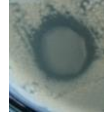




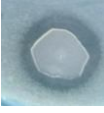

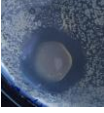
A atividade antibacteriana do ácido maltobiônico obtido neste estudo sugere potencialidades de aplicação em filmes com propriedades ativas.

5.7 Filmes incorporados com ácido maltobiônico

Os filmes de fécula de mandioca e quitosana incorporados com ácido maltobiônico apresentaram aspecto visual e manuseabilidade semelhantes ao padrão (filmes puros), porém com um acréscimo de espessura ($p < 0,05$), mesmo mantendo a mesma quantidade de solução filmogênica. As espessuras dos filmes de fécula de mandioca variaram de 0,09 mm (puro) a 0,25 mm (10% m/m ácido maltobiônico) e nos filmes de quitosana entre 0,03 mm (puro) a 0,15 mm (10% m/m ácido maltobiônico). Esses resultados e os de atividade antibacteriana das concentrações aplicadas são sumarizados na Tabela 17.

Segundo Gutiérrez et al. (2015), um aumento da espessura do filme ao alterar sua formulação pode ser atribuído à modificação por reticulação do polissacarídeo. Esta espessura é uma propriedade importante, pois afeta as propriedades de barreira, principalmente quando o filme é hidrofílico, devido às diferenças entre as pressões de vapor de água e umidade na interface do filme.

Tabela 17 - Atividade antibacteriana de filmes de fécula de mandioca e quitosana incorporados com diferentes concentrações de ácido maltobiônico.

Filmes	Concentração de ácido maltobiônico (%)	Espessura (mm)	Halo de inibição de crescimento (mm) e aspecto visual				
			<i>Listeria monocitogenes</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Quitosana	0	0,03 ^c ± 0,01	12,33 ^b ± 0,58 	12,33 ^c ± 0,58 			
	2,5	0,08 ^b ± 0,02		14,67 ^c ± 1,53 	13,00 ^c ± 1,00 	13,67 ^c ± 1,53 	
	5	0,08 ^b ± 0,01	20,00 ^a ± 4,36 		22,33 ^a ± 5,51 	16,67 ^a ± 1,53 	17,67 ^b ± 2,08 
	7,5	0,13 ^a ± 0,03	17,00 ^{ab} ± 2,00 		22,33 ^a ± 2,52 	17,00 ^a ± 1,00 	22,33 ^a ± 1,53 
	10	0,15 ^a ± 0,02					
Fécula de mandioca	0	0,09 ^c ± 0,03	10,00 ^b ± 0,00 	10,00 ^c ± 0,00 			
	2,5	0,16 ^b ± 0,02		16,33 ^b ± 1,53 	11,67 ^c ± 1,53 	15,33 ^b ± 1,15 	
	5	0,16 ^b ± 0,01	16,00 ^a ± 1,00 		18,83 ^{ab} ± 1,04 	15,67 ^a ± 1,15 	17,00 ^b ± 1,00 
	7,5	0,17 ^b ± 0,01	17,67 ^a ± 2,08 		19,00 ^a ± 1,00 	17,67 ^a ± 2,08 	21,67 ^a ± 2,08 
	10	0,25 ^a ± 0,03					

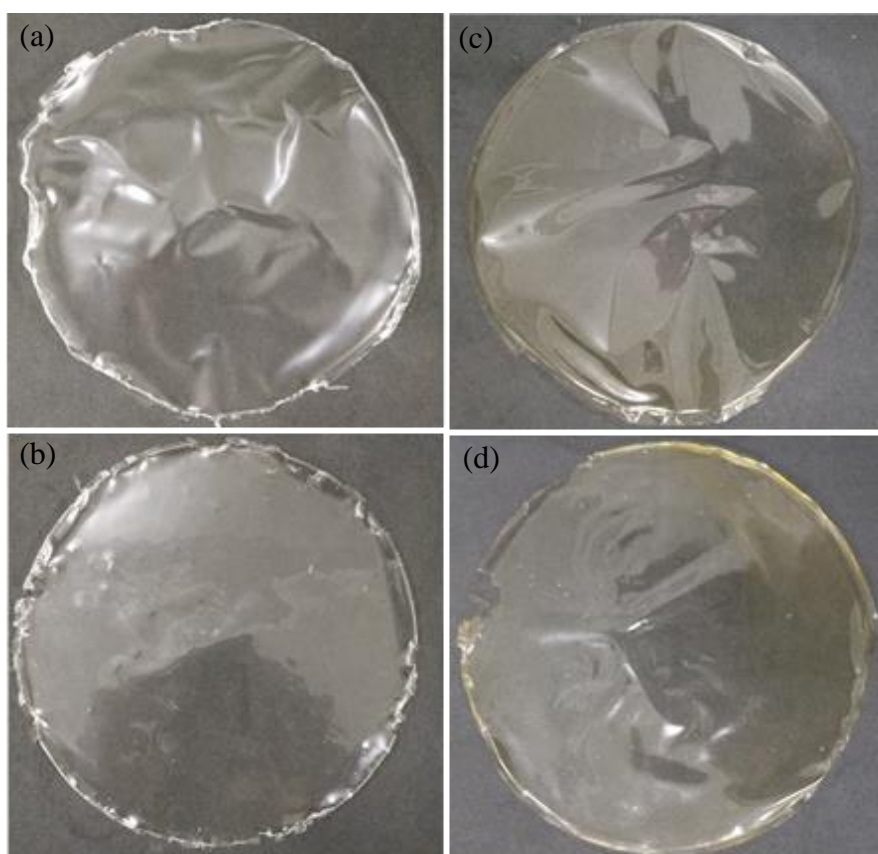
Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes para o mesmo filme (fécula de mandioca ou quitosana) e mesmo micro-organismo na mesma coluna correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

No filme de fécula de mandioca com 5% de ácido maltobiônico evidenciou-se atividade antibacteriana frente a *S. choleraesuis* e *S. aureus*, sendo observado halo de inibição de crescimento (16,33 e 15,33 mm, respectivamente), com diferença estatística significativa do filme puro (10 mm). Para *L. monocitogenes* e *E. coli*, a concentração de ácido maltobiônico

que levou à expressão da atividade antibacteriana em teste de difusão em ágar foi de 7,5% (halo de inibição de 16 e 15,67 mm, respectivamente). Comportamento semelhante foi evidenciado nos filmes de quitosana, na qual foi necessário incorporar 7,5% de ácido maltobiônico para obter filmes capaz de inibir o crescimento microbiano, com halos de inibição de 20; 22,33; 16,67 e 17,67 mm para *L. monocytogenes*, *S. choleraesuis*, *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$), em relação ao filme isento de ácido maltobiônico (12,33 mm).

Desta forma, os filmes incorporados com 7,5 mg mL⁻¹, com aspecto visual apresentado na Figura 28, foram utilizados para os ensaios de solubilidade

Figura 28 - Aspecto visual de filmes de (a) fécula de mandioca puro, (b) fécula de mandioca incorporado com 7,5% de ácido maltobiônico, (c) quitosana puro e (d) quitosana incorporado com 7,5% de ácido maltobiônico.

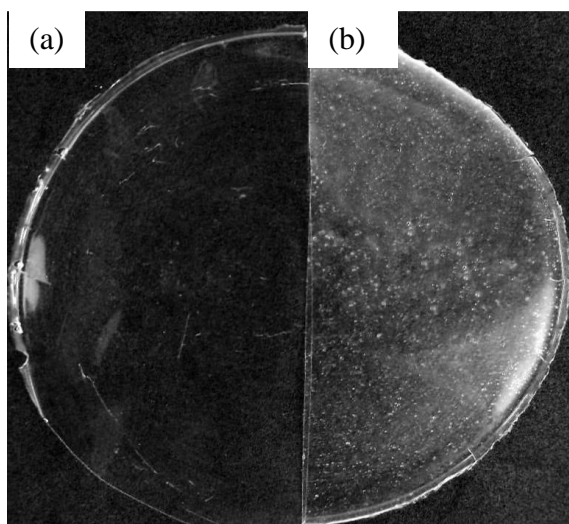


Fonte: Autor (2020).

O filme de acetato de celulose apresentou um aspecto visual desuniforme e com presença de cristais não solubilizado do ácido maltobiônico (Figura 29), devido à baixa

solubilidade do ácido maltobiônico em acetona. Desta maneira, o filme de acetato de celulose incorporado com ácido maltobiônico não foi utilizado nos demais ensaios.

Figura 29 - Aspecto visual do filme de acetato de celulose puro (a) e incorporado com 2,5% de ácido maltobiônico (b).





Fonte: Autor (2020).

Os resultados referentes aos testes de solubilidade em água e óleo dos filmes de fécula de mandioca ou quitosana incorporados com ácido maltobiônico são sintetizados na Tabela 18. Evidenciou-se que a incorporação do ácido aumentou a solubilidade dos filmes em água e, conseqüentemente reduziu ($p < 0,05$) a solubilidade em óleo, provavelmente devido a presença do grupo funcional hidroxila na estrutura molecular do ácido maltobiônico. Com relação ao aspecto visual dos filmes ao final destes ensaios, observou-se que o filme de quitosana com ácido maltobiônico não foi mais visível em água, o filme de fécula de mandioca com ácido maltobiônico se desintegrou na água e os demais permaneceram sem alterações perceptíveis no aspecto visual.

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes biodegradáveis e está relacionada à sua aplicabilidade, visto que filmes com alta solubilidade em água favorecem a aplicação como revestimentos comestíveis de produtos frescos e a insolubilidade em água é exigida para manter a integridade do produto e a resistência à água da embalagem (BALLESTEROS-MÁRTINEZ; PÉREZ-CERVERA; ANDRADE-PIZARRO, 2020). Adicionalmente, o conhecimento das propriedades de barreira de um polímero, como à umidade é muito importante para prever a mudança contínua na qualidade do produto e o seu prazo de validade (KANATT et al., 2012).

Tabela 18 - Solubilidade em água e óleo e aspecto visual de filmes de fécula de mandioca e quitosana incorporados com 7,5% de ácido maltobiônico.

Solventes	Filmes	Solubilidade (%)	Aspecto visual
Água	Fécula Pura	19,63 ^b ± 2,00	
	Fécula+7,5% ácido maltobiônico	62,68 ^a ± 2,40	
	Quitosana Pura	24,55 ^b ± 1,25	
	Quitosana+7,5% ácido maltobiônico	78,85 ^a ± 1,97	
Óleo	Fécula Pura	12,17 ^a ± 0,41	
	Fécula+7,5% ácido maltobiônico	6,23 ^b ± 0,23	
	Quitosana Pura	24,35 ^a ± 1,13	
	Quitosana+7,5% ácido maltobiônico	11,91 ^b ± 1,65	

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes para o mesmo filme (fécula de mandioca ou quitosana, com e sem ácido maltobiônico) e mesmo solvente (água ou óleo) na mesma coluna correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de *t* de *student*, utilizando o *software* SASM – Agri, versão 4.

No presente trabalho, utilizou-se o glicerol como plastificante, porém na literatura outros agentes podem ser adicionado aos filmes para alterar as propriedades mecânicas e de barreira, como por exemplo o sorbitol (LIM et al., 2020), celulose microcristalina, nanocelulose (CHEN et al., 2020), poli (álcool vinílico) (JUNLAPONG, et al., 2019), nanoargila ou fibras de celulose (MORAES; MULLER; LAURINDO, 2012). Segundo Lim et al. (2020), o tipo e o teor de plastificante são fatores cruciais para a selagem a quente, propriedades mecânicas, cristalinidade e teor de umidade de filmes de amido de mandioca.

O ácido maltobiônico apresentou potencialidades de aplicação em filmes de fécula de mandioca ou quitosana com propriedade antibacteriana ativa, alta solubilidade em água e baixa

em óleo e sem significativas alterações no aspecto visual, contribuindo com as futuras pesquisas na área.

6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos neste trabalho permite concluir que:

- A estratégia de imobilização *in situ* foi promissora, pois obteve-se um sistema imobilizado com atividade enzimática frente a glicose de $19,40 \text{ U g}_{\text{célula_seca}}^{-1}$, equivalente a 60,29% de rendimento de imobilização, e com possibilidade de utilização em 16 ciclos operacionais (15 reusos), em testes de 1 h, a partir da formulação de 7 g de poliol; 3,5 g de isocianato; 0,02 g de surfactante de silicone e 7 g de biomassa a $210 \text{ g}_{\text{célula_seca}} \text{ L}^{-1}$. A estratégia de imobilização *in situ* apresentou atividade enzimática 10 vezes superior ao método por contato. Em micrografias de microscopia eletrônica de varredura evidenciou-se o aprisionamento das células de *Z. mobilis* no suporte de PU.

- A concentração máxima de maltobionato de sódio de $648,61 \text{ mmol L}^{-1}$ foi obtida em 34,34 h, utilizando $8,5 \text{ g}_{\text{célula_seca}} \text{ L}_{\text{meio_reacional}}^{-1}$, concentração equimolar de maltose/frutose de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, processo conduzido a $39 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 6,30 e granulometria do sistema imobilizado *in situ* em PU na faixa de 0,125 e 0,355 mm.

- O sistema imobilizado *in situ* em PU apresentou uma estabilidade a estocagem de no mínimo 6 meses a $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, preservando uma produtividade de maltobiônico de sódio de 74,37% e 92,34%, respectivamente. A estabilidade operacional deste sistema imobilizado foi de 19 ciclos de bioconversão de 24 h, com uma produtividade mássica residual de aproximadamente 54%

- O ácido maltobiônico produzido apresentou pureza de 98,1% e concentração inibitória mínima de 8,5; 10,5; 8 e 8 mg mL^{-1} para *S. choleraesuis*, *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. O maltobionato de sódio apresentou habilidade antioxidante ao quelante de ferro de aproximadamente 50% na concentração entre 15 e 20 mg mL^{-1} .

- Na avaliação da potencialidade de aplicação em filmes de fécula de mandioca ou quitosana, foi possível incorporar 7,5% de ácido maltobiônico e com evidências de atividade antibacteriana frente a *S. choleraesuis*, *E. coli*, *S. aureus* e *L. Monocytogenes*. Esses filmes tiveram um aumento de espessura e de solubilidade em água e uma redução de solubilidade em óleo.

- Em síntese, este estudou propôs um novo sistema imobilizado formado por células de *Z. mobilis* e complexo enzimático periplasmático GOFR/GL imobilizados *in situ* em espuma de poliuretano flexível com estabilidade operacional a temperatura e pH, com capacidade de reutilização e de estocagem por no mínimo 6 meses, sem comprometimento da produtividade

de maltobionato de sódio. A capacidade de obter-se ácido maltobiônico com atividade antibacteriana indicou potencialidades de aplicação na área de alimentos, como filmes ativos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados alcançados, sugere-se a realização dos seguintes tópicos para trabalhos futuros:

- No cultivo para produção de células de *Z. mobilis* e GFOR/GL, investigar o uso de subprodutos da indústria como substratos alternativos à glicose pura;

- Com relação ao sistema imobilizado obtido, estudar a estabilidade a estocagem em período de tempo superior, em outras temperaturas e em diferentes embalagens; produzir maltobionato de sódio a partir de ensaios de bioconversão em maior escala e em regime descontínuo alimentado e contínuo; e produzir outros ácidos aldônicos e seus sais;

- Com relação ao ácido maltobiônico e maltobionato de sódio produzidos, realizar ensaios toxicológicos, de estabilidade e degradação forçada. Ademais, realizar análises alternativas para determinação de atividade antioxidante e avaliar o efeito sinérgico desses dois produtos com substâncias antimicrobianas e/ou antioxidantes;

- Para estudos de aplicabilidade do ácido maltobiônico e do maltobionato de sódio em filmes, analisar as propriedades mecânicas e de barreiras dos filmes incorporados com estes produtos; analisar novas estratégias de incorporação destes produtos em outros polímeros ou utilizando diferentes plastificantes ou aditivos; e aplicar esses filmes com propriedades ativas em alimentos, como chocolate e produtos cárneos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINDOYO, J. O.; BEG, M. D. H.; GHAZALI, S.; ISLAM, M. R.; JEYARATNAM, N.; YUVARAJ, A. R. Polyurethane types, synthesis and applications-a review. **RSC Advances**, v. 6, p. 114453–114482, 2016.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9730–9736, 2011.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Role of dissolved oxygen availability on lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 140–147, 2012.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1275–1291, 2013a.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Feeding strategies for enhanced lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 134–142, 2013b.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Selection method of pH conditions to establish *Pseudomonas taetrolens* physiological states and lactobionic acid production. **Biotechnological Products and Process Engineering**, v. 97, p. 3843–3854, 2013c.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 314–323, 2015a.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. A novel approach to monitor stress-induced physiological responses in immobilized microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 3573–3583, 2015b.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Tunable decoupled overproduction of lactobionic acid in *Pseudomonas taetrolens* through temperature-control strategies. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 9–16, 2017.
- AMIN, G.; DOELLE, H. W.; GREENFIELD, P. F. Ethanol production from sucrose by immobilized *Zymomonas mobilis* cells in polyurethane foam. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 225–228, 1987.
- BALDWIN, C.; AKASHE, A.; ZELLER, B. L.; MARQUEZ-SANCHEZ, M.; KOKA, R. Mineral Complexes of Lactobionic Acid and Method of Using for Mineral Fortification of Food Products. **US Patent Application Publication** 0026110 A1, 2007.
- BALDWIN, C.; AKASHE, A.; DINWOODIE, R.; KOKA, R.; WEST, L.G.; KORTUM, O. Use of siderophores and organic acid to retard lipid oxidation. **US Patent** 7.595.073 B2, 2009.

- BALLESTEROS-MÁRTINEZ, L.; PÉREZ-CERVERA, C.; ANDRADE-PIZARRO, R. Effect of glycerol and sorbitol concentrations on mechanical, optical, and barrier properties of sweet potato starch film. **NFS Journal**, v. 20, p. 1–9, 2020.
- BERTASSO, M.; SILVEIRA, M. M.; MANCILHA, I. M. Preservação da atividade da enzima glicose-frutose oxidorreductase em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações. **Anais...** São Carlos, p. 476, 1996.
- BIRKHED, D; EDWARDSSON, S.; KALFAS, S.; SVENSÄTER, G. Cariogenicity of sorbitol. **Swedish Dental Journal**, v. 8, n. 3, p.147-54, 1984.
- BOSCHETTO, D. L.; LERIN, L.; CANSIAN, R.; PERGHER, S. B. C.; DI LUCCIO, M. Preparation and antimicrobial activity of polyethylene composite films with silver exchanged zeolite-Y. **Chemical Engineering Journal**, v. 204-206, p. 210-216, 2012.
- BRIDEN, M. E.; GREEN, B. A. **The next generation hydroxyacids**. In: DRAELOS, Z. D., DOVER, J., ALAM, M., editors. Procedures in cosmetic dermatology: cosmeceuticals. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 205-12, 2005 *apud* GREEN, B. A.; SCOTT, E. J. V.; YU, R. J. Clinical uses of hydroxyacids. In: DRAELOS, Z. D., editor. Cosmetic Dermatology: Products and Procedures. Wiley-Blackwell, 327-334, 1 ed., 2010.
- BRITISH PHARMACOPOEIA. 2 v. Londres: The Stationery Office, 2009.
- BROUDA, I. B.; EDISON, B. L.; WEINKAUF, R. L.; GREEN, B. A. Maltobionic acid, a powerful yet gentle skincare ingredient with multiple benefits to protect skin and reverse the visible signs of aging. In: **Summer Academy Meeting of the American Academy of Dermatology**, Chicago, 2010.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: Princípios e métodos analíticos**, 1. ed., Curitiba: Appris, 2015.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E.; KINNEARY, J.F. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12. ed., Nova Jérсия: Merck & Co, 1996.
- BYFORD, L. L.; STODOLA, F. H. Process of culturing bacteria. **US Patent** 2496297 A, 2011.
- CAÑETE-RODRÍGUEZ, A. M.; SANTOS-DUENAS, I. M.; JIMÉNEZ-HORNERO, J. E.; EHRENREICH, A.; LIEBL, W., GARCÍA-GARCÍA, I. Gluconic acid: Properties, production methods and applications - An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. **Process Biochemistry**, v. 51, p.1891–1903, 2016.
- CAO, J.; FU, H.; GAO, L.; ZHENG, Y. Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiologica**, v. 64, p. 899–906, 2019.
- CARRA, S.; CONCATTO, K.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Cinética da ação de glicose-frutose oxidorreductase e glucono- δ -lactonase de *Zymomonas mobilis* na presença de diferentes carboidratos. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações. T282-Cd Rom. Florianópolis, 2003.

- CARRA, S. **Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2012.
- CARRA, S.; RODRIGUES, D. C.; BERALDO, N. M. C.; FOREST, P.; REGINATTO, C.; BASSANI, V. L.; SILVEIRA, M. M.; MALVESSI, E. Avaliação da temperatura na produção de ácido lactobiônico e sorbitol por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. In: XX Congresso de Engenharia Química. **Anais...** Florianópolis, 2014.
- CARRA, S.; RODRIGUES, D. C.; BERALDO, N. M. C.; SILVEIRA, M. M.; BASSANI, V. L.; MALVESSI, E. Reuso de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácido lactobiônico. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Anais...** Fortaleza, 2015.
- CARRA, S.; OLIVEIRA, A. P.; DEMOLINER, M.; ALBERTI, M.; SILVEIRA, M. M.; BASSANI, V. L.; MALVESSI, E. Purificação de ácido lactobiônico obtido com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC. **Anais...** Caxias do Sul, p. 4419, 2016.
- CARRA, S. **Ácido lactobiônico e lactobionato: obtenção por rota enzimática, purificação e secagem**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.
- CARRA, S.; RODRIGUES, D. C.; BERALDO, N. M. C.; FOLLE, A. B.; DELAGUSTINI, M. G.; SOUZA, B. C.; REGINATTO, C.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; BASSANI, V. L.; MALVESSI, E. High lactobionic acid production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells: a great step for large-scale process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 1265–1276, 2020.
- CHEN, O.; SHI, Y.; CHEN, G.; CAI, M. Enhanced mechanical and hydrophobic properties of composite cassava starch films with stearic acid modified MCC. (microcrystalline cellulose)/NCC (nanocellulose) as strength agent. **International Journal of Biological macromolecules**, v. 142, p. 846-854, 2020.
- CHEN, H.; ZHONG, Q. Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth and milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 260, p. 36–41, 2017.
- CHERRINGTON, C. A.; HINTON, M.; MEAD, G. S.; CHOPRA, I. Organic acid: chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, v. 32, p. 87-108, 1991.
- CHUN, U. H.; ROGERS, P. L. The Simultaneous Production of Sorbitol from Fructose and Gluconic Acid from Glucose Using an Oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 19-24, 1988.
- DEGHANI, S.; HOSSEINI, S. V.; REGENSTEIN, J. M. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. **Food Chemistry**, v. 240, p. 505–513, 2018.
- DELAGUSTIN, M. G. **Caracterização e Avaliação da Estabilidade do Ácido Lactobiônico e de Diferentes Lactobionatos Produzidos por *Zymomonas mobilis* Visando à Utilização**

- na Área Farmacêutica.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.
- DELAGUSTIN, M. G.; GONÇALVES, E.; CARRA, S.; BARCELLOS, T.; BASSANI, V. L.; SILVEIRA, M. M.; MALVESSI, E. Bioproduction and characterization of sodium, potassium, and calcium lactobionates. **Química Nova**, v. 40, p. 1003-1008, 2017.
- DEVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 225–231, 2000.
- DOELLE, H. W.; CRITTENDEN, R.; TOH, H.; DOELLE, M. B. *Zymomonas mobilis*: science and industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 57-98, 1993.
- ERZINGER, G. S.; SILVEIRA, M. M.; COSTA, J. P. C. L.; VITOLO, M.; JONAS, R. Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 329-333, 2003.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION. **European pharmacopoeia**. 6. ed., Strasbourg: Council of Europe, 2008.
- FAERGEMAND, M.; GILLELADEN, C.; QVIST, K. B. Method for producing an acidified milk product. **US Patent Application Publication** 20120045546 A1, 2012.
- FANG, Z.; ZHAO, Y.; WARNER, R. D.; JOHNSON, S. K. Active and intelligent packaging in meat industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 60-71, 2017.
- FDA.** Code of Federal Regulations, Title 21, 21 CFR 172.720. US Food and Drug Administration. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.720&SearchTerm=pudding>. Acesso em: 1 abri. 2021.
- FDA.** Part 182 – Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe, Sec. 184.1199 Calcium gluconate. US Food and Drug Administration. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=184.1199>. Acesso em: 1 abr. 2021.
- FEIN, J. E.; CHARLEY, R. C.; HOPKINS, K. A.; LAVERS, B.; LAWFORD, H. G. Development of a simple medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 1-6, 1983.
- FERRAZ, H. C.; BORGES, C. P.; ALVES, T. L. M. Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 89, p. 43-53, 2000.
- FOLLE, A. B.; BASCHERA, V. M.; CARRA, L. T. V. S.; POLIDORO, T. A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Assessment of different systems for the production of aldonic acids and sorbitol by calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 41, p. 185–194, 2018.

- FLORES, M. L. **Síntese biocatalítica, recuperação e caracterização físico-química do ácido maltobiônico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2019.
- GARIN, D. L. **Uso do Sistema Enzimático de *Zymomonas mobilis* para a Produção de Ácidos Maltobiônico e Lactobiônico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.
- GHAANI, M.; COZZOLINO, C. A.; CASTELLI, G.; FARRIS, S. An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 1-11, 2016.
- GIBBS, M.; DE MOSS, R.D. Anaerobic dissimilation of C14 – labeled glucose on fructose by *Pseudomonas lindneri*. **The Journal Biological Chemistry**, v. 207, p. 689-694, 1954.
- GODERSKA, K.; JUZWA, W.; SZWENGIEL, A.; CZARNECKI, Z. Lactobionic acid production by glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* expressed in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 2047–2053, 2015.
- GODERSKA, K. The antioxidant and prebiotic properties of lactobionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 3737–3751, 2019.
- GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J-L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p. 39-50, 1994.
- GREEN, B. A.; SCOTT, E. J. V.; YU, R. J. **Clinical uses of hydroxyacids**. In: DRAELOS, Z. D., editor. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. Wiley-Blackwell, 327-334, 1 ed., 2010.
- GROEN, B. W.; DE WRIES, S.; DUINE, J. A. Characterization of the hexose oxidase from the red seaweed *Chondrus crispus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, p. 858-861, 1997 *apud* GUTIÉRREZ, L. P.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. *International Dairy Journal*, v. 26, p.103-111, 2012.
- GROVER, N.; PLANKS, J. G.; SUMMERS, S. R., CHADO, G. R.; SCHURR, M. J.; KAAR, J. L. Acylase-containing polyurethane coating with anti-biofilm activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 12, p. 2535-2543, 2016.
- GUNCHEVA, M.; PAUNOVA, K.; DIMITROV, M.; YANCHEVA, D. Stabilization of *Candida rugosa* lipase on nanosized zirconia-based materials. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 43-50, 2014.
- GUTIÉRREZ, L. P.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **International Dairy Journal**, v. 26, p.103-111, 2012.
- GUTIÉRREZA, T. J.; MORALESB, N. J.; TAPIAA, M. S.; PÉREZA, E.; FAMÁC, L. Corn Starch 80:20 “Waxy”:Regular, “Native” and Phosphated, as Bio-Matrixes for Edible Films. **Procedia Materials Science**, v. 8, p. 304 – 310, 2015.

- HAMANN, D.; MARCO, M.; PAROUL, N.; WOLOSZYN, N.; SOUZA, R. C.; CANSIAN, R. L.; PALAVICINI, S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extrato etanólico de casca de banana da variedade caturra (*Musa* sp., subgrupo Cavendish) obtido por maceração na ausência e presença de ultrassom. **Perspectiva**, v. 42, p. 79-88, 2018.
- HARDMAN, M. J.; SCOPES, R. K. The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 173, p. 203-209, 1988.
- HOSSEINNEJAD, M. Active packaging for food applications - a review. **International Journal of Advanced Biological Biomedical Research**, v. 2, p. 1174–1180, 2014.
- HUA, L.; NORDKVIST, M.; NIELSEN, P. M.; VILLADSEN, J. Scale-Up of Enzymatic Production of Lactobionic Acid Using the Rotary Jet Head System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 842–849, 2007.
- HUSTEDE, H.; HABERSTROH, H.J.; SCHINZIC, E. **Gluconic acid**. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, v. 17, p. 37-44, 2012.
- IONESCU, M. **Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes**. 1. ed., United Kingdom: Rapra Technology Limited, 2005.
- ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 543–554, 2009.
- JANG, I. H.; JUNG, S. G.; CHANG, H. S.; CHUN, U. H. Improvement of the Process for Sorbitol Production with *Zymomonas mobilis* Immobilised in k-Carrageenan. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 485-492, 1996.
- JONAS, R.; SILVEIRA, M.M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 118, p. 321-336, 2004.
- JONES, W. E.; HO, C. Y. Novel techniques for the preparation and crystallization of 4-0-beta-D-galactopyranosyl-D-gluconic acid. **WO Patent** 051498, 2001.
- JUNLAPONG, K.; BOONSUK, P.; CHAIBUNDIT, C.; CHANTARAK, S. Highly water resistant cassava starch/poly(vinyl alcohol) films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 521–527, 2019.
- KANATT, S. R.; RAO, M.; CHAWLA, S.; SHARMA, A. Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 290–297, 2012.
- KANG, S.; KONG, F.; SHI, X.; HAN, H.; LI, M.; GUAN, B.; YANG, M.; CAO, X.; TAO, D.; ZHENG, Y.; YUE, X. Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Pseudomonas fluorescens* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its application on whole milk. **Food Control**, v. 108, p. 106876, 2020.
- KAPETANAKOU, A. E.; SKANDAMIS, P. N. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: Natural volatile antimicrobial compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 12, p. 1-12, 2016.

- KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v. 74, p. 113-130, 2006.
- KHANEGHAH, A. M.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 1-19, 2018.
- KIMURA, T. Feed additive for laying hens and feed containing the additive. **EP Patent Application Publication** 1731042 A1, 2006.
- KIRYU, T.; YAMAUCHI, K. MASUYAMA, A.; OOE, K.; KIMURA, T.; KISO, T.; NAKANO, H.; MURAKAMI, H. Optimization of Lactobionic Acid Production by *Acetobacter orientalis* Isolated from Caucasian Fermented Milk, "Caspian Sea Yogurt". **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, p. 361–363, 2012.
- KLUYVER, A. J.; DE LEY, J.; RIJVEN, A. The Formation and Consumption of Lactobionic and Maltobionic Acids by *Pseudomonas* Species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 17, p. 1- 14, 1951.
- KOEHNTOPP, P. I.; PINHEIRO, H. M. V.; SILVEIRA, M. M.; JONAS, R. Estudo da imobilização de *Zymomonas mobilis* em poliuretano visando a produção de sorbitol e ácido glicônico. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações. **Resumos...** São Carlos, p. 470, 1996.
- KOKA, R.; MEHNERT, D.W.; FRITSCH, R. J.; STEFFAN, W.; HABERMEIER, P.; BRADBURY, A.G.W.; ROHRMOOS, A.; WOLFSCHOON-POMBO, A.; ROSE, M. Process for manufacturing cheeses and other dairy products and products thereof. **US Patent** 6916496B2, 2005.
- LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas mobilis* ethanol fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, p. 287-304, 1997.
- LEE, S. Y.; LEE, S. J.; CHOI, D. S.; HUR, S. J. Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 2799-2810, 2015.
- LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6236-6249, 2013.
- LIM, W. S.; OCK, S. Y.; PARK, G. D.; LEE, I. W.; LEE, M. H.; PARK, H. J. Heat-sealing property of cassava starch film plasticized with glycerol and sorbitol. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, p. 100556, 2020.
- LIMA, O.G.; SCHUMACHER, I.E.; ARAÚJO, J.M. New conservations about the antagonist effects of *Zymomonas mobilis* var *recifensis*, ecological aspects of some problems in microbiology. **Revista do Instituto Antibiótico**, v. 12, p. 57-68, 1972.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2013.

- LUDWIG, R.; OZGA, M.; ZÁMOCKY, M.; PETERBAUER, C.; KULBE, K. D.; HALTRICH, D. Continuous enzymatic regeneration of electron acceptors used by flavoenzymes: Cellobiose dehydrogenase-catalyzed production of lactobionic acid as an example. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, p. 97–104, 2004 *apud* NORDKVIST, M.; NILESEN, P.M.; VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. *Biotechnology Bioengineering*, v. 97, p. 694-707, 2007.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed., São Paulo: Pearson Education, p. 350-351, 2010.
- MAISANABA, S.; LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; GUTIERREZ-PRAENA, D.; PICHARDO, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A. I., et al. New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation. **Food Reviews International**, v. 33, p. 447-515, 2016.
- MALHERBI, N. M. **Desenvolvimento e caracterização de embalagens biodegradáveis ativas: estudo da eficácia antioxidante para azeite de oliva extravirgem**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2018.
- MALVESSI, E.; CONCATTO, K.; CARRA, S.; SILVEIRA, M. M. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 39-144, 2006a.
- MALVESSI, E.; PASQUALI, F. C.; CARRA, S.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M. Bioconversão de ácido lactobiônico por endoenzimas presentes em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em diferentes configurações de biorreatores. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Resumos...** Caxias do Sul, p. 64, 2006b.
- MALVESSI, E. **Produção de Sorbitol e Ácidos Orgânicos por *Zymomonas mobilis***. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- MALVESSI, E.; CARRA, S.; SILVEIRA, M. M.; AYUB, M. A. Z. Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose–fructose oxidoreductase/glucono- δ -lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 1-6, 2010.
- MALVESSI, E.; CARRA, S.; PASQUALI, F. C.; KERN, D. B.; SILVEIRA, M. M.; AYUB, M. A. Z. Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 1–10, 2013.
- MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, p. 713-721, 2012.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2. ed., São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 1999.

- MAO, S.; LIU, Y.; HOU, Y.; MA, X.; Yang, J.; Han, H.; Han, J.; Jia, L.; Qin, H.; Lu, F. Efficient production of sugar-derived aldonic acids by *Pseudomonas fragi* TCCC11892. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 8, p. 39897–39901, 2018.
- MARQUES, C.; WOJEICCHOWSKI, J. P.; CARDOSO, T.; MAFRA, M. R.; MITTERER-DALTOÉ, M. L.; MASSON, M. L. Lactobionic acid as a suitable food preservative for yacon juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 64, p. 102400, 2020.
- MASTROMATTEO, M.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Advances in controlled release devices for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 591-598, 2010.
- MEIBERG, J. B. M.; BRUINENBERG, P. M.; SLOOTS, B. E. A process for the fermentative oxidation of reducing disaccharides. **EP Patent application** 0384534 A1, 1990.
- MERRILL, R. K.; SINGH, M. Food ingredients and food products treated with an oxidoreductase and methods for preparing such food ingredients and food products. **US Patent Application Publication** 8021704, 2011.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MINAL, N., BHARWADE, S. B.; CHAUDHARY, N. N.; JAIN, A. K. Lactobionic Acid: Significance and Application in Food and Pharmaceutical. **International Journal Food of Fermented**, v. 6, p. 25-33, 2017.
- MIYAKE, T.; SATO, Y. Process for the production of foods and drinks with the employment of maltobionic acid. **US Patent** 3.899.604, 1975.
- MIYAMOTO, Y.; OOI, T; KINOSHITA, S. Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas* sp. LS13-1. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 427–430, 2000.
- MORAES, J. O.; MULLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B. Influence of the simultaneous addition of bentonite and cellulose fibers on the mechanical and barrier properties of starch composite-films. **Food Science and Technology International**, v. 1, p. 23-28, 2012.
- MUKHOPADHYAY, R.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B.P.; BANERJEE, P.C.; GUHA, A.K. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 299–303, 2005.
- MURAKAMI, H.; KAWANO, J.; YOSHIZUMI, H.; NAKANO, H.; KITAHATA, S. Screening of Lactobionic Acid Producing Microorganisms. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 49, p. 469-477, 2002.
- MURAKAMI, H.; SEKO, A.; AZUMI, M.; KISO, T.; KIRYU, T.; KITAHATA, S.; SHIMADA, Y.; NAKANO, H. Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 50, p. 117-120, 2003.
- MURAKAMI, H.; SEKO, A.; AZUMI, M.; KISO, T.; KIRYU, T.; KITAHATA, S.; SHIMADA, Y.; NAKANO, H. Microbial Conversion of Lactose to Lactobionic Acid by Resting Cells of *Burkholderia cepacia* No. 24. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 53, p. 7-11, 2006.

- NEOSTRATA COMPANY. **Technical Information Bulletin**: Maltobionic Acid. Inc., 307 College Road East, Princeton, New Jersey, 2010.
- NIELSEN, P. M.; VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 694-707, 2007.
- NIELSEN, P. M.; HOEIER, E. Food products containing aldobionic acid. **WO Patent Application Publication** 007398 A1, 2009.
- NIELSEN, P.M. Meat based food product comprising lactobionic acid. **US Patent Application Publication** 0214752 A1, 2009.
- NIELSEN, P. M. Maltobionate as antioxidant in food products. **US Patent Application Publication** 2010/0173044 A, 2010.
- NISHIZUKA, Y.; HAYAISHI, O. Enzymic formation of lactobionic acid from lactose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, p. 2721-2728, 1962 *apud* NORDKVIST, M.; NILESEN, P.M.; VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnology Bioengineering**, v. 97, p. 694-707, 2007.
- NORDKVIST, M.; NILESEN, P. M.; VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnology Bioengineering**, v. 97, p. 694-707, 2007.
- NYARI, N. L. D. **Aplicação da lipase de *Candida antarctica* B imobilizada in situ em poliuretano em reação de síntese de ésteres em sistema livre de solvente**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2017.
- NYARI, N. L. D.; FERNANDES, I. A.; BUSTAMANTE-VARGA, C. E.; STEFFENS, C. D.; ZENI, J.; DALLAGO, R. M. *In situ* immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52, 2016.
- OH, Y. R.; JANG, Y. A.; HONG, S. H.; EOM, G. T. High-level production of maltobionic acid from high-maltose corn syrup by genetically engineered *Pseudomonas taetrolens*. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00558, 2020.
- OE, K.; KIMURA, T. Aging inhibitor for bread. **JP Patent Application Publication** 2011177121, 2011.
- OPEN CHEMISTRY DATABASE - PUBCHEM. Maltobionic Acid. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3036723#section=Top>. Acesso em: 7 abr. 2021.
- ORY, I.; ROMERO, L. E.; CANTERO, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 547-555, 2004.

- PARK, Y.; OH, E. J.; JO, J.; JIN, Y.; SEO, J. Recent advances in biological production of sugar alcohols. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 105-113, 2016.
- PEDRUZZI, I.; MALVESSI, E.; MATA, V. G.; SILVA, E. A. B.; SILVEIRA M. M.; RODRIGUES, A. E. Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1145, p. 128-132, 2007.
- PEDRUZZI, I.; SILVA, E. A. B.; RODRIGUES, A. E. Production of lactobionic acid and sorbitol from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomonas mobilis* cells: A kinetic study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 183-191, 2011.
- PIEROZAN, M. K.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L.; SANTOS, A. C. A.; LERIN, L. A.; DI LUCCIO, M.; MOSSI, A. J.; ATTI-SERAFINI, L.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 764-770, 2009.
- PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, p. 237-255, 1998.
- RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 185-195, 2006.
- REHR, B.; WILHEM, C.; SAHM, N. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 144-148, 1991.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6. ed., London: Pharmaceutical Press. Washington: American Pharmacists Association, 2009.
- SÁNCHEZ-ORTEGA, I.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; SANTOS-LÓPEZ, E. M.; AMARO-REYES, A.; BARBOZA-CORONA, J. E.; REGALADO, C. Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-18, 2014.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L. ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: Principais polímeros e avaliação de propriedades**, 1. ed., Campinas: CETEA/ITAL, 2002.
- SATORY, M.; FÜRLINGER, M.; HALTRICH, D.; KULBE, K. D.; PITTNER, F.; NIDETZKY, B. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 1205-1208, 1997.
- SAVARY, B. J., HICKS, K. B.; O'CONNOR, J. V. Hexose oxidase from *Chondrus crispus*: improved purification using perfusion chromatography. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 42-51, 2001 *apud* NORDKVIST, M.; NILESEN, P.M.; VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnology Bioengineering**, v. 97, p. 694-707, 2007.

- SCHIWECK, H.; BAR, A.; VOGEL, R. E.; SCHWARZ, E. E.; KUNZ, M. S.; LUSSEM, B.; MOSER, S. M.; PETERS, S. S. **Sugar Alcohols**. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- SEVERO JÚNIOR, J. B. **Síntese Biocatalítica do Sorbitol e Ácido Lactobiônico com Separação Simultânea por Eletrodialise**. Dissertação (Mestre em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- SEVERO JÚNIOR, J. B.; ALVEZ, T. L.; FERRAZ, H. C. Removal of lactobionic acid by electro dialysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 1003-1011, 2014.
- SILVEIRA, M. M.; WISBECK, E.; LEMMEL, C.; ERZINGER, G.; COSTA, J. P. L.; BERTASSO, M.; JONAS, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 99-103, 1999.
- SILVEIRA, M. M.; WISBECK, E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucosefructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 442-445, 2001.
- SILVEIRA, M. M.; JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 400-408, 2002.
- SILVEIRA, M. M.; MALVESSI, E.; CARRA, S.; PASQUALI, F. C.; POLIDORO, T. A. Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácidos orgânicos ou seus sais, preparação de elevada pureza isomérica de ácidos orgânicos ou seus sais. **INPI Patente de invenção 0700421-4**, 2007.
- SPRENGER, G. A. **Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some routes**. FEMS Microbiology Letters, 145:301-307, 1996.
- STODOLA, F. H.; LOCKWOOD, L. B. The Oxidation of Lactose and Maltose to Bionic Acids by *Pseudomonas*. **Journal Biological Chemistry**, v. 171, p. 213-221, 1947.
- SUN, X. D.; HOLLEY, R. A. Antimicrobial and antioxidative strategies to reduce pathogens and extend the shelf life of fresh red meats. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, p. 340-354, 2012.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 1- 46, 1977.
- TASIC-KOSTOV, M.; PAVLOVIC, D.; LUKIC, M.; JAKSIC, I.; ARSIC, I.; SAVIC, S. Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside-based topical emulsions: the colloidal structure, stability and efficacy evaluation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, p. 424-434, 2012.
- TOMALOK, C. C. G.; WLODARKIEWICZ, M. E.; BACKES, G. T. CANSIAN, R. L. Concentração inibitória mínima de ácidos orgânicos para controle microbiológico. In: II

- Semana Acadêmica e I Mostra Científica da Medicina Veterinária. **Anais...** Erechim, p. 19, 2020.
- UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.
- VALLE, T. A.; RUZZA, A. A.; MASTROENI, M. F.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M.; SOUZA, O; ERZINGER, G. S. Lactobionic acid produced by *Zymomonas mobilis*: alternative to prepare targets nanoparticles. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 4, p. 220, 2013.
- VASSILEV, N. B.; VASSILEVA, M. C.; SPASSOVA, D. I. Production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 39, p. 285-288, 1993.
- VENZON, L. T.; MIRON, D. Determinação de manitol em preparação injetável por reação colorimétrica. **Trabalho de conclusão** do Curso de Farmácia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS, 2008.
- VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 240-243, 2006.
- VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C., SILVA, R. S. F.; BARROS, M. The production of sorbitol by permeabilized and immobilized cells of *Zymomonas mobilis* in sucrose. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 49, p. 683-687, 2006.
- VILAR, W. D. **Química e Tecnologia dos Poliuretanos**, 2. ed., Rio de Janeiro: Vilar Consultoria, 1999.
- VILAR, W. D. **Química e tecnologia dos poliuretanos**, Vilar Consultoria Técnica, Disponível em: <http://www.poliuretanos.com.br>. Acesso em: 23 ago. 2019.
- VIKARI, L. Formation of Levan e Sorbitol from Sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 252-255, 1984a.
- VIKARI, L. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 118-123, 1984b.
- WALTER, T.; BEGLI, H. A. Flavour enhancer. **US Patent Application Publication** 0244080 A, 2011.
- WANICK, M. C.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, E. C.; SCHUMACHER, I. E. Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis*. **Revista do Instituto Antibiótico**, v. 10, p. 47-49, 1970.
- WOJCIECHOWSKA, A.; KLEWICKI, R.; KLEWICKA, E. The potential of new bionic acids as prebiotics and antimicrobials. **Food Science and Technology**, v. 125, p. 109246, 2020.

YANG, J.; XU, P.; LONG, L.; DING, S. Production of lactobionic acid using an immobilized cellobiose dehydrogenase/laccase system on magnetic chitosan spheres. **Process Biochemistry**, v. 100, p. 1-9, 2021.

YUEN, S. Mixture of maltobionic acid and monosodium glutamate as a food seasoning. **US Patent** 3.829.583, 1974.

ZACHARIOU, M.; SCOPES, R. K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **Journal of Bacteriology**, v. 3, p. 863-869, 1986.

ZAGONEL, T. P. **Obtenção de Ácido Lactobiônico por Processo de Transformação Utilizando *Zymomonas mobilis* ATCC 29191**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: Said, S. e Pietro, R.C.L.R. (Ed.) **Enzimas como agentes biotecnológicos**. São Paulo: Legis Summa, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Definição de temperatura e pH no processo reacional de bioconversão

Tabela 19 - Análise de variância para tempo de bioconversão, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto em função do planejamento fatorial completo 2² em função de temperatura e pH ótimos.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Tempo de bioconversão				
Regressão	5972,19	5,00	1194,44	17,99
Resíduo	332,02	5,00	66,40	
Falta de Ajuste	330,81	3,00		
Erro Puro	1,21	2,00		
Total	6304,21	10,00		
Produtividade mássica				
Regressão	8,47	5,00	1,69	57,53
Resíduo	0,15	5,00	0,03	
Falta de Ajuste	0,13	3,00		
Erro Puro	0,02	2,00		
Total	8,62	10,00		
Produtividade específica				
Regressão	2,93	5,00	0,59	57,53
Resíduo	0,05	5,00	0,01	
Falta de Ajuste	0,05	3,00		
Erro Puro	0,01	2,00		
Total	2,98	10,00		
Velocidade específica de formação de produto				
Regressão	19,26	5,00	3,85	14,04
Resíduo	1,37	5,00	0,27	
Falta de Ajuste	1,35	3,00		
Erro Puro	0,02	2,00		
Total	20,64	10,00		

*Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{tab.,95\%} = 5,050329$

Tabela 20 - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para tempo de bioconversão, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto em função de temperatura e pH ótimos.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	p
Tempo de bioconversão				
Média	32,95	0,45	73,47	0,0002
(1)Temperatura (°C)(L)*	-16,78	0,28	-61,01	0,0003
Temperatura (°C)(Q)*	11,28	0,33	34,39	0,0008
(2)pH(L)*	-13,04	0,28	-47,43	0,0004
pH(Q)*	13,55	0,33	41,29	0,0006
1L.2L*	15,90	0,39	40,94	0,0006
Produtividade mássica				
Média	3,72	0,05	73,86	0,0002
(1)Temperatura (°C)(L)*	0,65	0,03	20,89	0,0023
Temperatura (°C)(Q)*	-0,57	0,04	-15,58	0,0041
(2)pH(L)*	0,37	0,03	11,84	0,0071
pH(Q)*	-0,70	0,04	-18,94	0,0028
1L.2L*	-0,36	0,04	-8,16	0,0147
Produtividade específica				
Média	2,19	0,03	73,86	0,0002
(1)Temperatura (°C)(L)*	0,38	0,02	20,89	0,0023
Temperatura (°C)(Q)*	-0,34	0,02	-15,58	0,0041
(2)pH(L)*	0,22	0,02	11,84	0,0071
pH(Q)*	-0,41	0,02	-18,94	0,0028
1L.2L*	-0,21	0,03	-8,16	0,0147
Velocidade específica de formação de produto				
Média	6,35	0,06	111,31	0,0001
(1)Temperatura (°C)(L)*	1,37	0,04	39,17	0,0007
Temperatura (°C)(Q)*	-0,71	0,04	-16,88	0,0035
(2)pH(L)*	0,26	0,04	7,46	0,0175
pH(Q)*	-0,52	0,04	-12,46	0,0064
1L.2L*	-0,29	0,05	-5,84	0,0281

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabela 21 – Efeitos estimados de temperatura e pH para tempo de bioconversão, produtividade mássica, produtividade específica e velocidade específica de formação de produto em função de temperatura e pH ótimos.

	Efeitos	Erro padrão	t(2)	p	
Tempo de bioconversão					
	Média	32,95	0,45	73,47	0,0002
(1)Temperatura (°C)(L)*	-33,56	0,55	-61,01	0,0003	
Temperatura (°C)(Q)*	22,57	0,66	34,38	0,0008	
(2)pH(L)*	-26,09	0,55	-47,43	0,0004	
pH(Q)*	27,10	0,66	41,29	0,0006	
1L.2L*	31,80	0,78	40,94	0,0006	
Produtividade mássica					
	Média	3,72	0,05	73,86	0,0002
(1)Temperatura (°C)(L)*	1,29	0,06	20,89	0,0023	
Temperatura (°C)(Q)*	-1,15	0,07	-15,58	0,0041	
(2)pH(L)*	0,73	0,06	11,84	0,0071	
pH(Q)*	-1,40	0,07	-18,94	0,0028	
1L.2L*	-0,71	0,09	-8,16	0,0147	
Produtividade específica					
	Média	2,19	0,03	73,86	0,0002
(1)Temperatura (°C)(L)*	0,76	0,04	20,89	0,0023	
Temperatura (°C)(Q)*	-0,68	0,04	-15,58	0,0041	
(2)pH(L)*	0,43	0,04	11,84	0,0071	
pH(Q)*	-0,82	0,04	-18,94	0,0028	
1L.2L*	-0,42	0,05	-8,16	0,0147	
Velocidade específica de formação de produto					
	Média	6,35	0,06	111,31	0,0001
(1)Temperatura (°C)(L)*	2,74	0,07	39,17	0,0007	
Temperatura (°C)(Q)*	-1,41	0,08	-16,88	0,0035	
(2)pH(L)*	0,52	0,07	7,46	0,0175	
pH(Q)*	-1,04	0,08	-12,46	0,0064	
1L.2L*	-0,58	0,10	-5,84	0,0281	

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).