

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

PAULA CANDIDO LEITE

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS EM SUPORTE
TRIDIMENSIONAL (3D) E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NA PRODUÇÃO
ENZIMÁTICA DE AÇÚCARES PREBIÓTICOS**

POÇOS DE CALDAS - MG

2026

PAULA CANDIDO LEITE

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS EM SUPORTE
TRIDIMENSIONAL (3D) E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NA PRODUÇÃO
ENZIMÁTICA DE AÇÚCARES PREBIÓTICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Coorientador: Prof. Dr. Sergio A. V. Morales

POÇOS DE CALDAS - MG

2026

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

Leite, Paula Candido.

Imobilização de células microbianas em suporte tridimensional (3D) e avaliação do desempenho na produção enzimática de açúcares prebióticos / Paula Candido Leite. - Poços de Caldas, MG, 2026.

88 f. : il. -

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. *Aspergillus oryzae*. 2. Imobilização. 3. Manufatura aditiva. 4. Células biocatalíticas. 5. Fruto-oligossacarídeos. I. Perna, Rafael Firmani, orient. II. Título.

PAULA CANDIDO LEITE

IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS EM SUPORTE TRIDIMENSIONAL (3D) E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE AÇÚCARES PREBIÓTICOS

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 13 de março de 2026.

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Gisella Maria Zanin
Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Débora de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 13/03/2026, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1739700** e o código CRC **C3CE9528**.

Dedico este trabalho a todas as mulheres pesquisadoras
que me antecederam, que abriram caminhos na ciência
com coragem, competência e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e à Nossa Senhora, por terem me permitido chegar até aqui e por me conduzirem em todos os desafios enfrentados ao longo desta trajetória. À minha família e aos meus amigos, pelo apoio incondicional em todos os momentos e pelo constante incentivo para que eu alcançasse mais esta conquista.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG, Campus Poços de Caldas), pela oportunidade concedida, pelo acolhimento ao longo dos anos de trajetória acadêmica, bem como pela infraestrutura física e tecnológica disponibilizada ao longo deste e de outros trabalhos desenvolvidos.

Ao meu orientador e pai acadêmico, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pela confiança depositada, pela orientação dedicada durante grande parte da minha formação, pelos inúmeros momentos de incentivo ao longo do Mestrado Acadêmico, pela disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos. Agradeço, ainda, por ser exemplo de profissional e pesquisador, e por ter se tornado também um amigo e parceiro de trabalho.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Tecnologia Enzimática e Bioprocessos da UNIFAL-MG, especialmente às alunas de iniciação científica, pelo suporte prestado nos ensaios experimentais durante este período.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Proc. 404912/2021-4; Proc. 305029/2024-0; Proc. 403007/2025-9) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – Proc. APQ-00085-21; Proc. BPD-00030-22; Proc. APQ-00793-24) pelos recursos financeiros concedidos para a realização desta pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de estudos (Proc. 88887.990053/2024-00).

Por fim, e de forma especial, agradeço a mim mesma, pela resiliência e perseverança ao longo de toda a trajetória acadêmica, superando desafios e concluindo mais esta etapa com excelência.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001 e Processo nº 88887.990053/2024-00), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processos nº 404912/2021-4, nº 305029/2024-0 e nº 403007/2025-9) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Processo nº APQ-00085-21, nº BPD-00030-22 e nº APQ-00793-24).

“Nunca se intimide por não saber algo. Essa é exatamente a razão para investigar.”

Autor desconhecido

RESUMO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose produzidos pela transfrutossilacção da sacarose, catalisada por frutossiltransferases (FTase, E.C. 2.4.1.9). O uso de células com atividade de transfrutossilacção (A_T) imobilizadas em suportes porosos é uma estratégia promissora, pois aumenta a estabilidade do biocatalisador e elimina etapas de purificação enzimática. A escolha do suporte é determinante, pois influencia o microambiente enzimático e a eficiência de imobilização, destacando-se os suportes poliméricos obtidos por impressão 3D. Assim, este trabalho teve como objetivo imobilizar células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suportes de poliácido láctico (PLA) produzidos por impressão 3D e avaliar seu desempenho na produção de FOS em sistemas em batelada e contínuo. A produção das células microbianas imobilizadas foi conduzida em meio de cultura complexo, em pH 5,5, sob agitação de 200 rpm a 30 °C. A curva de crescimento microbiano indicou que o melhor tempo de cultivo foi de 40 h. As células biocatalíticas imobilizadas apresentaram retenção de 76,5 % da atividade inicial após 29 ciclos consecutivos de reação (1 h cada) em reator batelada, além de conversão e rendimento médios iguais a 37,78 % e 32,64 %, respectivamente, além de produtividade média global de FOS de $61,06 \pm 6,11 \text{ g}_{\text{FOS}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A estabilidade de armazenamento evidenciou retenção de A_T por até 300 dias, tanto na ausência quanto na presença de solução tampão. Os ensaios de atividade também foram realizados em reator de leito fixo (PBR) operando a 50 °C e alimentado com solução de sacarose (480 g L^{-1} , pH 5,5), avaliando-se vazões de 1, 4, 6 e 8 mL min^{-1} . Os maiores valores de A_T (variando entre $327,37 \pm 32,34 \text{ U g}^{-1}$ e $443,37 \pm 75,19 \text{ U g}^{-1}$) foram obtidos para vazões de 8 mL min^{-1} . Nos estudos de desativação térmica em reator PBR, observou-se redução da A_T em temperaturas acima de 30 °C, embora os biocatalisadores tenham apresentado elevada termoestabilidade e manutenção da A_T ao longo das 96 h de operação, indicando também alta estabilidade operacional. A 50 °C, o biocatalisador apresentou conversão média de 13,35 %, rendimento médio de 53,81 % e produtividade média global de FOS igual a $142,25 \pm 8,95 \text{ g}_{\text{FOS}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Os resultados obtidos indicam o potencial das células biocatalíticas imobilizadas para a produção de FOS com propriedades prebióticas, demonstrando a viabilidade do uso de suportes poliméricos tridimensionais (3D) em processos biotecnológicos sustentáveis e de alto desempenho biocatalítico.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*; Imobilização; Manufatura aditiva; Células biocatalíticas; Fruto-oligossacarídeos.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are fructose oligomers produced by the transfructosylation of sucrose, catalyzed by fructosyltransferases (FTase, E.C. 2.4.1.9). The use of cells with transfructosylation activity (A_T) immobilized on porous supports is a promising strategy, as it increases the stability of the biocatalyst and eliminates enzymatic purification steps. The choice of support is crucial, as it influences the enzymatic microenvironment and the immobilization efficiency, with polymeric support obtained by 3D printing standing out in this context. Thus, this work aimed to immobilize biocatalytic cells of *Aspergillus oryzae* IPT-301 on polylactic acid (PLA) support produced by 3D printing and to evaluate their performance in FOS production in batch and continuous systems. The production of immobilized microbial cells was carried out in a complex culture medium at pH 5.5, under agitation at 200 rpm and 30 °C. The microbial growth curve indicated that the optimal cultivation time was 40 h. The immobilized biocatalytic cells retained 76.5 % of their initial activity after 29 consecutive reaction cycles (1 h each) in a batch reactor, in addition to presenting average conversion and yield values of 37.78 % and 32.64 %, respectively, and an overall average FOS productivity of $61.06 \pm 6.11 \text{ g}_{\text{FOS}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Storage stability demonstrated retention of A_T for up to 300 days, both in the absence and presence of buffer solution. Activity assays were also performed in a packed-bed reactor (PBR) operating at 50 °C and fed with a sucrose solution (480 g L^{-1} , pH 5.5), evaluating flow rates of 1, 4, 6, and 8 mL min^{-1} . The highest A_T values (ranging from $327.37 \pm 32.34 \text{ U g}^{-1}$ to $443.37 \pm 75.19 \text{ U g}^{-1}$) were obtained at a flow rate of 8 mL min^{-1} . In the thermal deactivation studies conducted in the PBR, a reduction in A_T was observed at temperatures above 30 °C, although the biocatalysts exhibited high thermostability and maintained A_T throughout 96 h of operation, also indicating high operational stability. At 50 °C, the biocatalyst showed an average conversion of 13.35 %, an average yield of 53.81 %, and an overall average FOS productivity of $142.25 \pm 8.95 \text{ g}_{\text{FOS}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. The obtained results indicate the potential of immobilized biocatalytic cells to produce FOS with prebiotic properties, demonstrating the feasibility of using three-dimensional (3D) polymeric supports in sustainable biotechnological processes with high biocatalytic performance.

Key-words: *Aspergillus oryzae*; Immobilization; Additive manufacturing; Biocatalytic cells; Fructooligosaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural dos fruto-oligossacarídeos: (A) 1-kestose, (B) nistose e (C) 1-frutofuranosilnistose.....	21
Figura 2 - Esquema de reação de transfrutossilacção	24
Figura 3 - Suportes de PLA para a imobilização de células biocatalíticas fabricados por impressão 3D pela tecnologia Fused Deposition Modeling.....	34
Figura 4 - Etapas do cultivo celular.....	35
Figura 5 - (A) Suporte de PLA antes do cultivo celular; (B) Células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte 3D após o cultivo microbiano (30 °C, 200 rpm e 40 h); (C) Massa celular imobilizada após 24 h de secagem	36
Figura 6 - Etapas do ensaio de estabilidade operacional em batelada	38
Figura 7 - Biocatalisadores armazenados na presença e ausência de tampão	39
Figura 8 - (A) Aparato experimental em duplicata; (B) Reator de leito fixo (PBR)	40
Figura 9 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura	48
Figura 10 - Atividade de transfrutossilacção (barras cinzas) e concentração de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 (■) imobilizadas em suportes 3D de PLA.....	49
Figura 11 – Crescimento e imobilização das células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 nos suportes 3D de PLA em intervalos de tempo pré-definidos.	50
Figura 12 - Monitoramento do pH do meio de cultura de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301, imobilizadas em suportes 3D de PLA, em função do tempo de cultivo	53
Figura 13 – (A) Avaliação da estabilidade operacional de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suportes 3D de PLA durante ciclos reacionais consecutivos em modo batelada (barras cinzas) e concentração de fruto-oligossacarídeos (●) (B) Parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade) para o ensaio de estabilidade operacional, ao longo de 29 ciclos consecutivos.....	54
Figura 14 – Biocatalisadores heterogêneos obtidos após 29 ciclos reacionais	57
Figura 15 - Estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suportes de PLA. Biocatalisador heterogêneo armazenado em solução tampão (barras em cinza escuro), na ausência de solução tampão (barras em cinza claro) e monitoramento do controle (solução tampão, ●)	58

Figura 16 - Atividade de transfrutossilacão em função da vazão volumétrica de alimentação do substrato no reator PBR. Vazões volumétricas avaliadas: 1 mL min ⁻¹ (■), 4 mL min ⁻¹ (●), 6 mL min ⁻¹ (▲), 8 mL min ⁻¹ (▼).....	60
Figura 17 - Perfis de atividade de transfrutossilacão em função do tempo em diferentes temperaturas para a avaliação da estabilidade operacional dos biocatalisadores heterogêneos	63
Figura 18 - Parâmetros de desempenho (conversão, rendimento, produtividade volumétrica e produtividade específica) obtidos nos ensaios de estabilidade operacional em sistema contínuo ao decorrer de 96 h de processo em reator PBR	66
Figura 19 - Perfis de atividade de transfrutossilacão em função do tempo de reação em diferentes temperaturas para a avaliação da desativação térmica das células biocatalíticas de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte 3D de PLA (A) 40 °C.; (B) 50 °C; (C) 60 °C. (–) Modelo de Sadana e Henley.....	68
Figura 20 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores.	86
Figura 21 - Linearização da Equação de <i>Arrhenius</i> [$\ln(k_D)$ versus (T^{-1})] para estimativa da energia de desativação térmica (E_D) das células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em suporte tridimensional (3D) de PLA.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definição de atividade de transfrutoseilação por diferentes autores	25
Tabela 2 - Aplicações de células imobilizadas e seus respectivos autores	26
Tabela 3 - Aplicações de impressão 3D e polímeros para imobilização celular/enzimática e seus respectivos autores	27
Tabela 4 - Avaliação da produtividade de FOS em função da vazão volumétrica de alimentação no reator PBR.....	62
Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos de desativação para ensaios realizados em PBR com células de <i>A. oryzae</i> IPT-301 imobilizadas em PLA.....	69
Tabela 6 - Dados de concentração e absorvância para construção da curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico).....	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	20
3.2	CÉLULAS BIOCATALÍTICAS COM ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO	22
3.2.1	Atividade de Transfrutossilação	24
3.3	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS	25
3.4	MANUFATURA ADITIVA E POLIÁCIDO LÁTICO NA IMOBILIZAÇÃO CELULAR	27
3.5	REATORES ENZIMÁTICOS PARA A PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS ...	28
3.6	ESTABILIDADE TÉRMICA E OPERACIONAL PARA SISTEMAS REACIONAIS CONTÍNUOS E EM BATELADA.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO	33
4.1.1	Obtenção dos materiais de suporte por manufatura aditiva	33
4.1.2	Microrganismo, preparo do inóculo e condições de cultivo	34
4.1.3	Formulação do meio de cultura	35
4.1.4	Construção da curva de crescimento microbiano	35
4.1.5	Caracterização morfológica do material de suporte e das células biocatalíticas imobilizadas	36
4.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO EM MODO BATELADA.....	37
4.2.1	Ensaio de estabilidade operacional	37
4.2.2	Ensaio de estabilidade de armazenamento	38
4.3	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO EM MODO CONTÍNUO	39
4.3.1	Especificação do reator PBR e montagem do aparato experimental	39
4.3.2	Influência da vazão volumétrica no perfil de atividade enzimática e nos parâmetros de desempenho do reator	41

4.3.3	Avaliação da estabilidade operacional e obtenção dos parâmetros de desempenho	42
4.3.4	Avaliação da estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desativação	42
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	44
4.4.1	Determinação da atividade enzimática em modo batelada	44
4.4.2	Determinação da concentração de açúcares redutores	45
4.4.3	Determinação da concentração de glicose	45
4.4.4	Determinação da concentração de sacarose e de fruto-oligossacarídeos	46
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO	47
5.1.1	Microscopia eletrônica de varredura	47
5.2	CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO	48
5.3	ESTABILIDADE OPERACIONAL EM MODO BATELADA E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO	53
5.4	ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DOS BIOCATALISADORES	57
5.5	INFLUÊNCIA DA VAZÃO VOLUMÉTRICA DE ALIMENTAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	59
5.6	AValiação da estabilidade operacional em modo de operação contínuo e determinação dos parâmetros de desempenho	63
5.7	AValiação da termoestabilidade do biocatalisador em sistema reacional contínuo e obtenção dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desativação	67
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
7	CONCLUSÕES	73
8	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	86

APÊNDICE B – LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE ARRHENIUS	87
APÊNDICE C – TRABALHOS COMPLETOS E RESUMOS SUBMETIDOS EM EVENTO CIENTÍFICO NACIONAL E INTERNACIONAL	88

1 INTRODUÇÃO

As mudanças nos hábitos alimentares e, conseqüentemente, o crescimento da demanda mundial por alimentos funcionais têm se intensificado nos últimos anos, impulsionando o interesse no desenvolvimento de produtos com composição nutricional aprimorada (DIAS *et al.*, 2025; CORREA *et al.*, 2024). Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são açúcares que atualmente dominam a categoria de prebióticos, mostrando maior relevância industrial, reconhecidos por seus efeitos como alimentos funcionais (BIS-SOUZA *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2022). Os FOS são oligômeros de frutose constituídos, principalmente, por kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose, e têm se destacado como um ingrediente alimentar promissor devido às suas características funcionais (CORREA *et al.*, 2024). Esses açúcares, de baixa caloria, são classificados como prebióticos, não são cariogênicos, podem ser consumidos seguramente por diabéticos, aumentam a absorção de cálcio e magnésio pelo organismo humano e, por não serem hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, promovem a seletividade bacteriana na microbiota intestinal, auxiliando na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon (DIAS *et al.*, 2025; CORREA *et al.*, 2024; MAIORANO *et al.*, 2020; CUNHA *et al.*, 2019). Os FOS também auxiliam na redução dos níveis séricos totais de colesterol e no tratamento de doenças como a anemia, hipertensão arterial e insuficiência renal (JITONNOM *et al.*, 2018). Além disso, estudos têm demonstrado que os FOS promovem uma redução expressiva nos escores de ansiedade, além de aumentarem a proliferação de bifidobactérias intestinais em pacientes com síndrome do intestino irritável (AZPIROZ *et al.*, 2017). Naturalmente, os FOS estão presentes em alimentos ricos em carboidratos de reserva, como cebola, alho, chicória, alcachofra, entre outros (SILVA *et al.*, 2023, CUNHA *et al.*, 2019). Além de sua ocorrência natural, os FOS podem ser obtidos por meio da reação de transfrutossilacção da sacarose, catalisada por enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) (DIAS *et al.*, 2025; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; MAIORANO *et al.*, 2008). A produção dessas enzimas está predominantemente associada a fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, podendo ser secretadas para o meio de cultura (FTase extracelular ou solúvel) e/ou permanecerem aderidas na parede celular do microrganismo (FTase micelial) (BELMONTE IZQUIERDO *et al.*, 2023; DIAS *et al.*, 2025; CASTRO *et al.*, 2017; ANTOSOVÁ *et al.*, 2008). Especificamente, o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, conhecido por sintetizar FTases com elevada atividade de transfrutossilacção, destaca-se como um promissor microrganismo produtor dessas enzimas (CUERVO-FERNÁNDEZ *et*

al., 2007; CUNHA *et al.*, 2019; MAIORANO *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020; GARCIA *et al.* 2021; DIAS *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.* 2024; PEREIRA *et al.*, 2025).

O mercado de FOS tem apresentado um crescimento acelerado, com projeções indicando que o seu valor deve alcançar US\$ 5,22 bilhões até 2028, em comparação aos US\$ 2,37 bilhões registrados em 2020 (BAHDRA *et al.*, 2022). Esse avanço é impulsionado pela crescente demanda por adoçantes naturais e fibras alimentares, motivada por fatores como o aumento do interesse dos consumidores por ingredientes prebióticos, sua aplicação em fórmulas infantis e alimentos funcionais, além dos benefícios associados à saúde digestiva (DIAS *et al.*, 2025). As propriedades funcionais dos FOS têm sido altamente valorizadas pela indústria alimentícia e farmacêutica (BELMONTE-IZQUIERDO *et al.*, 2023). No entanto, a síntese desses açúcares por meio da FTase extracelular enfrenta desafios operacionais e econômicos, especialmente devido aos altos custos associados à síntese e purificação da enzima, à instabilidade da sua estrutura tridimensional quando isolada do seu ambiente natural, além da possível perda de atividade devido às condições do processo ou inibição provocada pelo substrato e/ou produto de reação, dificultando a viabilidade econômica do processo enzimático (KRAJEWSKA, 2004; SOUZA *et al.*, 2017). Portanto, a aplicação de células biocatalíticas imobilizadas pode se tornar uma alternativa promissora frente aos desafios levantados (NOBRE *et al.*, 2022). A imobilização consiste em aderir, física ou quimicamente, as células microbianas a um suporte sólido insolúvel, inerte e poroso, obtendo-se um biocatalisador heterogêneo com elevada atividade, especificidade, seletividade e estabilidade (DWEVEDI, 2016). Neste sentido, a imobilização tem sido considerada uma técnica muito promissora para aplicação em processos fermentativos (MUSSATTO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2017).

A aplicação da biomassa catalítica imobilizada permite obter biocatalisadores heterogêneos mais robustos e resistentes às mudanças do ambiente reacional (aumento da estabilidade enzimática), reutilizáveis e fáceis de serem separados do produto, além da possibilidade de implementar e conduzir processos nos modos contínuo e batelada (LAPPONI *et al.*, 2022; BRITTON *et al.*, 2018). Ressalta-se ainda que, a imobilização de células biocatalíticas é considerada mais vantajosa quando comparada à de enzimas, visto que a aplicação industrial de enzimas imobilizadas tem sido limitada devido a fatores como por exemplo baixo rendimento e etapas com custo elevado para extração e/ou purificação prévia da proteína (MALIK & GHOSH, 2012). Inclusive, a imobilização de células por encapsulação e reticulação tem possibilitado a preparação de biocatalisadores mais estáveis, com potencial aplicação em reatores de leito fixo (PBR) para a produção de FOS (RIBEIRO *et al.*, 2024; DIAS

et al., 2022; LORENZONI *et al.*, 2015; ZAMBELLI *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2020). O reator PBR preserva as características estruturais da biomassa catalítica imobilizada devido ao baixo efeito das forças de cisalhamento sobre as células microbianas, possibilitando tempos longos de operação e o bom controle dos parâmetros reacionais para a maximização da eficiência e do rendimento e produtividade do produto desejado (CAICEDO-PAZ *et al.*, 2024; ZHANG *et al.*, 2022; REMONATTO *et al.*, 2022).

O material de suporte para a imobilização celular é um dos principais parâmetros que afetam o desempenho do biocatalisador (MUSSATTO *et al.* 2009; CABRERA-OROZCO *et al.*, 2017). Dentre os diversos suportes reportados na literatura, as matrizes poliméricas, fabricadas a partir da impressão tridimensional (3D), têm sido identificadas como estruturas promissoras quando utilizadas nos processos de imobilização de células (REMONATTO *et al.*, 2023). Essa tecnologia possibilita a fabricação de suportes de imobilização customizados e com alta precisão, tornando-a rápida e eficiente para testar e otimizar diferentes geometrias, tamanho, volume e distribuição de poros no material obtido com morfologia e textura específicas (NGO *et al.*, 2018; RINALDI *et al.*, 2021). A impressão 3D possibilita produzir estruturas geométricas altamente complexas e personalizadas, com elevada porosidade, interconectividade de poros e baixa reatividade. Esses suportes customizados, projetados com precisão para maximizar a eficiência do sistema biocatalítico, representam uma inovação significativa para a indústria, permitindo o desenvolvimento de processos mais eficientes e sustentáveis, além de apresentar fácil escalabilidade de produção (NGO *et al.*, 2018; POSE-BOIRAZIAN *et al.*, 2022; REMONATTO *et al.*, 2023; FANIS, 2025).

Nesse projeto de pesquisa, a impressão 3D foi utilizada de forma inédita para a produção de suportes destinados à imobilização celular, destacando-se por possibilitar a fabricação de suportes com morfologia e texturas específicas que favorecem o crescimento e imobilização das células microbianas com atividade biocatalítica, a otimização da dinâmica de escoamento e a transferência de massa durante a reação enzimática. Os suportes foram fabricados a partir de poliácido láctico (PLA), um polímero amplamente utilizado para a fabricação de estruturas por impressão 3D devido à sua flexibilidade e resistências química, térmica e mecânica. Além disso, o PLA é reciclável, sustentável e de baixo custo, contribuindo para a redução dos custos de produção dos suportes de imobilização e para a diminuição da geração de resíduos (RINALDI *et al.*, 2021; REMONATTO *et al.*, 2023).

A relevância deste projeto extrapola o avanço tecnológico proposto, estando alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU). Ao integrar a imobilização celular em suportes de PLA fabricados por

impressão 3D para a produção de FOS, o estudo dialoga diretamente com o ODS 9 – Indústria, Inovação e Infraestrutura, ao propor uma tecnologia inovadora voltada ao fortalecimento de bioprocessos industriais mais eficientes e sustentáveis. Paralelamente, a utilização de um material biodegradável, associada à simplificação das etapas do processo produtivo, estabelece conexão com o ODS 12 – Consumo e Produção Responsáveis, ao incentivar práticas que reduzem o impacto ambiental e promovem o uso racional de recursos. Ademais, considerando as propriedades prebióticas dos FOS e sua aplicação em alimentos funcionais, o projeto também se vincula ao ODS 3 – Saúde e Bem-Estar, ao contribuir para a promoção da saúde humana e da qualidade de vida da população (Organização das Nações Unidas, 2025).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT-301, durante o cultivo celular submerso, em suportes macroporosos de poliácido láctico (PLA) fabricados por impressão 3D, e avaliar o seu desempenho em reatores batelada e de leito fixo visando obter biocatalisadores heterogêneos robustos, ativos e estáveis para a produção de fruto-oligossacarídeos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de imobilização das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 em estruturas poliméricas macroporosas, fabricadas por impressão 3D a partir de filamentos de poliácido láctico (PLA);
- Determinar a capacidade de crescimento e imobilização das células biocatalíticas no material de suporte em função do tempo de cultivo em meio de cultura complexo mediante a obtenção da curva de crescimento microbiano;
- Realizar a caracterização física do suporte 3D, na presença e ausência das células biocatalíticas imobilizadas, por microscopia eletrônica de varredura, a fim de comprovar seu potencial como material macroporoso estruturado para imobilização;
- Monitorar o desempenho dos biocatalisadores heterogêneos em ciclos bateladas consecutivas para avaliação da sua estabilidade operacional (capacidade de reuso) durante a produção de FOS;
- Avaliar a eficiência catalítica dos biocatalisadores heterogêneos quando armazenados na ausência e presença de solução tampão por longos períodos e sob refrigeração;

- Avaliar a influência da vazão volumétrica de alimentação de substrato nos perfis de atividade enzimática e nos parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividades volumétrica e específica) no reator de leito fixo (PBR);
- Avaliar as estabilidades térmica e operacional do sistema reacional contínuo por meio do monitoramento dos perfis de atividade enzimática e obtenção dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desativação térmica, além dos parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade) para o reator PBR.

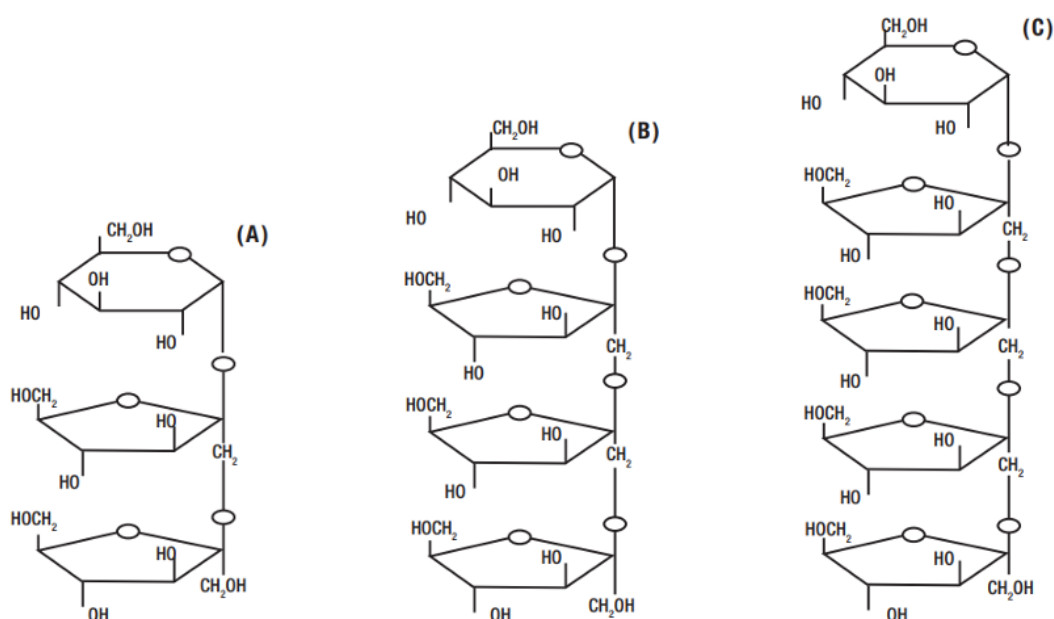
3 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo, apresenta-se uma revisão da literatura contemplando os fundamentos necessários à compreensão do processo de obtenção de biocatalisadores heterogêneos aplicados à produção de fruto-oligossacarídeos (FOS). Inicialmente, são discutidos os principais aspectos relacionados aos FOS, às células biocatalíticas com atividade de transfrutossilacção e às estratégias de imobilização celular. Em seguida, descreve-se a técnica de manufatura aditiva empregada na fabricação dos suportes de poliácido láctico utilizados neste trabalho para a obtenção dos biocatalisadores heterogêneos. Por fim, apresenta-se uma breve revisão dos principais tipos de reatores enzimáticos destinados à produção de FOS, bem como o embasamento teórico para a avaliação da estabilidade operacional e térmica em sistemas reacionais operados nos modos contínuo e em batelada.

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

A crescente preocupação dos consumidores com a saúde tem promovido mudanças nos hábitos alimentares, despertando nas indústrias o interesse em desenvolver produtos com benefícios adicionais à nutrição básica, como é o caso de alimentos funcionais, entre os quais se destacam os prebióticos. Nesse contexto, os fruto-oligossacarídeos (FOS), açúcares nutracêuticos não digeríveis, têm se destacado como ingredientes promissores para a formulação de alimentos funcionais (CUNHA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2023; DIAS *et al.*, 2025). Os FOS são oligômeros de frutose de cadeia curta, compostos por uma unidade de glicose ligada à unidade terminal de frutose de uma cadeia de frutano por meio de uma ligação glicosídica β -2,1. São formados principalmente por 1-kestose, nistose e 1-frutofuranosilnistose (MARTINS *et al.*, 2019; BAHDRÁ *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2024). Na Figura 1 mostra-se a fórmula estrutural dos fruto-oligossacarídeos.

Figura 1 - Fórmula estrutural dos fruto-oligossacarídeos: (A) 1-kestose, (B) nistose e (C) 1-frutofuranosilnistose



Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2024)

Além de seu efeito prebiótico, os FOS apresentam baixo valor calórico, favorecem a absorção de cálcio e magnésio no trato gastrointestinal, contribuem para a redução dos níveis de colesterol total, não são cariogênicos, são seguros para o consumo por indivíduos diabéticos e podem estimular o sistema imunológico, além de apresentarem potencial efeito antidepressivo (MAIORANO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.* 2020; SILVA *et al.*, 2023; DIAS *et al.*, 2025).

Com doçura relativa entre 30 % e 60 % da sacarose, os FOS oferecem vantagens nutricionais e funcionais que os tornam uma alternativa promissora como adoçante no setor alimentício (ANTOSOVÁ & POLAKOVIČ, 2001; HAULY & MOSCATTO, 2002; DIAS *et al.*, 2022). Segundo Dias *et al.* (2025), o mercado global de FOS tem apresentado expansão significativa nos últimos anos, especialmente na Ásia, Europa e América do Norte, impulsionada pelo crescimento do consumo de alimentos funcionais e suplementos alimentares. No contexto brasileiro, embora a produção ainda esteja concentrada em pesquisa e desenvolvimento, observa-se uma tendência de crescimento do mercado interno, estimulada pelo interesse crescente na incorporação de ingredientes prebióticos em alimentos funcionais, dietas especiais e suplementos nutricionais. Esse cenário configura uma oportunidade promissora para a expansão industrial nacional (Dias *et al.*, 2025).

Os FOS são naturalmente encontrados em concentrações variadas em alimentos como cebola, aspargos, alho e banana. No entanto, nessas fontes, a concentração de FOS geralmente

é baixa, variando de 0,1 % a 0,75 % (MAIORANO *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2018; BAHDRAN *et al.*, 2022).

Em escala industrial, os FOS podem ser produzidos por duas rotas enzimáticas distintas: (i) a hidrólise enzimática controlada da inulina, mediada pela enzima inulinase, e (ii) a reação de transfrutossilacção da sacarose, catalisada por frutossiltransferases (FTase E.C.2.4.1.9), utilizando a sacarose como substrato (DIAS *et al.*, 2022; PERNA *et al.* 2018; SINGH & SINGH, 2010; ROBERFROID, 1993).

A rota enzimática a partir da sacarose, empregando biocatalisadores, representa uma alternativa promissora para a produção de FOS, pois os processos químicos convencionais frequentemente envolvem reagentes tóxicos, apresentam baixa especificidade e seletividade e normalmente requerem elevado consumo de energia. Em contraste, a rota enzimática proporciona maior controle sobre as características do produto (DIAS *et al.*, 2025). As enzimas frutossiltransferases (FTases), amplamente empregadas na produção de FOS, destacam-se por sua elevada atividade de transfrutossilacção (MAIORANO *et al.* 2008; FORTES & MUNIZ, 2009; CUNHA *et al.*, 2019). Essas enzimas são majoritariamente sintetizadas por fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Penicillium* e *Rhizopus*, com destaque para espécies como *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (BELMONTE-IZQUIERDO *et al.*, 2023; DIAS *et al.*, 2025).

As FTases podem ser secretadas no meio de cultura caracterizando-se como enzimas extracelulares, e/ou permanecer associadas à parede celular (biomassa) do microrganismo, constituindo a fração micelial (FTase micelial). Entre as espécies relatadas, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 tem se destacado como fonte potencialmente produtora de FTases, apresentando alta atividade de transfrutossilacção, em comparação com outras cepas de fungos filamentosos avaliadas (CUERVO FERNANDEZ *et al.*, 2007; PERNA *et al.*, 2018; FARIA *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2022).

3.2 CÉLULAS BIOCATALÍTICAS COM ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILACÇÃO

Os custos associados à produção enzimática e ao rendimento das reações ainda apresentam desafios para o escalonamento do processo (RIBEIRO *et al.*, 2024). A síntese de FOS com FTase solúvel pode gerar altos custos de produção e purificação da enzima, pois o uso de enzimas solúveis exige a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável (KRAJEWSKA, 2004; SOUZA *et al.*, 2017). Além disso, enzimas solúveis apresentam redução de atividade devido às condições do processo e inibição por

substrato ou produto, resultando em curto tempo de meia-vida operacional (ASHKAN *et al.*, 2021).

Por outro lado, o uso de células biocatalíticas de microrganismos em vez das enzimas purificadas permite evitar a primeira etapa de produção de enzimas, reduzindo o processo a uma única fermentação e geralmente proporcionando maiores rendimentos de FOS, resultando em bioprocessos mais rápidos e econômicos (NOBRE *et al.*, 2022; MALIK & GHOSH, 2012). Na literatura, diversos trabalhos relatam o emprego de células microbianas, livres ou imobilizadas, com atividade de transfrutoseilação, para a síntese enzimática do FOS. Ganaie *et al.* (2014), estudaram a reutilização de FTase micelial de *A. flavus* NFCCI 2364 imobilizada em dois tipos de polímeros, quitosana e alginato, durante a produção contínua de FOS. As esferas de alginato foram preparadas com 0,3 % (m v⁻¹) de alginato de sódio com 0,1 % (m v⁻¹) de solução de CaCl₂. O estudo mostrou que as esferas de FTase/alginato alcançaram uma produção de aproximadamente 63 % (m m⁻¹) ao longo de sete dias, sem grandes alterações em sua atividade enzimática.

Huang *et al.* (2016) exploraram a utilização de células de *Aspergillus aculeatus* M105 imobilizadas por encapsulamento em alginato de cálcio, para produção de FOS. Os parâmetros ideais reportados foram pH 5,0 – 6,0 e temperatura de 65 °C respectivamente. O biocatalisador pôde ser reutilizado pelo menos cinco vezes em sistema com tampão e 15 vezes em sistema sem tampão, mantendo uma boa atividade de produção de FOS.

Nobre *et al.* (2019) investigaram a produção de FOS utilizando células de *Penicillium citreonigrum* em uma fermentação de etapa única (pH 5,5; 30 °C; 150 rpm; 36 h). Os ensaios realizados em biorreator resultaram em alto rendimento, produtividade e pureza de FOS (0,65 ± 0,06 g_{FOS} g_{sacarose inicial}⁻¹, 2,28 ± 0,08 g L h⁻¹ e 61 ± 0 %). A mistura de FOS foi purificada até 92 % (m m⁻¹) em coluna de carvão ativado. Os autores observaram que os FOS produzidos promoveram o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias.

Dias *et al.* (2022) avaliaram a atividade da FTase micelial de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em um reator de leito fixo contendo esferas de biocatalisador com um diâmetro de 4,0 ± 0,2 mm. A maior atividade de transfrutoseilação (660 U g⁻¹) foi obtida após 25 min de reação, em temperatura de 50 °C, concentração de sacarose de 470 g L⁻¹ e fluxo volumétrico de 15 mL min⁻¹. Como resultados, observou-se um aumento na produtividade da enzima (522 U g⁻¹ min⁻¹), aproximadamente 40 vezes superior ao valor reportado na literatura (12 U g⁻¹ min⁻¹) para reatores em batelada, demonstrando as vantagens da produção contínua de FOS utilizando as células biocatalíticas.

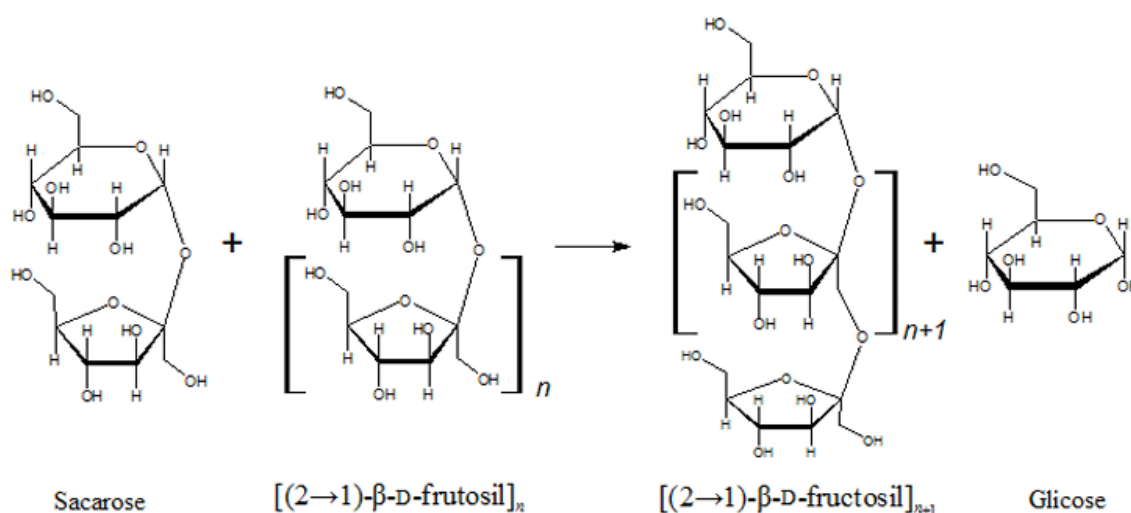
Ribeiro *et al.* (2024) imobilizaram células de *A. oryzae* IPT-301 por reticulação com glutaraldeído. As melhores condições de atividade de transfrutoseilação foram observadas a 200 rpm e 45 min. No reator PBR, a maior atividade (A_T) foi obtida a 50 °C, com taxas de fluxo de 3 mL min⁻¹ a 5 mL min⁻¹ e concentrações de sacarose de 473 g L⁻¹ e 500 g L⁻¹, mantendo uma atividade constante de aproximadamente 75 U g⁻¹ durante 12 h de reação.

No estudo de Jaswal *et al.* (2023) células de *Microbacterium paraoxydans* imobilizadas, em alginato de cálcio produziram levano de alta massa molecular com rendimento de 0,29 g g⁻¹ de sacarose consumida, resultando em concentração final de 44,6 g L⁻¹, em condições de solução tampão 100 mM, pH 7, temperatura de 37 °C, 400 g L⁻¹ e 20 mM de CaCl₂.

3.2.1 Atividade de Transfrutoseilação

A reação de transfrutoseilação ocorre quando a FTase se liga à posição β (2→1) da molécula de sacarose, promovendo a clivagem entre o grupo frutose e o grupo glicosil. Em seguida, o grupo frutose é transferido para uma molécula aceptora apropriada, como outra molécula de sacarose ou outras moléculas de FOS, formando um novo oligômero de frutose e liberando glicose no meio reacional (CUNHA *et al.*, 2019; MAIORANO *et al.*, 2020; ROCHA *et al.*, 2021), conforme exemplificado na Figura 2:

Figura 2 - Esquema de reação de transfrutoseilação



Fonte: Adaptado de Cunha (2017).

Conforme reportado na literatura, a definição de atividade de transfrutoseilação (A_T) pode variar entre diferentes autores, conforme apresentado na Tabela 1. Neste estudo, adotou-

se a definição de Dorta *et al.* (2006), que considera a A_T como a transferência da molécula de frutose para um acceptor apropriado.

Tabela 1 - Definição de atividade de transfrutossilação por diferentes autores

Autores	Definição
Dorta <i>et al.</i> , 2006, Cunha <i>et al.</i> , 2019, Gonçalves <i>et al.</i> , 2020, Garcia <i>et al.</i> , 2021; Dias <i>et al.</i> , 2022; Dias <i>et al.</i> , 2025; Pereira <i>et al.</i> , 2025; Prado <i>et al.</i> 2026; Cavini <i>et al.</i> 2026	Quantidade de enzima que transfere 1 μmol de frutose por minuto
Park; Oh; Yun, 2001 e Sangeetha; Ramesh; Prapulla, 2005	Quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto
L'hocine <i>et al.</i> , 2000 e Vandáková <i>et al.</i> , 2004	Quantidade de enzima que produz 1 μmol de 1-kestose por minuto
Otoni <i>et al.</i> , 2012	Quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol da mistura de FOS por minuto, sendo esta composta por 1-kestose, 1-nistose e 1-frutofuranosilnistose

Fonte: Adaptado de Dias (2020).

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

O processo de imobilização celular é uma técnica de confinamento físico das células em uma região definida, com o objetivo de catalisar reações específicas, mantendo sua atividade catalítica e possibilitando a reutilização em sistemas reacionais operados nos modos batelada e contínuos (COVIZZI *et al.*, 2007; ROUF *et al.*, 2017). Em comparação com células *in natura*, as células imobilizadas apresentam diversas vantagens, como por exemplo a fácil separação do biocatalisador, permitindo sua reutilização em processos repetidos e contínuos, maior proteção do biocatalisador imobilizado contra efeitos ambientais, aumento do rendimento e produtividade devido à maior densidade de sítios ativos, maior resistência a inibidores, menor custo e maior estabilidade durante o armazenamento (KRASŇAN *et al.*, 2016; JAIN; AWASTHI; GHOSH, 2023). A escolha do método de imobilização mais adequado deve levar em consideração as características do meio reacional e dos reagentes envolvidos, com o objetivo de maximizar a estabilidade celular e garantir a eficiência catalítica. (PRATA, 2020). Estudos comparativos entre células imobilizadas e livres demonstram alterações nas taxas de crescimento, maior absorção de substratos e aumento no rendimento de produtos, e menor formação de subprodutos fermentativos (KOURKOUTAS *et al.*, 2004). Outras vantagens da imobilização celular incluem, aumento da estabilidade celular, que pode resultar em maior

produtividade, elevação da eficiência do processo devido à alta concentração celular no meio fermentativo e maior atividade das culturas imobilizadas, que demonstram resistência superior a variações ambientais (SHELDON, 2007; MUSSATTO *et al.*, 2009; PRATA, 2020). A Tabela 2 apresenta algumas aplicações de células imobilizadas.

Tabela 2 - Aplicações de células imobilizadas e seus respectivos autores

Aplicação	Microrganismo	Suporte utilizado	Regime de Operação	Referência
Produção de pigmentos	<i>M. purpureus</i>	Alginato de cálcio, PUF, carvão, perlita	Batelada	Fenice <i>et al.</i> (2000)
Tratamento de águas residuais contendo cianeto	<i>Alcaligenes sp.</i>	Espuma de poliuretano	Batelada	Li <i>et al.</i> (2019)
Produção de ácido lático	<i>Rhizopus oryzae</i>	Esponja vegetal	-	Shahri, Vahabzadeh e Mogharei (2020)
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Alginato de cálcio	Contínuo (PBR)	Jung <i>et al.</i> (2011)
Produção de FOS	<i>Aspergillus japonicus</i>	Alginato de cálcio	Contínuo (tanques em série)	Sheu <i>et al.</i> (2013)
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Alginato de cálcio	Batelada	Jaswal <i>et al.</i> (2023)
	<i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301	Alginato de cálcio	Batelada	Gonçalves <i>et al.</i> (2020)
	<i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301	Espuma de poliuretano	Batelada	Barbosa (2022)
	<i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301	Espuma de poliuretano	Contínuo (PBR)	Cardoso (2023)
	<i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301	Óxidos de alumínio e titânio	Batelada e contínuo (PBR)	Santos (2024)
	<i>Aspergillus oryzae</i> IPT -301	Compósitos cerâmica-polímero	-	Fanis (2025)

Fonte: Autora (2026)

3.4 MANUFATURA ADITIVA E POLIÁCIDO LÁTICO NA IMOBILIZAÇÃO CELULAR

O material de suporte utilizado na imobilização celular é um dos parâmetros cruciais no processo de imobilização, devido ao seu impacto nas propriedades do sistema catalítico. É fundamental selecionar materiais capazes de proteger os biocatalisadores de condições adversas do meio, mantendo sua estabilidade e promovendo uma interação eficiente entre as células e a matriz de imobilização (ZDARTA *et al.*, 2018; REMONATTO *et al.*, 2023). Entre os diversos suportes reportados na literatura, as matrizes poliméricas, produzidas por impressão 3D, têm se mostrado promissoras para a imobilização de células (REMONATTO *et al.*, 2023). Essa tecnologia permite a fabricar suportes customizados com alta precisão, possibilitando testar e otimizar diferentes geometrias, tamanhos, volumes e distribuição de poros, obtendo materiais com morfologia e textura específicas (NGO *et al.*, 2018; RINALDI *et al.*, 2021). A impressão 3D, possibilita a criação de estruturas que podem maximizar significativamente a área específica dos suportes, favorecendo a imobilização celular (KHUMSUPAN *et al.*, 2025). Além disso, essa técnica permite produzir estruturas geométricas complexas e customizadas, com elevada porosidade, interconectividade de poros e baixa reatividade. Esses suportes customizados e projetados com precisão aumentam a eficiência do sistema biocatalítico, representando uma inovação importante para a indústria, ao possibilitar processos mais eficientes, sustentáveis, e de fácil ampliação de escala (NGO *et al.*, 2018; POSE-BOIRAZIAN *et al.*, 2022; REMONATTO *et al.*, 2023; FANIS, 2025).

Os aspectos sustentáveis da impressão 3D, incluem menor desperdício de material, redução de pós-processamento e baixo custo mesmo para a fabricação de peças complexas, além do potencial de reutilizar plásticos, reciclar e reduzir emissões (JANDYAL *et al.*, 2022). Esses aspectos tornam a impressão 3D uma tecnologia do futuro.

A Tabela 3 apresenta uma compilação de alguns trabalhos da literatura científica que utilizaram impressão 3D e polímeros para imobilização de células e enzimas.

Tabela 3 - Aplicações de impressão 3D e polímeros para imobilização celular/enzimática e seus respectivos autores

Aplicação	Microrganismo/Enzima imobilizados	Material de Suporte	Referência
Produção de ácido propiônico	<i>Propionibacterium</i>	Poliamida (nylon)	Belgrano (2018)
Remoção de estrogênio de águas residuais	Lacase	Poliácido lático (PLA)	Rybarczyk <i>et al.</i> (2023)

(continua)

(continuação)

Produção de bioetanol	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Poliamida 12 (nylon 12)	Khumsupan <i>et al.</i> (2025)
Biossensor enzimático para análises clínicas e monitoramento ambiental	Uricase	Poliácido láctico (PLA)	Stoikov <i>et al.</i> (2025)

Fonte: Autora (2026)

A impressão 3D permite a produção rápida e precisa de estruturas de suporte complexas sem a necessidade de solventes nocivos. Entre os materiais mais comuns utilizados para a impressão 3D visando à imobilização enzimática estão o poliácido láctico (PLA), o copolímero de acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) e o náilon (RYBARCZYK *et al.*, 2023). Com base na literatura, o poliácido láctico (PLA) se destaca devido a sua flexibilidade, resistência química, térmica e mecânica além de possuir boa biocompatibilidade, ser totalmente biodegradável, sustentável e de baixo custo. Essas características contribuem para a redução expressiva dos custos de produção dos suportes de imobilização e da geração de resíduos, ampliando sua gama de aplicações (RINALDI *et al.*, 2021; REMONATTO *et al.*, 2023, JOSEPH *et al.*, 2023, WANG *et al.*, 2024). No contexto da síntese de FOS, compostos de interesse na indústria alimentícia, é essencial que o material do suporte seja quimicamente inerte, não tóxico e seguro para contato com alimentos. Nesse sentido, o PLA é uma alternativa promissora, tendo sido aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para aplicações alimentícias, o que reforça sua adequação e segurança para esse tipo de processo (JOSEPH *et al.*, 2023).

3.5 REATORES ENZIMÁTICOS PARA A PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

A produção de FOS pode ser realizada em modo de operação batelada, ou em reatores de leito fixo (PBR) ou de leito fluidizado (FBR) (LORENZONI *et al.*, 2015; ZAMBELLI *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2024). Reatores em batelada são amplamente utilizados em experimentação de novos processos em pequena escala ou em processos de difícil adaptação à operação contínua (FOGLER, 2022). São versáteis e eficientes para a produção de FOS, permitindo controle preciso de parâmetros como temperatura, pH e concentração de substrato, facilitando a otimização do rendimento de FOS e fácil adaptação a diferentes substratos e biocatalisadores (GONÇALVES *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2021; LIANG *et al.*, 2021). O reator de leito fixo (PBR) é preferido em comparação a outros reatores catalíticos heterogêneos, devido à sua operação simples e ao maior contato entre

o substrato e o biocatalisador, além de permitir controle mais preciso do escoamento em relação ao leite fluidizado (FOGLER, 2022; DIAS *et al.* 2022; RIBEIRO *et al.* 2024). Esse reator consiste em uma pilha compacta e imóvel de biocatalisador, que funciona como meio poroso, dentro de uma coluna geralmente vertical, permitindo que o fluido reaja com a superfície interna e externa do biocatalisador (JAKOBSEN, 2014).

Lorenzoni *et al.* (2015) compararam a produção de FOS em reatores PBR e de leite fluidizado (FBR) utilizando β -fructosyltransferase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em quitosana. Os resultados mostraram que, sob as mesmas condições operacionais, o rendimento de FOS foi de 59 % no reator PBR e 54 % no FBR, indicando maior eficiência do PBR para a produção contínua de FOS com estabilidade operacional de 40 dias, sem redução na produtividade, mostrando boa estabilidade do reator.

Zambelli *et al.* (2016) utilizaram cinco cepas probióticas de *Lactobacillus* incubadas a 37 °C por 24 h e imobilizadas em alginato para avaliar a produção contínua de FOS em reator PBR e compararam com a produção em modo batelada. Os autores comprovaram que, sob as mesmas condições experimentais, a produtividade de FOS no PBR foi cerca de 1,7 vezes maior que no modo batelada. Além disso, concluíram que a transferência tecnológica do sistema em batelada para o sistema de fluxo contínuo resultou em uma melhora significativa na produtividade.

Oliveira *et al.* (2020) empregaram FTase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada em quitosana, para a produção de FOS tanto em reator de leito fixo (PBR) quanto em batelada. O maior rendimento de imobilização (95,9 %) foi obtido utilizando 4,0 % de glutaraldeído por 60 min e 80 rpm a 25 ± 1 °C. O biocatalisador apresentou boa estabilidade operacional e de armazenamento, além de produzir mais de 25 g L⁻¹ de FOS após 100 min de reação contínua. A operação em PBR mostrou-se eficiente para a produção contínua de FOS, mantendo uma alta atividade enzimática após imobilização. Além disso, os autores concluíram que a enzima imobilizada apresentou várias propriedades de interesse industrial, como maior estabilidade térmica em comparação com a enzima livre, além de alta reutilização e estabilidade durante o armazenamento.

Dias *et al.* (2022) investigaram o uso de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 como biocatalisadores na reação de transfrutossilacção de sacarose em reator de leito fixo (PBR). A maior atividade de transfrutossilacção (660 U g⁻¹) foi obtida aos 25 minutos de reação, a 50 °C, concentração de sacarose de 470 g L⁻¹ e fluxo volumétrico de 15 mL min⁻¹. O aumento do fluxo volumétrico elevou a atividade de transfrutossilacção, mas acelerou a desativação do

biocatalisador. As células mantiveram atividade enzimática estável durante 12 h de reação no PBR operado com fluxo descontínuo (5 e 11,5 mL min⁻¹) e no PBR operado com fluxo contínuo (5 mL min⁻¹). Cardoso (2023) implementou reatores de leito fixo com células de *Aspergillus oryzae* imobilizadas em poliuretano, avaliando vazões volumétricas de 1 mL min⁻¹ a 10 mL min⁻¹, concentração de substrato 200 g L⁻¹ a 600 g L⁻¹ e temperatura do meio reacional de 30 °C a 60 °C, além de estudos de estabilidade operacional com e sem reciclo no reator PBR por 12 h de reação. As melhores condições para atividade enzimática foram 400 g L⁻¹, 1 mL min⁻¹ e 50 °C resultando em produtividades de 115 g L⁻¹ h⁻¹ (com reciclo) e 5 g L⁻¹ h⁻¹ (sem reciclo). Nos ensaios de estabilidade operacional observaram valores de A_T elevados ao longo do processo. Ribeiro *et al.* (2024) avaliaram a atividade enzimática e estabilidade de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 reticuladas com glutaraldeído em reator de leito fixo (PBR), obtendo a maior atividade de transfrutossilação (A_T) com agitação de 200 rpm por 45 min. No PBR, os maiores valores de A_T ocorreram a 50 °C, em vazões de 3 a 5 mL min⁻¹ e concentrações de sacarose de 473 e 500 g L⁻¹. Durante 12 h de operação, a A_T permaneceu estável em aproximadamente 75 U g⁻¹ (fluxo contínuo) e 300 U g⁻¹ (fluxo descontínuo).

3.6 ESTABILIDADE TÉRMICA E OPERACIONAL PARA SISTEMAS REACIONAIS CONTÍNUOS E EM BATELADA

Um dos principais desafios da biocatálise é a desativação enzimática ao longo do tempo, fenômeno que impacta diretamente o dimensionamento e a seleção de reatores para aplicações industriais (SADANA, 1989). A redução progressiva da atividade catalítica compromete a produtividade do processo e constitui um fator determinante na avaliação da viabilidade técnica e econômica de um biocatalisador. Nesse contexto, a estabilidade enzimática torna-se um aspecto central para a implementação desses sistemas em processos industriais, especialmente aqueles que envolvem condições operacionais mais severas, capazes de comprometer a integridade estrutural e funcional das enzimas (SILVA *et al.* 2018; FOGLER, 2022; LEVENSPIEL, 1999).

Utilizando células de *A. pullulans* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, Jung *et al.* (2011) reportaram a produção de FOS em reator de leito fixo (PBR), com manutenção da estabilidade operacional por aproximadamente 100 dias. De forma análoga, Castro *et al.* (2017) observaram desempenho superior com células imobilizadas quando comparadas às células livres da mesma espécie.

No estudo de Dias *et al.* (2022), a estabilidade operacional das células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de leito fixo mostrou-se promissora, mantendo valores constantes de atividade de transfrutossilatação por 12 h de operação contínua a 50 °C. Similarmente, Cardoso (2023) também avaliou, em reator de leito fixo, células biocatalíticas do mesmo microrganismo imobilizadas em esponjas de poliuretano, reportando atividade máxima de transfrutossilatação de 2521 U g⁻¹ após 5 h de reação, além de atividade constante ao longo das 12 h de operação.

Além da estabilidade ao longo de tempos prolongados de reação, o desempenho de processos catalisados por enzimas é fortemente influenciado pela temperatura do meio reacional. Pequenas elevações de temperatura podem provocar perturbações estruturais na proteína, levando ao seu desdobramento parcial ou total e, conseqüentemente, à perda de atividade catalítica (RAHBAN *et al.*, 2022). Isso ocorre porque enzimas, enquanto macromoléculas proteicas, são suscetíveis à desnaturação térmica, resultante do rompimento de interações não covalentes que estabilizam sua estrutura tridimensional. Assim, a desnaturação pode promover alterações conformacionais em diferentes regiões da molécula, comprometendo a integridade do sítio ativo e reduzindo sua eficiência catalítica (DIXON; WEBB, 1979; FIELDS, 2001).

A estabilidade térmica das enzimas está diretamente ligada a fatores termodinâmicos que mantêm sua estrutura e, portanto, sua atividade catalítica. A temperatura influencia tanto a estabilidade estrutural quanto a velocidade da reação, criando um equilíbrio entre aumento da atividade e perda de conformação. Assim, compreender esses efeitos é essencial para definir uma temperatura de operação que combine bom desempenho catalítico com estabilidade ao longo do processo (SHULER & KARGI, 2002; FIELDS, 2001; DIXON; WEBB, 1979).

De acordo com Prado *et al.* (2026), a estabilidade térmica da frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizada foi investigada utilizando sílica-gel e sílica-gel funcionalizada como suportes. Os resultados indicaram maior preservação da atividade catalítica quando a enzima foi imobilizada no suporte funcionalizado, apresentando retenção superior a 70 % após 16 h a 30 °C e aproximadamente 50 % após 4 h nas temperaturas de 40 e 50 °C. Em contrapartida, a enzima imobilizada apenas em sílica-gel demonstrou menor estabilidade. Em temperaturas mais elevadas (60 °C), observou-se queda significativa da atividade em ambos os sistemas, atribuída à desnaturação térmica, restando cerca de 10 % da atividade inicial após 16 h de incubação.

Pereira *et al.* (2025) estudaram a termoestabilidade da frutossiltransferase (FTase) de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizada em sabugo de milho tratado com álcali. Os resultados indicaram o biocatalisador apresentou um tempo de meia-vida aproximadamente 1,4 vezes

superior ao da enzima solúvel, retendo cerca de 18, 15 e 5 % de sua atividade após 24 horas de incubação a 40, 50 e 60 °C, enquanto a enzima livre reteve apenas 15 % da atividade em todas as temperaturas testadas.

Mello (2025) avaliou a termoestabilidade de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em EPU e observou elevada atividade de transfrutoseilação por até 12 h de operação nas temperaturas de 40 e 50 °C, enquanto a 60 °C foi verificada uma taxa acentuada de decaimento da atividade. Por outro lado, a 30 °C não foi observada desativação enzimática significativa ao longo do período avaliado, embora os valores de atividade tenham sido consideravelmente inferiores aos obtidos nas demais temperaturas até as 12 h de operação.

Paiva *et al.* (2023) avaliaram como a encapsulação da β -galactosidase em hidrogel de pectina-alginato melhora sua resistência ao calor em comparação com a enzima livre. Os resultados mostraram que a enzima encapsulada apresentou maior meia-vida (por volta de 2 a 3 vezes maior) e uma energia de ativação da desnaturação significativamente mais alta (31,6 vezes maior) do que a enzima solúvel. Além disso, o encapsulamento aumentou a estabilidade após exposições a temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C.

O estudo de Araújo *et al.* (2022) teve como objetivo avaliar como a imobilização da FTase em PHB e GLU-PHB melhora sua resistência ao calor e estabilidade térmica em comparação com a forma solúvel. Os resultados mostraram que a imobilização aumentou significativamente a resistência ao calor, com valores de ΔG positivos mais elevados, particularmente para a FTase imobilizada em GLU-PHB, apresentando uma meia-vida de atividade até 2,6 vezes maior que a forma solúvel. Por outro lado, Dias *et al.* (2022) avaliaram o impacto da temperatura na atividade de transfrutoseilação de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em reator de leito fixo (PBR). Os resultados indicaram que, embora a maior atividade inicial ($671 \pm 7 \text{ U g}^{-1}$) tenha ocorrido a 60 °C, esta temperatura provocou uma rápida desativação térmica da enzima após 45 minutos ($491 \pm 69 \text{ U g}^{-1}$); em contrapartida, as temperaturas de 40 °C e 50 °C mostraram-se mais estáveis.

Barbosa (2022) reportou que os ensaios de estabilidade térmica indicaram maior termoestabilidade para as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas quando comparadas às células imobilizadas e reticuladas. Entretanto, os valores de $t_{1/2}$ obtidos foram muito próximos para ambos os biocatalisadores, sugerindo que o processo de reticulação celular não exerceu influência significativa sobre a termoestabilidade enzimática. De forma semelhante, Gonçalves *et al.* (2020) avaliaram a estabilidade térmica de células de *A. oryzae* IPT-301 livres e imobilizadas em alginato de cálcio, observando retenção total da atividade de transfrutoseilação das células imobilizadas após 24 h de armazenamento a 30 °C, enquanto as

células livres mantiveram apenas 64 % de sua atividade nessa mesma temperatura. Além disso, foi observada inativação térmica completa das células livres e das células reticuladas aprisionadas quando armazenadas a 60 °C.

Por fim, o estudo de Perna *et al.* (2017) avaliou a termoestabilidade da lipase de *Candida rugosa* (CRL) livre e imobilizada em glioxil-agarose objetivou investigar o impacto dos aditivos Triton X-100 e PEG na manutenção da atividade enzimática e na resistência ao calor, visando otimizar a estabilidade operacional. Os resultados demonstraram que a imobilização elevou a temperatura ótima de 40 °C para a faixa de 45–50 °C e que o uso de PEG foi determinante para a estabilidade térmica, permitindo que o biocatalisador retivesse 95 % de sua atividade inicial a 45 °C e apresentasse um tempo de meia-vida seis vezes superior ao da enzima livre.

De acordo com o levantamento realizado na literatura, não foram identificados estudos que avaliem de forma simultânea a estabilidade térmica e a estabilidade operacional de células biocatalíticas imobilizadas. Os trabalhos encontrados abordam esses parâmetros de maneira isolada. Nesse contexto, o presente estudo se diferencia ao integrar ambas as análises, proporcionando uma avaliação mais abrangente do desempenho do sistema biocatalítico para a produção de FOS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, descreve-se a metodologia experimental adotada para a condução dos ensaios. Os procedimentos foram organizados em cinco etapas: (i) produção do biocatalisador heterogêneo; (ii) avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador nos modos de operação batelada e (iii) contínuo; (iv) aplicação de métodos analíticos bem como determinação da atividade de transfrutossilacção; e (v) realização das análises estatística por meio do teste de *Tukey*.

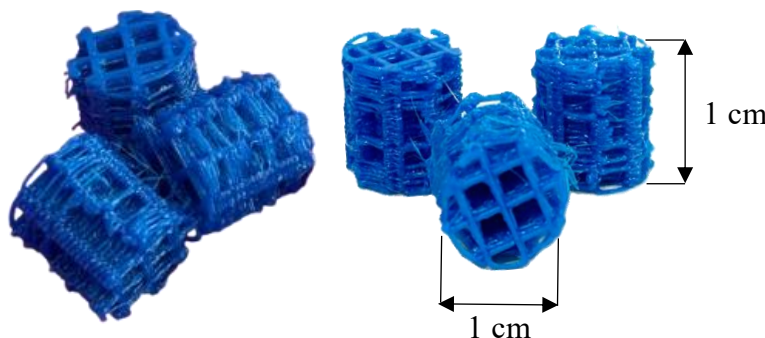
4.1 PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO

4.1.1 Obtenção dos materiais de suporte por manufatura aditiva

Os suportes para a imobilização das células biocatalíticas foram produzidos no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG, Campus Poços de Caldas) por meio da impressão 3D utilizando filamentos de

poliácido láctico (PLA) em uma impressora 3D CREALITY® Modelo K1C e a tecnologia *Fused Deposition Modeling*. As estruturas poliméricas obtidas apresentaram geometria cilíndrica com 1,0 cm de diâmetro e altura, poros com abertura de 2,65 mm e porosidade total de 71 % (Figura 3).

Figura 3 - Suportes de PLA para a imobilização de células biocatalíticas fabricados por impressão 3D pela tecnologia Fused Deposition Modeling



Fonte: Autora (2026).

4.1.2 Microrganismo, preparo do inóculo e condições de cultivo

Foram utilizadas cepas do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, gentilmente cedidas pelo banco de culturas do Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do de São Paulo (IPT-SP). Os esporos liofilizados do microrganismo foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril, e alíquotas de 70 μL foram inoculadas em meio sólido preparado em placa de Petri (16 x 60 mm), contendo (em %, m v^{-1}): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0, glicerina P.A. (Dinâmica®) 2,5, extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose P.A. (Dinâmica®) 2,5.

As culturas foram incubadas a 30 °C por 7 dias em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371). Após o período de incubação os esporos produzidos foram coletados por raspagem com alça de Drigalski, em 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % (m v^{-1}) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1 % (v v^{-1}). A suspensão de esporos obtida foi homogeneizada em solução de glicerina P.A. (Dinâmica®) 20,0 % (m v^{-1}) ajustando-se os volumes para obter uma concentração aproximada de 1×10^7 esporos mL^{-1} .

A quantificação dos esporos foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), e a suspensão obtida foi armazenada em congelador a -26 °C (CUNHA *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.* 2024).

4.1.3 Formulação do meio de cultura

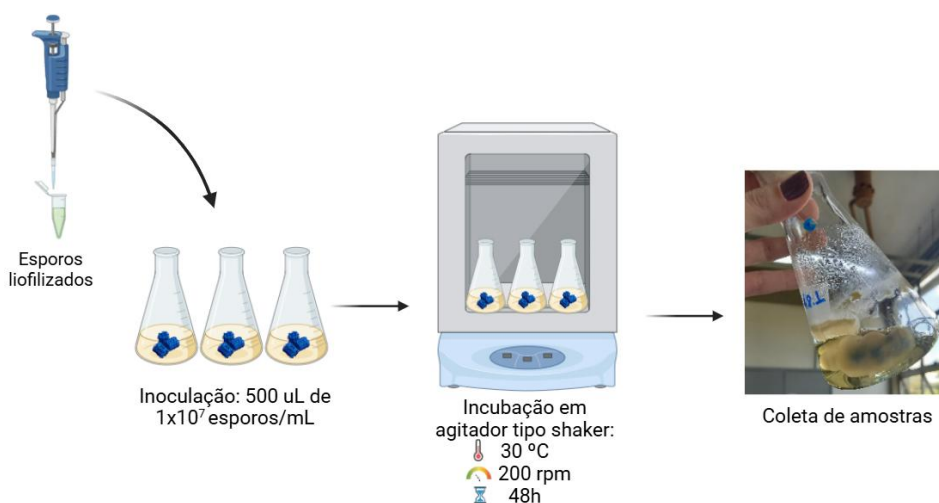
O meio de cultura complexo (pH 5,5), utilizado para o cultivo do microrganismo e a produção das células biocatalíticas foi constituído por (em %, $m v^{-1}$): sacarose P.A. (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5, $NaNO_3$ (Dinâmica®) 0,5, KH_2PO_4 (Synth®) 0,2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Dinâmica®) 0,05, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Synth®) 0,03, e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Synth®) 0,001. Um volume de 50 mL do meio de cultura foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL, vedados com tampão de algodão hidrofóbico e esterilizados em autoclave por 20 min a 120 °C e 2,022 atm (CUNHA *et al.*, 2019; FARIA *et al.* 2021; DIAS *et al.*, 2022).

Os suportes tridimensionais (3D) de poliácido láctico (PLA), obtidos por impressão 3D, foram previamente pesados e autoclavados separadamente, sob as mesmas condições. Em seguida, os suportes estéreis foram adicionados ao meio de cultura para os ensaios de cultivo e imobilização celular.

4.1.4 Construção da curva de crescimento microbiano

Para a construção da curva de crescimento microbiano, foram inoculados 500 uL de suspensão de esporos, em uma concentração de $1,0 \times 10^7$ esporos mL^{-1} , no meio de cultura complexo descrito no tópico 4.1.3. O cultivo e a imobilização celular foram conduzidos concomitantemente em agitador orbital do tipo *shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm, durante 48 h. As amostras foram coletadas em intervalos pré-estabelecidos (8, 16, 24, 32, 40, 44 e 48 h), conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Etapas do cultivo celular

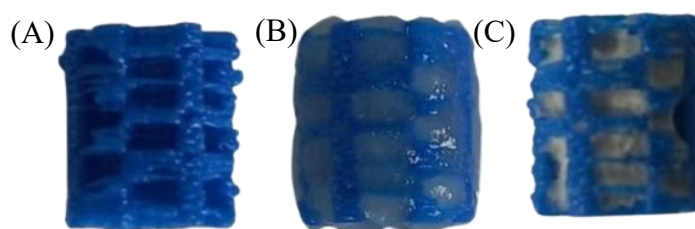


Fonte: Autora (2026)

O conteúdo total dos frascos de cultivo foi filtrado a vácuo em funil de Büchner empregando papel do tipo Qualy. As células biocatalíticas imobilizadas no suporte de PLA (Figura 5B), foram lavadas abundantemente com água destilada e, em seguida, submetidas aos ensaios de atividade enzimática descritos no tópico 4.4.1.

A quantidade de células imobilizadas foi determinada a partir da diferença entre a massa celular seca e a massa de suporte presente no meio de cultura expressa em ($g_{\text{célula}} g_{\text{suporte}}^{-1}$). A massa seca foi obtida após os ensaios de atividade enzimática mediante secagem das células biocatalíticas em estufa de circulação e renovação de ar (Tecnal®, modelo TE-394/1) a 50 °C por 24 h.

Figura 5 - (A) Suporte de PLA antes do cultivo celular; (B) Células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte 3D após o cultivo microbiano (30 °C, 200 rpm e 40 h); (C) Massa celular imobilizada após 24 h de secagem



Fonte: Autora (2026)

Durante a construção das curvas de crescimento microbiano, monitoraram-se simultaneamente a quantidade de células biocatalíticas imobilizadas no suporte 3D e o perfil de atividade enzimática com o objetivo de determinar o tempo ótimo de cultivo e imobilização das células fúngicas. Concomitantemente, avaliou-se o pH do meio de cultura ao longo dos ensaios utilizando-se um pHmetro digital (Tecnal®, modelo R-TEC-7/2-MP), cujos valores foram plotados em função do tempo de cultivo.

4.1.5 Caracterização morfológica do material de suporte e das células biocatalíticas imobilizadas

A estrutura morfológica, dos suportes de PLA e das células imobilizadas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), empregando microscópio eletrônico (Zeiss EVO MA-10, Alemanha). As observações foram realizadas com tensão de aceleração de 20 kV, distâncias de 13,9 mm e 14,4 mm e ampliações de 100x, 150x e 200x.

As amostras do material de suporte foram fixadas sobre fita de carbono em porta-amostras (*stub*) e recobertas por uma fina película de liga de ouro-paládio pelo processo de *sputtering*, utilizando um mini *Sputter Coater* (POLARON EMITECH®, modelo SC7620, Inglaterra). O processo de recobrimento conduzido por 3 min. As análises morfológicas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (LBI/IPT-SP).

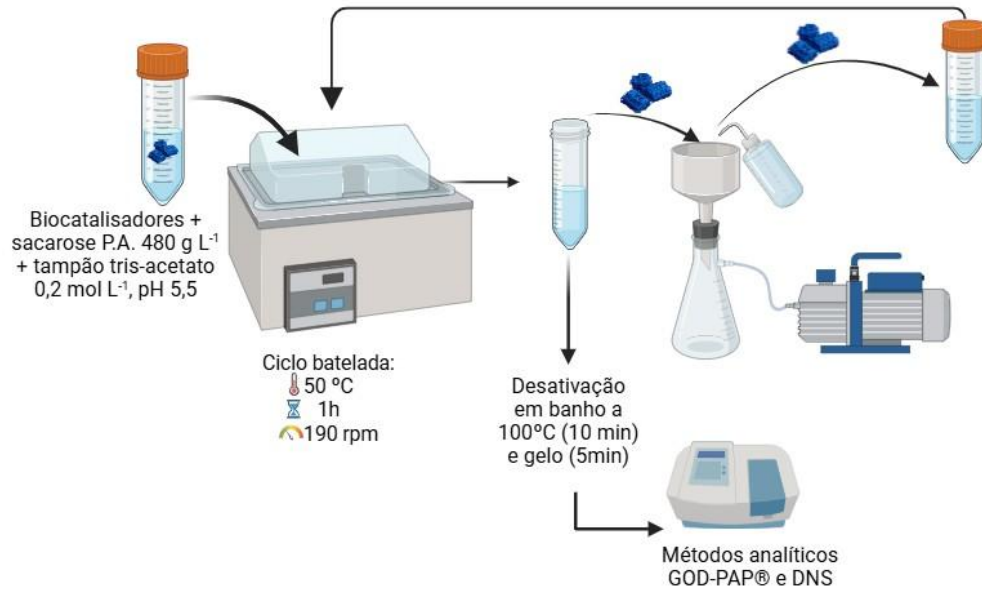
4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO EM MODO BATELADA

4.2.1 Ensaios de estabilidade operacional

Para os ensaios de estabilidade operacional, três unidades do biocatalisador heterogêneo (células biocatalíticas imobilizadas em suportes 3D) foram inseridas em meio reacional composto por 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (480 g L⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato (0,2 mol L⁻¹, pH 5,5) (CUNHA *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2021). Cada ciclo batelada teve duração de 1 h de reação.

Ao final de cada ciclo, o biocatalisador heterogêneo foi removido do meio reacional por filtração a vácuo, lavado abundantemente com água destilada (utilizando aproximadamente 1000 mL) e reintroduzido em um novo meio reacional com a mesma composição. A atividade de transfrutossilação foi monitorada ao longo de 29 ciclos conduzidos a 50 °C e 190 rpm e os parâmetros de desempenho, envolvendo a conversão (X, em %), rendimento (R, em %) e produtividade (P, em g L⁻¹ h⁻¹) (FOGLER, 2022; LEVENSPIEL, 1999) na produção de FOS, foram determinados para o 1º, 6º, 12º, 18º e 24º ciclos de reação. A Figura 6, ilustra esquematicamente as etapas do ensaio de estabilidade operacional.

Figura 6 - Etapas do ensaio de estabilidade operacional em batelada



Fonte: Autora (2026)

Os parâmetros de desempenho, para os ensaios de estabilidade operacional em sistema batelada, foram determinados de acordo com as Equações (1), (2) e (3), respectivamente (FOGLER, 2022):

$$X = \left[\frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \right] \cdot 100 \quad (1)$$

$$R = \left(\frac{C_P}{C_0} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

$$P = \frac{C_P}{t_R} \quad (3)$$

Em que C_0 e C_f correspondem às concentrações inicial e final de sacarose (substrato, em g L⁻¹), respectivamente. C_P representa a concentração do produto desejado (FOS, em g L⁻¹) e t_R corresponde ao tempo de reação (h).

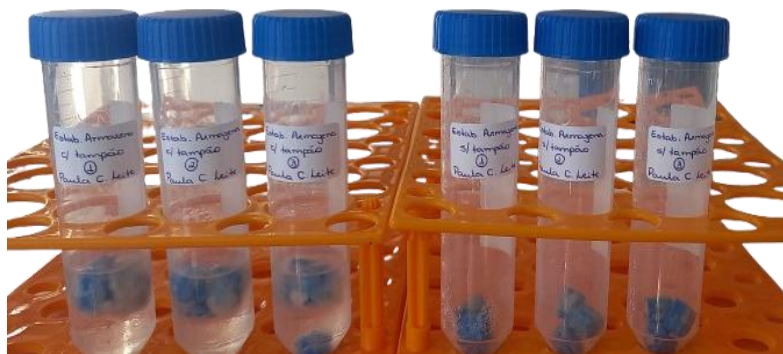
4.2.2 Ensaios de estabilidade de armazenamento

Os ensaios de estabilidade ao armazenamento foram realizados com as células biocatalíticas imobilizadas em diferentes períodos: 0 (dia inicial), 1 (24 h), 2, 5, 7, 9, 15, 30 dias, e, a partir desse ponto, com intervalos regulares de 30 dias, e posteriormente, intervalos

de 60 dias. O biocatalisador heterogêneo foi armazenado sob refrigeração a 4 °C, tanto em solução tampão tris acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5), quanto na ausência de tampão.

As atividades de transfrutossilacção foram determinadas nos tempos previamente estabelecidos, sob condições experimentais padrão descritas no tópico 4.4.1.

Figura 7 - Biocatalisadores armazenados na presença e ausência de tampão



Fonte: Autora (2026)

4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO EM MODO CONTÍNUO

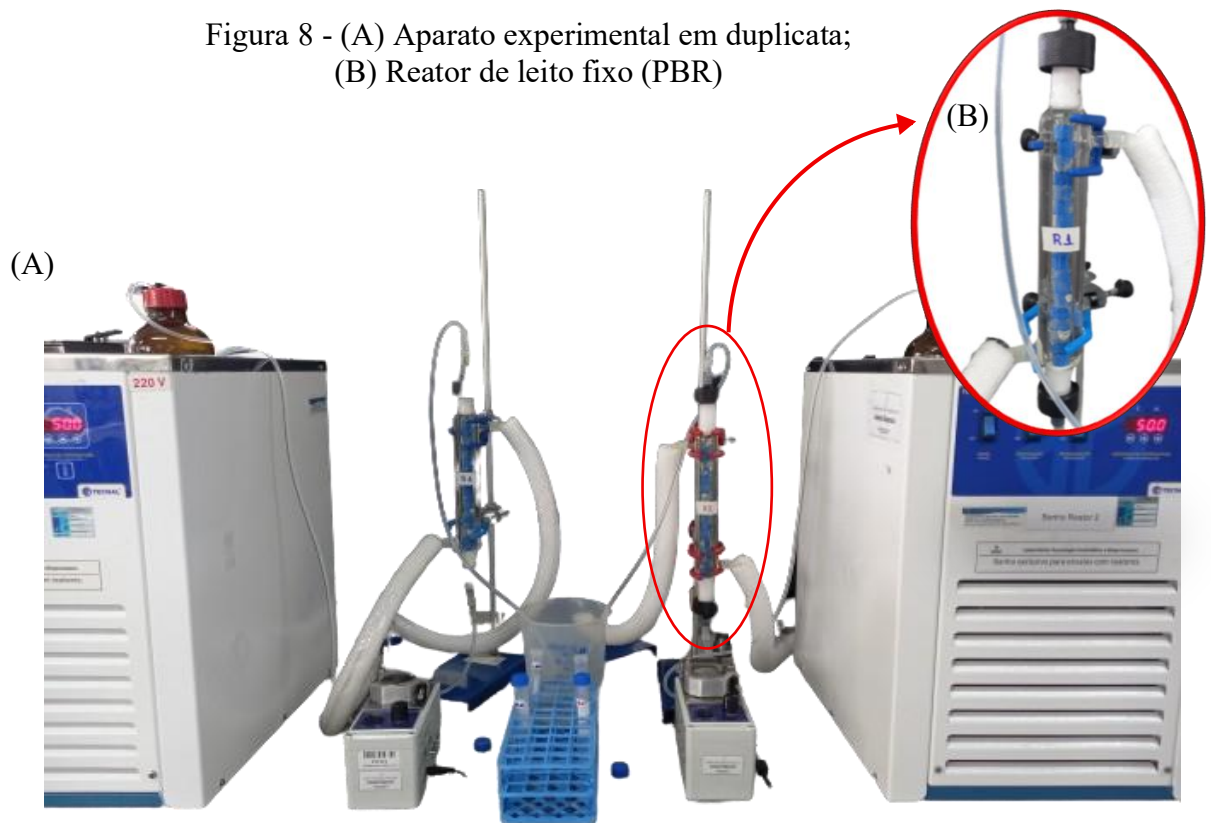
4.3.1 Especificação do reator PBR e montagem do aparato experimental

O aparato experimental utilizado nos ensaios em modo contínuo está apresentado na Figura 8A. O reator de leito fixo (PBR) (Figura 8B) foi construído em vidro de borossilicato com diâmetro e comprimento nominais de 1,2 cm e 20 cm, respectivamente.

O leito biocatalítico foi constituído por 18 peças cilíndricas do suporte 3D contendo as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas na estrutura polimérica de PLA.

O PBR foi envolvido por uma jaqueta térmica, permitindo o controle da temperatura por recirculação de água proveniente de um banho termostaticado (Tecnal®, modelo TE-2005). O meio reacional (solução de substrato) foi alimentado ao reator em fluxo ascendente, por meio de uma bomba peristáltica (MS Tecnopon®, modelo LAP-101-3) conectada a tubulação de silicone de 5 mm de diâmetro interno.

Figura 8 - (A) Aparato experimental em duplicata;
(B) Reator de leito fixo (PBR)



Fonte: Autora (2026)

Durante os ensaios, o substrato foi mantido na temperatura de reação previamente estabelecida, utilizando o mesmo banho termostaticado responsável pelo controle térmico do reator. As amostras do efluente foram coletadas na extremidade superior do PBR.

A atividade de transfrutossilacção foi calculada pela Equação (4) (DIAS *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2024), enquanto os parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade) foram calculados para o sistema reacional contínuo a partir das concentrações de sacarose e FOS (FOGLER, 2022; LEVENSPIEL, 1999).

$$At (Ug^{-1}) = \frac{[Ft]*Q}{ms} \quad (4)$$

em que F_T é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), Q é a vazão volumétrica de alimentação do substrato (em mL min^{-1}) e m_s é a massa seca de células biocatalíticas imobilizadas no suporte 3D (em g).

4.3.2 Influência da vazão volumétrica no perfil de atividade enzimática e nos parâmetros de desempenho do reator

Para a análise da influência da vazão volumétrica sobre a atividade de transfrutossilação e os parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade), o reator de leito fixo (PBR), preenchido com células biocatalíticas imobilizadas nos suportes 3D, foi alimentado com uma solução de substrato composta por sacarose (480 g L^{-1}) e tampão tris-acetato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5). O sistema foi submetido a diferentes vazões volumétricas de alimentação (1, 4, 6 e 8 mL min^{-1}).

A reação enzimática em modo contínuo foi conduzida a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 240 minutos (DIAS *et al.*, 2022; CARDOSO, 2023; RIBEIRO *et al.*, 2024). As amostras coletadas na saída do reator (efluente) foram imediatamente submetidas à imersão em banho de água em ebulição por 10 minutos, seguida de resfriamento em banho de água e gelo por 5 minutos, com o objetivo de interromper a reação enzimática.

Em seguida, determinaram-se as concentrações de açúcares redutores (tópico 4.4.2) e glicose (tópico 4.4.3), utilizadas para o cálculo da atividade de transfrutossilação (Equação 4), bem como as concentrações de sacarose e FOS (tópico 4.4.4), empregadas na avaliação dos parâmetros de desempenho do processo.

Os parâmetros de desempenho avaliados para este ensaio foram as produtividades volumétrica (P_V , em $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e específica (P_E , em $\text{g}_{\text{FOS}} \text{ g}_{\text{célula}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), calculadas pelas Equações (5) e (6), respectivamente. O tempo de residência hidráulico (τ , em min) foi calculado pela Equação (7).

$$P_V = \frac{C_P}{\tau} \quad (5)$$

$$P_E = \frac{Q \cdot C_P}{m_s} \quad (6)$$

$$\tau = \frac{V_R}{Q} \quad (7)$$

em que C_p representa a concentração do produto desejado (FOS, em g L^{-1}), Q corresponde à vazão volumétrica (em mL min^{-1}), m_s é a massa seca de células (em g) e V_R representa o volume útil do reator (em mL).

4.3.3 Avaliação da estabilidade operacional e obtenção dos parâmetros de desempenho

Para os ensaios de estabilidade operacional, o reator de leito fixo (PBR) foi empacotado com os biocatalisadores heterogêneos e a reação conduzida em diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C). A solução de substrato foi alimentada à vazão de 1 mL min⁻¹ por meio de bombas peristálticas (MS TecnoPON®, modelo LAP-101-3). O meio reacional foi composto por sacarose comercial (União®) na concentração de 480 g L⁻¹, preparada em solução tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5). A montagem do sistema experimental foi realizada conforme ilustrado na Figura 8 (Tópico 4.3.1). Foram coletados 5 mL de amostra da corrente do efluente em tempos pré-definidos (5 min, 10 min, 20 min, 30 min e 40 min, 1, 2, 3, 4, 8, 23, 27, 31, 47, 51, 55, 71, 75, 79 e 96 h) para obtenção dos perfis de atividade enzimática e determinação dos parâmetros de desempenho, envolvendo a conversão, rendimento e as produtividades volumétrica e específica, calculados pelas Equações (1), (2), (5), (6) e (7), respectivamente. Os ensaios foram conduzidos em quadruplicata.

4.3.4 Avaliação da estabilidade térmica e obtenção dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desativação

Os ensaios de estabilidade térmica foram realizados em reator PBR, conforme aparato experimental apresentado na Figura 8 (Tópico 4.3.1), cujo leito biocatalítico foi constituído pelo empacotamento das células microbianas imobilizadas nos suportes 3D. O reator foi alimentado com solução reagente constituído por sacarose (substrato) 480 g L⁻¹ solubilizada em tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. Os ensaios de termoestabilidade foram conduzidos em diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C) e amostras da corrente de efluente (5 mL) foram coletadas em intervalos de tempo distintos por um período de até 96 h para obtenção dos perfis de atividade enzimática.

O modelo de Sadana e Henley (1987) (Equação 8) foi ajustado aos dados experimentais para a determinação da constante de desativação térmica de primeira ordem (k_D , em min⁻¹). O ajuste foi realizado com o auxílio do software OriginPro 2026. (PRADO *et al.*, 2026; ARAÚJO *et al.*, 2022; FOGLER, 2022; SILVA *et al.*, 2021; SADANA & HENLEY, 1987).

$$\frac{At(t)}{At_0} = (1 - \alpha) \exp(-k_D * t) + \alpha \quad (8)$$

em que $At_{(t)}/At_0$ é a atividade residual adimensional no tempo t , α é a razão entre a atividade específica do estado final e a do estado inicial, e t (min) é o tempo decorrido da reação.

A energia de desativação térmica (E_D , em kJ mol^{-1}) para desativação das células biocatalíticas imobilizadas foi determinada a partir da Equação de *Arrhenius* linearizada (Equação 9), que permite avaliar a influência da temperatura sobre a taxa de desativação do biocatalisador (ARAÚJO *et al.* 2022; FOGLER, 2022; LEVENSPIEL, 1999).

$$\ln(k_D) = \ln(A) - \frac{E_D}{RT} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (9)$$

em que A é a frequência de *Arrhenius* do fator de colisão, R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K).

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, em min), as variações de entalpia de desativação (ΔH_D , kJ mol^{-1}), as energias de Gibbs (ΔG_D , kJ mol^{-1}) e as variações de entropia (ΔS_D , $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) para cada temperatura avaliada, foram calculadas a partir das Equações (10), (11), (12) e (13), respectivamente (PRADO *et al.*, 2026; PEREIRA *et al.*, 2025; ARAÚJO *et al.*, 2022; PAIVA *et al.* 2023; PERNA *et al.* 2017).

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_D} \quad (10)$$

$$\Delta H_D = E_D - RT \quad (11)$$

$$\Delta G_D = -RT * \ln \left(\frac{k_D * h}{kb * T} \right) \quad (12)$$

$$\Delta S_D = \left(\frac{\Delta H_D - \Delta G_D}{T} \right) \quad (13)$$

em que kb é a constante de *Boltzmann* ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J k}^{-1}$) e h é a constante de *Planck* ($66,24 \cdot 10^{-22} \text{ J h}^{-1}$) (ARAÚJO *et al.*, 2022; PAIVA *et al.* 2023; PERNA *et al.* 2017).

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinação da atividade enzimática em modo batelada

A atividade de transfrutoseilação foi determinada conforme o procedimento descrito por Cunha *et al.* (2019), Garcia *et al.* (2021) e Gonçalves *et al.* (2020). Para isso, o biocatalisador heterogêneo (células biocatalíticas imobilizadas no suporte 3D) foi incubado em 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 (Nova Técnica®, modelo NT-230) a 50 °C, 190 rpm por 60 min, sendo interrompida pela imersão do meio reacional em água em ebulição por 10 min, seguido de resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para completa inativação enzimática.

Posteriormente, o meio reacional foi filtrado a vácuo e as concentrações de açúcares redutores e glicose foram determinadas conforme os procedimentos descritos nos tópicos 4.4.2 e 4.4.3, respectivamente. A atividade de transfrutoseilação (A_T) para os ensaios em batelada foi calculada pela Equação (14).

$$At = \frac{[Ft] * V}{t * ms} \quad (14)$$

em que: $[F_T]$ é a concentração molar de frutose transfrutoseilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), V_r é o volume do meio reacional (em L), t é o tempo de reação (em min) e m_s é a massa seca de células biocatalíticas imobilizadas no suporte 3D.

A concentração de frutose transfrutoseilada pode ser obtida, indiretamente, pelas Equações (15), (16) e (17).

$$[AR] = [G] + [F] \quad (15)$$

$$[F] = [AR] - [G] \quad (16)$$

$$[FT] = [G] - [F] = 2[G] - [AR] \quad (17)$$

sendo que: $[AR]$, $[G]$, $[F]$ representam as concentrações, expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$, de açúcares redutores, glicose e frutose, respectivamente.

Conforme descrito no tópico 3.2.1, por definição, uma unidade (1U) de atividade de transfrutossilação corresponde à quantidade de enzima que transfere um micromol (1 μmol) de frutose por minuto por grama de célula seca, sob condições experimentais estabelecidas (CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2024; PEREIRA *et al.*, 2025).

4.4.2 Determinação da concentração de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores [AR] presentes no meio reacional, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). A solução DNS foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) (Dinâmica®) em 200 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2 mol L^{-1} (Dinâmica®) (Reagente A). Paralelamente, preparou-se o Reagente B, composto, por 500 mL de solução aquosa (Reagente B) contendo 600 g L^{-1} de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Dinâmica®), sob aquecimento e agitação até completa dissolução dos sais. Em seguida, os reagentes A e B foram misturados, e o volume final da mistura ajustado para 1,0 L em balão volumétrico.

A quantificação dos AR foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 0,5 mL da amostra proveniente da reação enzimática a 0,5 mL da solução de DNS preparada. A reação foi incubada em banho maria a 100 °C por 10 minutos e, posteriormente, resfriada em banho de água e gelo por 5 minutos para interrupção da reação. Após o resfriamento, adicionaram-se 4,0 mL de água destilada à mistura. As amostras foram analisadas em triplicata utilizando espectrofotômetro (Bel Photonics®, modelo UV-M51) a 540 nm, para determinação das absorbâncias e posterior determinação das concentrações dos AR a partir da curva de calibração obtida para o método (APÊNDICE A). O controle analítico foi preparado seguindo o mesmo procedimento, substituindo a amostra da reação enzimática, por água destilada.

4.4.3 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose [G], presente no meio reacional foi quantificada pelo método GOD-PAP® (GANAIE *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020). O método baseia-se em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4 hidroxibenzoato. A glicose é oxidada pela enzima glicose oxidase (GOD), formando peróxido

de hidrogênio, o qual é subsequentemente oxidado pela enzima peroxidase (POD). Nesta etapa a presença de 4-AF e 4 hidroxibenzoato resulta na formação de um composto de coloração rosácea ou vermelha (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008).

O kit enzimático utilizado no presente trabalho foi da marca Laborlab®. A quantificação da glicose foi realizada pela adição de 10 µL da amostra proveniente da reação enzimática em microtubos tipo *Eppendorf*, seguida da adição de 1 mL da solução reagente do kit enzimático. A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. A coloração final foi analisada com auxílio de espectrofotômetro (Bel®, modelo UV-M51) a 505 nm, obtendo-se as absorvâncias e, conseqüentemente, as concentrações de glicose, calculadas a partir do “*fator f*” determinado com base na amostra padrão fornecida pelo fabricante.

A amostra controle foi preparada seguindo o mesmo procedimento, substituindo-se a amostra da reação enzimática por água destilada.

4.4.4 Determinação da concentração de sacarose e de fruto-oligossacarídeos

As concentrações de sacarose e de FOS (1-kestose, nistose e 1-β-frutofuranosilnistose), para cálculo dos parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade), foram obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas utilizando duas colunas cromatográficas *Shodex* SC 1011 (300 x 7,8 mm) acopladas em série e mantidas a 72 °C.

O sistema cromatográfico foi constituído por um HPLC Waters® (EUA), composto por uma bomba isocrática modelo W515, um detector de índice de refração modelo W2414, um injetor automático modelo W2707 e o software de aquisição e tratamento de dados Empower 2.0. A eluição das amostras foi realizada com uma solução de EDTACa (Na)₂ 5 × 10⁻² mol L⁻¹, empregando uma vazão de 0,4 mL min⁻¹.

A identificação dos componentes foi efetuada por comparação dos tempos de retenção com padrões analíticos dos mesmos analitos (Fuji Wako Chemicals, Japão) (CARDOSO, 2023; BARBOSA, 2022; PERNA *et al.*, 2018; MAIORANO *et al.*, 2020). Os ensaios cromatográficos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (LBI/IPT-SP).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios experimentais foram realizados em triplicata, e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Tukey*, adotando-se um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Esse procedimento estatístico permitiu avaliar e identificar diferenças significativas entre os tratamentos analisados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos a partir dos ensaios laboratoriais conduzidos conforme as metodologias previamente descritas. Inicialmente, são apresentados os resultados relacionados à produção e à caracterização do biocatalisador heterogêneo, por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da construção da curva de crescimento microbiano. Em seguida, são discutidos os resultados referentes à aplicação do biocatalisador em sistemas reacionais operados nos modos batelada e contínuo.

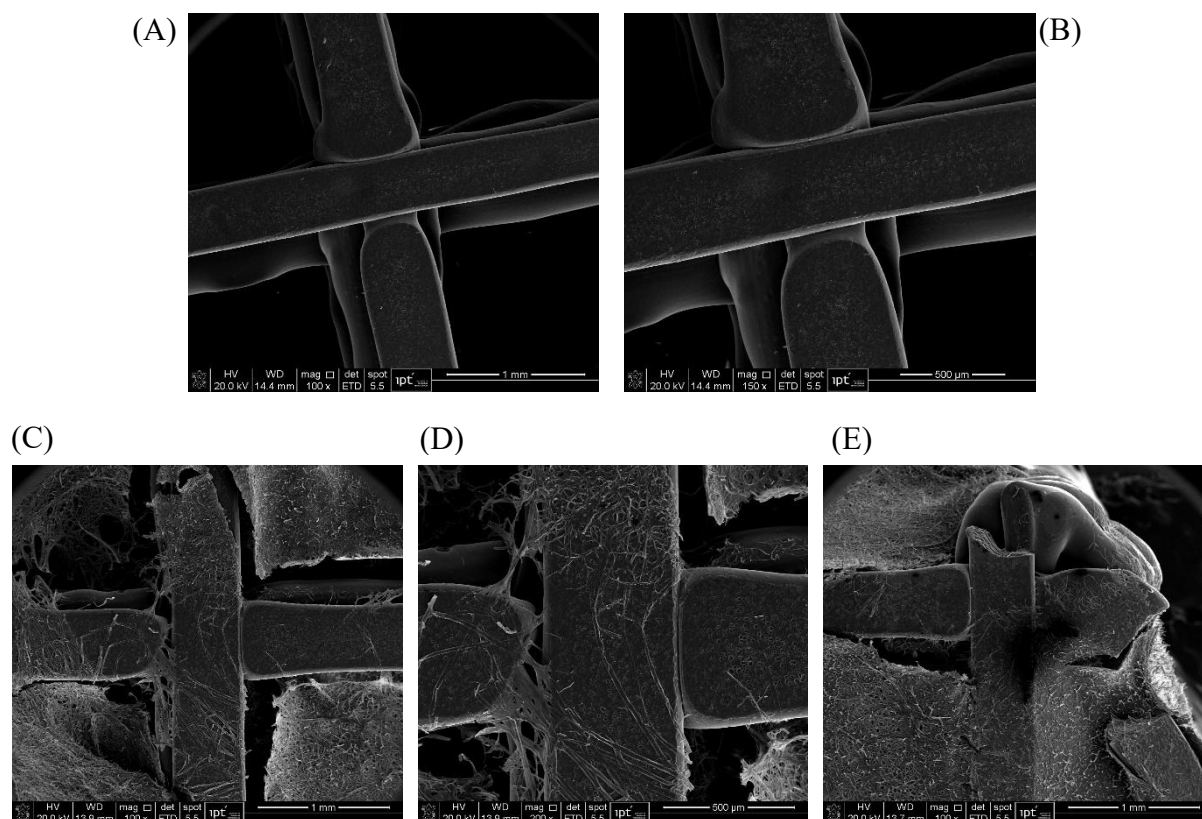
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO

5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar o crescimento das células fúngicas, com atividade biocatalítica nos suportes de PLA, foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) ao longo do tempo de cultivo (Figura 9). Nas Figuras 9(A) e 9(B), observa-se a estrutura íntegra do suporte de PLA antes do cultivo celular, apresentando abertura de poros com diâmetro médio de 2,65 mm.

Nas Figuras 9(C), 9(D) e 9(E), nota-se a fixação, aderência e crescimento das células nos poros e ao longo dos filamentos do suporte, após 40 h de cultivo. As micrografias de MEV evidenciam o crescimento das células microbianas e sua aderência ao material de suporte obtido por impressão 3D, demonstrando resultados positivos tanto para o cultivo quanto para o processo de imobilização celular.

Figura 9 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Autora (2026)

Legenda: (A), (B) - suporte de PLA antes do cultivo celular. (C), (D), (E) – suporte de PLA após 40 h de cultivo celular submerso.

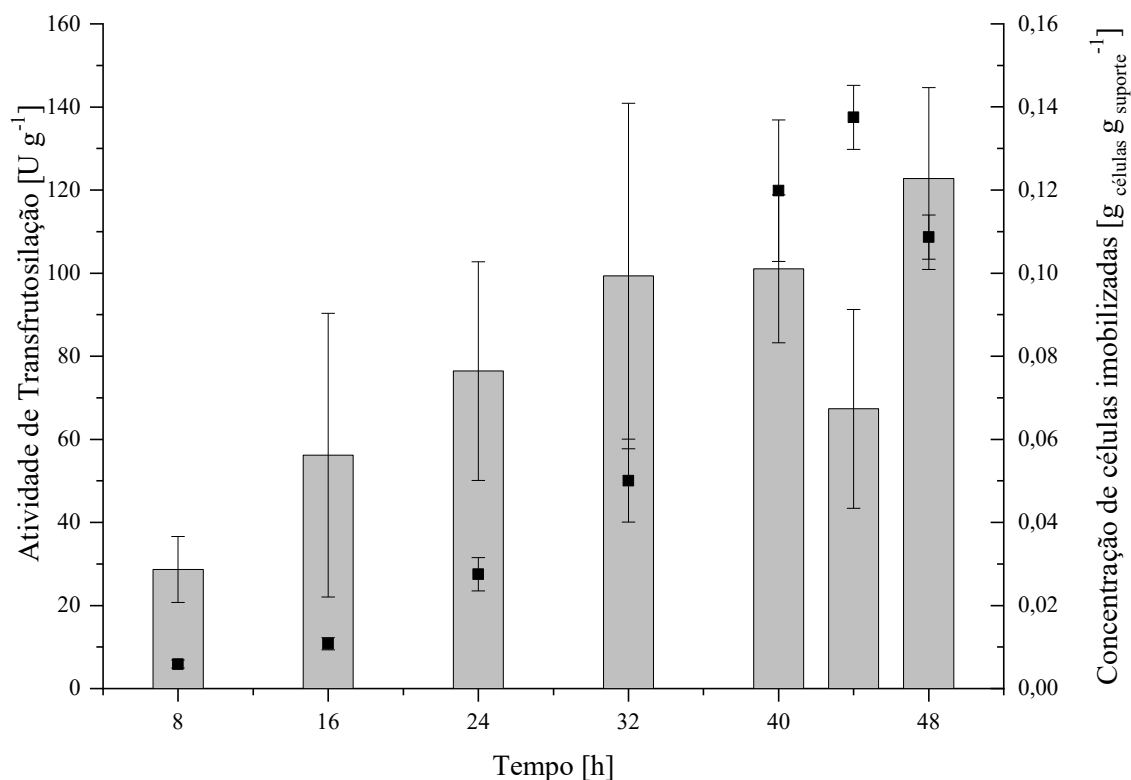
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO

O ensaio para a construção da curva de crescimento microbiano foi realizado com o objetivo de determinar o tempo ótimo de cultivo e imobilização concomitantes, de modo a obter um biocatalisador heterogêneo com maior valor de atividade de transfrutossilacção. A Figura (10) mostra resultados de atividade de transfrutossilacção e da concentração de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes de PLA, em função do tempo de cultivo submerso.

Durante as primeiras 16 h de cultivo e imobilização celular, observa-se de adaptação (“fase lag”), caracterizada pelo período em que as células ajustam seu metabolismo ao novo ambiente, sem a ocorrência imediata de multiplicação, e, conseqüentemente, sem d aumento significativo de massa (GODBEY, 2021). Em seguida, tem início a fase exponencial de crescimento (“fase log”), que se estende até cerca de 44 h de cultivo. Nessa etapa, ocorre o pico

de crescimento celular, atingindo uma concentração de células imobilizadas de aproximadamente $0,14 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{célula}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$.

Figura 10 - Atividade de transfrutossilação (barras cinzas) e concentração de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 (■) imobilizadas em suportes 3D de PLA



Fonte: Autora (2026)

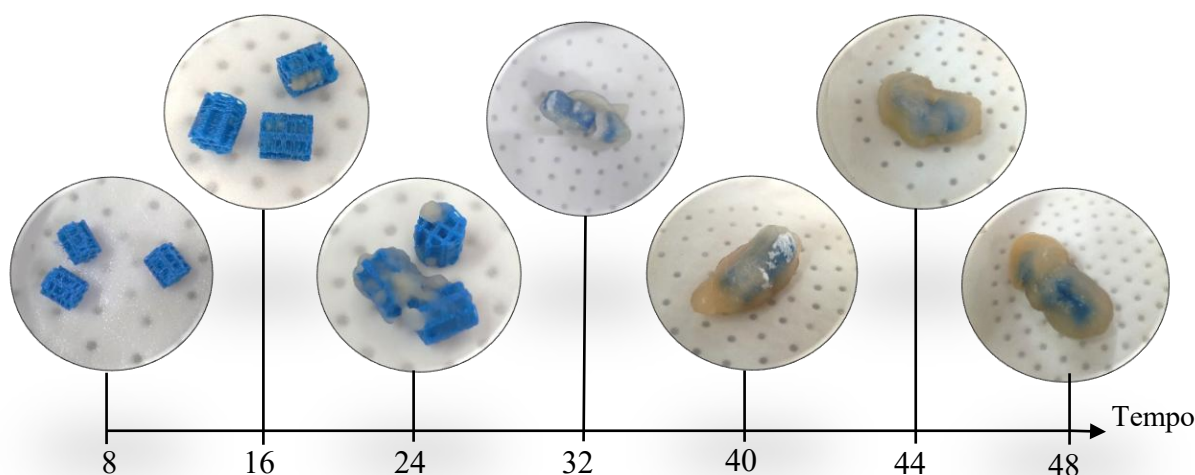
Nota - Condições de cultivo e imobilização: pH 5,5, 30 °C, 200 rpm e 48h.

O aumento na biomassa celular e da eficiência de imobilização está diretamente associado às características estruturais do suporte, especialmente ao tamanho e à distribuição de poros. A macroporosidade do material favorece a difusão de oxigênio e substrato para o interior do material polimérico, promovendo melhor desempenho no processo de crescimento e imobilização celular (MARTINEZ *et al.*, 2015; BARBOSA, 2022; ARANDA, 2024).

Embora o pico de concentração de células imobilizadas tenha sido observado em 44 h de cultivo submerso, verificou-se uma redução de 33,36 % na atividade do biocatalisador em relação ao valor obtido em 40 h de processo ($101,05 \pm 17,82 \text{ U g}^{-1}$). A partir de 44 h de cultivo, de acordo com a análise estatística, a concentração de células imobilizadas não apresentou diferença significativa, indicando que a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento celular. A fase de declínio ou morte celular não foi observada nas condições experimentais avaliadas, sugerindo a manutenção da viabilidade celular do sistema de imobilização durante o

período. A Figura 11 permitiu avaliar, de forma visual, o crescimento das células biocatalíticas nos suportes 3D, corroborando com o comportamento observado durante o cultivo submerso e o processo de imobilização celular.

Figura 11 – Crescimento e imobilização das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 nos suportes 3D de PLA em intervalos de tempo pré-definidos



Fonte: Autora (2026)

Nas primeiras 8 h de cultivo, não foi possível identificar crescimento na superfície externa do suporte. A partir de 16 h, as células biocatalíticas começaram a aderir à superfície, tornando-se mais evidentes após 24 h de processo. Em 32 h, observou-se um aumento na concentração de células, caracterizando o início da fase de crescimento exponencial, conforme indicado pela curva de crescimento microbiano (Figura 10). Entre 40 h e 48 h de cultivo, observou-se uma elevada concentração de células, sem variações visuais perceptíveis, indicando a estabilização do crescimento celular no suporte.

Mussatto *et al.* (2009) estudaram a produção e a imobilização de células de *Aspergillus japonicus* em matrizes cúbicas de esponja de poliuretano para a síntese de FOS. Sob condições de cultivo em meio sintético, a 28 °C, 160 rpm, após 48 h de processo, os autores obtiveram uma concentração de células imobilizadas de $0,48 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$. No mesmo estudo, foi também avaliada a imobilização celular em fibra vegetal, sob as mesmas condições operacionais, resultando em uma concentração de $1,25 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$. No estudo de Castro *et al.* (2017), foi avaliada a imobilização de células de *Aureobasidium pullulans* em materiais sintéticos, subprodutos agroindustriais e materiais minerais, visando à produção de FOS. A concentração de células imobilizadas e reticuladas em materiais sintéticos foi de aproximadamente $2,2 \pm 0,25 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$, após 25 h de cultivo celular, a 28 °C e 150 rpm. De

acordo com os autores, os materiais sintéticos apresentaram maior potencial de imobilização, entre os suportes avaliados, destacando-se como alternativas promissoras para processos biotecnológicos de síntese de FOS.

Barbosa (2022) investigou a imobilização de células *A. oryzae* IPT-301 em esponjas de poliuretano com geometria cúbica (0,8 cm de aresta), obtendo uma concentração de $11,89 \pm 2,29 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ após 32 horas de cultivo, em pH 5,5, 200 rpm e 30 °C. Santos (2024) avaliou a imobilização de células de *A. oryzae* IPT 301 em suportes de óxido de alumínio obtidos pela técnica de réplica, utilizando esponjas de poliuretano de 1 cm de aresta como molde. Nessa condição foi alcançada uma concentração máxima de células imobilizadas de $0,14 \pm 0,001 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$ após 48 h de cultivo em meio complexo (pH 5,5) a 200 rpm e 30 °C. No mesmo estudo, também foi investigada a imobilização celular em suportes de óxido de titânio produzidos pelo mesmo método de réplica, obtendo uma concentração celular máxima de $0,25 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{células}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$, nas mesmas condições experimentais e tempo de cultivo (48 h).

Em relação ao desempenho catalítico das células imobilizadas, a análise estatística indicou que os valores de atividade de transfrutoseilação do biocatalisador não apresentaram diferença significativa entre 32 h e 40 h de cultivo e imobilização celular. De acordo com Delvigne *et al.* (2014), em estudos envolvendo microrganismos e bioprocessos, é comum a ocorrência de variações associadas a diferentes fontes de heterogeneidade fenotípica, como reações metabólicas e influências do microambiente. Esses fatores podem levar a diferentes comportamentos celulares dentro de uma mesma população, ocasionando ampla distribuição dos dados e, conseqüentemente, maiores desvios estatísticos (DELVIGNE *et al.*, 2014). O tempo de cultivo e imobilização celular foi definido com base na concentração de células microbianas aderidas ao material de suporte 3D e, principalmente, no maior valor de atividade enzimática do biocatalisador obtido. Assim, verificou-se que, em 40 h de cultivo, foram produzidos e imobilizados $0,12 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{célula}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$, correspondendo aos maiores valores de atividade de transfrutoseilação ($101,05 \pm 17,82 \text{ U g}^{-1}$). Concentrações mais elevadas de células imobilizadas no suporte favorecem sua aplicação como leitos biocatalíticos em reatores de leito empacotado (PBR), minimizando a formação de caminhos preferenciais e zonas de estagnação do fluido no processo em fluxo contínuo (ZAMBELLI *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2024). Esse aspecto também foi considerado um fator determinante na definição do tempo ótimo de cultivo e de imobilização.

Biocatalisadores com alta atividade enzimática possibilitam a condução de processos de síntese de FOS com alto desempenho (CUNHA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2025). Garcia *et al.* (2021) e Ribeiro *et al.* (2024) reportaram as maiores atividades de transfrutoseilação

após 64 h de cultivo, sob as mesmas condições experimentais e utilizando a mesma cepa fúngica usada neste trabalho. Entretanto, os autores aplicaram um método distinto de imobilização, baseado no uso de células microbianas *in natura*, posteriormente reticuladas com glutaraldeído, o que pode justificar as diferenças observadas no desempenho catalítico em relação ao sistema de imobilização em suporte de PLA objeto desta pesquisa. De forma semelhante, Mussatto *et al.* (2012) obtiveram células de *Penicillium expansum* imobilizadas em matrizes de esponja vegetal, com maior valor de atividade enzimática após 48 h de cultivo, enquanto Cunha *et al.* (2019) relataram que 64 h de cultivo foram necessárias para atingir os maiores valores de atividade de transfrutossilacção em células *in natura* de *A. oryzae* IPT 301. Esses resultados reforçam que o tempo de cultivo ótimo pode variar amplamente conforme o tipo de microrganismo, o meio de cultivo e, sobretudo o método e o material de imobilização empregados.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, com elevada atividade de transfrutossilacção, podem ser produzidas e imobilizadas de forma concomitante, apresentando uma redução de 38 % no tempo de cultivo, em comparação às 64 h reportadas na literatura, e sendo aplicáveis à síntese de FOS. Esses resultados evidenciam uma vantagem significativa em termos de eficiência de processo, uma vez que a obtenção do biocatalisador em etapa única – englobando simultaneamente o cultivo e a imobilização das células microbianas - pode contribuir para a redução do tempo operacional, do consumo de reagentes e do gasto energético do processo enzimático (MUSSATTO *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2017).

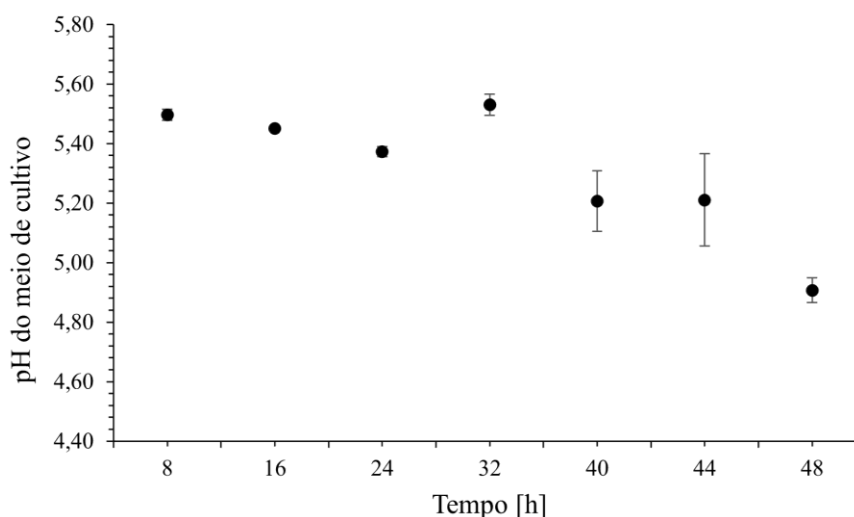
O método de imobilização proposto neste estudo, fundamentado na adesão e no crescimento celular em suportes de poliácido láctico (PLA) obtidos por impressão 3D, apresenta vantagens expressivas em comparação aos sistemas convencionais que empregam agentes reticulantes, como o glutaraldeído. Além de dispensar o uso de compostos potencialmente tóxicos e ambientalmente prejudiciais, o suporte de PLA destaca-se pela elevada biocompatibilidade, boa estabilidade mecânica e possibilidade de controle preciso da porosidade e da geometria, fatores que favorecem a difusão de nutrientes e oxigênio e, conseqüentemente, o desempenho catalítico (RINALDI *et al.*, 2021; REMONATTO *et al.*, 2023.)

A possibilidade de adaptar a geometria tridimensional do suporte conforme as exigências operacionais do processo amplia significativamente sua versatilidade, permitindo aplicação em distintas configurações reacionais, com destaque para reatores de leito fixo (PBR)

e sistemas contínuos voltados à produção de FOS. Dessa forma, embora as concentrações celulares obtidas sejam inferiores às reportadas em alguns trabalhos da literatura, o sistema de imobilização em PLA desenvolvido apresenta elevada eficiência catalítica e estabilidade operacional, configurando-se como uma alternativa sustentável, segura e tecnicamente consistente para processos biotecnológicos baseados em células imobilizadas.

Também foi monitorada a variação do pH do caldo de cultivo ao longo de todo o processo (Figura 12). Inicialmente, o pH apresentava valor de 5,5, permanecendo praticamente constante até aproximadamente 24 h de cultivo. A partir de 40 h, observou-se um leve declínio nos valores de pH, possivelmente associado à produção de proteases ácidas por *A. oryzae*, as quais promovem a clivagem de ligações peptídicas e a consequente liberação de aminoácidos, resultando na acidificação do meio de cultura (TSUJITA *et al.*, 1997; CUNHA *et al.*, 2019). Além disso, Park *et al.* (2019) relataram que valores mais baixos de pH favorecem a formação de ácidos orgânicos, contribuindo adicionalmente para a acidificação do meio durante o cultivo submerso de cepas de *A. oryzae*.

Figura 12 - Monitoramento do pH do meio de cultura de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em suportes 3D de PLA, em função do tempo de cultivo



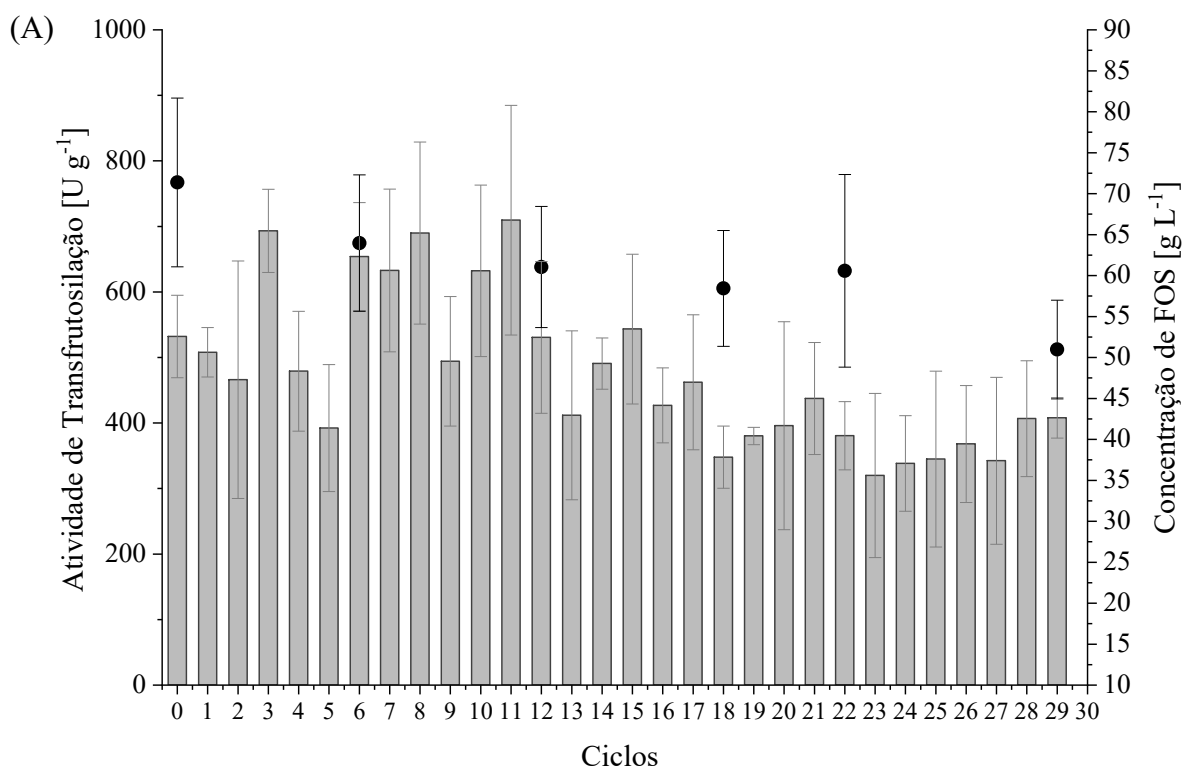
Fonte: Autora (2026)

5.3 ESTABILIDADE OPERACIONAL EM MODO BATELADA E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO

A estabilidade operacional das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em suportes tridimensionais (3D) de PLA, foi avaliada ao longo de 29 ciclos reacionais

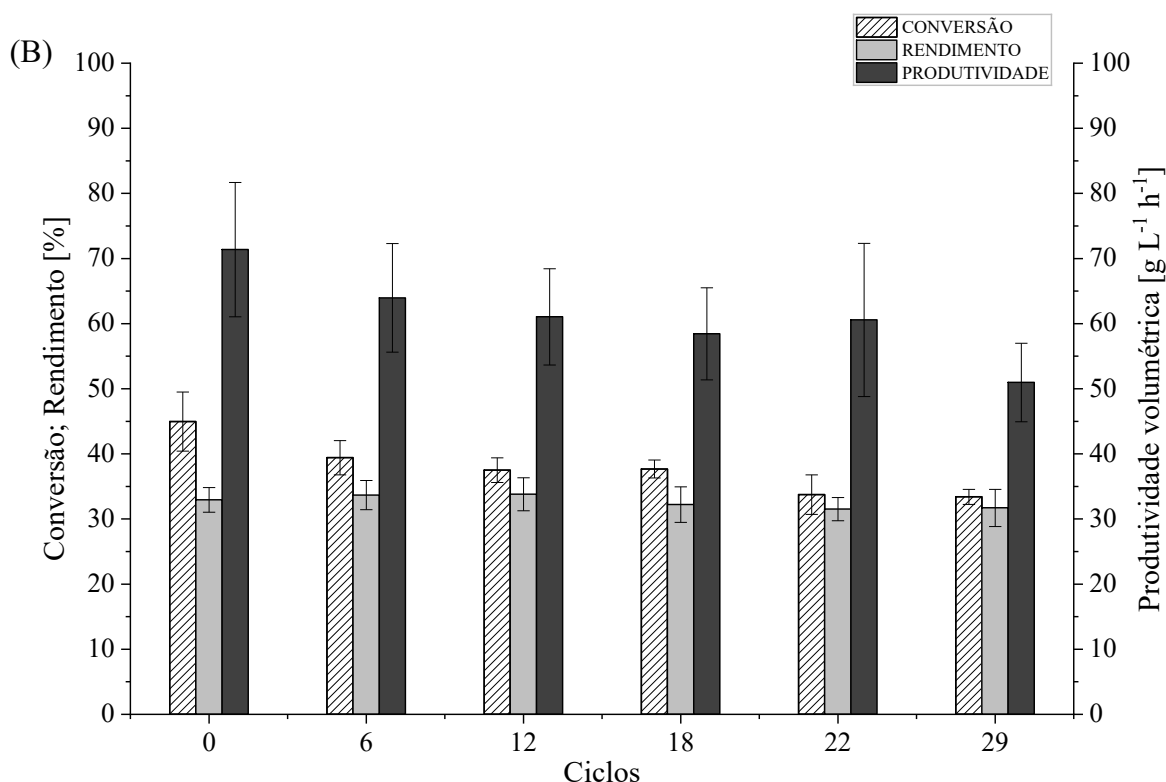
consecutivos em modo batelada (Figura 13A). No ciclo inicial, foram produzidos $71,37 \pm 10,31 \text{ g L}^{-1}$ de FOS, com conversão e rendimento de $46,96 \pm 4,55 \%$ e $32,93 \pm 1,89 \%$, respectivamente, conforme apresentado na Figura 13B. O maior valor da atividade de transfrutossilção (A_T) foi observado no décimo primeiro ciclo, atingindo $709,52 \pm 175,27 \text{ U g}^{-1}$. No décimo segundo ciclo consecutivo, o biocatalisador apresentou conversão de $37,50 \pm 1,88 \%$, rendimento de $33,80 \pm 2,54 \%$ e produtividade de $61,05 \pm 7,39 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ do açúcar prebiótico. De acordo com o teste de *Tukey*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de atividade comparadas.

Figura 13 – (A) Avaliação da estabilidade operacional de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes 3D de PLA durante ciclos reacionais consecutivos em modo batelada (barras cinzas) e concentração de fruto-oligossacarídeos (●) (B) Parâmetros de desempenho (conversão, rendimento e produtividade) para o ensaio de estabilidade operacional, ao longo de 29 ciclos consecutivos



Fonte: Autora (2026)

Nota - Condições experimentais: a reação foi realizada em meio constituído por 3,8 mL de sacarose P.A (480 g L^{-1}) e 1,2 mL de tampão tris-acetato pH 5,5 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), com velocidade de agitação de 190 rpm, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 minutos.



Fonte: Autora (2026)

Nota: Parâmetros de desempenho obtidos por meio das Equações (1), (2) e (3) apresentadas no tópico (4.2.1).

No último ciclo, a A_T foi de $407,87 \pm 30,94 \text{ U g}^{-1}$, o que corresponde a uma redução de aproximadamente 42 % em relação ao valor máximo obtido e uma retenção de cerca de 76,5 % da atividade inicial. Além disso, ao final dos ensaios (29º ciclo operacional), foram obtidos os seguintes valores médios: concentração de FOS de $50,97 \pm 6,03 \text{ g L}^{-1}$, conversão de $33,4 \pm 1,15 \%$, rendimento de $31,7 \pm 2,86 \%$ e produtividade de $50,97 \pm 6,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esses resultados correspondem a uma redução de aproximadamente 26 % na conversão inicial e 29 % na produtividade. Tal comportamento pode estar associado à desativação térmica dos sítios ativos do biocatalisador, que permaneceu exposto por até 29 h consecutivas a 50 °C. Embora a reintrodução do biocatalisador em um meio reacional sob condições experimentais semelhantes promova a renovação da concentração de substrato, ocorre simultaneamente um aumento na quantidade de sítios ativos termicamente desativados, região na qual se processa a reação enzimática (ARANDA, 2024; SAQIB *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2022).

Aranda (2024) reportou que os biocatalisadores, produzidos por meio da imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em bucha vegetal, apresentaram produtividade de $63,88 \pm 11,45 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ após 12 ciclos reacionais consecutivos, e uma redução de 50 % da conversão inicial. Destaca-se que a bucha vegetal utilizada como suporte no referido trabalho,

é um material orgânico, com estrutura macroporosa não uniforme e elevada flexibilidade, características que podem ter influenciado a transferência de massa e a estabilidade operacional do sistema ao longo dos ciclos.

Em termos de atividade, Garcia *et al.* (2021) reportaram um aumento da estabilidade operacional mediante reticulação de células de *A. oryzae* IPT-301 com glutaraldeído 25 % (v v⁻¹), demonstrando que, após 12 ciclos reacionais consecutivos, o biocatalisador reteve 88,9 % da atividade inicial. De forma semelhante, Gonçalves *et al.* (2020), mostraram que a atividade de transfrutossilção de células de *A. oryzae* IPT-301, reticuladas e encapsuladas em alginato de cálcio, mantiveram até 92 % da atividade inicial para cinco ciclos reacionais consecutivos. Por outro lado, Barbosa (2022) avaliou a estabilidade das células de *A. oryzae* IPT-301 submetidas aos processos de imobilização e imobilização seguida de reticulação ao longo de 12 ciclos reacionais consecutivos, observando que retenções de atividade enzimática de 50,23 % e 60,90 %, respectivamente.

Santos (2024) avaliou a estabilidade de células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em óxido de titânio ao longo de 20 ciclos reacionais, observando uma redução de apenas 30 % entre os valores máximo e mínimo de atividade registrados. O maior valor de atividade foi obtido no sétimo ciclo, correspondendo a $1421,56 \pm 43,24 \text{ U g}^{-1}$. Em comparação com os resultados do presente trabalho, nota-se que os valores reportados por Santos (2024) são significativamente mais elevados. No entanto, essa diferença pode ser atribuída ao uso de suportes com geometria cúbica e a maiores concentrações de células imobilizadas, o que justifica, de forma proporcional, os maiores valores de atividade observados.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os dados da literatura, que evidenciam a maior estabilidade operacional conferida pela imobilização celular, e destacam o potencial dos suportes 3D de PLA como matriz de imobilização, uma vez que possibilitaram a condução de 29 ciclos reacionais consecutivos, número superior aos usualmente reportados em estudos anteriores. Esses resultados indicam que os suportes 3D de PLA apresentam boa resistência mecânica e compatibilidade com o sistema biocatalítico, favorecendo a manutenção da atividade de transfrutossilção ao longo de múltiplos ciclos.

A Figura 14 apresenta os biocatalisadores heterogêneos obtidos em triplicata após a realização de 29 ciclos reacionais consecutivos. Durante o ensaio, não foi observado despreendimento de células do suporte, nem mesmo perda do material em decorrência das forças cisalhantes. No entanto, o experimento foi encerrado no 29º ciclo, uma vez que, a partir das etapas finais de filtração, observou-se que as células começaram a se desprender, o que poderia

levar à perda de biomassa imobilizada e comprometer a reprodutibilidade dos ciclos subsequentes.

Figura 14 – Biocatalisadores heterogêneos obtidos após 29 ciclos reacionais



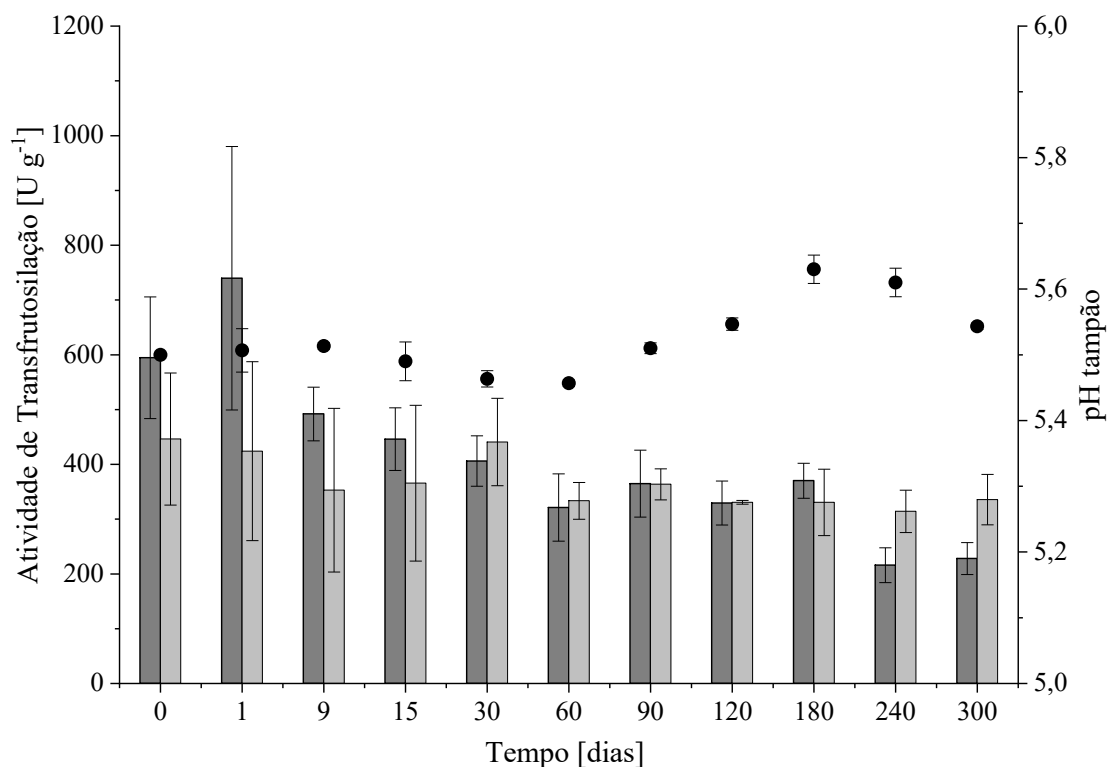
Fonte: Autora (2026)

5.4 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DOS BIOCATALISADORES

A Figura 15 apresenta o perfil de estabilidade de armazenamento das células biocatalíticas imobilizadas em suportes 3D de PLA, mantidas sob refrigeração, na ausência e na presença de solução tampão tris-acetato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5), ao longo de 300 dias. As atividades de transfrutoseilação foram monitoradas durante o período de estocagem e determinadas a partir da massa seca dos biocatalisadores.

A atividade inicial obtida neste ensaio foi de $594,63 \pm 111,13 \text{ U g}^{-1}$ para os biocatalisadores armazenados em solução tampão e de $446,30 \pm 120,61 \text{ U g}^{-1}$ para aqueles armazenados na ausência de tampão. Após 300 dias de armazenamento, verificou-se maior estabilidade das células biocatalíticas mantidas sem tampão, que apresentaram retenção de 75,2 % da atividade inicial ($335,57 \pm 46,06 \text{ U g}^{-1}$). Em contraste, as células armazenadas em solução tampão apresentaram redução de 61,7 % da atividade enzimática ($227,94 \pm 29,14 \text{ U g}^{-1}$) em relação ao valor inicial.

Figura 15 - Estabilidade de armazenamento de células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suportes de PLA. Biocatalisador heterogêneo armazenado em solução tampão (barras em cinza escuro), na ausência de solução tampão (barras em cinza claro) e monitoramento do controle (solução tampão, ●)



Fonte: Autora (2026)

Nota - Condições experimentais: a reação foi conduzida em meio composto por 3,8 mL de sacarose P.A (480 g L⁻¹) e 1,2 mL de tampão tris-acetato pH 5,5 (0,2 mol L⁻¹), sob de agitação de 190 rpm, a 50 °C, durante 60 min. Os biocatalisadores foram armazenados sob refrigeração (4 °C) , na ausência e presença de solução tampão tris-acetato (0,2 mol L⁻¹, pH 5,5).

Embora os resultados tenham apresentado certa variabilidade nos primeiros 15 dias de armazenamento, o teste estatístico, ao nível de 95 % de confiança, indicou que não houve diferença significativa entre os valores de atividade obtidos nas duas condições ao longo do ensaio.

Gonçalves *et al.* (2020) relataram que a biomassa de *Aspergillus oryzae* IPT-301, reticulada e encapsulada em alginato de baixa viscosidade, apresentou redução de aproximadamente 5 % da atividade de transfrutossilatação inicial após nove dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C). No estudo de Barbosa (2022), utilizando células do mesmo microrganismo imobilizadas em esponja de poliuretano, foi observada maior estabilidade de armazenamento nos primeiros sete dias de incubação. Após 28 dias, as células mantiveram 43 % da atividade inicial (396,89 ± 98,32 U g⁻¹).

De forma semelhante, Santos (2024) avaliou células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em óxido de titânio e armazenadas por 70 dias no mesmo tampão e pH. O autor relatou atividades elevadas e estatisticamente semelhantes nos dias 0 e 1 ($195,25 \pm 15,3 \text{ U g}^{-1}$ e $182,84 \pm 9,5 \text{ U g}^{-1}$, respectivamente), seguidas por redução de 53 % da atividade a partir do terceiro dia, mantendo-se constante até 30 dias. Ao final do período experimental, os biocatalisadores retiveram 17 % da atividade inicial.

Aranda (2024) verificou que as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em esponja vegetal, mantiveram sua atividade praticamente constante até o terceiro dia de armazenamento em solução tampão tris-acetato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5), apresentando valor aproximado de $1153,23 \pm 27,80 \text{ U g}^{-1}$. Em contraste, as células armazenadas na ausência de solução tampão apresentaram redução da atividade já no segundo dia de armazenamento, alcançando $780,93 \pm 40,60 \text{ U g}^{-1}$. Ao final do período de armazenamento, após 48 dias, observaram que as células biocatalíticas retiveram 10,8 % de sua atividade inicial quando estocadas em solução tampão e apenas 2,5 % quando armazenadas sem tampão.

A capacidade de armazenamento dos biocatalisadores constitui um parâmetro essencial para avaliação de sua aplicabilidade em processos industriais. Nesse contexto, maior estabilidade de armazenamento está diretamente associada a maior eficiência operacional, permitindo redução de tempo, custos de produção e necessidade de reposição de biocatalisadores (ARAÚJO *et al.*, 2022).

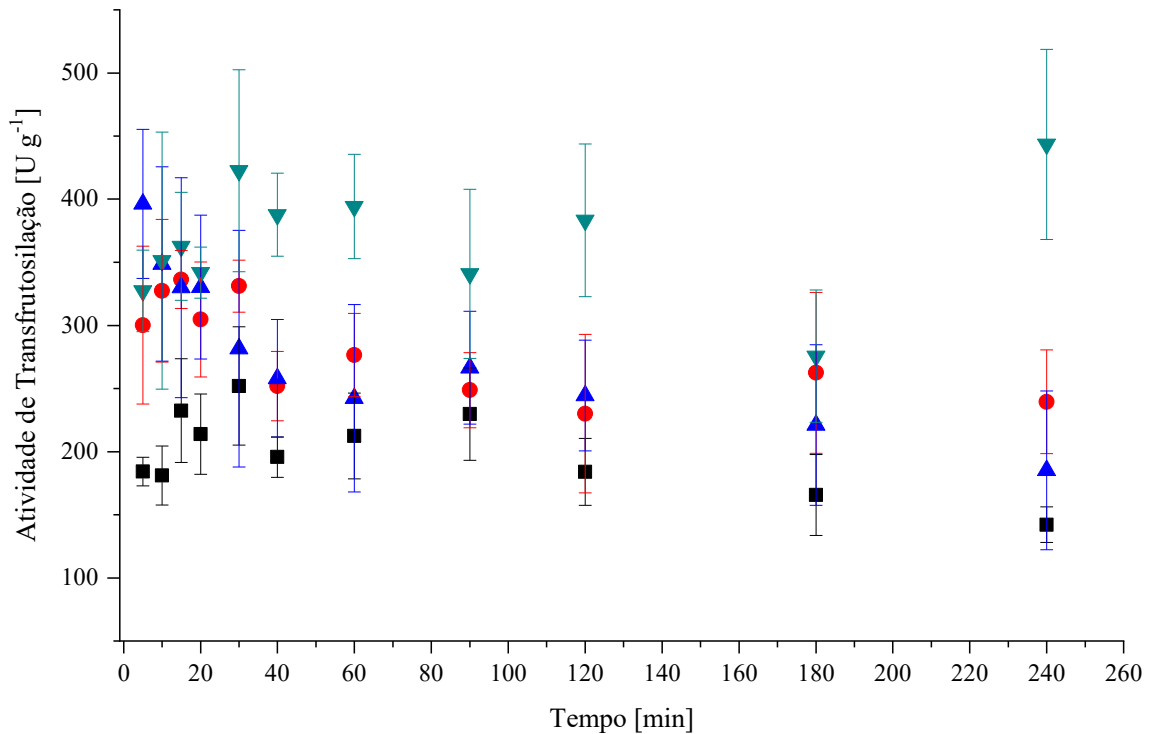
5.5 INFLUÊNCIA DA VAZÃO VOLUMÉTRICA DE ALIMENTAÇÃO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A influência da vazão volumétrica de alimentação do substrato na atividade de transfrutossilção foi avaliada, e os perfis de atividade do biocatalisador no reator PBR estão apresentados na Figura 16. Observa-se que o sistema reacional atingiu o estado estacionário a partir de 30 minutos de operação, mantendo-se estável até o final do ensaio aos 240 minutos, para todas as vazões avaliadas.

Nos primeiros pontos de coleta, foi identificado o período de estabelecimento do perfil de escoamento, caracterizado pela acomodação do fluido no leito do reator. A vazão de 1 mL min^{-1} apresentou os menores valores de atividade de transfrutossilção, variando de $184,5 \pm 11,28 \text{ U g}^{-1}$ a $142,14 \pm 14,04 \text{ U g}^{-1}$. As vazões de 4 e 6 mL min^{-1} exibiram intervalos de atividade semelhantes, compreendidos entre $300,17 \pm 62,57 \text{ U g}^{-1}$ e $239,44 \pm 41,09 \text{ U g}^{-1}$ e

$396,25 \pm 59,03 \text{ U g}^{-1}$ a $185,21 \pm 62,88 \text{ U g}^{-1}$, respectivamente, indicando desempenhos médios próximos entre ambas as condições.

Figura 16 - Atividade de transfrutoseilação em função da vazão volumétrica de alimentação do substrato no reator PBR. Vazões volumétricas avaliadas: 1 mL min^{-1} (■), 4 mL min^{-1} (●), 6 mL min^{-1} (▲), 8 mL min^{-1} (▼)



Fonte: Autora (2026)

Nota - Condições experimentais: a reação foi conduzida com alimentação de sacarose a 480 g L^{-1} , pH 5,5 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 240 minutos.

Por outro lado, a vazão de 8 mL min^{-1} apresentou os maiores valores de atividade, variando de $327,37 \pm 32,34 \text{ U g}^{-1}$ a $443,37 \pm 75,19 \text{ U g}^{-1}$, o que sugere maior eficiência catalítica do sistema sob condições de maior fluxo volumétrico. Em reatores PBR, baixas vazões volumétricas favorecem a formação de uma camada limite difusional mais espessa ao redor das partículas de biocatalisador, fazendo com que a taxa de reação passe a ser controlada pela transferência de massa externa (DIAS *et al.*, 2022). Com o aumento da vazão volumétrica, observa-se a redução dessa camada limite, o que intensifica o transporte de substrato até a superfície do biocatalisador, onde ocorre a reação enzimática (FOGLER, 2022).

Ao comparar as atividades médias entre as diferentes vazões testadas, observa-se um aumento progressivo da atividade de transfrutoseilação (A_T) da vazão mais baixa (1 mL min^{-1}) para a mais alta (8 mL min^{-1}). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que baixas

vazões favorecem a formação de uma camada limite mais espessa ao redor das partículas do biocatalisador, tornando o processo limitado pela transferência de massa externa. Com o aumento das vazões volumétricas, a espessura da camada limite diminui, reduzindo a resistência à transferência de massa e facilitando o acesso do substrato à superfície do biocatalisador, local onde ocorre a reação (FOGLER, 2022).

Apesar disso, a proximidade entre os valores de A_T observados para as vazões intermediárias (4 e 6 mL min⁻¹) sugere que, nessa faixa, os efeitos difusionais tornam-se pouco expressivos, prevalecendo os efeitos do fluxo e da cinética da reação (DIAS *et al.*, 2022).

No estudo de Dias *et al.* (2022), foi avaliada a influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilção de células *in natura* de *A. oryzae* IPT-301 em reator PBR, operado em diferentes vazões (5; 7,5; 11,5; 15 e 20 mL min⁻¹). A reação foi conduzida por 45 minutos, utilizando solução reagente composta por sacarose comercial (473 g L⁻¹ e tampão tris-acetato (0,2 mol L⁻¹, pH 5,5,) e. Os resultados mostraram que o aumento da vazão até 15 mL min⁻¹ promoveu elevação da atividade de transfrutossilção, enquanto a vazão de 20 mL min⁻¹ resultou em redução da atividade devido ao menor tempo de residência e ao contato insuficiente entre o substrato e o biocatalisador. As vazões intermediárias (7,5; 11,5 e 15,0 mL min⁻¹) apresentaram valores de atividade próximos entre si, sendo o menor valor registrado para a vazão (5 mL min⁻¹). Neste estudo, a variação de atividade de transfrutossilção ficou entre aproximadamente 350 e 650 U g⁻¹.

De modo semelhante, Ribeiro *et al.* (2024) imobilizaram células de *A. oryzae* IPT-301 por reticulação com glutaraldeído, avaliando seus efeitos biocatalíticos em reator de leito fixo (PBR). A influência da vazão volumétrica foi avaliada alimentando-se o reator com solução de sacarose comercial (473 g L⁻¹, pH 5,5), por 150 minutos de reação, em diferentes vazões (1, 2, 3, 4 e 5 mL min⁻¹). Os autores verificaram que a vazão de 1 mL min⁻¹ foi a mais adequada nas condições testadas, pois proporcionou maior tempo de residência do substrato, favorecendo o contato com o biocatalisador e reduzindo o arraste das partículas, o que resultou em melhor desempenho na reação de transfrutossilção.

Ao avaliar os parâmetros de desempenho (produtividade volumétrica e produtividade específica) para cada vazão investigada (Tabela 4), observou-se que, conforme esperado, o aumento da vazão resultou em elevação gradual da produtividade. Esse comportamento é característico de reatores contínuos, nos quais o aumento da vazão implica maior taxa de processamento de substrato por unidade de tempo, podendo elevar a taxa de formação de produto (FOGLER, 2022). De forma análoga ao observado para a produtividade volumétrica, a produtividade específica também apresentou aumento com o aumento da vazão de substrato.

Verifica-se que o aumento da vazão de 1 para 4 mL min⁻¹, resultou em um acréscimo de 63 % na produtividade. Entretanto, ao se promover novo aumento da vazão, de 4 para 8 mL min⁻¹, o incremento obtido foi de aproximadamente 19 %. Esses resultados indicam que o ganho de produtividade não é proporcional ao aumento da vazão. Assim, sob a perspectiva da produtividade, conforme Tabela 4, o emprego de vazões mais elevadas não proporciona vantagem operacional expressiva para o sistema reacional avaliado, uma vez que, embora a vazão de 8 mL min⁻¹ tenha apresentado os maiores valores de atividade, o aumento da vazão de 4 para 8 mL min⁻¹ não resultou em incremento proporcional na produtividade.

Tabela 4 - Avaliação da produtividade de FOS em função da vazão volumétrica de alimentação no reator PBR

Vazão volumétrica [mL min⁻¹]	Produtividade volumétrica [g L⁻¹ h⁻¹]	Produtividade específica [g_{FOS} g_{célula}⁻¹ h⁻¹]
1	138,79 ± 3,16	7,26 ± 0,16
4	375,75 ± 18,61	15,58 ± 0,77
6	378,85 ± 50,96	12,7 ± 1,71
8	462,61 ± 9,05	23,43 ± 0,46

Fonte: Autora (2026)

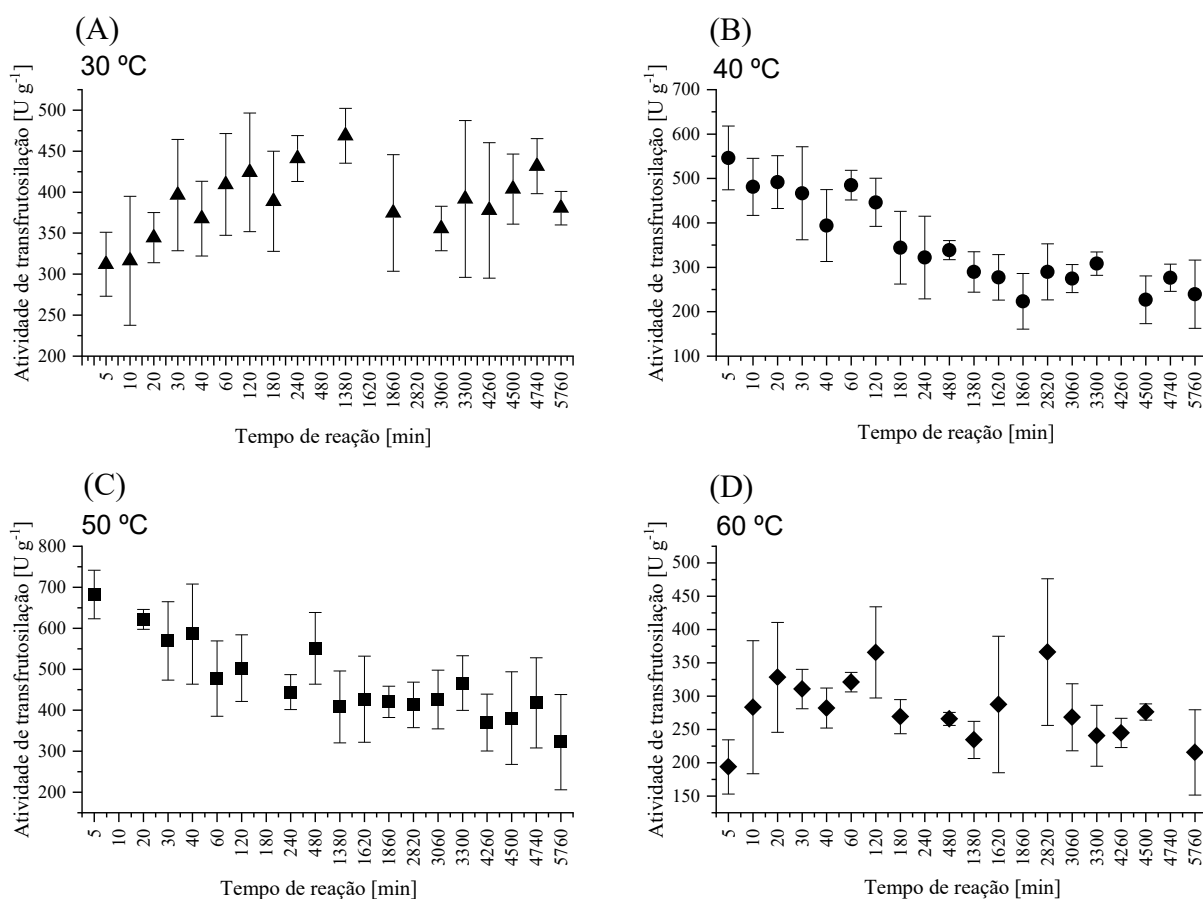
Nota: Parâmetros de desempenho obtidos por meio das Equações (5), (6) e (7) apresentadas no tópico (4.3.2).

De modo geral, a comparação dos resultados indica que a vazão volumétrica exerce influência direta sobre a atividade de transfrutossilção, em função do balanço entre o tempo de residência do substrato no reator e os fenômenos de transferência de massa. Vazões reduzidas, embora prolonguem o contato entre o substrato e o biocatalisador, podem intensificar gradientes de concentração e limitações difusionais externas, comprometendo a taxa global de reação (FOGLER, 2022; SHULER & KARGI, 2002). Em contrapartida, vazões elevadas diminuem o tempo de residência, restringindo o aproveitamento catalítico do sistema (FOGLER, 2022; LEVENSPIEL, 1999). Nas condições avaliadas neste estudo, a vazão de 8 mL min⁻¹ proporcionou o melhor desempenho, sugerindo que o regime hidrodinâmico estabelecido e a arquitetura dos suportes tridimensionais de PLA favoreceram uma distribuição homogênea do fluxo e um acesso eficiente do substrato aos sítios ativos, resultando na maximização da atividade de transfrutossilção e evidenciando a robustez operacional do sistema frente a diferentes condições de escoamento.

5.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OPERACIONAL EM MODO DE OPERAÇÃO CONTÍNUO E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO

A estabilidade operacional dos biocatalisadores produzidos foi avaliada durante 96 h de operação contínua em reator de leito fixo, nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. Os experimentos foram conduzidos conforme o procedimento descrito no Tópico 4.3.3, e os resultados estão apresentados na Figura 17.

Figura 17 - Perfis de atividade de transfrutossilação em função do tempo em diferentes temperaturas para a avaliação da estabilidade operacional dos biocatalisadores heterogêneos



Fonte: Autora (2026)

Nota - Condições experimentais: a reação foi conduzida com alimentação de sacarose a 480 g L⁻¹, pH 5,5 (0,2 mol L⁻¹), vazão de 1mL min⁻¹, durante 96 h.

Na condição de 30 °C (Figura 17A), a atividade inicial foi de $311,99 \pm 38,99$ U g⁻¹. Observou-se um discreto aumento da atividade nos primeiros minutos de operação, seguido de estabilização a partir de aproximadamente 30 minutos. Esse comportamento pode estar associado a uma fase inicial de acomodação hidrodinâmica do sistema, possivelmente

relacionada à redistribuição do fluxo no leito e à melhoria do contato entre o substrato e o biocatalisador (FOGLER, 2022; LEVENSPIEL, 1999). Após 96 h de operação, foi registrada uma atividade de $380,5 \pm 20,45 \text{ U g}^{-1}$, indicando elevada estabilidade ao longo do processo. A análise estatística pelo teste de Tukey confirmou a ausência de diferenças significativas entre os valores obtidos ao longo do tempo de operação. Na temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 17B), a atividade inicial foi de $546,42 \pm 71,81 \text{ U g}^{-1}$, sendo a mais elevada entre as condições avaliadas. Entretanto, observou-se redução gradual da atividade ao longo do período experimental. Ao final do ensaio (96 h), a atividade enzimática foi de $239,41 \pm 76,78 \text{ U g}^{-1}$, correspondendo a uma diminuição de 56,2 % em relação ao valor inicial. Apesar dessa redução, o sistema manteve funcionamento estável durante todo o período de operação contínua, conforme indicado pela análise estatística. Esses resultados sugerem que, mesmo sob condição térmica mais elevada, o biocatalisador preserva atividade catalítica quando submetido ao escoamento em fluxo contínuo.

Similarmente, na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 17C), o sistema apresentou atividade inicial mais elevada ($682,48 \pm 59,12 \text{ U g}^{-1}$), seguida por redução ao longo das 96 h, com atividade final de $322,31 \pm 116,15 \text{ U g}^{-1}$. Ainda assim, não foram observados indícios de instabilidade estrutural do leito, como perdas abruptas de atividade ou aumento da variabilidade experimental. Após 96 h de operação, o biocatalisador apresentou redução de 52,77 % da atividade inicial, resultado que pode ser considerado satisfatório diante do prolongado período de reação. Na temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 17D), a atividade inicial foi de $193,80 \pm 40,67 \text{ U g}^{-1}$, e atingindo um pico aos 20 minutos de reação, valor de máxima atividade obtida nesta condição ($328,20 \pm 82,49 \text{ U g}^{-1}$). Apesar das oscilações observadas ao longo do ensaio, não houve desativação brusca ou interrupção do processo, e os resultados não apresentaram diferença estatística significativa. Após 96 h, a atividade foi de $215,58 \pm 64,06 \text{ U g}^{-1}$, correspondendo a uma redução de 34,3 % em relação ao valor máximo obtido.

Ao comparar as atividades médias obtidas nas diferentes temperaturas avaliadas, observaram-se valores de 387,33; 353,85; 471,50 e 279,62 U g^{-1} para 30, 40, 50 e $60 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Verifica-se redução mais acentuada da atividade a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, comportamento consistente com o aumento da taxa de desativação térmica em temperaturas elevadas, uma vez que a elevação da temperatura pode comprometer a estabilidade estrutural da enzima e favorecer sua desnaturação (RAHBAN *et al.*, 2022).

Até o momento, não foram identificados na literatura científica estudos que avaliem a desativação catalítica ao longo de 96 h de operação contínua utilizando células do gênero

Aspergillus em reatores de leito fixo para a produção de FOS. O único trabalho encontrado com abordagem semelhante é o de Mello (2025), que investigou a estabilidade operacional de células fúngicas do mesmo gênero empregado no presente estudo, imobilizadas em esponja de poliuretano, também ao longo de 96 h de operação. Nesse estudo, o autor relatou valores elevados de atividade de transfrutossilção (A_T) durante as primeiras 12 h de operação para temperaturas de leito de 40 e 50 °C, enquanto, a 60 °C, foi observado um decaimento acentuado da atividade enzimática. Para os ensaios conduzidos a 30 °C, não foi reportada desativação enzimática significativa ao longo do período de operação, comportamento semelhante ao observado nos perfis experimentais obtidos no presente estudo.

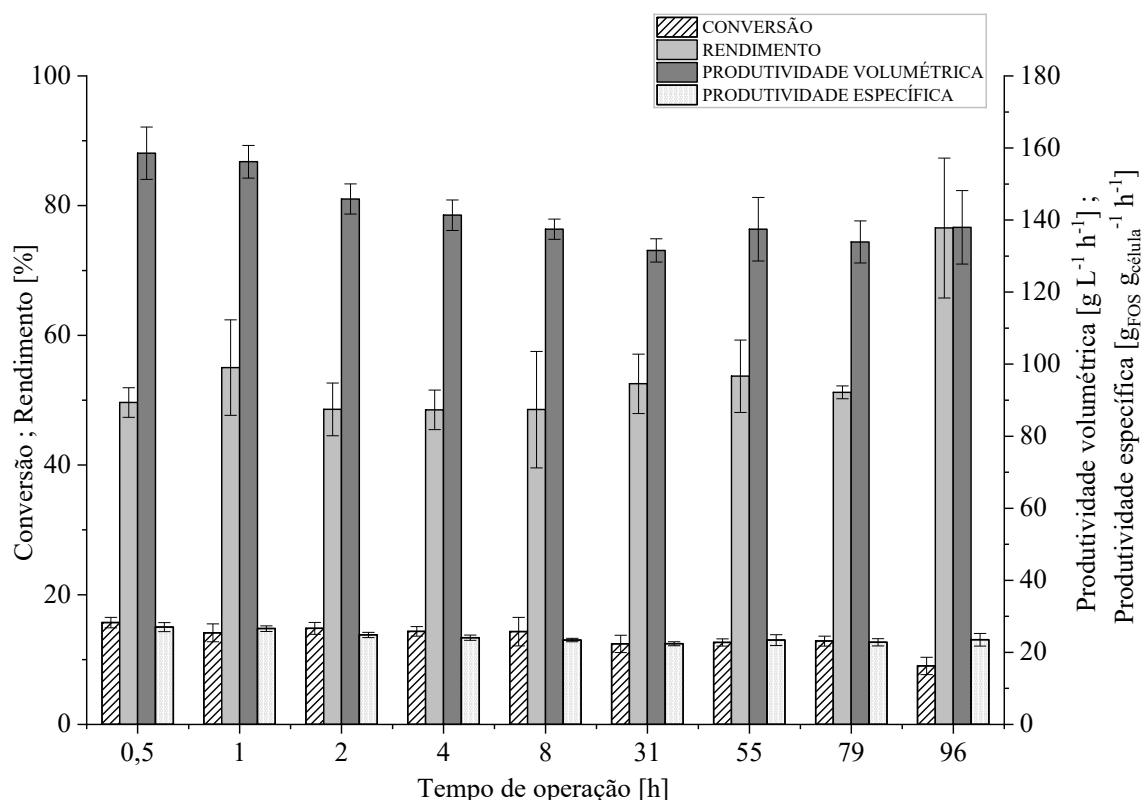
No estudo de estabilidade operacional conduzido por Dias *et al.* (2022), foram avaliadas células *in natura* de *A. oryzae* IPT-301 em reator de leito fixo (PBR), operado a 50 °C durante 12 h, com vazões de alimentação de substrato de 5 e 11,5 mL min⁻¹, evidenciando desempenho estável do sistema. Para a vazão de 5 mL min⁻¹, a atividade de transfrutossilção (A_T) manteve-se praticamente constante ao longo das 12 h de operação, em torno de 253 U g⁻¹. Por outro lado, na vazão de 11,5 mL min⁻¹, observou-se uma redução aproximada de 27 % no valor de A_T entre 35 e 180 min de reação, seguida de estabilização até o término do ensaio, atingindo 384 ± 50 U g⁻¹. Além disso, os autores reportaram um aumento de até 40 vezes na produtividade enzimática dos biocatalisadores quando operados em sistema contínuo, em comparação com processos em batelada descritos na literatura.

No presente trabalho, os parâmetros de desempenho do processo (conversão, rendimento e produtividade) foram avaliados a 50 °C (Figura 18), temperatura que apresentou a maior atividade enzimática média ao longo das 96 h de operação, razão pela qual também foi adotada nos demais ensaios conduzidos em reator de leito fixo. Nos primeiros 30 minutos de reação, obteve-se concentração de FOS de $37,36 \pm 1,71$ g L⁻¹, produtividade volumétrica de $158,55 \pm 7,25$ g L⁻¹ h⁻¹ e rendimento de $49,64 \pm 2,29$ %. Ao final do ensaio, embora tenha sido observada redução de 44,3 % na conversão, verificou-se um incremento de 35 % no rendimento, resultando em concentração final de $32,51 \pm 2,41$ g L⁻¹ e produtividade volumétrica de $137,97 \pm 10,21$ g L⁻¹ h⁻¹ do açúcar prebiótico. Em termos de produtividade específica, ao longo das 96 h de reação, os biocatalisadores apresentaram produtividade específica média global de $24,23 \pm 1,52$ g_{FOS} g_{células}⁻¹ h⁻¹.

Aranda (2024) avaliou a produção de FOS em reator empacotado com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em bucha vegetal, durante 180 minutos de reação (400 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,5 e 50 °C), obtendo concentração de 26,51 g L⁻¹ de FOS. Cardoso (2023), sob as mesmas condições experimentais e em regime estacionário, utilizou células da mesma

cepa microbiana imobilizadas em esponja de poliuretano em reator PBR operado por 12 h, alcançando concentração de 70 g L^{-1} do bioproduto. Por sua vez, Lorenzoni *et al.* (2015) investigaram a produção contínua de FOS em reator PBR operando a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,5 e 600 g L^{-1} de sacarose, com células de *Aspergillus aculeatus* imobilizadas em quitosana, obtendo concentração máxima de 230 g L^{-1} do açúcar prebiótico.

Figura 18 - Parâmetros de desempenho (conversão, rendimento, produtividade volumétrica e produtividade específica) obtidos nos ensaios de estabilidade operacional em sistema contínuo ao decorrer de 96 h de processo em reator PBR



Fonte: Autora (2026)

Nota: Parâmetros de desempenho obtidos por meio das Equações (1), (2), (5), (6) e (7) apresentadas nos tópicos (4.2.1) e (4.3.2).

Embora existam estudos conduzidos por períodos mais prolongados, os biocatalisadores empregados em reatores de leito fixo (PBR) para produção de FOS foram obtidos a partir de diferentes cepas fúngicas, como por exemplo os trabalhos de Jung *et al.* (2011), que utilizaram células de *Aureobasidium pullulans* imobilizadas em alginato de cálcio em ensaios com duração superior a 100 dias, alcançando produtividade de $180 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de FOS, e de Zambelli *et al.* (2016), que realizaram experimentos contínuos por até 7 dias com células de *Cladosporium cladosporioides* imobilizadas em alginato de sódio. Nesse estudo, foi observada produção

máxima de 313 g L⁻¹ de FOS em 20 h de tempo de residência, em sistema contínuo operando a pH 6 e 600 g L⁻¹ de sacarose.

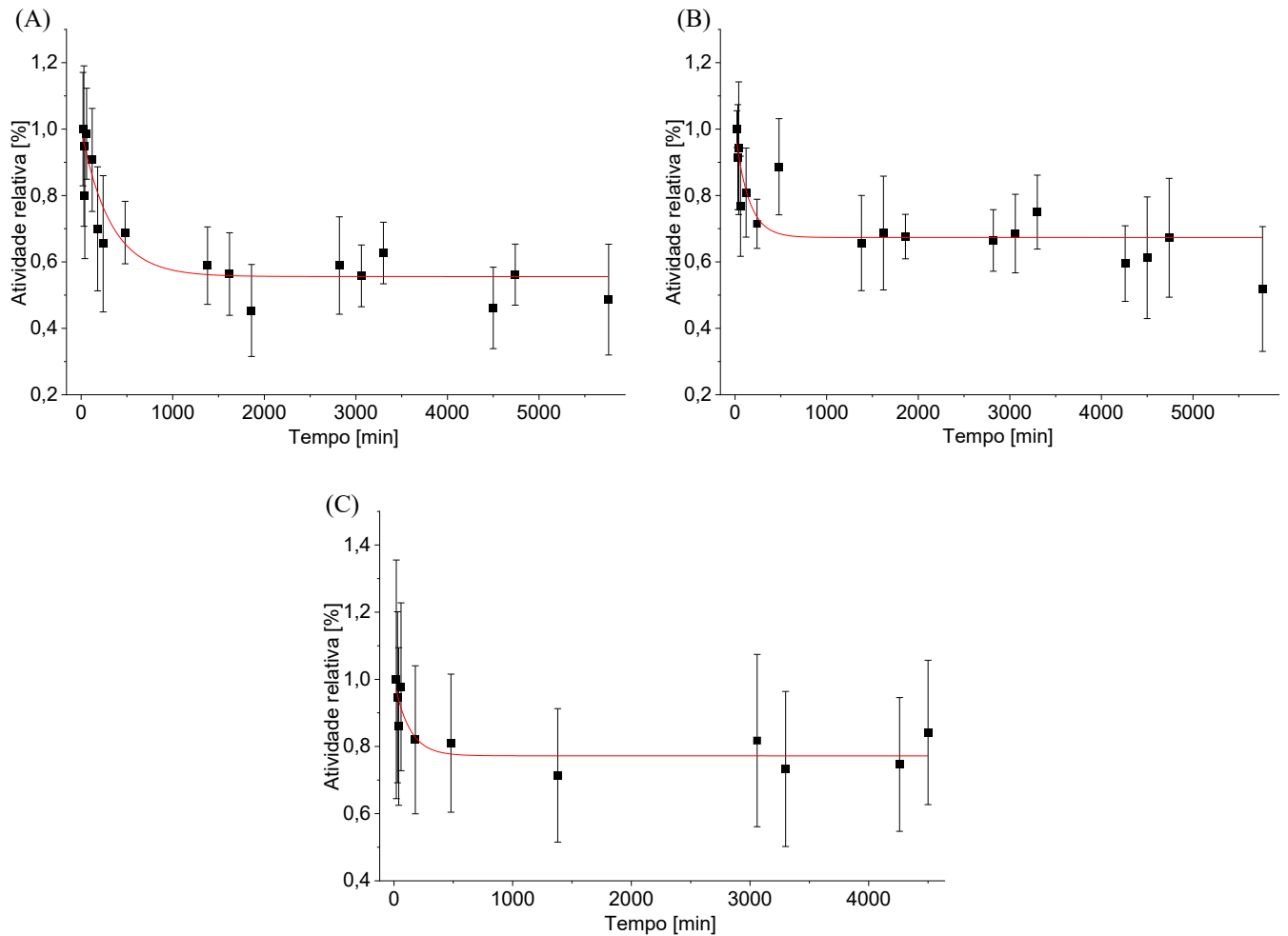
5.7 AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DO BIOCATALISADOR EM SISTEMA REACIONAL CONTÍNUO E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DE DESATIVAÇÃO

O modelo matemático descrito pela Equação (8) foi aplicado ao ajuste dos dados experimentais apresentados na Figura 17, visando estimar os valores das constantes de desativação térmica (k_D , em min⁻¹), para as diferentes temperaturas avaliadas. Os perfis obtidos a partir do ajuste, segundo o modelo de Sadana e Henley (1987) são apresentados na Figura 19.

Na condição de 30 °C, o modelo cinético de desativação térmica apresentou ajuste insatisfatório, evidenciado pelo baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,52$). Esse resultado pode estar associado à ausência de desativação térmica significativa do biocatalisador, que apresentou atividade média de $387,33 \pm 40,53$ U g⁻¹, ao longo das 96 h de operação do reator, conforme observado no perfil de estabilidade operacional (Figura 17A). Dessa forma, a limitação no ajuste do modelo em questão pode ser atribuída à reduzida variação da atividade ao longo do tempo, o que dificulta a adequada estimação dos parâmetros cinéticos de desativação.

Para as temperaturas de 40 e 50 °C, observa-se que o biocatalisador reteve 51 e 48 % da atividade relativa, respectivamente, após 96 h de operação. A 60 °C, foi observada uma redução mais acentuada na atividade, apresentando apenas 16 % da atividade relativa ao final do período de incubação. De acordo com Aranda (2024), Barbosa (2022) e Gonçalves *et al.* (2020), as células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301, apresentam maior termoestabilidade para uma faixa de temperatura compreendida entre 30 e 40 °C.

Figura 19 - Perfis de atividade de transfrutoseilação em função do tempo de reação em diferentes temperaturas para a avaliação da desativação térmica das células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte 3D de PLA (A) 40 °C.; (B) 50 °C.; (C) 60 °C. (–) Modelo de Sadana e Henley



Fonte: Autora (2026)

Nota - Condições experimentais: a reação foi conduzida com alimentação de sacarose a 480 g L^{-1} , pH 5,5 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), vazão de 1 mL min^{-1} , durante 96 h.

Prado *et al.* (2026) relataram que a FTase imobilizada em gel de sílica funcionalizado apresentou maior estabilidade térmica, mantendo mais de 70 % da atividade após 16 h a 30 °C e mais de 50 % após 4 h a 40 e 50 °C, enquanto a enzima imobilizada em gel de sílica não funcionalizado apresentou atividades significativamente menores nas mesmas condições. Além disso, a 60 °C ambas apresentaram forte perda de atividade devido à desnaturação térmica, mantendo cerca de 10 % da atividade inicial após 16 h de incubação.

Pereira *et al.* (2025) relataram atividades residuais de transfrutoseilação de 18, 15 e 5 % a 40, 50 e 60 °C, respectivamente, para a enzima imobilizada em partículas de sabugo de milho tratadas com álcali. Por sua vez, Araújo *et al.* (2022) relataram atividade residual de 70 a 20 %

para a FTase imobilizada em polihidroxibutirato, (PHB) e de 75 a 30 % para a enzima imobilizada no PHB ativado com glutaraldeído após 24 h de incubação em temperaturas entre 30 e 60°C, respectivamente.

Destaca-se que, em temperaturas mais elevadas, os biocatalisadores apresentam menor atividade relativa, pois as enzimas aderidas às células microbianas podem sofrer desnaturação térmica, processo no qual ocorre a ruptura de interações moleculares responsáveis pela manutenção de sua estrutura, resultando na perda irreversível de suas propriedades catalíticas (PRADO *et al.* 2026; ARAÚJO *et al.*, 2022; ARANDA, 2024).

Os parâmetros termodinâmicos das células biocatalíticas imobilizadas em PLA estão mostrados na Tabela 5. A energia de ativação para a desnaturação térmica (E_D , em kJ mol^{-1}) das células biocatalíticas, foi determinada pela linearização da Equação de *Arrhenius*, mediante aplicação da Equação (10), cuja representação gráfica está apresentada na Figura 21 (APÊNDICE B).

Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos de desativação para ensaios realizados em PBR com células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em PLA

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	30	40	50	60
R^2	0,52	0,843	0,831	0,680
k_D (min^{-1})	-	0,00314	0,00693	0,00784
$t_{1/2}$ (min)	-	220,75	100,02	88,41
E_D (kJ mol^{-1})	-		39,97	
ΔH_D (kJ mol^{-1})	-	37,36	37,28	37,19
ΔG_D (kJ mol^{-1})	-	91,82	92,71	95,33
ΔS_D ($\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)	-	-0,174	-0,171	-0,174

Fonte: Autora (2026)

Nota: Os valores de k_D e E_D foram obtidos a partir do ajuste dos modelos de Sadana e Henley (1987) e de *Arrhenius*, respectivamente, aos dados experimentais de atividade enzimática. R^2 é o coeficiente de correlação para estimativa dos valores de k_D ; k_D é a constante de desativação térmica de primeira ordem; $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida; E_D é a energia de desativação térmica; ΔH_D é a variação de entalpia de ativação de desnaturação; ΔG_D é a variação da energia de Gibbs de ativação de desnaturação; ΔS_D é a variação de entropia de ativação de desnaturação.

Os valores de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) dos biocatalisadores (Tabela 5) diminuíram progressivamente com o aumento da temperatura, enquanto a constante de desativação térmica (k_D) apresentou aumento. No estudo presente, o maior $t_{1/2}$ foi de 220,75 min na temperatura de 40 °C. A meia-vida é definida como o tempo requerido para que a atividade enzimática se reduza à metade da atividade inicial a uma dada temperatura (PRADO *et al.*, 2026; ARAÚJO

et al., 2022; FARIA *et al.*, 2021; SAQIB *et al.*, 2010) e, quanto maior o tempo de meia-vida, maior a estabilidade térmica do biocatalisador, indicando que este pode resistir a uma temperatura por um período maior, aumentando a possibilidade de reuso, bem como sua aplicação industrial (MARTÍNEZ *et al.* 2024; SILVA *et al.*, 2021;).

Em estudo conduzido com FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizada em polihidroxibutirato (PHB) em sistema batelada, Araújo *et al.* (2022) reportaram tempos de meia-vida de 136,44; 111,61 e 45,57 min para as mesmas temperaturas avaliadas no presente trabalho. O trabalho de Santos (2024) resultou em tempos de meia-vida de 139,47; 30,69 e 10,96 min para células do mesmo microrganismo imobilizadas em óxido de titânio, em sistema batelada, sob as mesmas temperaturas testadas.

Prado *et al.* (2026), por sua vez, reportaram que a FTase imobilizada no gel de sílica funcionalizado com glutaraldeído apresentou valores de $t_{1/2}$ aproximadamente 6,6 vezes e 2,5 vezes maiores do que aqueles da FTase imobilizada no gel de sílica a 30 °C e 40–50 °C, respectivamente, indicando maior termoestabilidade quando ligada ao suporte inorgânico funcionalizado.

A Tabela 5 também apresenta o valor de energia de desativação térmica (E_D) para o biocatalisador em estudo (39,97 kJ mol⁻¹). Este parâmetro representa a energia mínima necessária para que a enzima se torne inativa, sendo a desnaturação térmica caracterizada por uma modificação irreversível na conformação da biomolécula catalítica decorrente do fornecimento de energia de ativação (PRADO *et al.*, 2026; PEREIRA *et al.*, 2025; ARAÚJO *et al.*, 2022). Assim, quanto maior o valor de E_D , maior é a energia requerida para a desativação da estrutura proteica e, conseqüentemente, maior a estabilidade térmica do biocatalisador (ARAÚJO *et al.*, 2022; ARANDA, 2024; SAQIB *et al.*, 2010).

Gonçalves *et al.* (2020), ao avaliarem células de *A. oryzae* IPT-301 livres e reticuladas em batelada, verificaram menores taxas de desativação térmica para os biocatalisadores reticulados, obtendo $t_{1/2}$ de 990 min a 50 °C e E_D de 136,32 kJ mol⁻¹. Outros valores de E_D reportados na literatura incluem 56,8 kJ mol⁻¹ para FTase imobilizada em sílica gel (FARIA *et al.*, 2021) e 50,8 kJ mol⁻¹ para FTase imobilizada em polihidroxibutirato (ARAÚJO *et al.*, 2022), ambos em sistema batelada.

A variação de entalpia de desativação térmica (ΔH_D) está diretamente relacionada com E_D , e está associada à quantidade total de energia necessária para a desativação enzimática (PRADO *et al.*, 2026; PEREIRA *et al.*, 2025; ARAÚJO *et al.*, 2022). Assim como a energia de desativação térmica, valores elevados e positivos deste parâmetro indicam elevada estabilidade térmica do biocatalisador (FARIA *et al.*, 2021; ARAÚJO *et al.*, 2024). De acordo com os

resultados apresentados na Tabela 5, o biocatalisador em estudo apresentou um comportamento termicamente estável para a faixa de temperaturas avaliadas.

No estudo de Pereira *et al.* (2025), os autores reportaram valores de entalpia de desativação térmica iguais a 16 kJ mol^{-1} para a enzima FTase imobilizada em espiga de milho, na mesma faixa de temperatura avaliada no presente trabalho. Similarmente, Faria *et al.* (2021) obtiveram valores de ΔH_D em torno de 54 kJ mol^{-1} a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, para a FTase imobilizada em sílica-gel, enquanto Araújo *et al.* (2022) relataram para este parâmetro, valores de 39 kJ mol^{-1} para a mesma enzima imobilizada em polihidroxibutirato.

Em contraste, estudos conduzidos por Paiva *et al.* (2023) que trabalharam com β -galactosidase imobilizada, Gonçalves *et al.* (2020) e Mello (2025), que avaliaram as células de *A. oryzae* IPT-301 reticuladas e imobilizadas em EPU, respectivamente, relataram valores significativamente mais elevados de ΔH_D a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, correspondendo a 93,38; 133,64 e $103,66 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente, o que indica biocatalisadores mais termoestáveis em comparação ao avaliado neste estudo.

Embora valores elevados e positivos de ΔH_D sugere que a enzima é termostável, também é importante analisar a entropia de desativação (ΔS_D) e a energia de Gibbs de desativação (ΔG_D). O ΔS_D expressa a quantidade de energia por grau envolvida na transição de um estado nativo para um estado desnaturado do biocatalisador (ARAÚJO *et al.* 2022; SILVA *et al.*, 2021). A desnaturação térmica da enzima causa a ruptura da estrutura da proteína e gera um sistema desordenado, ocasionando o aumento da entropia (SILVA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.* 2020)

Como mostrado na Tabela 5, as células biocatalíticas imobilizadas em PLA, apresentaram valores negativos de ΔS_D , em todas as temperaturas estudadas, o que indica transição da enzima para um estado mais ordenado e estável (PRADO *et al.*, 2026; ARAÚJO *et al.*, 2022; RASHID & SIDDIQUI, 1998). Tal comportamento converge com os resultados reportados em trabalhos com células de *A. oryzae* IPT-301, imobilizadas em EPU por Mello (2025) ($-0,02 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$) e imobilizadas em bucha vegetal no trabalho de Aranda (2024) ($-0,0018 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$), bem como em estudos com FTase de *A. oryzae* IPT-301, imobilizada em sílica gel por Faria *et al.* (2021) ($-0,17 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$), imobilizada em polihidroxibutirato por Araújo *et al.* (2022) ($-0,2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$) e imobilizada em sílica-gel funcionalizada com glutaraldeído no estudo de Prado *et al.* (2026) ($-0,12 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$).

Por fim, a variação da energia de Gibbs de desativação (ΔG_D) é o parâmetro mais preciso e confiável para se avaliar a termoestabilidade de biocatalisadores, pois integra tanto as

contribuições entálpicas quanto entrópicas (PRADO *et al.*, 2026; PEREIRA, *et al.*, 2025; ARAÚJO *et al.*, 2022; SAQIB *et al.*, 2010). A obtenção de valores positivos de ΔG_D , além de indicarem boa termoestabilidade do biocatalisador (PEREIRA *et al.* 2025), também sugerem que, na condição de equilíbrio, a concentração de proteína no estado nativo é maior do que no estado desnaturado e, portanto, o processo não é espontâneo durante a transição de estado (FARIA *et al.*, 2021).

Os valores de ΔG_D (Tabela 5) obtidos no presente trabalho, foram positivos em todos os casos, indicando que, a transição do estado nativo para o estado desnaturado das células biocatalíticas imobilizadas em PLA, foi um processo não espontâneo, nas condições do experimento (PRADO *et al.*, 2026; PAIVA *et al.* 2023; GONÇALVES *et al.*, 2020). Esse mesmo comportamento pode ser observado nos processos de desativação estudados por Mello (2025) que imobilizou células biocatalíticas de *A. oryzae* IPT-301 em suportes de EPU (111,14 kJ mol⁻¹, 50 °C) e Aranda (2024) que avaliou a imobilização das células do mesmo microrganismo em bucha vegetal (103,15 kJ mol⁻¹, 50 °C), e obtiveram resultados satisfatórios de desativação térmica dos biocatalisadores.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstram o potencial dos suportes tridimensionais de PLA como matriz alternativa, sustentável e de baixo custo para a imobilização de células de *A. oryzae* IPT-301, apresentando desempenho estável e elevada durabilidade operacional e térmica. Essas características evidenciam a viabilidade de aplicação desses biocatalisadores, contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis voltadas à produção de açúcares funcionais e prebióticos, em consonância com os princípios da química verde e com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS).

O método de imobilização proposto, fundamentado na adesão e no crescimento celular em suportes de poliácido láctico (PLA) produzidos por impressão 3D, apresenta vantagens significativas em relação aos sistemas convencionais que empregam agentes reticulantes, como o glutaraldeído. Além de evitar o uso de compostos potencialmente tóxicos e ambientalmente agressivos, o suporte de PLA oferece elevada biocompatibilidade, boa estabilidade mecânica e controle preciso da porosidade e da geometria, fatores que favorecem a difusão de nutrientes e oxigênio e, conseqüentemente, o desempenho catalítico.

Adicionalmente, a possibilidade de modular a estrutura tridimensional do suporte de acordo com as demandas do processo amplia sua aplicabilidade em diferentes configurações

reacionais, especialmente em reatores de leito empacotado (PBR) e sistemas contínuos de produção de FOS. Assim, embora os valores de concentração celular obtidos sejam inferiores aos reportados em alguns estudos da literatura, o sistema de imobilização em PLA desenvolvido neste trabalho apresenta elevada eficiência catalítica e viabilidade operacional, tanto em regime contínuo quanto em batelada, consolidando-se como uma alternativa sustentável, segura e tecnicamente robusta para processos biotecnológicos baseados em células imobilizadas.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho propôs a produção de células biocatalíticas de *Aspergillus oryzae* IPT-301, imobilizadas em suportes de poliácido láctico (PLA) fabricados por impressão 3D, obtidas por cultivo celular submerso em meio de cultura complexo.

A partir da curva de crescimento microbiano, determinou-se que o melhor tempo de cultivo celular foi de 40 h, resultando em uma concentração de células imobilizadas foi de $0,12 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{célula}} \text{ g}_{\text{suporte}}^{-1}$, e atividade de transfrutoseilação de $101,05 \pm 17,82 \text{ U g}^{-1}$ e as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos suportes, com e sem células imobilizadas, confirmaram o potencial dos suportes de PLA produzidos por manufatura aditiva como material macroporosos estruturados adequados para imobilização celular.

Nos ensaios de estabilidade operacional em batelada, as células imobilizadas retiveram aproximadamente 76,5 % da atividade inicial após 29 ciclos consecutivos, bem como produtividade média global de $61,06 \pm 6,11 \text{ g}_{\text{FOS}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Quanto à estabilidade de armazenamento, após 300 dias a 4 °C, observou-se retenção de 75,2 % da atividade inicial na ausência de tampão e 38,3 % na presença de solução tris-acetato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5). Tais resultados reforçam a possibilidade de reuso do biocatalisador desenvolvido, bem como armazenamento por longos períodos, sem a necessidade de um agente tamponante.

A avaliação da influência da vazão no reator de leito fixo indicou melhor desempenho para 8 mL min^{-1} , com atividades entre $327,37 \pm 32,34 \text{ U g}^{-1}$ e $443,37 \pm 75,19 \text{ U g}^{-1}$ ao longo de 240 min de operação contínua e produtividade média global de $462,61 \pm 9,05 \text{ g}_{\text{FOS}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Os ensaios conduzidos por até 96 h demonstraram que o uso de reator de leito fixo com células imobilizadas constitui uma alternativa promissora para a produção contínua de FOS, por longos períodos. A temperatura mostrou-se determinante para o desempenho do sistema, visto que a 30 °C não houve desativação significativa, nas temperaturas de 40 °C e 50 °C verificou-se boa estabilidade, com redução de 56,2 e 52,77 % da atividade inicial, respectivamente, sendo que a 50 °C observou-se maior atividade média ao longo do processo.

Por fim, na temperatura de 60 °C ocorreu maior taxa de decaimento da atividade, indicando intensificação da desativação térmica, além de atividade inicial inferior às demais condições. Na temperatura de 50 °C, o biocatalisador apresentou produção de 33,52 g L⁻¹ de FOS, conversão de 13,35 %, rendimento médio de 53,81 % e produtividade média global de 142,25 ± 8,95 g_{FOS} L⁻¹ h⁻¹.

8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação dos efeitos da concentração de substrato na atividade de transfrutoseilação do biocatalisador heterogêneo em sistema reacional contínuo, por meio da obtenção dos perfis de concentração de reagente/substrato (sacarose) na superfície do biocatalisador heterogêneo, visando compreender a influência da disponibilidade de substrato no desempenho catalítico e na eficiência do processo de transfrutoseilação.
- Obtenção dos modelos de cinética enzimática que melhor se ajustam ao processo reacional enzimático avaliado, tomando como base os modelos reportados na literatura, com o uso dos dados operacionais em estado estacionário, de modo a descrever adequadamente o comportamento cinético do sistema e estimar os parâmetros cinéticos envolvidos no processo reacional.
- Obtenção dos parâmetros de transferência de massa interna (TMI) e externa (TME), visando avaliar a influência dos fenômenos difusionais no desempenho do biocatalisador e possibilitar a detecção de limitações no sistema reacional contínuo.

REFERÊNCIAS

- ANTOSOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- ANTOSOVÁ, M.; ILLEOVÁ, V.; VANDÁKOVÁ, M.; DRUZKOVSKÁ, A.; POLAKOVIC, M. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 58–63, 2008. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.02.016
- ARANDA, I. A. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja vegetal para a síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2024.
- ARAÚJO, I. M.; BECALETTE, P. C.; SILVA, E. S.; DIAS, G. S.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; MAIORANO, A. E.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F. Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 419–430, 2022. doi:10.1002/jctb.7255
- ASHKAN, Z.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; JAMLIDOOST, M.; TASHAKOR, A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 708–721, 2021. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.127
- AZPIROZ, F.; DUBRAY, C.; BERNALIER-DONADILLE, A.; CARDOT, J. M.; ACCARINO, A.; SERRA, J.; DAPOIGNY, M. Effects of scFOS on the composition of fecal microbiota and anxiety in patients with irritable bowel syndrome: a randomized, double blind, placebo controlled study. **Neurogastroenterology & Motility**, 29(2), e12911, 2017. doi:10.1111/nmo.12911
- BARBOSA, N. R. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto-oligossacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2022.
- BELMONTE-IZQUIERDO, Y.; SALOMÉ-ABARCA, L. F.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C.; LÓPEZ, M. G. Fructooligosaccharides (FOS) Production by Microorganisms with Fructosyltransferase Activity. **Fermentation**, 9, 968, 2023. doi.org/10.3390/fermentation9110968
- BHADRA, S.; CHETTRI, D.; VERMA, A. K. Microbes in fructooligosaccharides production. **Bioresource Technology Reports**, 20, 101159, 2022. doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101159
- BIS-SOUZA, C. V.; PATEIRO, M.; DOMÍNGUEZ, R.; PENNA, A. L. B.; LORENZO, J. M.; BARRETTO, A. C. S. Impact of fructooligosaccharides and probiotic strains on the quality parameters of low-fat Spanish Salchichón. **Meat Science**, 159, 107936, 2020. doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107936
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

BRITTON, J.; MAJUMDAR, S.; WEISS, G. A. Continuous flow biocatalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 47, p. 5891-5918, 2018. doi: 10.1039/c7cs00906b

CABRERA-OROZCO, A.; GALÍNDEZ-NÁJERA, S.P.; RUIZ-ORDAZ, N.; GALÍNDEZ MAYER, J. *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. doi:10.1007/s11356-016-6204-5

CAICEDO, A. V.; MUSSAGY, C. U.; MESA, V.; MIOTTI JUNIOR, R. H.; VALENZUELA, R.; PAULA, A. V.; MARTINEZ-GALAN, J. P. Enzymatic synthesis of structured lipids from sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) oil with capric acid via acidolysis reaction in stirred tank and packed bed mini reactors. **Food Bioscience**, v. 58, p. 103769, 2024. doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103769

CARDOSO, M. F. M. **Implementação de reator de leito fixo empacotado com células de *Aspergillus oryzae* IPT - 301 imobilizadas em esponja de poliuretano para a produção enzimática de fruto oligossacarídeos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2023.

CASTRO, C. C.; NOBRE, C.; DUPREZ, M. E.; WEIRELD, G.; HANTSON, A. L.; Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 82–90, 2017. dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.011

CAVINI, A. P. S.; CARDOSO, M. C.; VIEIRA, A. C.; SIMÕES, M. F.; ALMEIDA, A. F.; TEIXEIRA, M. L. N.; MORALES, S. A. V.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F.; OTTONI, C. A. Use of Demerara and VHP Sugars Combined with Various Nitrogen Sources for Enhanced Fructosyltransferase Production in *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Processes**, v. 14, p. 840, 2026. https://doi.org/10.3390/pr14050840

CHEN, Y.; ZHAO, Y.; LU, H.; ZHANG, W.; GAI, Y.; NIU, G.; MENG, X.; LV, H.; QIAN, X.; DING, X.; CHEN, J. Protective effect of short-chain fructo-oligosaccharides from chicory on alcohol-induced injury in GES-1 cells via Keap1/Nrf2 and NLRP3 inflammasome signaling pathways. **Frontiers in Nutrition**, v. 11, p. 1374579, 2024. doi:10.3389/fnut.2024.1374579

CORREA, A. C.; LOPES, M. S.; PERNA, R. F.; SILVA, E. K. Fructan-type prebiotic dietary fibers: Clinical studies reporting health impacts and recent advances in their technological application in bakery, dairy, meat products and beverages. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, p.121396, 2024. doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121396

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

CUERVO-FERNÁNDEZ, R.; OTTONI, C.A.; SILVA, E.S.; MATSUBARA, R.M.S.; CARTER, J.M.; MAGOSSÍ, L.R.; WADA, M.A.A.; RODRIGUES, M.F.A.; MARESMÁ, B.G.; MAIORANO, A.E. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 87, 2007. doi:10.1007/s00253-006-0803-x

CUNHA, J. S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de frutooligossacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas - MG, 2017.

CUNHA, J. S.; OTTONI, C. A.; MORALES, S. A. V.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 657-658, 2019. dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180572

DELVIGNE, F.; GOFFIN, P. Microbial heterogeneity affects bioprocess robustness: Dynamic single-cell analysis contributes to understanding of microbial populations. **Biotechnology Journal**, v. 9, p. 61-72, 2014. doi:10.1002/biot.201300119

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

DIAS, G. S.; SANTOS, E. D.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F.; MORALES, S. A. V. Study on the transfructosylation activity of *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97(10), p. 2904-2911, 2022. doi:10.1002/jctb.7163

DIAS, G. S.; VIEIRA, A. C.; SILVA, G. B.; SIMÕES, N. F.; MILESSI, T. S.; SARAIVA, L. S.; XAVIER, M. C. A.; LONGATI, A. A.; RODRIGUES, M. F. A.; FERNANDES, S.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; MORALES, S. A. V.; BASSO, R. C.; PERNA, R. F. Fructooligosaccharides: A Comprehensive Review on Their Microbial Source, Functional Benefits, Production Technology, and Market Prospects, **Processes**, v. 13, p. 1252, 2025. doi.org/10.3390/pr13041252

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3. Ed. New York: Academic Press, 1979.

DORTA, C.; *et al.* Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 1003–1009, 2006.

DWEVEDI, A. Enzyme Immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment. **Switzerland: Springer International Publishing**, p. 132, 2016.

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

FARIA, L. L.; MORALES, S. A. V.; PRADO, J. P. Z.; DIAS, G. de S.; DE ALMEIDA, A. F.; XAVIER, M. da C. A.; DA SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. 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. https://doi.org/10.1007/s10529-020-03016-7

FENICE, M.; FEDERICI, F.; SELBMANN, L.; PETRUCCIOLI, M. Repeated-batch production of pigments by immobilised *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, p. 271-276, 2000.

FIELDS, P. A. **Review: protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 129, p. 417-431, 2001.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharias das reações químicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2022.

FORTES, R. C.; MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligosacarídeos e inulina no organismo humano: Estudo baseado em evidências. **Ciência & Saúde**, v. 20, p. 241-252, 2009.

GANAI, M. A.; RAWAT, H. K.; WANI, O. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 840–844, 2014. [dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.026](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.026)

GARCIA, R. L.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; TARDIOLI, P. W.; PERNA, R. F. 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, p. 273-285, 2021. <https://doi.org/10.1007/s43153-021-00110-9>

GARCIA, L. A.; PRADO, J. P. Z.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; LOPES, M. S.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; GUNNEWIEK, R. F. K.; PERNA, R. F. Synthesis and characterization of a novel silica-niobia support for the immobilization of microbial fructosyltransferase aiming at fructooligosaccharides production. **Materials Today Communications**, v. 31, p. 103588, 2022. doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103588

GODBEY, W.T., **Biotechnology and its Applications: Using Cells to Change the World**. New Orleans: Academic Press, 2021.

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**, v. 95, n. 9, p. 2473-2482, 2020. [doi:10.1002/jctb.6429](https://doi.org/10.1002/jctb.6429)

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, dez. 2002.

HUANG, M. P.; WU, M.; XU, Q. S.; MO, D. J.; FENG, J. X. 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. [doi:10.1021/acs.jafc.6b02115](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02115)

JAIN, V.; AWASTHI, A.; GHOSH, S. Biosynthesis of xylitol by cell immobilization: an insight. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 1, p. 1–13, 2023. Disponível em: <https://link-springer-com.ez37.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s13399-022-03724-2>.

JAKOBSEN, H. A. **Chemical Reactor Modeling: Multiphase Reactive Flows**. 2. ed. Cham: Springer International Publishing, 2014.

JANDYAL, A.; CHATURVEDI, I.; WAZIR, I.; RAINA, A. 3D printing –A review of processes, materials and applications in industry 4.0. **Sustainable Operations and Computers**, v. 3, p. 33-42, 2022. doi.org/10.1016/j.susoc.2021.09.004

JASWAL, A. S.; ELANGO VAN, R., MISHRA, S. Synthesis and molecular characterization of levan produced by immobilized *Microbacterium paraoxydans*. **Journal of Biotechnology**, 323, 63-72, 2023. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.07.003

JITONNOM, J., KETUDAT-CAIRNS, J. R., HANNONGBUA S. QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicus*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharide. **Journal of Molecular Graphics and Modelling** 79:175–184, 2018. doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.11.010

JOSEPH, T. M.; KALLINGAL, A.; SURESH, A. M.; MAHAPATRA, D. K.; HASANIN, M. S.; HAPONIUK, J.; THOMAS, S. 3D printing of polylactic acid: recent advances and opportunities. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, 125:1015–1035, 2023. doi.org/10.1007/s00170-022-10795-y

JUNG, K. H.; BANG, S. H.; OH, T. K.; PARK, H. J. Industrial production of fructooligosaccharides by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a packed bed reactor. **Biotechnology Letters**, v. 33, 1621-1624, 2011. DOI 10.1007/s10529-011-0606-8

KHUMSUPAN, D.; LIN, S.; HUANG, Y.; CHEN, C.; CHI, H.; JANTAMA, K.; LIN, H.; CHENG, K. Creating a robust and reusable cell immobilization system for bioethanol production by thermotolerant yeast using 3D printing and soybean waste. **Industrial Crops & Products**, 224, 120434, 2025. doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120434

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

KRASŇAN, V.; STLOUKAL, R.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2535–2553, 2016. doi:10.1007/s00253-016-7283-4

KUMAR, C.G; SRIPADA, S., POORNACHANDRA, Y. Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. **Role of Materials Science in Food Bioengineering**, Chapter 4, 2018. dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00014-0

LAPPONI, M. J.; MÉNDEZ, M. B.; TRELLES, J. A. RIVERO, C. W. Cell immobilization strategies for biotransformations. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 33, 10056, 2022. doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100565

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**. John Wiley & Sons, New York, 1999.

- L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, S. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 73-84, 2000.
- LI, Q.; LU, H.; YIN, Y.; QIN, Y.; TANG, A.; LIU, H.; LIU, Y. Synergic effect of adsorption and biodegradation enhance cyanide removal by immobilized *Alcaligenes sp.* strain DN25. **Journal of Hazardous Materials**, v. 364, p. 367–375, 2019. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.007
- LIANG, X.; LI, C.; CAO, W.; CAO, W.; SHEN, F.; WAN, Y. Fermentative Production of Fructo-Oligosaccharides Using *Aureobasidium pullulans*: Effect of Dissolved Oxygen Concentration and Fermentation Mode. **Molecules**, 26, 3867, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26133867>
- LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.111, p.51 55, 2015. dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.002
- MAIORANO, A. E.; PICCOLI, R. M.; SILVA, E. S.; RODRIGUES, M. F. A. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1867–1877, 2008. doi:10.1007/s10529-008-9793-3
- MAIORANO, A. E.; SILVA, E. S.; PERNA, R. F.; OTTONI, C. A.; PICCOLI, R. A. M.; FERNANDEZ, R. C.; MARESMA, B. G.; RODRIGUES, M. F. A. Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 42, p. 2619-2629, 2020. doi.org/10.1007/s10529-020-03006-9
- MALIK, M.; GHOSH, M. Immobilization Parameters Statistically Optimized for Whole Cells of *Pseudomonas putida* G7 to Enhance Limonin Biotransformation. **Journal of Advanced Laboratory Research in Biology**, v. 3, 2012.
- MARTINEZ, C. O.; RUIZ, S. P.; NOGUEIRA, M. T.; BONA, E.; PORTILHO, M.; MATIOLI, G. Effective immobilization of *Agrobacterium sp.* IFO 13140 cells in loofa sponge for curdlan biosynthesis. **Molecules**, v. 20, p.7957-7973, 2015. doi.org/10.3390/molecules20057957
- MARTÍNEZ, D.; SOBRINO, A.; AGUIAR, A.; GONZÁLEZ-BACERIO, J.; HERNÁNDEZ, L.; PÉREZ, E. R.; MONTE-MARTÍNEZ, A. Rational design and immobilization of a recombinant sucrose: Sucrose 1-fructosyltransferase on Sepabeads® and ReliZyme™ supports for short-chain fructooligosaccharides production. **Process Biochemistry**, v. 137, p. 71-87, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.12.015>
- MARTINS, G. N.; URETA, M. M.; TYMCZYSZYN, E. E.; CASTILHO, P. C.; GOMEZ-ZAVAGLIA, A. Technological Aspects of the Production of Fructo and Galacto-Oligosaccharides. Enzymatic Synthesis and Hydrolysis. **Frontiers in Nutrition**, v.6, 2019. doi: 10.3389/fnut.2019.00078
- MELLO, V. G. **Estudo do desempenho catalítico de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, imobilizadas em suportes porosos, para a produção de fruto-oligossacarídeos em**

reatores de leito fixo. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2025.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MUSSATTO, S. I.; AGUILAR, C. N.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 6, p. 795– 800, 2009. doi:10.1016/j.carres.2009.01.025

MUSSATTO, S. I.; PRATA, M. B.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Production of fructooligosaccharides and b-fructofuranosidase by batch and repeated batch fermentation with immobilized cells of *Penicillium expansum*. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 1, p. 13–22, 2012. doi:10.1007/s00217-012-1728-5

NGO, T. D.; KASHANI, A.; IMBALZANO, G.; NGUYEN, K. T. Q.; HUI, D. Additive manufacturing (3D printing): a review of materials, methods, applications and challenges, **Composites Part B: Engineering**, v.143, p. 172-196, 2018. doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.02.012

NOBRE, C.; NASCIMENTO, A. K. C.; SILVA, S. P.; COLHOO, E.; COIMBRA, M. A.; CAVALCANTI, M. T. H.; TEIXEIRA, J. A.; PORTO, A. L. F. Process development for the production of prebiotic fructo-oligosaccharides by *penicillium citreonigrum*. **Bioresource Technology**, 282, 464-474, 2019. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.053

NOBRE, C.; SIMÕES, L. S., GONÇALVES, D. A.; BERNI, P.; TEIXEIRA, J. A. Fructooligosaccharides production and the health benefits of prebiotics. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, (pp.109-138), 2022. doi.org/10.1016/B978-0-12-823506-5.00002-3

OLIVEIRA, R. L; SILVA, M. F.; SILVA, S. P.; CAVALCANTI, J. V. F. L.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Immobilization of a commercial *Aspergillus aculeatus* enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: A kinetic/thermodynamic study and fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, 169 – 182, 2020. doi.org/10.1016/j.fbp.2020.05.001

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). *Objetivos de Desenvolvimento Sustentável*. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 20 out. 2025.

OTTONI, C. A.; CUREVO-FERNÁNDEZ, R.; PICCOLI, R. M.; MOREIRA, R.; GUILARTE-MARESMA, B.; SILVA, E. S.; RODRIGUES, M. F. A.; MAIORANO, A. E. Media Optimization for β -Fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 49–59, 2012. doi.org/10.1590/S0104-66322012000100006

PAIVA, M. J.; PAULA-ELIAS, F. C.; PEREIRA, L. A.; CARREIRO, S. C.; VIEIRA-ALMEIDA, E. C.; SILVA, E. M.; DIAS, G. S.; XAVIER, M. C. A.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F.; ALMEIDA, A. F. Stabilization of β -Galactosidase Encapsulated in Pectin-Alginate Hydrogel and Hydrolysis of Whey Lactose and Whole Milk. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 12, p. 1743-1752, 2023. doi.org/10.21577/0103-5053.20230067

PARK, J. P.; OH, T. K.; YUN, J. W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemical**, v. 37, n. 5, p. 471–476, 2001.

PARK, M. K.; SEO, J.; KIM, Y. Comparative study on metabolic changes of *Aspergillus oryzae* isolated from fermented foods according to culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 307, p.108270, 2019. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108270

PEREIRA, R. S.; VIEIRA, A. C.; LEITE, P. C.; MAESTRELLI, S. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; XAVIER, M. C. A.; LOPES, M. S.; PAULA, A. V.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F. Application of an Agro-Waste for the Immobilization of Microbial Fructosyltransferase: A New Alternative for Fructooligosaccharide Production. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 36, p.1-13, 2025. dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20240172

PERNA, R. F.; TIOSSO, P. C.; SGOBI, L. M.; VIEIRA, A. M. S.; VIEIRA, M. F.; TARDIOLI, P. W.; SOARES, C. M. F.; ZANIN, G. M. Effects of Triton X-100 and PEG on the Catalytic Properties and Thermal Stability of Lipase from *Candida Rugosa* Free and Immobilized on Glyoxyl-Agarose. **The Open Biochemistry Journal**, v. 11, p. 66-76, 2017.

PERNA, R. F.; CUNHA, J. S.; GONÇALVES, M. C. P.; BASSO, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Microbial Fructosyltransferase: Production by Submerged Fermentation and Evaluation of pH and Temperature Effects on Transfructosylation and Hydrolytic Enzymatic Activities. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 4, Issue-3, 2018.

POSE-BOIRAZIAN, T.; MARTÍNEZ-COSTA, J.; EIBES, G. 3D Printing: An Emerging Technology for Biocatalyst Immobilization. **Macromolecular Bioscience**, v. 22, p. 2200110, 2022. doi: 10.1002/mabi.202200110

PRADO, J. P. Z.; VIEIRA, A. C.; MAIORANO, A. E.; FERNANDES, S.; BASSO, R. C.; MAESTRELLI, S. C.; OTTONI, C. A.; XAVIER, M. C. A.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F. Immobilization of a Fungal Fructosyltransferase onto Silica Gel and Glutaraldehyde-Functionalized Silica Gel for Biocatalytic Applications. **ACS Omega**. v.1, p. 1-12, 2026. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c08802>

PRATA, M. G. **Implementação de reator de leito fixo recheado com biomassa microbiana encapsulada em alginato para a produção de fructooligossacarídeos**. 102 f f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas. 2020.

RASHID, M.H.; SIDDIQUI, K.S. Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified α -glucosidases from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 109–115, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00036-8).

RAHBAN, M.; ZOLGHDARI, S.; SALEHI, N.; AHMAD, F.; HAERTLÉ T.; REZAEI-GHALEH, N.; SAWYER, L.; SABOURY, A. A. Thermal stability enhancement: Fundamental concepts of protein engineering strategies to manipulate the flexible structure. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 214, p. 642-654, 2022. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.154

REMONATTO, D.; MIOTTI JR, R. H.; MONTI, R.; BASSAN, J.C.; PAULA, A.V. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, v. 114, p.1-20, 2022. doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004

REMONATTO, D.; IZIDORO, B. F.; MAZZIERO, V. T.; CATARINO, B. P.; NASCIMENTO, J. F. C.; CERRI, M. O.; ANDRADE, G. S. S.; PAULA, A. V. 3D printing and enzyme immobilization: An overview of current trends. **Bioprinting**, e00289, 2023. doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00289

RIBEIRO, B. M.; SANDRE JÚNIOR, L. R.; DIAS, G. S.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F.; MORALES, S. A. V. Crosslinked whole cells for the sucrose transfructosylation reaction in a continuous reactor. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 30, p. 99-110, 2024. doi.org/10.2298/CICEQ221220015M

RINALDI, M.; CATERINO, M.; FERA, M.; MANCO, P.; MACCHIAROLI, R. Technology selection in green supply chains – the effects of additive and traditional manufacturing. **Journal of Cleaner Production**, v. 282, p. 124554, 2021. doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124554

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: A review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 103- 148, 1993.

ROCHA, R. J.; PEREIRA, R. S.; PRADO, J. P. Z.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F.; LOPES, M. S. Imobilização de frutossiltransferase microbiana em bagaço de cana e sabugo de milho para a produção de frutooligosacarídeos. 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-defrutossiltransferasemicrobiana-em-bagaco-de-cana-e-sabugo-de-milho-para-a-producao-defrutooligos>.

ROUF, A.; KANOJIA, V.; NAIK, H.R. Cell immobilization: An overview on techniques and its applications in food industry. **International Journal of Chemical Studies**, v.5(6), 1817-1824, 2017.

RYBARCZYK, A.; SMULEK, W.; GRZYWACZYK, A.; KACZOREK, E.; JESIONOWSKI, T.; NGHIEM, L. D.; ZDARTA, J. 3D printed polylactide scaffolding for laccase immobilization to improve enzyme stability and estrogen removal from wastewater. **Bioresource Technology**, 381, 129144, 2023. doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129144

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 717-723, 1987.

SADANA, A. Enzyme Deactivation in Reactors. **Biocatalysis**, v. 2, p. 175-216, 1989.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemical**, v. 40, n. 3-4, p. 1085–1088, 2005.

SANTOS, E. D. Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suportes inorgânicos e sua aplicação como biocatalisadores para a produção de fruto-oligosacarídeos.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2024.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641-646, 2010. doi:10.1016/j.procbio.2009.12.011

SHAHRI, S. Z.; VAHABZADEH, F.; MOGHAREI, A. Lactic acid production by loofah-immobilized *Rhizopus oryzae* through one-step fermentation process using starch substrate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, 333-345, 2020. doi.org/10.1007/s00449-019-02231-5

SHELDON, R. A. **Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance**. Advanced Synthesis & Catalysis, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHEU, D. C.; CHANG, J. Y.; WANG, C. Y.; WU, C. T.; HUANG, C. J. Continuous production of high-purity fructooligosaccharides and ethanol by immobilized *Aspergillus japonicus* and *Pichia heimii*. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 36, 1745-1751, 2013. doi:10.1007/s00449-013-0949-8

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

SILVA, C.; MARTINS, M.; JING, S.; FU, J.; CAVACO-PAULO, A. Practical insights on enzyme stabilization. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 335-350, 2018. doi.org/10.1080/07388551.2017.1355294

SILVA, M. B. P. O.; ABDAL, D.; PRADO, J. P. Z.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, e2020283, 2021. doi.org/10.1590/1981-6723.28320

SILVA, P. I. S.; ORIENTE, S. F. RAMOS, N. J. S.; GUSMÃO, T. A. S.; GUSMÃO, R. P. Fructooligosaccharídeos e aplicação em produtos lácteos: uma revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v.12, n.5, e13812541582, 2023. dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i5.41582

SINGH, R. S., SINGH, R. P. Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential. **Food Technology and Biotechnology**. v. 48, n. 4, p. 435-450, 2010.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; PESSELA, B. C.; SANTORO, R. R.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte, p. 529 -568. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

STOIKOV, D.; KAPPO, D.; IVANOV, A.; GORBACHUK, V.; MOSTOVAYA, O.; PADNYA, P.; STOIKOV, I.; EVTUGYN, G. Enzyme Biosensor Based on 3D-Printed Flow-Through Reactor Modified with Thiocalixarene-Functionalized Oligo (Lactic Acids). **Biosensors**, 15, 77, 2025. doi.org/10.3390/bios15020077

TSUJITA, Y.; ENDO, A. Extracellular acid protease of *Aspergillus oryzae* grown on liquid media: multiple forms and association with heterogeneous polysaccharides. **Journal of Bacteriology**, p. 48-56, 1997.

VANDÁKOVÁ, M. *et al.* Optimization of cultivation conditions for production of fructosyltransferase by *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v. 58, n. 1, p. 15–22, 2004.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa, p. 1–59, 2013.

WANG, X.; HUANG, L.; LI, Y.; WANG, Y.; LU, X.; WEI, Z.; MO, Q.; ZHANG, S.; SHENG, Y.; HUANG, C.; ZHAO, H.; LIU, Y. Research progress in polylactic acid processing for 3D printing. **Journal of Manufacturing Processes**, 112, 161-178, 2024. doi.org/10.1016/j.jmapro.2024.01.038

WONG, C. M.; WONG, K. H.; CHEN, X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 927–938, 2008.

ZAMBELLI, P.; TAMBORINI, L.; CAZZAMALLI, S.; PINTO, A.; ARIOLI, S.; BALZARETTI, S.; PLOU, F. J.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; MOLINARI, F.; CONTI, P. ROMANO, D. An efficient continuous flow process for the synthesis of a nonconventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 607–613, 2016. dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.002

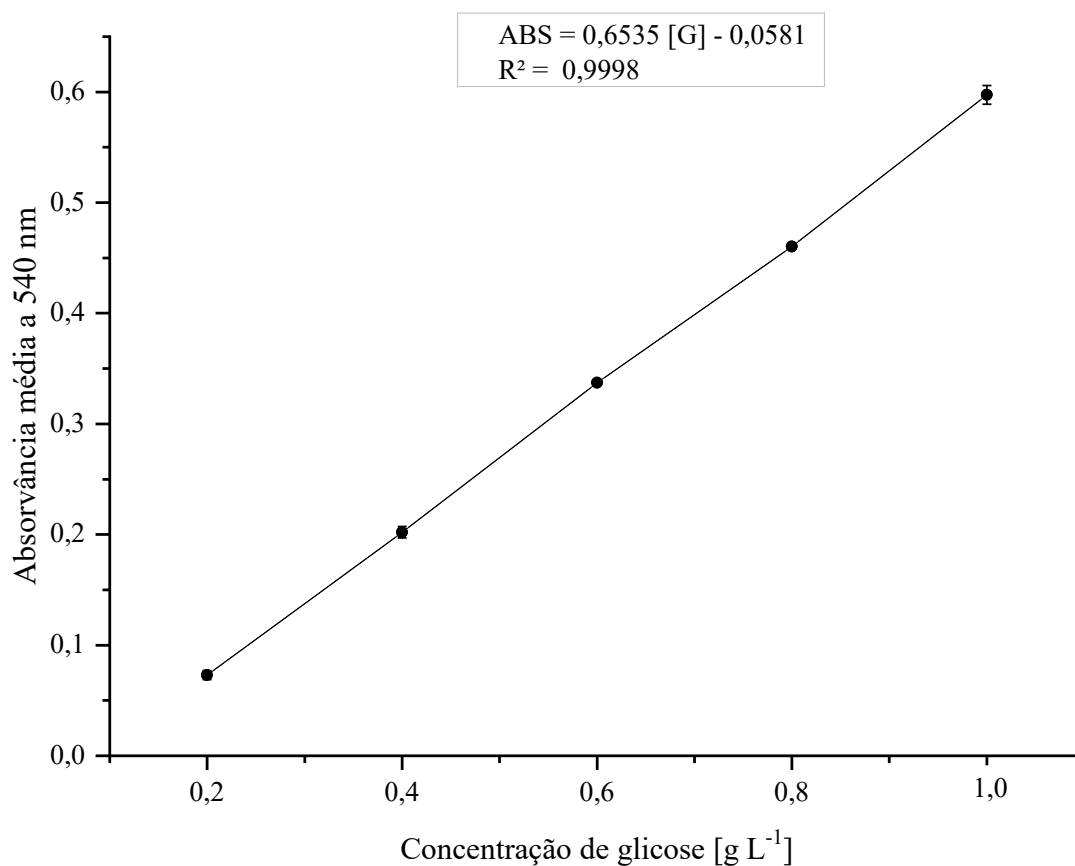
ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**, 8, n. 2, p. 92, 2018. doi:10.3390/catal8020092

ZHANG, Y.; WANG, P.; XIA, C.; WU, Z.; ZHONG, Z.; XU, Y.; ZENG, Y.; LIU, H.; LIU, R.; LIAO, M.; Fructooligosaccharides supplementation mitigated chronic stress-induced intestinal barrier impairment and neuroinflammation in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104060, 2020. doi.org/10.1016/j.jff.2020.104060

ZHANG, Z.; LEE, W.J.; SUN, X.; WANG, Y. Enzymatic interesterification of palm olein in a continuous packed bed reactor: Effect of process parameters on the properties of fats and immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **LWT – Food Science and Technology**, v. 162, p. 113459, 2022. doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113459

APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Figura 20 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores



Fonte: Autora (2026)

Nota: Curva de calibração obtida a partir do método descrito no tópico 4.4.2.

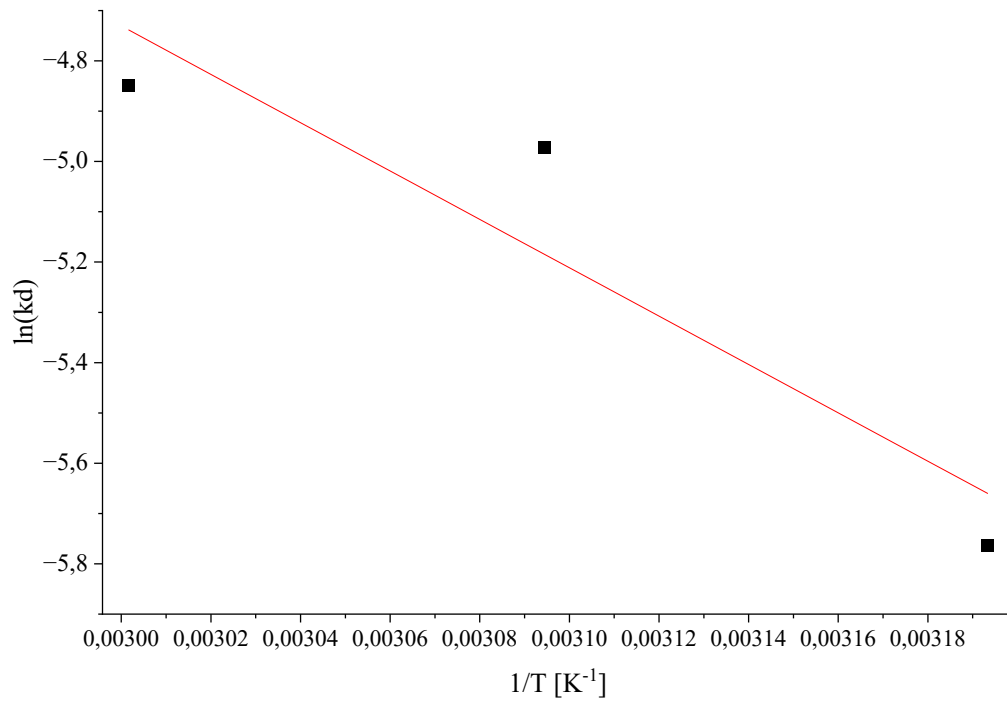
Tabela 6 - Dados de concentração e absorvância para construção da curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico)

Concentração [g L ⁻¹]	Absorvância			Média	Desvio padrão
0,2	0,0690	0,0730	0,0770	0,0730	0,0040
0,4	0,2050	0,2050	0,1960	0,2020	0,0052
0,6	0,3360	0,3360	0,3400	0,3373	0,0023
0,8	0,4600	0,4600	0,4610	0,4603	0,0006
1,0	0,5910	0,5940	0,6070	0,5973	0,0085

Fonte: Autora (2026)

APÊNDICE B – LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE ARRHENIUS

Figura 21 - Linearização da Equação de *Arrhenius* [$\ln(k_D)$ versus (T^{-1})] para estimativa da energia de desativação térmica (E_D) das células de *A. oryzae* IPT-301 imobilizadas em suporte tridimensional (3D) de PLA



Fonte: Autora (2026)

**APÊNDICE C – TRABALHOS COMPLETOS E RESUMOS SUBMETIDOS EM
EVENTO CIENTÍFICO NACIONAL E INTERNACIONAL**



BRAZILIAN POLYMER CONFERENCE

Campos do Jordão/SP - Brazil

October 19th to 23rd

2025



Certificate

This is to certify that

Felipe de Paula Faria

has delivered a **Pôster (Abstract)** presentation of the work titled **EVALUATION OF THE REUSE OF BIOCATALYSTS OBTAINED FROM THE IMMOBILIZATION OF FUNGAL CELLS ON 3D SUPPORTS**, authored by **Paula Candido Leite, Jéssica Barbosa Fanis, Krycia Kulay de Araujo Carnevale, Felipe de Paula Faria, Ana Carolina Vieira, Felipe Lopes Ribeiro, Luiz Gustavo da Silva, Juliano Marini, Sylma Carvalho Maestrelli and Rafael Firmani Perna**, at the 18th Brazilian Polymer Conference (CBPol), held in Campos do Jordão, São Paulo, Brazil, from October 19 to 23, 2025.


Prof. Guilhermino J. M. Fechine
Chair


Prof. Denise F. S. Petri
Scientific Coordinator


Prof. Leonardo B. Canto
President of ABPol



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado:

**IMMOBILIZATION OF WHOLE CELLS OF *Aspergillus oryzae*
IPT-301 ON SUPPORTS MANUFACTURED BY 3D PRINTING FOR
THE ENZYMATIC PRODUCTION OF
FRUCTOOLIGOSACCHARIDES**

De autoria de **Paula Candido Leite, Luiz Gustavo da Silva,
Sylma Carvalho Maestrelli, Juliano Marini, Sergio Andres
Villalba Morales, Rafael Firmani Perna**

foi apresentado oralmente no 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Química e 20º Encontro Brasileiro sobre o Ensino em Engenharia Química, realizado entre o período de 6 a 10 de outubro de 2025, em Belo Horizonte-MG.



Prof. Fernando Cotting
Presidente do 25º COBEQ





16º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição

A Ciência de Alimentos e sua Importância na Saúde, no
Desenvolvimento Tecnológico e Social

17, 18 E 19 DE NOVEMBRO

ÁGUAS DE LINDÓIA, SP

CERTIFICADO

Certificamos que o resumo intitulado:

**"EVALUATION OF THE OPERATIONAL AND STORAGE STABILITY OF Aspergillus oryzae
IPT-301 CELLS IMMOBILIZED ON 3D-PRINTED SUPPORTS FOR FRUCTOOLIGOSACCHARIDES
PRODUCTION"**


de autoria de

**"Paula Candido Leite, Franciane Dal'Ava Monteiro, Mayumi Sakete Carvalho Tomaz,
Krycia Kulay de Araujo Carnevale, Luiz Gustavo da Silva, Ana Carolina Vieira, Juliano
Marini, Sylma Carvalho Maestrelli, Sergio Andres Villalba Morales, Rafael Firmani Perna"**

foi apresentado na categoria "Pôster" no **16º SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência
de Alimentos e Nutrição: "A Ciência de Alimentos e sua Importância na Saúde, no
Desenvolvimento Tecnológico e Social"**, realizado de 17 a 19 de novembro de 2025, em Águas
de Lindóia - São Paulo - Brasil.


Prof. Dr. Juliano Lemos Bicaças
Coordenador do Comitê Científico


Prof. Dra. Cinthia Baú Betim Cazarin
Coordenadora do Comitê Científico


Prof. Dr. Márcio Roberto Maróstica Jr.
Coordenador do Comitê de Programação


Prof. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente do Evento

