

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
CAMPUS POÇOS DE CALDAS

ELISA BONELLI FIGUEIREDO

**CÉLULAS MICROBIANAS IMOBILIZADAS EM TITÂNIA E RETICULADAS PARA
APLICAÇÃO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSACARÍDEOS**

POÇOS DE CALDAS/MG

2026

ELISA BONELLI FIGUEIREDO

**CÉLULAS MICROBIANAS IMOBILIZADAS EM TITÂNIA E RETICULADAS PARA
APLICAÇÃO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSACARÍDEOS**

Projeto final de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Bioprocessos.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Vieira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sylma Carvalho Maestrelli

POÇOS DE CALDAS/MG

2026

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Figueiredo, Elisa Bonelli.

Células microbianas imobilizadas em titânia e reticuladas para aplicação na síntese enzimática de fruto oligosacarídeos / Elisa Bonelli Figueiredo. - Poços de Caldas, MG, 2026.

46 f. : il. -

Orientador(a): Ana Carolina Vieira.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Fruto-oligosacarídeos. 2. Imobilização celular. 3. *Aspergillus oryzae*. 4. Reticulação. 5. Frutotransferase. I. Vieira, Ana Carolina, orient. II. Título.

ELISA BONELLI FIGUEIREDO

**CÉLULAS MICROBIANAS IMOBILIZADAS EM TITÂNIA E RETICULADAS PARA
APLICAÇÃO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSACARÍDEOS**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 07 de julho de 2026

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Vieira
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG

Assinatura:

Prof.^a Dr.^a Sylma Carvalho Maestrelli
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG

Prof. Msc. Felipe de Paula Faria
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho foi possível graças ao apoio conjunto de vários colaboradores, aos quais expresso a minha mais sincera gratidão.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e sua imensa graça, por ter me guiado e sustentado através dos caminhos desafiadores da jornada acadêmica.

Aos meus pais, Francisco e Regiane, que sempre colocaram os meus sonhos em primeiro lugar, me incentivaram, apoiaram e me sustentaram em oração. Dedico todo e qualquer sucesso a eles, que sob muito sol, me fizeram chegar até aqui pela sombra.

Ao meu noivo, Luiz Henrique, que me acompanha desde muito antes do início da minha trajetória acadêmica, sempre me apoiando, acreditando em mim, comemorando as minhas conquistas e sendo o meu porto seguro durante os períodos mais difíceis.

Às minhas amigas e companheiras de graduação, Alana e Letícia, que sempre estiveram presentes, seja na troca de conhecimento ou ajuda, e assim tornaram essa jornada mais leve e feliz.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Vieira, agradeço toda a paciência para ensinar e todo o suporte oferecido, e à minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Sylma Carvalho Maestrelli, pela disposição em ajudar neste trabalho. Sem vocês não teria sido possível.

Aos professores e alunos do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Bioprocessos (LabTEB), Laboratório de Materiais (LABMAT), ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP), que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, agradeço o compartilhamento de conhecimentos e experiências que enriqueceram minha trajetória.

Agradeço a todos técnicos e funcionários da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG) que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Agradeço o apoio financeiro da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil (Concessões n.º 404912/2021-4, n.º 305029/2024-0 e n.º 403007/2025-9), da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (Concessão n.º APQ-00793-24) e BPD-00030-22 (CNPq/FAPEMIG).

RESUMO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são açúcares prebióticos, cuja produção ocorre pela reação de transfrutosilação da sacarose catalisada pela enzima frutossiltransferase (FTase; EC 2.4.1.9), sintetizada pelo fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301. Este trabalho teve por objetivo produzir e caracterizar suportes porosos de óxido de titânio (TiO_2) e avaliar as propriedades bioquímicas (pH e temperatura) de células de *A. oryzae* IPT-301 nele imobilizadas e reticuladas com glutaraldeído, visando à síntese de FOS. Os suportes foram confeccionados pela técnica de réplica, partindo-se de uma espuma de poliuretano com porosidade de 40 ppi impregnada com barbotina de titânia (55%), seguida de secagem e sinterização a 1500 °C durante 2 h; o pó de partida foi caracterizado por difração de raios X (DRX) e por área de superfície específica (método de B.E.T.). As células foram produzidas e imobilizadas por cultivo submerso em meio sintético (30 °C, 200 rpm, 32 h) e, em seguida, reticuladas com glutaraldeído 25% em tampão tris-acetato, com posterior redução por borohidreto de sódio. A influência do pH e da temperatura sobre a atividade de transfrutosilação foi avaliada por meio de DCCR 2², com três pontos centrais e quatro pontos axiais, e os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA), superfícies de resposta e gráfico de Pareto no software Protimiza Experimental Design (nível de significância $\alpha = 10\%$). A caracterização do suporte por DRX confirmou a presença predominante da fase rutilo (estrutura tetragonal, grupo espacial $\text{P4}_2/\text{mmn}$) e área de superfície específica de 10,9456 m² g⁻¹. O maior valor experimental de atividade de transfrutosilação ($237,07 \pm 18,57 \text{ U g}^{-1}$) foi obtido a 40 °C e pH 6,91, enquanto a análise da superfície de resposta indicou uma atividade máxima de $292,99 \pm 67,95 \text{ U g}^{-1}$ na condição de 55,9 °C e pH 6,57. Observou-se um efeito linear positivo da temperatura e um efeito quadrático negativo do pH, com o biocatalisador mantendo-se estável em ampla faixa de pH (5,5 a 6,9). Conclui-se que o suporte de óxido de titânio, associado à reticulação com glutaraldeído, constitui uma alternativa promissora e estável para a imobilização celular voltada à produção de fruto-oligossacarídeos.

Palavras-chave: fruto-oligossacarídeos; imobilização celular; *Aspergillus oryzae*; reticulação; frutossiltransferase.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are prebiotic sugars produced through the transfructosylation reaction of sucrose catalyzed by the enzyme fructosyltransferase (FTase; EC 2.4.1.9), synthesized by the fungus *Aspergillus oryzae* IPT-301. This study aimed to produce and characterize porous titanium oxide (TiO₂) supports and to evaluate the biochemical properties (pH and temperature) of *A. oryzae* IPT-301 cells immobilized on these supports and cross-linked with glutaraldehyde for FOS synthesis. The supports were fabricated using the replica technique, employing a 40 ppi polyurethane foam impregnated with a titanium slurry (55%), followed by drying and sintering at 1500 °C for 2 h. The starting powder was characterized by X-ray diffraction (XRD) and specific surface area analysis (BET method). The cells were produced and immobilized by submerged cultivation in a synthetic medium (30 °C, 200 rpm, 32 h), followed by cross-linking with 25% glutaraldehyde in Tris-acetate buffer and subsequent reduction with sodium borohydride. The effects of pH and temperature on transfructosylation activity were evaluated using a 2² central composite rotatable design (CCRD), with three center points and four axial points. The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA), response surface methodology, and Pareto charts using Protimiza Experimental Design software (significance level $\alpha = 0.10$). XRD characterization of the support confirmed the predominant presence of the rutile phase (tetragonal structure, space group P4₂/mm), with a specific surface area of 10.9456 m² g⁻¹. The highest experimental transfructosylation activity (237.07 ± 18.57 U g⁻¹) was obtained at 40 °C and pH 6.91, whereas response surface analysis predicted a maximum activity of 292.99 ± 67.95 U g⁻¹ at 55.9 °C and pH 6.57. A positive linear effect of temperature and a negative quadratic effect of pH were observed, while the biocatalyst remained stable over a broad pH range (5.5–6.9). These results indicate that the titanium oxide support, combined with glutaraldehyde cross-linking, represents a promising and stable alternative for cell immobilization aimed at fructooligosaccharide production.

Keywords: fructooligosaccharides; cell immobilization; *Aspergillus oryzae*; cross-linking; fructosyltransferase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da barbotina.	19
Tabela 2 – Composição do meio de cultivo.....	21
Tabela 3 - Valores codificados das variáveis de entrada para o planejamento estatístico.	23
Tabela 4 - Projeto experimental para as influências de duas variáveis independentes (pH e temperatura) na atividade enzimática das células <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em um suporte poroso de óxido de titânio e reticulados com glutaraldeído.	26
Tabela 5 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático com interação para a avaliação dos efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática.	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula química dos FOS: (A) 1-kestose, (B) nistose e (C) 1-frutofuranosilnistose.	14
Figura 2 - Esquematização da reação de transfrutossilacção.	15
Figura 3 - Suportes de óxido de titânio: (A) antes da queima e (B) após o tratamento térmico.	20
Figura 4 - Difractograma de raios X da amostra de óxido de titânio, com os picos indexados à fase rutilo (TiO_2 , estrutura tetragonal, grupo espacial $\text{P4}_2/\text{mmn}$).	25
Figura 5 - Gráfico de Pareto com os efeitos dos parâmetros e suas interações para o planejamento experimental feito para a atividade enzimática da FTase contida na biomassa.	28
Figura 6 - Gráfico de dispersão entre os valores de atividade enzimática observados e preditos pelo modelo completo.	30
Figura 7 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) da reação de atividade enzimática da biomassa.	32

LISTA DE ABREVIações

ABS	Acrilonitrila Estireno Butadieno
A.S.E.	Área de Superfície Específica
B.E.T.	Método desenvolvido pelos pesquisadores Stephen Brunauer, Paul Emmett e Edward Teller para medir a área de superfície específica e a porosidade de materiais
DRX	Difração de Raios X
G	Glicose
GF	Sacarose
GF2	1-kestose
GF3	Nistose
GF4	Frutofuranosil nistose
GRAS	Generally Recognized As Safe
F	Frutose
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FT	Frutose transfrutossilada
FTase	Frutossiltransferase
GOD/PAP®	Kit enzimático glicose-oxidase
IPT	Instituto de Pesquisa e Tecnologia
LBI	Laboratório de Biotecnologia Industrial
PETG	Polietileno Tereftalato Glicol
PLA	Poli-ácido láctico
PU	Poliuretano
TiO ₂	Titânia ou óxido de titânio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	13
3.2 PROCESSOS FERMENTATIVOS	15
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS COM ATIVIDADE CATALÍTICA	16
3.4 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO	17
3.5 RETICULAÇÃO	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE	18
4.2 PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS COM ATIVIDADE CATALÍTICA	21
4.3 RETICULAÇÃO	22
4.4 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE TEMPERATURA E PH	22
4.5 ENSAIOS ANALÍTICOS: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE	24
5.2 ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE TEMPERATURA E PH DE CÉLULAS MICROBIANAS IMOBILIZADAS EM ÓXIDO DE TITÂNIO E RETICULADAS	26
6. CONCLUSÃO	35
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	36
8. REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	43
Anexo A – Certificados de Trabalhos Publicados em Congresso	43
Anexo B – Resumos Publicados/Submetidos em Congresso	44

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a alimentação saudável tem sofrido modificações com o passar do tempo e a saúde tem sido um assunto cada vez mais discutido no século XXI, visto que as pessoas têm buscado uma alimentação melhor para alcançar uma vida mais saudável (Manicardi *et al.*, 2023). Nesse sentido, alguns açúcares têm se destacado no meio alimentar por promoverem benefício à nutrição humana, e, além disso, terem sabor muito semelhante ao da sacarose convencional. Eles são os fruto-oligossacarídeos (FOS), açúcares prebióticos e não cariogênicos (Maiorano *et al.*, 2020; Nobre *et al.*, 2018). Conhecido como FOS, é um composto de origem natural, considerado um açúcar não convencional, visto que não é metabolizado pelo corpo humano e possui baixo valor calórico, sendo encontrado em mais de 36 mil espécies de plantas e em alimentos tais como alcachofra, aspargos, banana, beterraba, cebola e tomate (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022).

Os fruto-oligossacarídeos são oligossacarídeos formados através da estrutura expandida da sacarose, fazendo parte da família dos frutanos, e sua abreviação FOS é usada para associar tais frutanos tipo inulina que podem ou não ter um grupo terminal de glicose (Macedo *et al.*, 2020; Passos & Park, 2003). Ele é sintetizado através da reação de transfrutosilação da sacarose, onde usa-se enzimas microbianas, neste caso, a frutossiltransferase (FTase; EC 2.4.1.9), que age como catalisadora nesse processo, além de muito prezada pela indústria por sua capacidade de gerar compostos prebióticos benéficos à saúde intestinal e ao sistema imunológico. No entanto, obter essa produção de maneira eficiente por meio da FTase ainda esbarra em desafios técnicos, uma vez que, de modo geral, as enzimas em sua forma livre possuem tempo de meia-vida reduzido, o que prejudica a viabilidade industrial do processo (Fanis, 2025).

Frente à crescente busca pelo FOS, há grande procura por microrganismos que produzem enzimas para este fim, destacando-se a cepa do *Aspergillus oryzae* IPT-301, proveniente dos fungos do gênero *Aspergillus sp.* Essa cepa é adequada para a síntese da FTase, obtendo uma enzima com alta capacidade para a transfrutosilação da sacarose (Antosová *et al.*, 2008; Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2021; Nobre *et al.*, 2018).

Para melhorar o desempenho e aumentar a atividade de transfrutosilação, utiliza-se a técnica de imobilização celular, onde as células fúngicas ricas em enzima FTase ficam confinadas e fixas em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso, no qual estarão

protegidas contra condições adversas que possam existir no meio (Canilha *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2021). Outras vantagens são: maior resistência a mudanças no meio reacional, a possibilidade de reutilizar o biocatalisador e maior facilidade de separar o catalisador do produto. Um dos principais e mais importantes parâmetros que influenciam no desempenho dos biocatalisadores é o material do qual o suporte para imobilização é feito (Souza *et al.*, 2017; Cabrera-Orozco *et al.*, 2017).

Segundo Souza *et al.* (2017), os materiais utilizados como suporte para a imobilização celular podem ser classificados de acordo com sua origem, em orgânicos e inorgânicos, e, quanto à sua estrutura, em porosos, não porosos ou com conformação em gel. Além disso, a literatura descreve uma grande diversidade de suportes empregados na imobilização enzimática, variando em composição, estrutura e propriedades físico-químicas. Nesse sentido, o óxido de titânio foi escolhido como suporte devido à sua capacidade de reuso e estabilidade térmica (Santos, 2024).

Dado o contexto, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um biocatalisador heterogêneo utilizando o suporte de óxido de titânio (TiO₂) para imobilizar células com propriedades biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT-301, aplicar a técnica de reticulação, e avaliar as propriedades bioquímicas (pH e temperatura) desse suporte quanto à sua atividade enzimática de FTase.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Obter um biocatalisador baseado a partir da imobilização e reticulação das células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e avaliar suas propriedades bioquímicas para a síntese de FOS.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Produzir suportes cerâmicos porosos de óxido de titânio pela técnica de réplica, utilizando espumas de poliuretano (PU);
- b) Caracterizar os suportes por difração de raios X (DRX), identificando as fases cristalinas presentes;
- c) Produzir e imobilizar células de *A. oryzae* IPT-301 nos suportes por meio de cultivo

- submerso em meio sintético;
- d) Submeter a biomassa imobilizada ao processo de reticulação com glutaraldeído, seguido de redução com borohidreto de sódio;
 - e) Avaliar a influência do pH e da temperatura sobre a atividade de transfrutossilação por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR);
 - f) Determinar as condições de pH e temperatura que maximizam a atividade enzimática e analisar estatisticamente os resultados (ANOVA, superfícies de resposta e Gráfico de Pareto) no *Software Protimiza Experimental Design*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

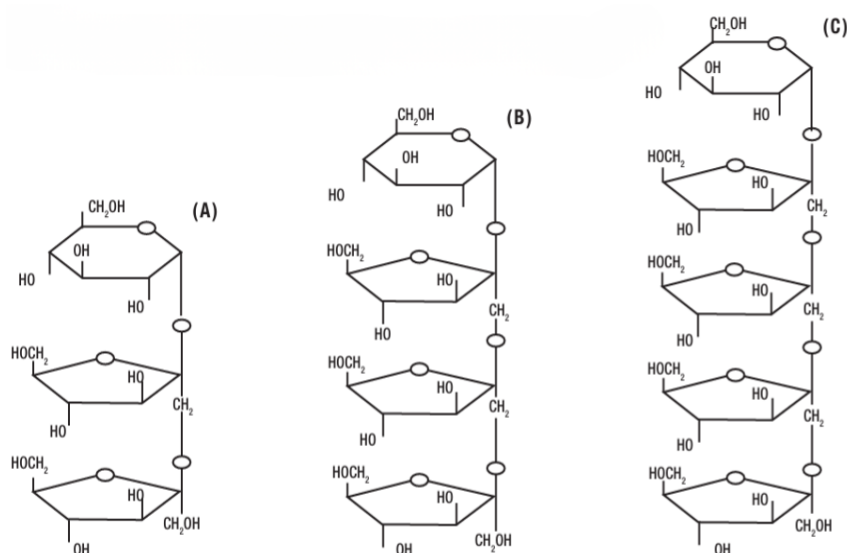
O FOS é comercializado como um açúcar prebiótico que auxilia na saúde intestinal, adicionado ao fato de ele não ser digerido até chegar ao cólon (Huang *et al.*, 2016). Por essa razão ele é conhecido por melhorar a microflora intestinal, pois sua fermentação e de outros prebióticos pelo intestino auxilia no crescimento da comunidade microbiana e melhora a composição lipídica do sangue, promovendo maior absorção de cálcio e magnésio (Mahalak *et al.*, 2023).

Os FOS, quando ingeridos em quantidades adequadas, proporcionam diversos benefícios à saúde. São adoçantes não cariogênicos e de baixo valor calórico (apresentando poder adoçante de 0,4 a 0,6 vez menor que o da sacarose), o que os torna uma possível alternativa a esse açúcar. Além disso, contribuem para a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos, podem auxiliar o organismo no combate a infecções ao diminuírem as citocinas pró-inflamatórias, estimulam o sistema imunológico e promovem a síntese de vitaminas do complexo B (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023; Bhadra *et al.*, 2022). Em razão do tipo de ligações glicosídicas que possuem, esses compostos não são hidrolisados pelas enzimas salivares ou intestinais humanas, sendo metabolizados por bactérias anaeróbias presentes no intestino. Tal característica os torna apropriados para o consumo por pessoas com diabetes (Rahim *et al.*, 2021).

As moléculas de FOS pertencem ao grupo de frutanos, e são oligômeros formados por cadeias curtas de unidades de frutose. Sua estrutura (Figura 1) mais comum é formada por 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄), na qual as unidades de frutossil (F) são ligadas na posição $\beta(2\rightarrow1)$ da sacarose, e isso os distingue de outros oligômeros (Macedo *et al.*, 2020).

Dentre as rotas de síntese do FOS, extração de fontes vegetais, reação de transfrutossilação enzimática da sacarose e hidrólise enzimática da inulina (Roberfroid, 1993), a rota com maior eficiência é a de reação de transfrutossilação da sacarose pelas enzimas FTases (Ftase, E.C. 2.4.1.9), que têm alta atividade de transfrutossilação e baixa atividade hidrolítica (Dias *et al.*, 2022; Singh; Singh, 2010). Nessa reação, essas enzimas são capazes de catalisar a transferência de unidades de frutose para uma molécula de sacarose, formando FOS com moléculas de tamanhos diversos e permitindo uma produção de composição controlada.

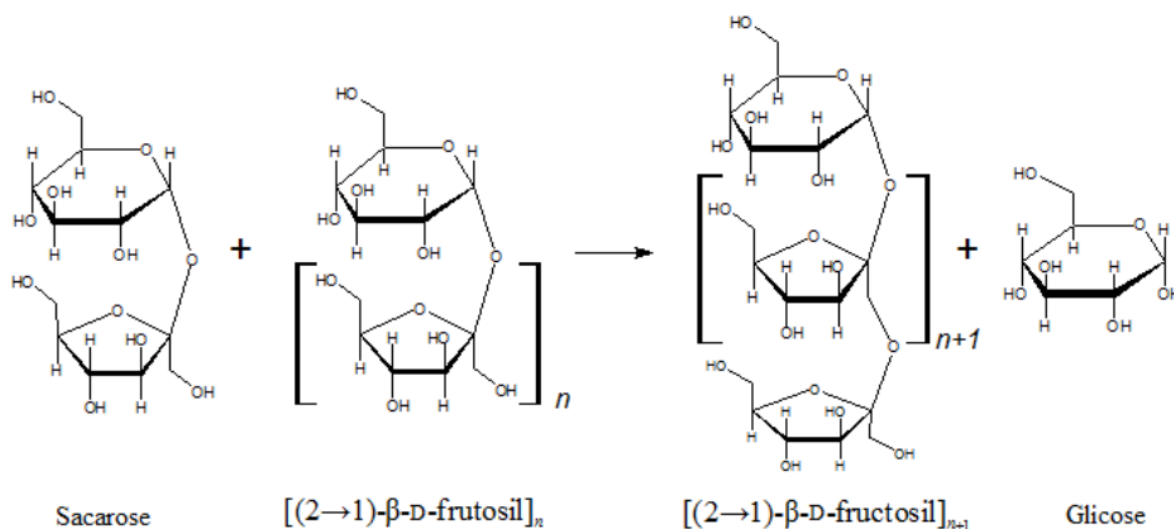
Figura 1 - Fórmula química dos FOS: (A) 1-kestose, (B) nistose e (C) 1-frutofuranosilnistose.



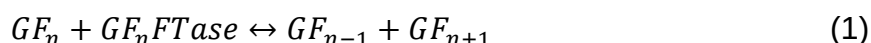
Fonte: Fortes e Muniz (2009).

A reação de transfrutossilação acontece quando a FTase se liga à molécula de sacarose na posição β (2 $\rightarrow$ 1), promovendo sua clivagem e separando o grupo frutossil do grupo glicosil. Posteriormente, o grupo frutossil é transferido para uma molécula aceptora adequada, como a própria sacarose ou outros FOS, resultando na formação de um oligômero de frutose e na liberação de glicose no meio reacional (Rocha *et al.*, 2021), conforme ilustrado na Figura 2 e demonstrado na Equação 1.

Figura 2 - Esquematização da reação de transfrutossilação.



Fonte: Cunha (2017).



Em que G e F representam a glicose e frutose, respectivamente, e quando o índice n tem valor de 1, trata-se da molécula de sacarose (GF).

A eficiência na produção de FOS está diretamente ligada ao microrganismo escolhido para o cultivo, bem como à otimização do meio de cultura e das variáveis operacionais do processo. Nesse contexto, o fungo *Aspergillus oryzae* se destaca por sua elevada capacidade de produzir a enzima frutossiltransferase (FTase). Além disso, por possuir status de GRAS (*Generally Recognized As Safe*), pela Food and Drug Administration (FDA), é amplamente empregado na indústria de alimentos devido à sua baixa toxicidade. Para a cepa *A. oryzae* IPT-301, as condições de cultivo e o meio foram otimizados por Ottoni *et al.* (2012), servindo como base para diversos estudos subsequentes.

3.2 PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos compreendem as formas de cultivo de produção da biomassa fúngica, que nesse caso será usada a fermentação submersa, onde o suporte contendo o inóculo do fungo está submerso em um meio de cultivo, e será submetido a determinada temperatura e rotação ideais durante um período de tempo para o crescimento da biomassa e alcance de atividade de transfrutossilação máxima. É durante a fermentação que a enzima (FTase) será sintetizada, e uma quantidade significativa

dela ficará aderida ao micélio e outra parte será desprendida diretamente no meio de fermentação (Faria *et al.*, 2021).

O fungo que fundamenta a base do estudo é o *Aspergillus oryzae* IPT-301, e é amplamente usado com fins de obtenção de diversas enzimas, como amilases, celulasas, lipases e proteases, e dentre elas, produz a enzima Frutossiltransferase (Maresma *et al.*, 2009). No caso do *A. oryzae* IPT-301, pode-se utilizar as enzimas aderidas ao micélio para reações de transfrutossilação, não tendo a necessidade da enzima ser extraída da célula fúngica (Hernalsteens & Maugeri, 2010; Cuervo-Fernandez *et al.*, 2007).

Obtida a biomassa enzimaticamente ativa, o processo passa à etapa de biocatálise, que engloba os processos e funções enzimáticas dentro do meio reacional e implica o uso de enzimas para acelerar reações com alta seletividade e elevada eficiência catalítica (Fernandes *et al.*, 2023). No caso em questão, a reação a ser catalisada é a transfrutossilação - responsável pela produção do FOS - tendo a FTase, presente na célula microbiana do *Aspergillus oryzae* produzida por fermentação submersa, como agente catalisador (Silva *et al.*, 2021).

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS COM ATIVIDADE CATALÍTICA

Trata-se de uma técnica amplamente utilizada nos ramos de biotecnologia e bioquímica, que consiste na fixação das células em um espaço definido, onde elas ficarão confinadas, e suas atividades catalíticas serão mantidas em processos contínuos ou descontínuos, podendo ser reutilizado (Covizzi *et al.*, 2007).

A imobilização de células fúngicas é importante pois o uso dos microrganismos em sua forma livre apresenta várias implicações, como alto custo para produzir e purificar, baixa estabilidade operacional, e impossibilidade de reutilização (Souza *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2020). Uma maior concentração de células microbianas imobilizadas no suporte favorece a produção de metabólitos, aumenta a eficiência do processo fermentativo e ainda contribui para uma recuperação mais fácil dos produtos de interesse (Covizzi *et al.*, 2007).

A imobilização celular tem diversas vantagens sobre a imobilização enzimática, pois não necessita da extração e purificação da enzima para depois fixá-la em um suporte, diminuindo consideravelmente o custo do processo, além de aumentar a estabilidade da enzima (Aranda, 2024).

O uso das células imobilizadas tem como vantagens a fácil recuperação do produto, ampla escolha de reatores, operação de reator facilitada e a reutilização do biocatalisador, além de possibilitar o maior controle sobre condições operacionais (Bashir *et al.*, 2020). Utiliza-se diversos métodos de imobilização, como o encapsulamento, reticulação e ligação cruzada da enzima com material insolúvel (Santos *et al.*, 2014). Neste trabalho foi utilizada a imobilização celular por confinamento.

3.4 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

A escolha do suporte é de suma importância para que a imobilização seja bem-sucedida e obtenha seu máximo desempenho, devendo ser consideradas as características das células e uso final do biocatalisador. Um suporte adequado deve ter alta permeabilidade, estabilidade química e mecânica, alta área superficial, capacidade de recuperação, baixo custo, podendo ter composição orgânica ou inorgânica (Souza *et al.*, 2017).

Entre os exemplos recentemente experimentados, destacam-se materiais naturais, como a bucha vegetal, e sintéticos, como cerâmicas (como o óxido de alumínio e titânio) e polímeros, como o Poli-ácido láctico (PLA), Acrilonitrila Estireno Butadieno (ABS) e Polietileno Tereftalato Glicol (PETG) (Peixoto Filho, 2025; Fanis, 2025; Barbosa, 2022).

O óxido de titânio é um material inorgânico, podendo apresentar três fases polimórficas: rutilo, anatase e brookita, com estruturas cristalinas tetragonal e ortorrômbica (Santos, 2024). Dentre essas, o rutilo é a forma mais estável e sendo normalmente utilizada em diversas aplicações comerciais, como tintas, cosméticos, indústria de papel e celulose, revestimentos etc.

Os dados experimentais apresentam variação de 350°C a 1175°C para a transformação de fase, segundo o estudo de Saleiro *et al.* (2010), ao passo que Pinheiro (2012) aponta que, de modo geral, admite-se que essa transição ocorra a 850°C. Ainda que existam interpretações divergentes, neste trabalho será adotada uma temperatura de sinterização bastante superior, de 1500°C, o que assegura que a titânia presente nas peças porosas produzidas encontra-se na fase rutilo.

Do ponto de vista tecnológico, o óxido de titânio possui elevada inércia química, garantindo-lhe estabilidade em meios básicos e ácidos, alta refratariedade (temperatura de fusão acima de 1800°C), além de poder ser obtido da natureza por meio da extração

de minerais, o que diminui seu custo de produção (Santos, 2024). Ainda, a obtenção de peças porosas de titânia é favorecida pela possibilidade de se obter barbotinas estáveis a partir do pó cerâmico, as quais podem ser utilizadas na conformação pela técnica de réplica, seguida de secagem e sinterização, permitindo que a produção de suportes com boa resistência mecânica e estabilidade química e térmica.

3.5 RETICULAÇÃO

A imobilização de células por reticulação é uma técnica que consiste na formação de um aglomerado celular, que pode ocorrer naturalmente ou através de agentes químicos, induzindo a formação de ligações cruzadas entre as células (*cross-linking*), formando ligações covalentes entre moléculas de proteínas (Garcia *et al.*, 2021). A reticulação permite a obtenção de células catalíticas com maior resistência e estabilidade frente a agentes desnaturantes, tais como calor e pH extremos (Souza *et al.*, 2017).

Para a reticulação induzida há diversos agentes bifuncionais, conhecidos como agentes reticulantes, sendo o glutaraldeído o que mais se destaca, devido ao seu baixo custo (Mateo *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2012). Esse agente reticulante apresenta ao menos dois grupos reativos, que são capazes de se ligar a regiões específicas de aminoácidos na superfície da enzima, daí vem seu caráter bifuncional. O processo de imobilização covalente de enzimas começa com etapas de ativação, nas quais a superfície do suporte é modificada para gerar intermediários reativos. Nesse contexto, o glutaraldeído é frequentemente empregado como agente ativador, pois apresenta mecanismos mais simples e alta eficiência na obtenção de preparações enzimáticas estáveis (Peixoto Filho, 2025).

Nesse processo, a molécula de glutaraldeído interage tanto com o suporte quanto com a enzima, promovendo sua imobilização covalente ao suporte por meio da reação com os grupos amino (α -NH₂ da extremidade da cadeia, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ originado de amina química), o que resulta na formação das bases de Schiff (Mateo *et al.*, 2007).

Há estudos que sugerem ainda a conveniência de uma etapa complementar após reticulação com glutaraldeído, em que as bases de Schiff, inicialmente reversíveis, são reduzidas, originando ligações mais estáveis com aminas secundárias, enquanto os grupos aldeído remanescentes são transformados em espécies inertes. Essa etapa de redução pode ser realizada com o uso de borohidreto de sódio (NaBH₄) (Migneault *et al.*,

2004; Rueda *et al.*, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE

Os suportes de óxido de titânio a partir do pó (TiO_2 , 99% de pureza, MW: 79,87 g/mol - Sigma-Aldrich®) foram produzidos no Laboratório de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Alfenas (LABMAT), Poços de Caldas/MG. As peças foram confeccionadas pela técnica de réplica, descrita por Faria (2019), sendo produzidas com porosidade de 40 ppi (menor tamanho de poros) e identificadas como peças TI40, tendo como molde esponjas de poliuretano e 40 ppi com 1 cm de aresta. A porosidade final, portanto, foi definida com base na esponja de poliuretano, em decorrência dos resultados promissores obtidos com seu uso como suporte de imobilização celular.

Para a produção das peças, preparou-se também a barbotina à base de óxido de titânio, com concentração de 55% desse composto, complementada pela adição dos aditivos em solução, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Composição da barbotina.

Componentes	Quantidade (%)
Óxido de titânio (TiO_2)	55
Disperlan	2
Água	16
Glicerina	4
Polietilenoglicol	1
Ácido oleico	0,5
Carboximetilcelulose (CMC)	1,5
Poli álcool vinílico (PVA)	20

Fonte: Autora (2025).

Em seguida, a titânia e os aditivos foram homogeneizados por meio de agitação mecânica e manual. Na etapa seguinte, realizou-se a impregnação das esponjas de PU, previamente cortadas, na barbotina. As esponjas foram submersas até que a barbotina aderisse completamente a elas e, então, retiradas uma a uma com o auxílio de uma pinça, sendo passadas duas vezes por uma calandra com abertura de 3 mm antes de serem dispostas sobre uma superfície para secagem.

Após a conformação, as peças a verde foram secas em estufa FANEM e submetidas ao tratamento térmico cujas condições foram: aquecimento a $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 650°C e patamar de 2h, seguido de novo aquecimento a uma taxa de $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 1500°C e 2h de patamar.

A Figura 3A mostra os suportes de óxido de titânio antes da queima, enquanto a Figura 3B mostra as peças de óxido de titânio após o tratamento térmico. É possível observar a mudança de coloração das peças após a queima, o que é característico do processo de queima. Além disso, observa-se por meio do toque manual, o aumento da resistência mecânica das peças (suportes) após a queima.

Figura 3 - Suportes de óxido de titânio: (A) antes da queima e (B) após o tratamento térmico.



Fonte: Santos, 2024.

O pó de titânia foi caracterizado por Difractometria de Raios X (DRX), a fim de verificar a cristalinidade e identificar as fases presentes antes das etapas de mistura, e por determinação da área de superfície específica pelo método de B.E.T. Tal caracterização preliminar mostrou-se fundamental para a preparação e a otimização da barbotina de titânia destinada à conformação das peças cerâmicas porosas.

A caracterização do pó via DRX foi feita através do equipamento *Rigaku Ultima IV* do Laboratório de Cristalografia da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas/MG. Empregou-se um tubo de cobre ($K\alpha = 0,1542 \text{ nm}$), com potencial de aceleração e corrente de 40 kV e 30 mA, respectivamente, em varredura angular contínua entre 15° e 75° e passo de $0,02^{\circ}$. Para fins de análise de resultados, utilizou-se o banco de dados cristalográfico PDF 2003 (*Powder Diffraction File*) da JCPDS-ICDD (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards - International Centre for Diffraction Data*).

A análise pelo método de B.E.T. foi realizada no Laboratório de Materiais da

Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas - MG. A Fisissorção de Nitrogênio (B.E.T), foi feita no equipamento *Micromeritics* ASAP 2020 na temperatura de 77 K. A densidade foi medida através da picnometria a Hélio em ensaios de quintuplicata, através do equipamento *Micromeritics AccuPyc* 1330 com taxa de equilíbrio de gás $5,0 \times 10^{-3}$ psig min⁻¹.

4.2 PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS COM ATIVIDADE CATALÍTICA

Para produzir células que contenham a enzima FTase, utilizou-se a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, que foi fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP) e posteriormente replicada pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática e Bioprocessos (LabTEB).

O cultivo do microrganismo e concomitantemente imobilização de células fúngicas foi realizado no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Bioprocessos (LabTEB). Um meio de cultivo sintético estabelecido com pH 5,5 foi preparado (Garcia *et al.*, 2021; Fernandez *et al.*, 2007). A constituição do meio sintético é trazida na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do meio de cultivo.

Componente	Fabricante	Concentração (% m v⁻¹)
Sacarose	Synth®	15,0
Extrato de levedura	Synth®	0,5
NaNO ₃	Dinâmica®	0,5
KH ₂ PO ₄	Synth®	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Dinâmica®	0,05
MnCl ₂ ·4H ₂ O	Synth®	0,03
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Synth®	0,001

Fonte: Autora (2025).

O meio de cultura foi igualmente distribuído em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio em cada um, juntamente com 3 peças de suportes de óxido de titânio, e autoclavados a 120 °C e 2,022 atm por 20 min. Após isso, inoculou-se 500 µL de suspensão dos esporos do fungo na concentração de 1×10^7 esporos mL em cada frasco, e os Erlenmeyers foram dispostos em uma incubadora (modelo TE-4200 da Tecnal), sendo mantidos a uma temperatura constante de 30 °C, com agitação a

200 rpm, durante um período consecutivo de 32 h. (Cunha, 2017; Faria, 2019; Fernandez *et al.*, 2007; Pereira, 2021). Ao término do cultivo celular, o conteúdo dos Erlenmeyers foi filtrado à vácuo por sucção através de papel filtro qualitativo número 1. As biomassas imobilizadas nos suportes de óxido de titânio empregado foram submetidas ao processo de reticulação para posterior aplicação nas reações enzimáticas subsequentes.

4.3 RETICULAÇÃO

Após o cultivo microbiano foi feita a reticulação, onde as células imobilizadas nos biocatalisadores foram adicionadas a frascos Erlenmeyer contendo 150 mL de um meio composto por 137,4 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ de pH 7,9 e 12,6 mL de solução de glutaraldeído 25 % (v v⁻¹). A reação de reticulação foi realizada em Banho Dubnoff (Lab-Line®, modelo 3540) a 25 °C, 200 rpm por 45 min, e foi interrompida por mais 30 min com a adição de 1,5 mL de solução de borohidreto de sódio 100 g L⁻¹ dissolvido em uma solução de hidróxido de sódio 1.10⁻³ mol L⁻¹. Após o fim da reação, os suportes foram filtrados a vácuo e lavados com água destilada (Garcia *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2021, Ribeiro *et al.*, 2024).

4.4 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS

Para a realização do ensaio, os parâmetros de reação foram otimizados utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² com três pontos centrais e quatro pontos axiais, conforme mostra a Tabela 1. Os níveis das variáveis pH e temperatura foram definidos com base em estudos prévios do grupo de pesquisa que delimitaram tais faixas operacionais, conforme Cunha *et al.* (2019), Faria *et al.* (2021) e Aranda (2024).

O modelo para a superfície de resposta foi ajustado a uma variável resposta, Y, ou seja, a atividade de transfrutossilação. A função resposta, de segunda ordem, para os dois fatores avaliados foram descritas pela Equação (2) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para p-valores ≤ 0,05.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_{12} + \beta_{11} (X_1)^2 + \beta_{22} (X_2)^2 \quad (2)$$

Em que X₁ e X₂ representam pH e temperatura, respectivamente, enquanto β₀, β₁, β₂, β₁₂, β₁₁ e β₂₂ representam os coeficientes estimados pelo modelo estatístico.

Tabela 3 - Valores codificados das variáveis de entrada para o planejamento estatístico.

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH (X ₂)	4,09	4,5	5,5	6,5	6,91
Temperatura (X ₁)	25,9	30	40	50	54,1

Fonte: Autora (2026).

Em seguida foram realizados os ensaios de atividade enzimática em temperaturas e pH's variados conforme a Tabela 3. Os dados foram analisados e representados graficamente utilizando o software *Protimiza Experimental Design*, com um nível de significância de $\alpha = 10 \%$.

4.5 ENSAIOS ANALÍTICOS: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As atividades enzimáticas de transfrutossilação foram determinadas conforme procedimento descrito por Cunha *et al.* (2019), Gonçalves *et al.* (2020) e Garcia *et al.* (2021). Para isso, a biomassa imobilizada no suporte (equivalente a 3 suportes porosos) foi incubada com 3,7 mL de solução de sacarose 48 % (m v⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5.

A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Lab-Line®, modelo 3540) a 50 °C, 190 rpm por 60 min e interrompida pela imersão do meio reacional em água fervente por 10 min, seguido por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para inativação enzimática. Em seguida, o meio reacional foi filtrado à vácuo e a concentração de açúcares redutores (AR) e glicose (G) foram quantificadas. A atividade de transfrutossilação (A_T) foi calculada pela Equação (3).

$$A_T = \frac{F_T V_R}{t_R m_{ms}} \quad (3)$$

Em que F_T é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em µmol L⁻¹), V_R é o volume do meio reacional (em L), t_R o tempo de reação (em min) e m_{ms} a massa seca efetiva de células microbianas imobilizadas nos suportes porosos de óxidos de titânio (em g). Uma unidade (1 U) de atividade de transfrutossilação pode ser definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol (1 µmol) de frutose (F_T) por minuto,

sob condições experimentais estabelecidas.

Para quantificação das concentrações de glicose (G) e de açúcares redutores (AR), serão utilizados os métodos colorimétricos GOD/PAP® (kit enzimático glicoseoxidase) e DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), respectivamente. As concentrações de frutose liberada (F) e frutose transfrutossilada (transferida) (FT) no meio reacional foram determinadas pelas Equações (4) e (5) (Chen, Liu, 1996; Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020; Garcia *et al.* 2021; Dias *et al.*, 2022).

$$[F] = [AR] - [G] \quad (4)$$

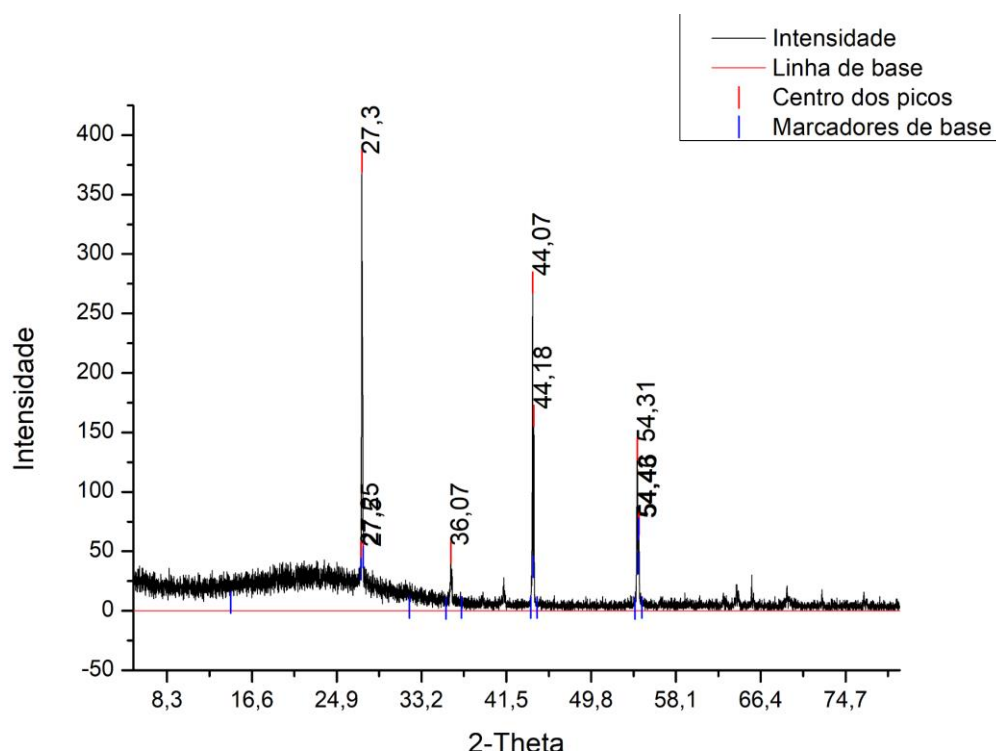
$$[F_T] = [G] - [F] \quad (5)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE

A Figura 4 mostra o resultado obtido para a difração de raios X realizada no pó de titânia. Os picos de difração foram identificados e ajustados no software OriginPro por meio da ferramenta *Peak Analyzer*, com subtração da linha de base e ajuste individual dos picos.

Figura 4 - Difratoograma de raios X da amostra de óxido de titânio, com os picos indexados à fase rutilo (TiO_2 , estrutura tetragonal, grupo espacial $P4_2/mnm$).



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software OriginPro (2026)

A análise por DRX revelou picos de difração bem definidos, com destaque para os picos em 2θ igual a $27,35^\circ$, $44,1^\circ$ e $54,31^\circ$, indexados, respectivamente, aos planos (110), (210) e (211) da fase rutilo da titânia (estrutura tetragonal, grupo espacial $P4_2/mnm$), em concordância com a ficha cristalográfica de referência ICDD PDF nº 21-1276.

A ausência do pico característico do anatásio em $2\theta \approx 25,3^\circ$ indica que, dentro dos limites de detecção da técnica, a amostra é constituída predominantemente pela fase rutilo. Esse resultado é consistente com o tratamento térmico de sinterização da peça cerâmica, uma vez que o anatásio, fase metaestável de baixa temperatura, converte-se irreversivelmente em rutilo — fase termodinamicamente estável — em temperaturas elevadas e consistente também com os dados do fornecedor, que indica que o pó se encontra na fase rutilo. A elevada intensidade e a pequena largura dos picos evidenciam também a elevada cristalinidade do material.

O valor da área de superfície específica (A.S.E.) obtida pela técnica de B.E.T. para o pó de titânia foi de $10,9456 \text{ m}^2/\text{g}$, valor típico de óxidos de titânio comerciais micrométricos usados na área de pigmentos. A análise da A.S.E. é fundamental para a

preparação da barbotina (usada na etapa de réplica); pós nanométricos possuem maior força de atração (Van der Waals), tornando-os mais propensos à formação de aglomerados, exigindo um controle reológico mais complexo e, por conseguinte, um estudo mais detalhado sobre o tipo de defloculante a ser utilizado na produção da barbotina.

5.2 EFEITO DO PH E DA TEMPERATURA DE REAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A Tabela 4 apresenta os valores de atividade de transfrutoseilação obtidos experimentalmente para as diferentes combinações de pH e temperatura definidas pelo delineamento composto central rotacional (DCCR), acompanhados dos respectivos valores preditos pelo modelo estatístico (Equação 6).

Tabela 4 - Projeto experimental para as influências de duas variáveis independentes (pH e temperatura) na atividade enzimática das células *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas em um suporte poroso de óxido de titânio e reticulados com glutaraldeído.

Experimento	pH (X ₂)	Temperatura (°C) (X ₁)	Atividade enzimática (U g ⁻¹)	Atividade enzimática predita (U g ⁻¹)
1	4,5	30	41,862 ± 1,35	91,150
2	6,5	30	25,484 ± 3,94	10,950
3	4,5	50	76,149 ± 5,95	85,030
4	6,5	50	220,109 ± 5,47	165,230
5	4,09	40	117,808 ± 4,91	37,914
6	6,91	40	237,073 ± 18,56	37,914
7	5,5	25,9	39,309 ± 3,04	86,644
8	5,5	54,1	29,691 ± 1,33	191,096
9	5,5	40	111,472 ± 28,47	138,870
10	5,5	40	111,092 ± 21,7	138,870
11	5,5	40	111,282 ± 5,58	138,870

Fonte: Autora (2026).

Observa-se que a resposta enzimática variou de forma expressiva ao longo de todo o domínio experimental, oscilando desde $25,48 \pm 3,94 \text{ U g}^{-1}$, na condição de pH 6,5

e 30 °C, até $237,07 \pm 18,57 \text{ U g}^{-1}$, obtida a pH 6,91 e 40 °C. Essa amplitude, superior a nove vezes entre o menor e o maior valor, evidencia a forte dependência da atividade de transfrutossilação em relação às condições reacionais e reforça a pertinência de um estudo sistemático desses dois fatores, uma vez que pequenas variações de pH e temperatura podem comprometer significativamente o desempenho do biocatalisador.

Os três ensaios realizados no ponto central (pH 5,5 e 40 °C) forneceram valores praticamente coincidentes — $111,472 \pm 28,47$, $111,092 \pm 21,7$ e $111,282 \pm 5,58 \text{ U g}^{-1}$, com reduzida dispersão entre as réplicas. Essa baixa variabilidade traduz-se no valor extremamente pequeno do erro puro registrado na análise de variância (Tabela 5) e atesta a boa reprodutibilidade do procedimento experimental, desde o cultivo e a imobilização das células até a etapa de quantificação da atividade enzimática. A consistência dos pontos centrais é um requisito fundamental da metodologia de superfície de resposta, pois é a partir da estimativa independente do erro puro que se torna possível avaliar, de maneira estatisticamente rigorosa, tanto a significância dos coeficientes do modelo quanto a existência de eventual falta de ajuste.

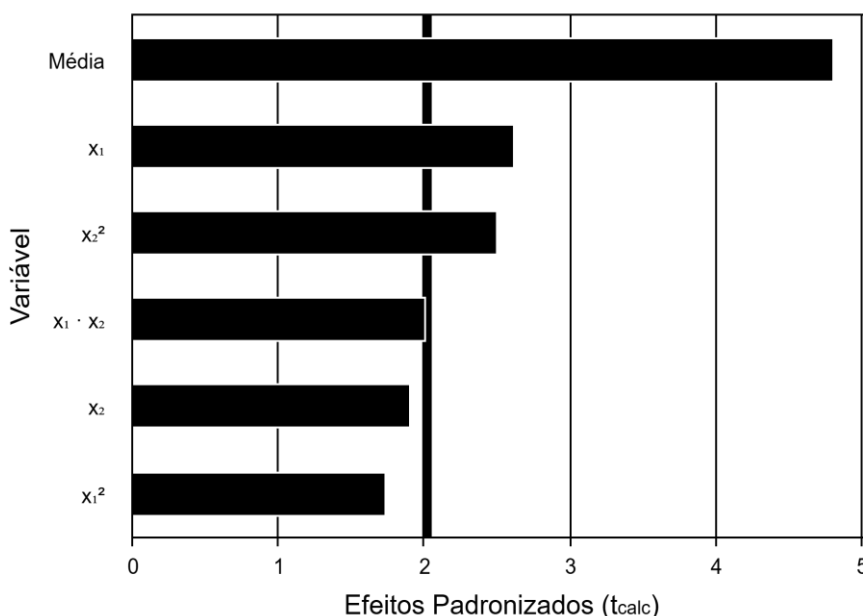
A temperatura e pH ótimos do meio reacional obtidos nesse trabalho estão alinhados com os resultados da literatura desenvolvidos por Aranda (2024), que obtiveram atividade enzimática máxima de $(246,29 \pm 37,23 \text{ U g}^{-1})$ a 50 °C e pH 5,5 ao realizar a imobilização celular em esponja vegetal. Com isso, os resultados indicaram que a imobilização em diferentes suportes (óxido de titânio e esponja vegetal) com reticulação não afetaram o pH e temperatura do meio reacional.

Cabe destacar, inicialmente, que a atividade quantificada neste estudo se refere especificamente à transfrutossilação, calculada a partir da concentração de frutose transfrutossilada (Equações 3 a 5), e não à atividade hidrolítica da enzima. Essa distinção é essencial, pois a FTase de *A. oryzae* IPT-301 catalisa simultaneamente a transferência de unidades frutossil para moléculas aceptoras — reação de interesse para a síntese de FOS — e a hidrólise da sacarose, que libera monossacarídeos sem formação de oligômeros. A predominância de uma ou outra via depende fortemente das condições reacionais, em especial da concentração de substrato: elevadas concentrações de sacarose, como os 48% (m v^{-1}) empregados nos ensaios de atividade, deslocam o equilíbrio no sentido da transfrutossilação, uma vez que a própria sacarose atua comoceptor do grupo frutossil, favorecendo o alongamento das cadeias em detrimento da simples hidrólise (Chen & Liu, 1996; Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022). Assim, as

condições ótimas de pH e temperatura aqui identificadas devem ser interpretadas à luz dessa elevada disponibilidade de substrato, que constitui um dos pilares para maximizar o rendimento em FOS.

O Gráfico de Pareto mostrado na Figura 5 exibe os reflexos dos impactos de AT, apresentado por $p\text{-valor} < \alpha$, e para a sua obtenção, foi usado um coeficiente de significância (α) igual a 10%, obtendo o R^2 igual a 64,11%, indicando a boa representatividade do conjunto de dados experimentais. Analisando o gráfico pode-se observar que as variáveis X_1 , X_2^2 e $X_1 \cdot X_1$ influenciam diretamente na atividade enzimática, e seus efeitos e magnitudes podem ser observados no gráfico.

Figura 5 - Gráfico de Pareto com os efeitos dos parâmetros e suas interações para o planejamento experimental feito para a atividade enzimática da FTase contida na biomassa.



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design® (2026).

Nota: Fatores do planejamento experimental: X_1 – temperatura; X_2 – pH.

No que se refere ao efeito da temperatura, verificou-se uma contribuição linear positiva e estatisticamente significativa sobre a atividade de transfrutossilção, conforme evidenciado pelo gráfico de Pareto (Figura 5) e pelo coeficiente positivo associado ao termo X_1 na Equação 6.

O pH, por sua vez, manifestou-se por meio de um efeito quadrático negativo significativo (termo X_2^2 na Equação 6), o que caracteriza a existência de uma região ótima intermediária, para além da qual a atividade decresce tanto em valores mais ácidos quanto mais alcalinos. Esse padrão é típico de biocatalisadores enzimáticos e decorre

da influência do pH sobre o estado de ionização dos grupos ionizáveis dos resíduos de aminoácidos situados no sítio ativo e em suas imediações.

Alterações no pH modificam a distribuição de cargas dessas cadeias laterais, afetando tanto a ligação do substrato quanto a estabilização do estado de transição da reação. Além disso, valores extremos de pH podem provocar alterações conformacionais e até a desnaturação parcial da enzima, reduzindo a fração de moléculas cataliticamente ativas. O comportamento observado é consistente com o descrito por Silva *et al.* (2021), que avaliaram os efeitos de temperatura, pH e tempo de estocagem sobre a estabilidade da frutossiltransferase extracelular de *A. oryzae* IPT-301, e por Cuervo-Fernandez *et al.* (2007), que relataram a dependência da velocidade enzimática em relação ao pH e à temperatura em microrganismos produtores de β -frutofuranosidase.

Merece destaque a interação significativa entre pH e temperatura (termo X_1X_2), cujo efeito positivo indica que a resposta do biocatalisador a uma dessas variáveis depende do nível em que a outra se encontra. Na prática, isso significa que o benefício proporcionado pelo aumento da temperatura é mais pronunciado em determinadas faixas de pH, e vice-versa, de modo que a condição ótima não pode ser determinada avaliando-se os fatores isoladamente. Esse comportamento é corroborado pelos dados da Tabela 4: enquanto a elevação da temperatura de 30 para 50 °C a pH 4,5 aumentou a atividade de 41,86 para 76,15 U g⁻¹, o mesmo incremento de temperatura a pH 6,5 elevou a atividade de 25,48 para 220,11 U g⁻¹, um ganho muito superior. A presença dessa interação reforça a importância de uma abordagem por planejamento experimental, capaz de capturar efeitos combinados que passariam despercebidos em estudos que variam um fator de cada vez.

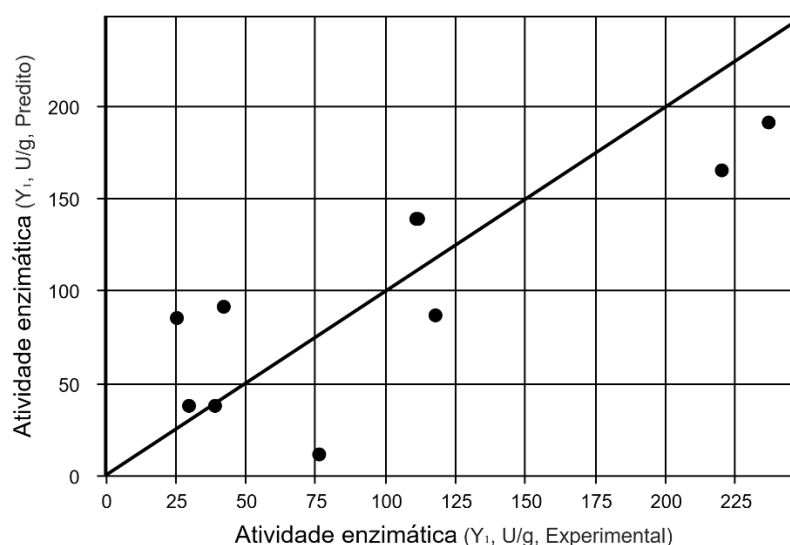
O modelo de superfície de resposta foi ajustado a uma variável de resposta (Y), ou seja, a atividade de transfrutossilação (U g⁻¹). A função de resposta de segunda ordem para dois fatores é dada na Equação (6) na qual permaneceram apenas os termos estatisticamente significativos ao nível de 10%, a saber, o efeito linear da temperatura (X_1), o efeito quadrático do pH (X_2^2) e a interação entre ambos (X_1X_2). Os termos correspondentes ao efeito quadrático da temperatura (X_1^2) e ao efeito linear do pH (X_2) não se mostraram significativos e foram excluídos sequencialmente durante a etapa de reparametrização, procedimento que visa obter um modelo mais parcimonioso e de melhor interpretação física.

$$Y = 138,87 + 37,04 x^1 - 50,78 x_2^2 + 40,10 x_1 x_2 \quad (6)$$

O gráfico de Pareto (Figura 5) sintetiza graficamente a magnitude e a direção desses efeitos, dispondo-os em relação à linha de significância correspondente ao p-valor associado ao nível $\alpha = 10\%$. Para o modelo completo obteve-se coeficiente de determinação de $R^2 = 84,59\%$, ao passo que a etapa associada ao gráfico de Pareto forneceu $R^2 = 64,11\%$, indicando que a parcela dominante da variabilidade dos dados experimentais é explicada pelos fatores considerados, ainda que uma fração relevante permaneça não descrita pelo modelo.

A Figura 6 apresenta o gráfico de dispersão entre os valores observados e preditos pelo modelo completo, no qual os pontos se distribuem próximos à reta de identidade, em concordância com o elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 64,11\%$) e confirmando a boa capacidade preditiva do modelo nesta etapa.

Figura 6 - Gráfico de dispersão entre os valores de atividade enzimática observados e preditos pelo modelo completo.



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design® (2026).

A Figura 6, que confronta os valores de atividade enzimática observados experimentalmente com aqueles preditos pelo modelo, corrobora essa leitura. Os pontos distribuem-se de maneira relativamente próxima à reta de identidade, em consonância com o coeficiente de determinação obtido, mas apresentam dispersão perceptível em algumas condições, coerente com a falta de ajuste detectada na ANOVA. Ainda assim, o modelo mostra-se satisfatório para os fins deste trabalho, que consistiram em mapear

a influência do pH e da temperatura e delimitar a região operacional mais favorável à transfrutossilação, e não em obter uma equação preditiva de precisão absoluta.

A análise de variância (ANOVA) foi apresentada para o modelo quadrático aplicado e o ajuste das respostas experimentais ao modelo estatístico foi avaliado pelo coeficiente de determinação do erro (R^2), conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático com interação para a avaliação dos efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática.

Fonte da Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	33347,8	3	11115,9	4,2	0,05472
Resíduos	18672,4	7	2667,5	-	-
Falta de Ajuste	18672,4	5	3734,5	103448,1	0,00001
Erro Puro	0,1	2	0,0	-	-
Total	52020,3	10	-	-	-

Fonte: Autora (2026).

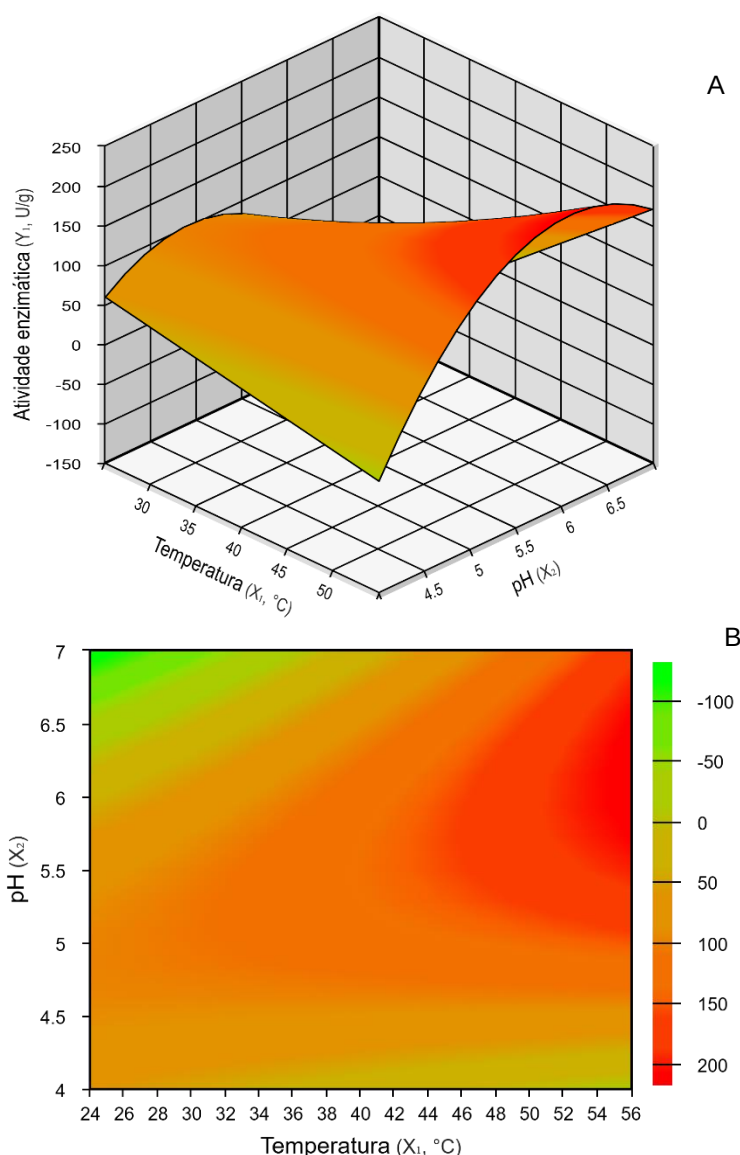
A análise de variância (Tabela 5) complementa a avaliação da qualidade do ajuste. A regressão apresentou valor de F calculado igual a 4,2, com p-valor de 0,055, situando-se no limiar da significância adotada e indicando que o modelo é capaz de descrever a tendência geral da atividade de transfrutossilação em função do pH e da temperatura. Por outro lado, a decomposição da soma dos quadrados dos resíduos revelou uma falta de ajuste estatisticamente significativa, com F calculado elevado e p-valor de 0,00001, decorrente do contraste entre o erro puro extremamente baixo — reflexo da já mencionada reprodutibilidade dos pontos centrais — e a variância associada aos demais ensaios.

Esse resultado deve ser interpretado com cautela: a falta de ajuste não invalida o modelo como ferramenta exploratória para identificar tendências e a região de interesse, mas sinaliza que a superfície de resposta de segunda ordem não reproduz com total fidelidade o comportamento enzimático em toda a extensão do domínio investigado, sobretudo porque a condição ótima se localiza nas bordas do planejamento. A própria elevada sensibilidade da estatística de falta de ajuste ao valor diminuto do erro puro contribui para a magnitude observada, uma vez que qualquer desvio dos pontos fatoriais e axiais em relação ao modelo é amplificado quando confrontado com a variância praticamente nula das réplicas centrais.

Essa redução do R^2 não deve ser interpretada isoladamente como deterioração do modelo, mas ponderada em conjunto com a significância estatística dos coeficientes e com o objetivo do estudo. Para fins de identificação de tendências e da região operacional ótima, um modelo parcimonioso e fisicamente coerente é preferível a um modelo sobreajustado, ainda que este último exiba R^2 nominalmente superior. A persistência de falta de ajuste em ambas as parametrizações, por sua vez, reitera a recomendação de refinar o planejamento experimental em trabalhos futuros.

A Figura 7 mostra um gráfico de superfície por meio do qual pode-se notar o comportamento da atividade enzimática frente às variáveis X_1 e X_2 construídas a partir da Equação (6).

Figura 7 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) da reação de atividade enzimática da biomassa.



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Protimiza Experimental Design® (2026).

A superfície de resposta e as respectivas curvas de contorno (Figura 7) traduzem geometricamente o comportamento descrito pela Equação 6, permitindo visualizar a região que maximiza a atividade de transfrutossilação. A análise das curvas de contorno indica que os maiores valores de atividade se concentram em temperaturas próximas ao limite superior investigado, da ordem de 55 °C, associadas a uma faixa de pH compreendida entre 5,5 e 6,9. Dentro dessa região, o modelo estimou uma atividade de transfrutossilação de $292,99 \pm 67,95 \text{ U g}^{-1}$ para a combinação de 55,9 °C e pH 6,57, valor superior ao maior resultado experimental direto ($237,07 \pm 18,57 \text{ U g}^{-1}$, a pH 6,91 e 40 °C) e que evidencia o potencial do biocatalisador quando operado nas condições mais favoráveis. É importante ressaltar, contudo, que essa condição ótima situa-se na fronteira do domínio experimental, o que confere caráter de extrapolação a parte da predição e reforça a recomendação de ampliar a faixa de temperatura em estudos subsequentes.

Os valores de atividade obtidos neste trabalho são compatíveis com os reportados na literatura para sistemas análogos de produção de FOS a partir de *A. oryzae* IPT-301. Aranda (2024), ao imobilizar células do mesmo microrganismo em esponja vegetal e submetê-las à reticulação, obteve atividade máxima de $246,29 \pm 37,23 \text{ U g}^{-1}$ a 50 °C e pH 5,5, valor da mesma ordem de grandeza do aqui observado. De modo semelhante, Cunha *et al.* (2019) relataram atividades da ordem de 260 U g^{-1} para pH inferior a 6,5 e temperaturas acima de 46 °C, porém empregando células livres, sem imobilização e sem reticulação. A proximidade entre esses resultados e os do presente estudo indica que a imobilização em suporte de óxido de titânio, aliada à reticulação com glutaraldeído, preservou a capacidade catalítica das células, não acarretando perdas expressivas de atividade em relação às configurações previamente descritas — aspecto relevante, dado que a imobilização frequentemente impõe restrições difusionais e limitações de acesso do substrato aos sítios ativos.

Quanto às condições ótimas de pH e temperatura, os resultados alinham-se ao conjunto de trabalhos voltados à síntese enzimática de FOS. Faria *et al.* (2021) observaram atividade máxima a 50 °C e pH 5,5 ao imobilizar a FTase em sílica gel, enquanto Gonçalves *et al.* (2020) e Barbosa (2022) reportaram desempenho semelhante para células reticuladas com glutaraldeído e encapsuladas em gel de alginato de cálcio. A convergência das faixas ótimas de temperatura (em torno de 50 °C) e de pH (de levemente ácido a neutro) entre suportes de naturezas tão distintas — sílica, alginato, esponja vegetal, poliuretano e, neste trabalho, óxido de titânio — sugere que tais

parâmetros são governados majoritariamente pelas propriedades intrínsecas da enzima e das células de *A. oryzae* IPT-301, e não pela matriz de imobilização. Em outras palavras, o suporte influencia primordialmente a estabilidade, a reutilização e a facilidade de manuseio do biocatalisador, ao passo que a resposta ao pH e à temperatura permanece atrelada à bioquímica da própria FTase.

Um resultado particularmente relevante deste estudo diz respeito à ampliação da faixa de pH em que o biocatalisador se mantém estável e ativo, que se estendeu de 5,5 a 6,9. Esse alargamento pode ser atribuído ao processo de reticulação com glutaraldeído, o qual, por meio de sua ação bifuncional, promove a formação de ligações covalentes entre os grupos amino das proteínas das células de *A. oryzae* IPT-301, aumentando o número de interações intercelulares e originando um emaranhado mais denso e coeso em comparação às células imobilizadas sem reticulação (Barbosa *et al.*, 2012; Monsan, 1978; Peixoto Filho, 2025). Essa rede de ligações cruzadas confere rigidez estrutural à enzima, restringindo os movimentos conformacionais que conduzem à sua inativação sob condições adversas e, conseqüentemente, tornando-a mais tolerante a variações de pH. A maior estabilidade em ampla faixa de pH é vantajosa do ponto de vista industrial, pois amplia a flexibilidade operacional do processo e reduz a necessidade de controle rigoroso desse parâmetro ao longo da reação.

Do ponto de vista mecanístico, o efeito estabilizador da reticulação está associado à reação entre os grupos aldeído do glutaraldeído e os grupos amino disponíveis na superfície celular e nas proteínas — o grupo α -amino terminal das cadeias polipeptídicas e, sobretudo, os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina —, com formação das chamadas bases de Schiff (Mateo *et al.*, 2007; Migneault *et al.*, 2004). Essas ligações imina, inicialmente reversíveis, foram estabilizadas neste trabalho pela etapa subsequente de redução com borohidreto de sódio (NaBH_4), que as converte em aminas secundárias, mais estáveis, ao mesmo tempo em que transforma os grupos aldeído residuais em espécies inertes, evitando reações indesejadas e o comprometimento da atividade ao longo do tempo (Rueda *et al.*, 2016). A combinação da reticulação com a etapa de redução, portanto, não apenas fixa mais firmemente a enzima à biomassa e ao suporte, como também contribui para a manutenção da densidade de sítios ativos, reduzindo o arraste e a dessorção da enzima durante a operação — aspecto especialmente crítico em reatores operados em modo contínuo, como o reator de leito empacotado descrito por Dias *et al.* (2022) e Ribeiro *et al.* (2024).

As propriedades do suporte de óxido de titânio também contribuem para o desempenho observado. Conforme discutido na caracterização, o material apresenta-se predominantemente na fase rutilo, termodinamicamente estável, e exibe elevada inércia química, estabilidade térmica e resistência mecânica, características que garantem sua integridade nas condições reacionais e viabilizam o reuso das peças (Santos, 2024). A moderada área de superfície específica determinada pelo método B.E.T. ($10,9456 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e a estrutura macroporosa obtida pela técnica de réplica favorecem a colonização das células fúngicas e o acesso do substrato, ainda que suportes com maior área superficial pudessem, em princípio, comportar maior carga celular. O equilíbrio entre porosidade, resistência mecânica e estabilidade química faz do óxido de titânio uma alternativa competitiva frente a suportes orgânicos, como a esponja vegetal e o poliuretano, que, embora eficientes, apresentam menor durabilidade sob tratamentos sucessivos. A possibilidade de recuperação e reaproveitamento das peças cerâmicas, mesmo após ciclos de queima, representa um diferencial economicamente atrativo para aplicações de maior escala.

Sob a perspectiva de aplicação, os resultados obtidos sustentam a viabilidade do biocatalisador desenvolvido para a produção de FOS. A obtenção de atividades de transfrutossilação da ordem de centenas de unidades por grama, associada à estabilidade em ampla faixa de pH e à robustez térmica do suporte, indica que o sistema é compatível com as condições típicas de operação industrial, nas quais se buscam simultaneamente elevada produtividade, longevidade do biocatalisador e simplicidade de separação entre catalisador e produto. A imobilização em suporte cerâmico rígido facilita o emprego em reatores de leito fixo ou empacotado, configuração amplamente favorecida para processos contínuos por permitir o reuso do biocatalisador e a operação prolongada, e converge com a tendência observada nos trabalhos mais recentes do grupo de pesquisa voltados à intensificação da produção enzimática de fruto-oligossacarídeos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e caracterizar um biocatalisador heterogêneo baseado na imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suportes porosos de óxido de titânio, reticuladas com glutaraldeído, e avaliar suas propriedades bioquímicas frente ao pH e à temperatura, visando à síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos. A produção e a imobilização das células por cultivo submerso em

meio sintético, seguidas da etapa de reticulação e de redução com borohidreto de sódio, mostraram-se eficazes na obtenção de um biocatalisador ativo e estável.

A caracterização do suporte confirmou a adequação do óxido de titânio à finalidade proposta. A difração de raios X evidenciou a presença predominante da fase rutilo (estrutura tetragonal, grupo espacial $P4_2/mnm$), termodinamicamente estável, resultante do tratamento térmico de sinterização a 1500 °C, enquanto a área de superfície específica de 10,9456 m² g⁻¹, determinada pelo método de B.E.T., aliada à estrutura macroporosa obtida pela técnica de réplica, revelou-se compatível com a imobilização celular e o acesso do substrato.

Quanto ao estudo das propriedades bioquímicas, o delineamento composto central rotacional permitiu descrever o comportamento da atividade de transfrutossilação em função do pH e da temperatura. Verificou-se um efeito linear positivo da temperatura, um efeito quadrático negativo do pH e uma interação significativa entre os dois fatores, indicando a existência de uma região ótima intermediária de pH e o aumento da atividade com a temperatura dentro da faixa investigada. O maior valor experimental de atividade de transfrutossilação foi de $237,07 \pm 18,57$ U g⁻¹, obtido a 40 °C e pH 6,91, ao passo que a análise da superfície de resposta indicou uma atividade máxima de $292,99 \pm 67,95$ U g⁻¹ na condição de 55,9 °C e pH 6,57. O modelo quadrático completo apresentou coeficiente de determinação de $R^2 = 84,59\%$, evidenciando boa representatividade dos dados, embora a análise de variância tenha acusado falta de ajuste significativa e o modelo reparametrizado, ainda que fisicamente mais coerente, tenha exibido capacidade preditiva inferior — limitações associadas, sobretudo, ao posicionamento da condição ótima na fronteira do domínio experimental.

Dessa forma, conclui-se que o emprego de suportes porosos de óxido de titânio, aliado à reticulação com glutaraldeído, representa uma estratégia eficaz para a obtenção de biocatalisadores estáveis e reutilizáveis, capaz de ampliar a faixa operacional de pH e de manter elevada atividade de transfrutossilação, contribuindo para o aprimoramento dos processos de produção de fruto-oligossacarídeos. Recomenda-se, para consolidar e aprofundar esses resultados, a ampliação da faixa experimental de temperatura, a adoção de um novo planejamento centrado na região de máxima atividade e o aperfeiçoamento da análise estatística, conforme detalhado nas sugestões para trabalhos futuros.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos e nas limitações identificadas ao longo deste trabalho, sugerem-se os seguintes desdobramentos para estudos futuros:

- a) Avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador ao longo de sucessivos ciclos de reação, preferencialmente em reatores de leito fixo ou empacotado, determinando o número de reusos possíveis sem perda significativa de atividade;
- b) Investigar a estabilidade de armazenamento do biocatalisador imobilizado sob diferentes condições de temperatura e tempo;
- c) Avaliar a capacidade de recuperação e reuso dos suportes de óxido de titânio após tratamentos térmicos sucessivos, quantificando a perda de massa e a integridade mecânica das peças;
- d) Otimizar as condições de reticulação (concentração de glutaraldeído, tempo e temperatura) com o intuito de maximizar a estabilidade do biocatalisador sem comprometer a atividade enzimática;
- e) Quantificar e caracterizar os FOS produzidos (gf_2 , gf_3 e gf_4) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), avaliando o rendimento e a seletividade da reação de transfrutossilação, bem como avaliar aspectos ainda não explorados, como a difusão de substrato e produto no interior do suporte poroso e o desempenho do biocatalisador em reator de leito fixo operado em modo contínuo.

REFERÊNCIAS

- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- ARANDA, I. A. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja vegetal para a síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos**. 93f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2024.
- BARBOSA, N. R. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligossacarídeos**. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2022.
- BARBOSA O, TORRES R., ORTIZ C, FERNANDEZ-LAFUENTE R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochem.** v. 47, p. 1220-1227, 2012.
- BASHIR, N. *et al.* Enzyme immobilization and its applications in food processing: a review. **International Journal Of Chemical Studies**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 254-261, 1 mar. 2020.
- BHADRA, S. *et al.* Microbes in fructooligosaccharides production. **Bioresources Technology**. Rep. 20, 101159, 2022.
- BELMONTE-IZQUIERDO, Y. *et al.* Fructooligosaccharides (FOS) production by microorganisms with fructosyltransferase activity. **Fermentation**. 9, 968, 2023.
- CABRERA-OROZCO, A. *et al.* Biodegradation of a commercial mixture of the herbicides atrazine and Smetolachlor in a multi-channel packed biofilm reactor. **Environmental Science and Pollution Research**, 24, n. 33, p. 25656-25665, 2017.
- CANILHA, L. *et al.* Biotacalisadores imobilizados. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 36, n. 36, p.47-57, 2006.
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 153-160, 1996.
- COVIZZI, L. G. *et al.* Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 143-160, jul./dez. 2007.
- CRUZ, J.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R.; ORTIZ, C. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 7–14, 2012.

CUERVO-FERNANDEZ R. *et al.* (2007). Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 75, p.87-93, 2007.

CUNHA, J. S. *et al.* Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 657–668, 2019.

DIAS, G. S *et al.*, Study on the transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production, **Chem Technology and Biotechnology**, v. 97, p. 2904-2911, 2022.

DIAS, G. S. **Implementação de reator de leito fixo empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para produção de fruto-oligossacarídeos.** 2020. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2020.

FANIS, J. B. **Compósitos cerâmica-polímero obtidos por impressão 3D aplicados na imobilização do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a produção de fruto-oligossacarídeos.** 2025. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2025.

FARIA, F. P. **Obtenção de cerâmicas porosas de óxido de zinco para aplicação em fotocatalise.** 2019. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas – MG, 2019.

FARIA, L. L. *et al.* Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 1, p. 43–59, 2021.

FERNANDES, P. *et al.* Special Issue on “Biocatalysis, Enzyme and Process Engineering”. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 1-4, 2023.

FERNANDEZ, R. C. *et al.* Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms 83 and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 87–93, 2007.

GONÇALVES, M. C. P.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F.; KIECKBUSCH, T. G. Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 95, n. 9, p. 2473-2482, 2020.

GARCIA, R. L. *et al.* Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 2, p. 273–285, 2021.

HERNALSTEENS S., MAUGERI F. (2010). Synthesis of fructooligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula* sp. **J Food Biochem** 34(3):520–534. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00295.x>

HUANG, M. P. *et al.* Highly Efficient Synthesis of Fructooligosaccharides by Extracellular Fructooligosaccharide-Producing Enzymes and Immobilized Cells of *Aspergillus aculeatus* M105 and Purification and Biochemical Characterization of a Fructosyltransferase from the Fungus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 33, p. 6425–6432, 2016.

MACEDO, L. L. *et al.* (2020). Fructooligosaccharides: nutritional, technological and sensory aspects. **Brazilian Journal of Food Technology**, 23, e2019080. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08019>

MAESTRELLI, S. C. *et al.* Estudo de caracterização de argilas não plásticas da região de Poços de Caldas, MG (Study of the characterization of non-plastic clays from Poços de Caldas, MG). Cerâmica. **Anais**, 2013.

MAHALAK K. K. *et al.* (2023). Fructooligosaccharides (FOS) differentially modifies the in vitro gut microbiota in an age-dependent manner. **Front. Nutr.** 9:1058910. doi: 10.3389/fnut.2022.1058910

MAIORANO, A. E. *et al.* Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of 53 *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, 42, n. 12, p. 2619-2629, 2020.

Manicardi, T. *et al.* Xylooligosaccharides: A bibliometric analysis and current advances of this bioactive food chemical as a potential product in biorefineries portfolios. **Foods**, 12, 3007, 2023.

MARESMA, B. G. *et al.* MUTAGENESIS OF *Aspergillus oryzae* IPT-301: to improve the production of β fructofuranosidase. **Brazilian Journal Of Microbiology**, Cuba, p. 186-195, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 3, n. 5, p. 371-384, 1978.

NOBRE, C. *et al.* Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. **Food Science and Technology**, v. 89, p. 58–64, 2018.

OTTONI, C. A.; CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.;

GUILARTEMARESMA, B.; SABINO DA SILVA, E.; RODRIGUES, M. F. A.; MAIORANO, A. E. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, ed. 1, p.49-59, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000100006>.

PASSOS, L. M. L., & PARK, Y. K. Fruto-oligossacarídeos: Implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, p. 385-390, 2003.

PEIXOTO FILHO, L. R. **Imobilização e reticulação de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em bucha vegetal e esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligossacarídeos**. 2025. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2025.

PEREIRA, Richard S. *et al.* Application of an Agro-Waste for the Immobilization of Microbial Fructosyltransferase: a new alternative for fructooligosaccharide production. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], p. 1-13, 2025. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20240172>.

PINHEIRO, R. M. M. **Síntese e propriedades no infravermelho distante de pó de TiO₂ nanoestruturado**. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2012.

RAHIM, M.A. *et al.* Functional and nutraceutical properties of fructo-oligosaccharides derivatives: A review. **International Journal of Food Properties**. 24, 1588–1602, 2021.

RIBEIRO, B. M. *et al.* Cross-linked whole cells for the sucrose transfructosylation reaction in a continuous reactor. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 30, n. 2, p. 99–110, 2024.

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J. A.; GIBSON, G. R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 1, p. 11-19, 1998. <https://doi.org/10.1093/jn/128.1.11>.

ROCHA, R. J. *et al.* Imobilização de frutossiltransferase microbiana em bagaço de cana e sabugo de milho para a produção de fruto-oligossacarídeos. In: Anais do I Web Encontro Nacional de Engenharia Química, 1, 2021, Diamantina (MG). **Anais eletrônicos [...]** Diamantina, 2021, online. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/wendeq2021/345335-imobilizacao-defrutossiltransferase-microbiana-em-bagaco-de-cana-e-sabugo-de-milho-para-a-producao-defruto-oligos>. Acesso em: 09 mai. 2026.

RUEDA, N.; DOS SANTOS, C. S.; RODRIGUEZ, M. D.; ALBUQUERQUE, T. L.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: a mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, 2016.

SALEIRO, G. T. *et al.* Avaliação das fases cristalinas de dióxido de titânio suportado em cerâmica vermelha. **Revista Cerâmica**, Campos dos Goytacazes, n. 56, p. 162-167, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2010.

SANTOS, E. D. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suportes inorgânicos e sua aplicação como biocatalisadores para a produção de fruto-oligossacarídeos.** 2024. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2024.

SANTOS, B. L. *et al.* Diferentes técnicas de imobilização enzimática: para obtenção de catalisadores. **Trends In Bioscience & Biotechnology**, Botucatu, p. 16-21, 2014.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering.** 2. ed. New Jersey: PrenticeHall, Inc., 2002

SILVA, M. B. P. O. *et al.* Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [s.l.], v. 24, p. 1-11, 2021.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 565-572, 2016.

SOUZA, T. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria.** São Paulo, v. 4, p. 529-568, 2017.

ANEXOS

Anexo A – Certificados de Trabalhos Publicados em Congresso



Anexo B – Resumos Publicados/Submetidos em Congresso



STUDY OF THE REGENERATION CAPACITY AND REUSE OF TITANIUM OXIDE WITH IMMOBILIZED *ASPERGILLUS ORYZAE* IPT-301 CELLS FOR THE PRODUCTION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES

Elisa B. Figueiredo^{1*}; Érica D. Santos²; Ana C. Vieira²; Rafael F. Perna²; Sergio A. V. Morales³.

* elisa.figueiredo@sou.unifal-mg.edu.br

¹ Undergraduated Program in Chemical Engennering, Federal University of Alfenas (UNIFAL), Poços de Caldas, Brazil.

² Graduated Program in Chemical Engennering, Federal University of Alfenas (UNIFAL), Poços de Caldas, Brazil.

³ Graduated Program in Food Science and Technology, Federal University of Tocantins (UFT), Palmas, Brazil

ABSTRACT

The fructooligosaccharides (FOS) are sugars with benefits for human health, and their production occurs through the sucrose transfructosylation reaction catalyzed by fructosyltransferase enzymes (FTase, E.C.2.4.1.9). However, the use of enzymes in their soluble form can cause some problems, such as high production and purification costs and the impossibility of reusing them. One way of reducing these problems is to immobilize the cells in porous solid supports. The titanium oxide (TiO₂) is a material that when used in support for enzymatic immobilization offers the possibility of being regenerated and reused, maintaining viability for growth of catalytic biomass. This study proposes the evaluation of the use of regenerated titanium oxide supports for immobilization of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells for the production of fructooligosaccharides. Initially, the support was produced from a barbotine and its conformation into larger (TI30) and smaller (TI40) porosity, followed by heat treatment at 1500 °C. For microbial growth, a culture medium was prepared in which the cells were immobilized on the support and subjected to the ideal conditions for growth. After cultivation, the enzymatic reaction was performed with the biocatalyst produced and then it was taken for drying in an oven at 60 °C for 24 hours. At the end of this process, the support was subjected to a new heat treatment in a muffle furnace at 400 °C for 1 hour. It was noted that there were still remnants of the biomass, so the pieces were again subjected to heat treatment at 550 °C for 1 hour and 30 minutes. The supports were then washed with alcohol and distilled water and dried in an oven for 24 hours at 60°C. The supports were reused in a new culture and another heat treatment, totaling two regenerations. It was observed that after the heat treatment the peaces, they became more fragile and brittle, but when the supports were re-cultured, the TI40 pieces did not fall apart, proving that they were more resistant than the TI30 pieces due to their lower porosity. In the 1st reuse, the concentration of cells obtained was 0.19 g_{cells} g_{support}⁻¹ and the transfructosylation activity was 336.1 U g⁻¹. In the 2nd reuse, the cell concentration was 0.18 g_{cells} g_{support}⁻¹ and the transfructosylation activity was 282.9 U g⁻¹. From the results it can be seen that the transfructosylation activity and cell concentration were close, proving the effectiveness of reusing the support for up to two cultivation cycles.

Keywords: Fructooligosaccharides Production, Support Regeneration, Reuse Process.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support from the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Proc. 421540/2018-4 and Proc. 404912/2021-4), the Foundation for Research of the State of Minas Gerais - FAPEMIG (Proc. APQ-00085-21 and Proc. BPD-00030-22), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The authors are also grateful to the Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG, Brazil) and the Institute for Technological Research (IPT/SP, São Paulo, Brazil).



STUDIES OF THE BIOCHEMICAL PROPERTIES OF MICROBIAL CELLS IMMOBILIZED IN TITANIUM OXIDE AND RETICULATED FOR APPLICATION IN FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES PRODUCTION

EB FIGUEIREDO¹, AF FIGUEIREDO¹, JF FANIS³, SC MAESTRELLI³, RF PERNA², AC VIEIRA²

¹ Federal University of Alfenas, Institute of Science and Technology, Undergraduate Program in Chemical Engineering

² Federal University of Alfenas, Institute of Science and Technology, Graduate Program in Chemical Engineering

³ Federal University of Alfenas, Institute of Science and Technology, Graduate Program in Materials Science and Engineering

*Contact email: ana.vieira@unifal-mg.edu.br

ABSTRACT –The objective of this work was to evaluate the biochemical properties (pH and temperature) of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells immobilized in porous support of titanium oxide and cross-linked with gluteraldehyde. The production and immobilization of microbial cells in the support were carried out in a synthetic culture medium at pH 5.5, 200 rpm, 30 °C and 32 h, followed by cross-linking and enzymatic reaction, which was conducted at temperatures and pH variable according to statistical planning (DCCR). The highest value of enzymatic activity obtained was 292.99 67.95 U g⁻¹ (55.9 °C and pH 6.91), however the planning showed a working range for the biocatalyst in which the pH varied from 5.5 to 6.9, with little oscillation of enzymatic activity. Thus, it is observed that the crosslinking gave a stability to the biocatalyst and could positively impact on FOS productivity.

1 INTRODUCTION

The work of Correa *et al.* (2024) showed that in recent times there has been an increase in society's concern for health, awakening the need for healthier foods in the industry. In this sense, Fructooligosaccharides (FOS) represent an excellent alternative as prebiotic sugars, and, according to Cunha *et al.* (2019); Dias *et al.* (2022), they are sugars composed of fructose oligomers, low in calories and non-cariogenic, their consumption helps prevent diseases and can be consumed by diabetics without concern.

FOS production occurs from the sucrose transfructosylation reaction, catalyzed by the enzymes fructosyltransferases (FTase, E.C.2.4.1.9), that are synthesized by the *Aspergillus oryzae* IPT-301 fungus (Dias *et al.* 2022; Fernandez *et al.* 2007), which has shown being a producer of cells with high transfructosylation activity (A_T). To promote the operational stability of the biocatalyst, we investigate the immobilization of the fungus biomass, which was relevant for FOS production according to studies by Fernandez *et al.* (2007) and Souza *et al.* (2017). In this context, adding the crosslinking process after immobilizing the biomass could