

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL
CAMPUS POÇOS DE CALDAS**

ANA CAROLINA SUDÁRIO CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae*
IPT-301 IMOBILIZADAS POR RETICULAÇÃO PARA A SÍNTESE DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS EM MODO BATELADA**

POÇOS DE CALDAS/ MG

2025

ANA CAROLINA SUDÁRIO CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae*
IPT-301 IMOBILIZADAS POR RETICULAÇÃO PARA A SÍNTESE DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS EM MODO BATELADA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pelo Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna .

POÇOS DE CALDAS/ MG

2025

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

Campos, Ana Carolina Sudário .

Avaliação da eficiência catalítica de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas por reticulação para a síntese de frutooligossacarídeos em modo batelada / Ana Carolina Sudário Campos. - Poços de Caldas, MG, 2025.

67 f. : il. -

Orientador(a): Rafael Firmini Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Fruto-oligossacarídeos. 2. Reticulação. 3. Frutossiltransferase. 4. Imobilização. 5. Estabilidade. I. Perna, Rafael Firmini, orient. II. Título.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA DE CÉLULAS DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 IMOBILIZADAS POR RETICULAÇÃO PARA A SÍNTESE DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM MODO BATELADA

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

Aprovada em: 29 de agosto de 2025.

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

Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni
Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Flávio Augusto Dias de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2025, às 11:41, 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 **1583936** e o código CRC **791CA5BA**.

Dedico este trabalho à memória amorosa dos meus pais, que, com coragem e generosidade, fizeram tudo o que estava ao seu alcance e até o que parecia impossível para que eu pudesse chegar até aqui. Embora não estejam mais presentes fisicamente, seus ensinamentos continuam vivos em mim, guiando meus passos com ternura e sabedoria. São, e sempre serão, minha eterna fonte de amor, força e inspiração.

"Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará."
Salmos 37:5

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de não me deixar desistir e me tornar mais forte a cada momento difícil, por me conceder saúde e sabedoria para vencer mais essa etapa.

Ao meu marido Victor Marques Campos, que me apoiou em todos os momentos difíceis, comemorou minhas conquistas, me deu forças para continuar, sem ele nada disso seria possível.

A minha mãe Silvana Sudário, que mesmo não estando presente fisicamente está em meu coração. Que trabalhou duro para que eu tivesse oportunidade de estudar e não mediu esforços para demonstrar seu orgulho por mim.

Ao meu irmão Juliano Sudário, que me demonstrar todos os dias o quanto as coisas são lindas e simples. Por toda sua força e resiliência mesmo sendo tão pequeno.

A minha amiga Érica Daniely Santos, que tornaram meus dias melhores e amenizaram minhas frustrações com palavras e gestos de conforto, que me lembram constantemente da minha capacidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, que me acolheu quando mais precisei, por todo conhecimento compartilhado, por transmitir todo o amor que sente pela pesquisa e pelo apoio durante as atividades de laboratório e por acreditar no meu potencial.

Agradeço a Capes pela concessão da bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A crescente demanda por fruto-oligossacarídeos (FOS) como prebióticos funcionais tem estimulado o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes e sustentáveis. Neste trabalho, foi investigada a produção de FOS em biorreatores em modo batelada utilizando células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas por reticulação com glutaraldeído. A estratégia eliminou etapas de purificação enzimática, reduziu limitações difusionais e conferiu maior estabilidade operacional ao biocatalisador. O planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) permitiu otimizar as condições de concentração de biomassa (m.m^{-1}) e velocidade de agitação (rpm), alcançando atividade máxima de transfrutossilação de $240,50 \text{ U g}^{-1}$ após 32 horas de reação. Estudos cinéticos e termodinâmicos revelaram parâmetros de elevada robustez com o tempo de meia-vida superior a 230 minutos em determinadas condições, energia de ativação de $729,96 \text{ kJ/mol}$ e valores positivos de energia livre de Gibbs (ΔG), que indicam resistência à desnaturação. Os valores de entalpia (ΔH) mostraram que a desnaturação exige altos níveis de energia, refletindo forte integridade estrutural, enquanto a entropia (ΔS) indicou baixa desordem molecular, característica desejável para aplicações em processos prolongados. Esses resultados comprovam que o biocatalisador mantém atividade mesmo em condições industriais, com vantagens para reatores contínuos e de leito fixo. A combinação de elevada atividade enzimática, estabilidade térmica e viabilidade operacional demonstra que a imobilização por reticulação é uma estratégia promissora para o escalonamento da produção de FOS. Este trabalho contribui com evidências experimentais que fortalecem o uso de biocatalisadores mais duráveis e sustentáveis na biotecnologia de alimentos, aproximando o processo da realidade industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*; frutossiltransferase; reticulação; imobilização de células inteiras; fruto-oligossacarídeos; otimização de processos.

ABSTRACT

The growing demand for fructo-oligosaccharides (FOS) as functional prebiotics has driven the development of more efficient and sustainable bioprocesses. In this study, FOS production was investigated in batch bioreactors using *Aspergillus oryzae* IPT-301 cells immobilized by cross-linking with glutaraldehyde. This strategy eliminated enzymatic purification steps, reduced diffusional limitations, and provided greater operational stability to the biocatalyst. A Central Composite Rotational Design (CCRD) experimental approach was used to optimize biomass concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and agitation speed (rpm), achieving a maximum transfructosylation activity of $240.50 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ after 32 hours of reaction. Kinetic and thermodynamic studies revealed highly robust parameters, with a half-life exceeding 230 minutes under certain conditions, an activation energy of 729.96 kJ/mol , and positive Gibbs free energy (ΔG) values, indicating resistance to denaturation. The enthalpy (ΔH) values showed that denaturation requires high energy levels, reflecting strong structural integrity, while entropy (ΔS) indicated low molecular disorder a desirable trait for long-term process applications. These results demonstrate that the biocatalyst maintains activity even under industrial conditions, offering advantages for continuous and fixed-bed reactors. The combination of high enzymatic activity, thermal stability, and operational feasibility shows that cross-linking immobilization is a promising strategy for scaling up FOS production. This work provides experimental evidence supporting the use of more durable and sustainable biocatalysts in food biotechnology, bringing the process closer to industrial reality.

Key-words: *Aspergillus oryzae*; fructosyltransferase; crosslinking; whole-cell immobilization; fructooligosaccharides; process optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de fruto-oligossacarídeos a partir da sacarose pela frutossiltransferase.....	16
Figura 2 - Análise bibliográfica: Visualização de sobreposição para artigos do período de 2013 a 2025 usando a palavra-chave: “Fructooligosaccharides”.	19
Figura 3 - Análise bibliográfica: Visualização de sobreposição para artigos do período de 2012 a 2025 usando as palavras-chaves: Fructooligosaccharides e immobilization.....	25
Figura 4 - Análise bibliográfica: Visualização de sobreposição para artigos do período de 2012 a 2025 usando as palavras-chaves: Fructooligosaccharides e immobilization e Reactor.....	25
Figura 5 - Comparação de células de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 não imobilizadas e imobilizadas por reticulação com glutaraldeído.....	29
Figura 6 - Perfil de concentração de glicose (gL^{-1}) em 48h.....	36
Figura 7 - Ajuste do modelo Splines Cúbicos Suavizados para diferentes temperaturas	38
Figura 8 - Curva de ajuste cinético para determinação da energia de ativação.....	39
Figura 9 - Influência da Biomassa e Agitação na Produção de FTase em 16h.....	44
Figura 10 - Influência da Biomassa e Agitação na Produção de FTase em 32h.....	45
Figura 11 - Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de frutossiltransferases.....	24
Tabela 2 - Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de massa e agitação em reator batelada. Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	28
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a FTase presente nas células integras imobilizada por reticulação, incubada em diferentes temperaturas.....	36
Tabela 4 - Resultados dos ensaios experimentais com variação de concentração de biomassa (X_1) e velocidade de agitação (X_2), com respostas de atividade de transfrutossilação em 16h (Y_1) e 32h (Y_2) e concentração de glicose em 16h (Z_1) e 32h (Z_2).....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	16
3.2	FRUTOSILTRANSFERASE	20
3.3	MECANISMO PARA A PRODUÇÃO DE FOS	22
3.4	CÉLULAS COM ATIVIDADES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO	23
3.5	IMOBILIZAÇÃO	24
3.6	IMOBILIZAÇÃO POR RETICULAÇÃO	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS	28
4.1.1	Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo	28
4.1.2	Imobilização de células íntegras com glutaraldeído	28
4.2	AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE ESTABILIDADE E REATOR	29
4.2.1	Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	29
4.2.2	Ensaio de estabilidade operacional em reator batelada	30
4.2.3	Ensaio de estabilidade térmica	31
4.2.6	Ensaio para avaliação da concentração de biomassa	32
4.2.7	Análise estatística	33
4.2.8	Análise Bibliométrica	33
4.3.	MÉTODOS ANALÍTICOS	33
4.3.1	Determinação da atividade enzimática	33
4.3.2	Determinação da concentração de açúcares redutores	34
4.3.3	Determinação da concentração de glicose	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	ESTABILIDADE EM REATOR BATELADA	36
5.2	ESTUDO CINÉTICO E TERMODINÂMICO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA	37
5.3	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)	41

5.3.1	Análise Estatística	42
5.3.2	Superfícies de Resposta	43
6	CONCLUSÃO.....	47
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICES.....	56

1 INTRODUÇÃO

A busca por compostos prebióticos oligossacarídeos dietéticos, que podem ser utilizados como ingredientes em alimentos nutracêuticos, se expande atualmente devido aos seus efeitos benéficos associados a saúde humana e animal. Esses prebióticos tem baixo valor calórico, auxiliam na redução do colesterol total e são seguros para diabéticos (Cunha *et al.*, 2019; Cunningham *et al.*, 2021; Guarner *et al.*, 2024). Dentre os prebióticos descritos com tais características se destacam os fruto-oligossacarídeos (FOS).

Os FOS comerciais são oligômeros de unidades monossacarídicas, considerados de cadeia curta e classificados como prebióticos (Corrêa *et al.*, 2024; Garcia *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021). Seus principais componentes são kestose (GF2), nistose (GF3) e 1- β - frutofuranosilnístose (GF4) (Cunha *et al.*, 2019; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Perna *et al.*, 2018). Esses oligômeros tem se destacado como ingrediente alimentar promissor pois estimula a melhoria na microbiota intestinal, ampliando a imunidade, favorece a absorção de cálcio e magnésio, além de possuir baixo valor calórico e potencial anticarcinogênico, prevenindo principalmente o câncer de cólon do intestino (Choukade; Kango, 2021). Além disso, estudos recentes mostraram que os FOS auxiliam no controle do colesterol e na prevenção de anemia, obesidade, osteoporose, hipertensão, intolerância à lactose e insuficiência renal (Corrêa *et al.*, 2024).

Alimentos ricos em carboidratos, como cebola, alho, beterraba, chicória e em diversas plantas e vegetais como tomate, alho, trigo, centeio, raiz de chicória, alcachofras de Jerusalém, nectarina, algas marinhas, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de mandioca, farelo de arroz, farelo de milho, palha de arroz, bagaço de maçã, mamão, cascas de beterraba e cascas de banana e em batata yacon são descritos como fonte natural de FOS (Maiorano *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2019; Rahim *et al.*, 2021). Entretanto, essas fontes não possuem quantidade suficiente para ser extraído e aplicado industrialmente, logo, comercialmente o FOS pode ser obtido de outras maneiras, com maior rendimento, pela hidrólise da inulina ou usando enzimas fúngicas para síntese a partir da sacarose (Dou *et al.*, 2022; Maiorano *et al.*, 2020).

Comumente, as enzimas usadas em indústrias são produzidas por microrganismos principalmente por causa de sua alta pureza e atividade enzimática, estabilidade,

menos geração de coprodutos e fabricação lucrativa (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023). Segundo Choukade e Kango (2021) a produção de FOS em larga escala pode ser obtida utilizando sacarose como substrato e das enzimas β -D-frutofuranosidase (β -D-FFases) e frutossiltransferase (FTases), ambas enzimas produzidas a partir de cepas de alto rendimento.

As frutossiltransferases (FTases) são enzimas que transferem grupos frutossil para moléculas de sacarose, apresentando alta atividade de transfrutosilação. As β -D-FTases são produzidas principalmente por microrganismos como fungos dos gêneros *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Rawat *et al.*, 2024). Podem ser secretadas no meio de cultura, denominadas FTases solúveis, ou permanecer aderidas à parede celular do microrganismo, conhecidas como FTases micelial (Ribeiro *et al.*, 2024). A síntese enzimática é o principal método comercial para produzir FOS, utilizando sacarose como substrato e enzimas frutossiltransferases (FTases, E.C.2.4.1.9) (Castro *et al.*, 2017; Antosová *et al.*, 2008). Células biocatalíticas *in natura* ou imobilizadas também podem ser utilizadas na produção de FOS (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023).

A imobilização consiste em confinar ou aderir fisicamente ou quimicamente a célula microbiana, obtendo-se um biocatalisador com elevada atividade, especificidade, seletividade e estabilidade (Dwevedi, 2016). Dessa forma, a imobilização é considerada a técnica mais promissora para tornar a aplicação de enzimas competitiva no setor industrial (Souza *et al.*, 2017). Sendo mais vantajosa, pois elimina a necessidade de extração e/ou purificação prévia da proteína, utilizando a própria estrutura da biomassa como suporte natural do biocatalisador (Belmonte-Izquierdo *et al.*, 2023).

A imobilização de células por encapsulação e reticulação tem permitido a criação de biocatalisadores mais estáveis, com aplicação potencial em biorreatores batelada, leito fixo e fluidizado para a produção de FOS (Dias *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2020; Lorenzoni *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2024; Zambelli *et al.*, 2016).

Especificamente, a reticulação de células microbianas permite obter biocatalisadores robustos e mais resistentes a agentes desnaturantes, como calor, solventes orgânicos e pH extremos, além de reduzir o fenômeno de dessorção da enzima micelial (Ribeiro *et al.*, 2024). O glutaraldeído é o reagente mais comumente utilizado nesses processos de reticulação, proporcionando biocatalisadores ativos e estáveis (Barbosa *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2020; Mateo *et al.*, 2007).

Ribeiro *et al.* (2024) e Garcia *et al.* (2021) estudaram a reticulação com glutaraldeído de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e relataram elevada estabilidade operacional e estabilidade da atividade de transfrutoseilação por até 12 ciclos de reação em batelada. Isso demonstra que as células microbianas reticuladas com glutaraldeído são biocatalisadores promissores para a implementação de um sistema de produção de FOS, mesmo que não tenha sido estudado sobre a otimização dos parâmetros no processo.

Neste contexto, torna-se necessária a otimização da produção e implementação de sistemas em batelada que aumentem o volume de produção de FOS e diminuam seus custos de produção. Para isso, faz-se necessário a utilização de biocatalisadores que apresentem estabilidades térmica e operacional com atividade de transfrutoseilação expressiva e que as condições reacionais empregadas sejam favoráveis à maximização da produção do FOS (Castro *et al.*, 2017; Cunha *et al.*, 2019; Fogler, 2012; Jung *et al.*, 2011; Perna *et al.*, 2018).

Dessa forma, a aplicação da técnica de reticulação à biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 concilia o uso de um método de imobilização ainda não explorado visando a otimização dos parâmetros de produção, apresentando assim a possibilidade de obtenção de um biocatalisador robusto para a produção de FOS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho catalítico de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301, imobilizadas por reticulação em glutaraldeído durante o cultivo celular submerso e avaliar suas estabilidades bioquímicas visando obter biocatalisadores heterogêneos robustos, ativos e estáveis para a produção de fruto-oligossacarídeos.

2.2 Objetivo Específico

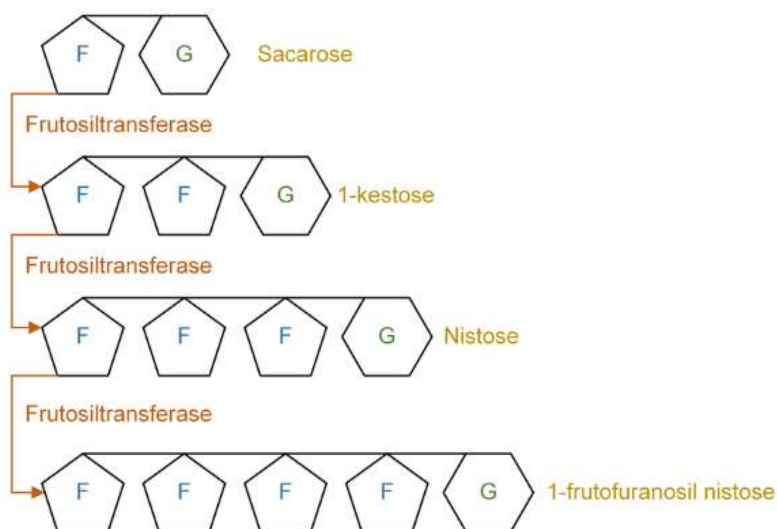
- a) Avaliar a influência dos parâmetros operacionais do reator batelada (tempo, velocidade de agitação e razão massa de biocatalisador/volume de reação) na atividade de transfrutossilacção do biocatalisador;
- b) Obtenção dos parâmetros de desativação térmica (cinéticos e termodinâmicos) do biocatalisador;
- c) Análise e processamento dos dados experimentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) comerciais são oligossacarídeos de cadeia curta, formados por unidades monossacarídicas, e são reconhecidos como prebióticos devido aos seus efeitos benéficos sobre a microbiota intestinal. Seus principais componentes incluem cetoose (GF2), nistose (GF3) e 1- β -frutofuranosilnistose (GF4) como mostra a Figura 1, a síntese enzimática é o principal método comercial para produzir FOS, utilizando sacarose como substrato e enzimas frutossiltransferases (Ftases, E.C.2.4.1.9) (Antosová *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2017)

Figura 1- Produção de fruto-oligossacarídeos a partir da sacarose pela frutossiltransferase



Fonte: Macedo *et al.*, 2020.

Muitas publicações de trabalhos com fruto-oligossacarídeos são encontradas na literatura e comprovam seus benefícios para saúde humana e animal. Estudos recentes examinaram os efeitos da ingestão de FOS em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos, em que pacientes com diabetes do tipo 1 apresentaram menor diversidade da microbiota, associada a alterações na permeabilidade intestinal (Roshanravan *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2019; Guarner *et al.*, 2024).

Dessa forma, a ingestão de prebióticos pode melhorar o controle glicêmico e reduzir a permeabilidade intestinal, e assim, diminuir a resistência à insulina em pacientes diabéticos (Roshanravan *et al.*, 2017). Outros trabalhos demonstraram que a ingestão de FOS pode reduzir a absorção de açúcares simples e carboidratos complexos na corrente sanguínea, diminuindo os níveis de glicose (Adriano *et al.*, 2019; Shimonaka *et al.*, 2020).

No estudo de Choukade e Kango (2021), o uso *in vitro* de FOS mostrou potencial anticancerígeno contra câncer de cólon, induzindo diretamente genes apoptóticos, responsáveis por eliminar células cancerígenas do organismo. De acordo com Euler *et al.* (2005) após suplementação de FOS na dieta de bebês saudáveis, a contagem de bifidobactérias em microbiota intestinal foram estatisticamente maiores do que o grupo de bebês que não ingeriram o prebiótico.

Dados disponíveis mostraram que estudos com modelos celulares *in vitro* sugeriram que os prebióticos favorecem a absorção de minerais como magnésio, cálcio, cobre e ferro no cólon, aumentando a retenção óssea (Whisner; Castillo, 2018). Existem ainda estudos que comprovam que os FOS são anticariogênicos, ou seja, não são assimilados por *Streptococcus mutans* para a geração de ácidos e β -glucanos insolúveis, responsáveis pela formação de cáries dentárias (Mutanda *et al.*, 2014). Quanto aos benefícios para saúde animal, o consumo de FOS mostrou melhorias na densidade óssea de ratos fêmeas Winstar em crescimento, além de aumentar o volume do fêmur, além de melhorar a absorção de cálcio e magnésio (Whisner; Castillo, 2018)

Como edulcorantes, os FOS demonstram sabor similar e possuem um poder adoçante entre 40% e 60% em comparação à sacarose, sendo equivalentes aos FOS encontrados naturalmente em alimentos (Khuenpet *et al.*, 2015; Santos-Moriano *et al.*, 2015). Além destes benefícios, suplementação alimentar com frutanos tem demonstrado ser uma importante ferramenta para pacientes diagnosticados com doença celíaca, um distúrbio digestivo e imunológico genético devido à ingestão de glúten, que afeta a absorção de nutrientes importante, como cálcio, fosfato e vitamina D (Corrêa *et al.*, 2024). Suplementação com FOS e inulina em crianças celíacas, em dieta sem ingestão de glúten, promoveu o aumento de vitamina D e (Drabinská *et al.*, 2020)

A incorporação de FOS na indústria alimentícia é bastante vasta, estando presente como ingrediente em fórmulas infantis, suplementos vitamínicos para idosos, doces,

erva-mate e, também, são comercializados para consumo diário além de serem aplicados em rações para animais domésticos (Guarner *et al.*, 2024; Verified Market Reports, 2024). Estudos vem testando a substituição parcial da sacarose por fruto-oligossacarídeos em bolos, pães, iogurtes e até mesmo, produtos derivados de carne (Corrêa *et al.*, 2024).

O mercado nutracêutico, em 2019, foi avaliado em US\$ 382,51 bilhões. Com perspectiva de crescimento de 8,3% ao ano de 2020 até 2027, resultando em US\$ 722,5 bilhões em 2027 (Research, 2020). Já no ano de 2022, foi avaliado em US\$ 7,2 e deve atingir US\$ 22,92 bilhões até 2032, cuja taxa de crescimento anual está estimada em 12,43 % de 2023 a 2032 (Verified Market Reports, 2024). A Europa mantém uma parcela significativa do mercado do FOS devido ao seu elevado consumo de probióticos presentes em produtos dietéticos e de nutrição infantil. Em seguida, tem-se a América do Norte e Ásia. Há uma perspectiva de crescimento de 11,2% entre os anos de 2020 e 2025 no mercado global de fruto-oligossacarídeos (Mordor Intelligence, 2020; Research and Market, 2024). No Brasil ainda não se encontra tecnologia eficaz para a produção de FOS em larga escala que seja proporcional à demanda existente, tendo que ser importado. Os custos relacionados à produção enzimática e ao rendimento reacional apresentam desafios perante o escalonamento do processo. Por outro lado, o Brasil é um dos maiores produtores de sacarose, matéria prima largamente utilizada para a produção de FOS (CONAB, 2025).

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento, a expectativa é que o Brasil permaneça na liderança da produção mundial de açúcar na safra atual 2023/24, com estimativa de mais de 637,1 milhões de toneladas produzidas. Segundo o levantamento, a fabricação de açúcar deverá chegar a 38,77 milhões de toneladas, sendo a segunda maior já registrada na série histórica, perdendo apenas para a temporada de 2020/21 quando foi estimada em 41,25 milhões de toneladas (CONAB, 2023).

Uma análise bibliométrica foi realizada utilizando as plataformas Web of Science, PubMed, SciELO, Lilacs e CAPES, tendo como fonte de pesquisa as palavras-chave “Fructooligosaccharides; Fructooligosacarídeo; Fruto-oligossacarídeo e FOS”. O processamento dos dados foi feito no software VOSviewer®, que aplica métodos quantitativos apoiados em ferramentas matemáticas e estatísticas para mensurar inter-relações entre publicações. Como o VOSviewer gera automaticamente os mapas

publicações associadas. Isso sugere que, embora o interesse científico em aspectos funcionais e nutricionais dos FOS seja expressivo, os estudos focados na otimização de processos, etapa crítica para viabilizar a produção em escala industrial ainda são limitados. Essa escassez pode estar relacionada à complexidade de se manter estabilidade operacional e rendimento em condições otimizadas, o que exige um controle rigoroso de variáveis como pH, temperatura, atividade enzimática e substrato. Portanto, esse nicho representa uma lacuna relevante na literatura atual e um potencial campo de desenvolvimento tecnológico.

3.2 FRUTOSILTRANSFERASE

A produção de fruto-oligossacarídeos por micro-organismos depende da atividade de enzimas frutossiltransferases (FTases), que catalisam a transferência de unidades de frutose a partir da sacarose, formando ligações glicosídicas específicas, como $\beta(2\rightarrow1)$, $\beta(2\rightarrow6)$ e $\beta(2\rightarrow6G)$, que determinam o tipo de FOS gerado e seu potencial funcional (Belmonte-izquierdo *et al.*, 2025; WU *et al.*, 2025). A Tabela 1 apresenta uma comparação entre diferentes micro-organismos produtores de FTases, destacando suas características catalíticas, produtos principais e condições ideais de atividade, com base em estudos recentes que visam otimizar a produção de FOS para aplicações industriais e nutricionais.

Tabela 1- Micro-organismos produtores de frutossiltransferases

(continua)

Micro-organismo	Tipo de Enzima	EC Número	Produtos Principais	Tipo de Ligação	Referência
<i>Aspergillus niger</i> FS054	Frutossiltransferase	EC 2.4.1.9	1-kestose, nystose, blastose	$\beta(2\rightarrow1)$, $\beta(2\rightarrow6)$	WU <i>et al.</i> , 2025
<i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301	Frutossiltransferase / β -frutofuranosidase	EC 2.4.1.9 / EC 3.2.1.26	1-kestose, nystose, DP5	$\beta(2\rightarrow1)$	BELMONTE-IZQUIERDO <i>et al.</i> , 2025
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Frutossiltransferase	EC 2.4.1.9	1-kestose, nystose	$\beta(2\rightarrow1)$	BELMONTE-IZQUIERDO <i>et al.</i> , 2025

Tabela 1- Micro-organismos produtores de frutossiltransferases

(conclusão)

Micro-organismo	Tipo de Enzima	EC Número	Produtos Principais	Tipo de Ligação	Referência
Schwanniomycetes occidentalis	β -frutofuranosidase com atividade FTase	EC 3.2.1.26	6-kestose, blastose	$\beta(2\rightarrow6)$, $\beta(2\rightarrow6G)$	BELMONTE-IZQUIERDO <i>et al.</i> , 2025
Xanthophyllomyces dendrorhous	6G-frutofuranosidase	EC 3.2.1.26	neo-kestose, blastose	$\beta(2\rightarrow6G)$	BELMONTE-IZQUIERDO <i>et al.</i> , 2025

Fonte: Da autora, 2025.

A cepa *Aspergillus niger* FS054 demonstrou alta atividade enzimática (3422 U/L) sob condições otimizadas de fermentação, com produção predominante de 1-kestose, nystose e blastose, ligadas por ligações $\beta(2\rightarrow1)$ e $\beta(2\rightarrow6)$ (WU *et al.*, 2025). *Aspergillus oryzae* IPT-301, estudado por Belmonte-Izquierdo *et al.* (2025), apresentou atividade tanto de FTase quanto de β -frutofuranosidase, com produção de FOS de maior grau de polimerização (DP3 a DP5), incluindo 1-kestose e nystose.

A diversidade de ligações glicosídicas observadas — $\beta(2\rightarrow1)$, $\beta(2\rightarrow6)$ e $\beta(2\rightarrow6G)$ reflete a especificidade enzimática de cada micro-organismo, o que é essencial para aplicações industriais voltadas à produção de FOS com propriedades funcionais diferenciadas (WU *et al.*, 2025). A frutossiltransferase (FTase) é uma enzima amplamente utilizada na síntese de fruto-oligossacarídeos, sendo adequada para aplicações industriais desde que as reações desejáveis sejam favorecidas em altas concentrações de sacarose, como demonstrado por Charoenwongpaiboon *et al.* (2024), que obtiveram rendimentos de até 45% na produção de FOS utilizando sacarose como substrato. O mecanismo de ação dessa enzima depende da sua origem: quando derivada de plantas ou de certos micro-organismos, sua atividade ocorre em conjunto com outras enzimas, como endo-hidrolases, formando sistemas enzimáticos acoplados (Tian *et al.*, 2014; Porras-Domínguez *et al.*, 2017).

Por outro lado, em micro-organismos específicos, como *Erwinia tasmaniensis* ou *Bacillus subtilis*, a frutossiltransferase atua de forma independente,

sem necessidade de enzimas auxiliares, sendo capaz de catalisar a síntese de FOS por si só (Charoenwongpaiboon *et al.*, 2024; Raga-Carbajal *et al.*, 2018). Como membro da classe das transferases, a frutossiltransferase catalisa a transferência de grupos frutossil de uma molécula doadora (geralmente sacarose) para uma molécula aceitadora, formando ligações glicosídicas específicas, como $\beta(2\rightarrow1)$ ou $\beta(2\rightarrow6)$, que definem o tipo de FOS produzido (Costa *et al.*, 2022; Phengnoi *et al.*, 2020). Essa atividade é essencial para a geração de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização, os quais apresentam propriedades prebióticas e funcionais relevantes, como atividade antioxidante, imunomodulação e efeitos anti-inflamatórios intestinais (Capitán-Cañadas *et al.*, 2016; Pasqualetti *et al.*, 2014; Biedrzycka & Bielecka, 2004).

3.3 MECANISMO PARA A PRODUÇÃO DE FOS

O mecanismo detalhado para a formação de FOS a partir da sacarose foi estudado por Jung *et al.* (1989) que indicaram que a formação de FOS ocorre mediante um conjunto de reações consecutivas:



onde: n (inteiro) > 1 , G e F é porção de glucopiranosil e frutofuranosil na molécula de sacarose, respectivamente.

Duan *et al.* (1994), baseados no estudo realizado por Jung *et al.* (1989), propuseram o estudo cinético para a atividade de uma frutossiltransferase. O mecanismo de reação catalisada pela enzima envolvida na produção de FOS é apresentado nas equações 1 a 4:



A inibição competitiva da glicose foi incluída nas equações (1 a 3), tendo sacarose (GF), 1- kestose (GF₂) e nistose (GF₃) como substratos das reações catalisadas pela frutossiltransferase. A inibição dos substratos inclui-se na equação (1) para a reação de transfrutossilacção de sacarose e equação (4) para a reação de

hidrolise da nistose. Refletindo a complexidade do sistema enzimático, onde a competição entre substrato e produto interfere diretamente na eficiência da síntese.

3.4 CÉLULAS COM ATIVIDADES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

Rawat, Ganaie e Kango (2015) avaliaram a produção de FTase intracelular a partir de diversos fungos com diferentes concentrações de substrato para a produção de FOS, e obtiveram as maiores atividades para o *Aspergillus niger* GNCC 2613 ($121 \pm 2,36 \text{ U mL}^{-1}$), *Aspergillus awamori* MTCC 2879 ($124 \pm 1,84 \text{ U mL}^{-1}$), *Aspergillus niger* GNCC 2668 ($83,1 \pm 0,69 \text{ U mL}^{-1}$) e *Aspergillus ficuum* MTCC 7591 ($64,7 \pm 0,84 \text{ U mL}^{-1}$).

Nascimento *et al.* (2019) estudaram uma nova cepa, *Aspergillus carbonário* PC-4, para a produção de células FTase, variando fontes de carbono e de nitrogênio de baixo custo. Os resultados obtidos mostraram que a coroa do abacaxi foi a melhor fonte de carbono utilizada, com atividade de $14,6 \text{ U mL}^{-1}$ após 5 dias de cultivo, enquanto nitrato de amônio e proteína de soja foram as melhores fontes de nitrogênio para a produção de FTase, com $24,0 \text{ U mL}^{-1}$ e $24,9 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente, de atividade.

Ribeiro *et al.* (2024) também imobilizaram células de *A. oryzae* IPT-301 por reticulação com glutaraldeído, e obtiveram melhores resultados para a imobilização realizada nas condições de 200 rpm e 45 min. O biocatalisador foi inserido em reator de leito fixo (PBR) e os maiores valores de atividade foram encontrados nas condições de 50°C , vazão entre 3 mL^{-1} e 5 mL^{-1} e concentrações de sacarose entre 473 g L^{-1} e 500 g L^{-1} . Além disso, foi observada uma atividade constante de aproximadamente $75 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ durante 12 horas de reação em um reator de leito fixo (PBR) operando em fluxo contínuo. Utilizando o mesmo fungo imobilizado com glutaraldeído, Garcia *et al.* (2021) relataram que, após 12 ciclos de operação em batelada, as células imobilizadas mantiveram 88,9% da atividade inicial de transfrutosilação, demonstrando maior estabilidade em comparação às células livres, que conservaram apenas 50,3% da atividade no mesmo ensaio.

3.5 IMOBILIZAÇÃO

A utilização de microrganismos em sua forma livre pode apresentar diversos problemas como o alto custo de sua produção e purificação, baixa estabilidade operacional, impossibilidade de reutilização, entre outros fatores (Gonçalves *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2017). A imobilização consiste no confinamento físico das células em um espaço definido, onde suas atividades catalíticas são mantidas em processos de atuação contínua ou descontínua, propiciando sua reutilização (Covizzi *et al.*, 2007). Com isso, o processo de imobilização de células tem sido uma alternativa para produções, que utilizam microrganismos, em escala industrial.

Existem diversos métodos e suportes de imobilização, e a escolha correta dessas variáveis interferem na eficiência do processo. Dentre os métodos de imobilização celular os mais utilizados são: ligação a superfície, auto agregação e aprisionamento em matrizes porosas (Kourkoutas *et al.*, 2004; Queissada; Silva, 2020).

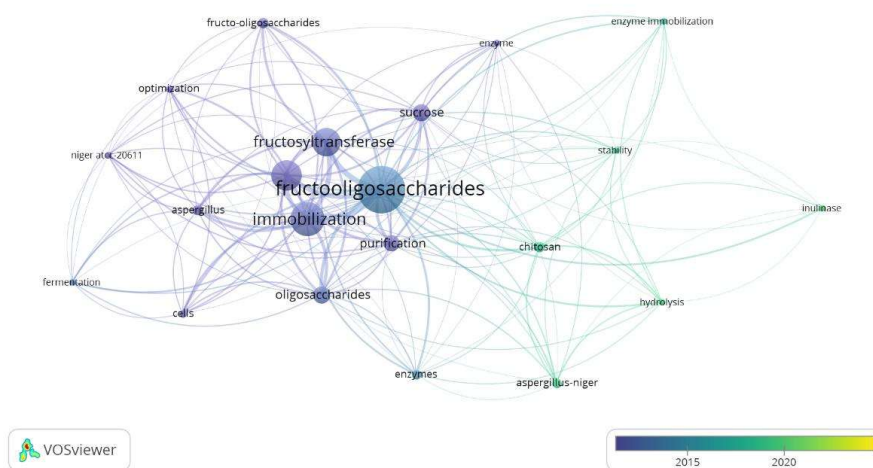
A imobilização de células microbianas, tem permitido um aumento significativo nas estabilidades térmica e operacional das Ftases miceliais (Huang *et al.*, 2016; Ribeiro, *et al.*, 2024). Ftases miceliais de *A. oryzae* IPT-301 tem apresentado maiores atividades de transfrutossilção, em comparação a outras dezessete linhagens de fungos filamentosos avaliadas (Cuervo-fernandez *et al.*, 2007). O uso dessas células como biocatalisadores proporciona ao meio reacional os sítios ativos imobilizados no seu suporte natural, oferece resistência ao arraste da enzima, aumentando assim a estabilidade operacional e facilitando a separação do meio de reação mediante (Ganaie *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2024).

As células inteiras do micro-organismo imobilizadas, são biocatalisadores promissores para a implementação de um sistema de produção de FOS, especialmente em biorreatores, que proporcionam um maior contato efetivo entre o substrato e o biocatalisador (Fogler, 2012). No entanto, o biorreator deve ser projetado e operado para minimizar as limitações de transferência de massa e evitar a presença de caminhos preferenciais ou volumes mortos, a fim de maximizar a produção de FOS.

Quando a palavra “Immobilization; imobilização” é adicionada a busca na análise bibliométrica, o número de artigos relacionados é reduzido a 48 artigos nos anos de 2012 à 2024 que incluem ambas as palavras-chaves, como mostra o Apêndice A de [1] – [48]. Ao adicionar “Reactor; Reator; Biorreator” o número decai

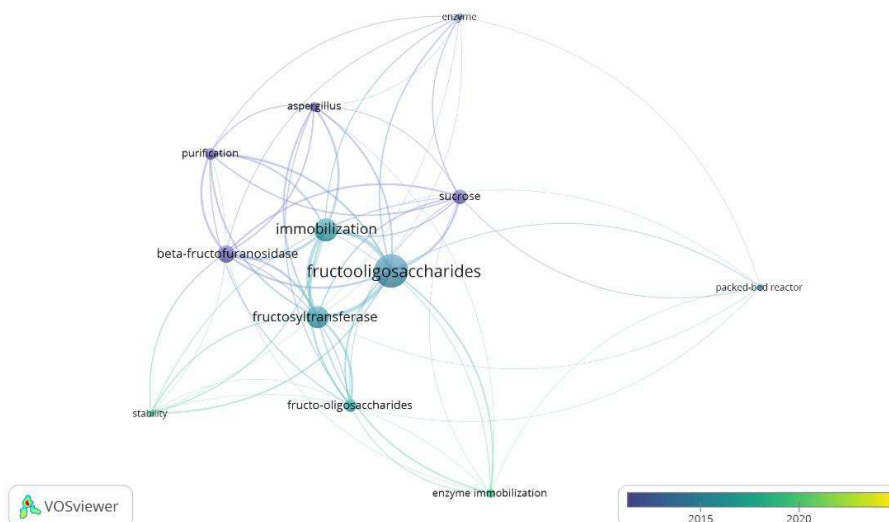
para 31 artigos publicados, como mostra o apêndice A de [49] – [79], e como podemos ver nas figuras 3 e 4.

Figura 3- Análise bibliográfica: Visualização de sobreposição para artigos do período de 2012 a 2025 usando as palavras-chaves: Fructooligosaccharides e immobilization



Fonte: Da Autora utilizando o software VOSviewer®

Figura 4- Análise bibliográfica: Visualização de sobreposição para artigos do período de 2012 a 2025 usando as palavras-chaves: Fructooligosaccharides e immobilization e Reactor



Fonte: Da Autora utilizando o software VOSviewer®.

Em ambas as análises bibliométricas, o termo que se mantém presente relacionando as palavras-chaves está relacionado a estabilidade, o que nos diz que o gargalo do processo para produção do FOS é a sua estabilidade durante o processo de otimização para redução de custos.

O uso da célula íntegra do micro-organismo como biocatalisador remove a necessidade de uma etapa de purificação para obtenção da enzima, diminuindo os passos do processo e o tornando mais barato e rápido (Castro *et al.*, 2017)

A imobilização de células é definida como a técnica de fixação de células microbianas, visando aumentar a estabilidade da célula e possibilitar sua utilização como biocatalisador, podendo ser feita por aprisionamento em uma matriz sólida, retenção por uma membrana ou reticulação celular (Krasňan *et al.*, 2016).

3.6 IMOBILIZAÇÃO POR RETICULAÇÃO

Entre as diversas técnicas de imobilização, a reticulação entre as células possui a vantagem de aproveitar a própria estrutura celular como um suporte e não exigir o uso de um segundo suporte físico, necessitando apenas de um agente químico que promova ligações cruzadas entre as células, como o glutaraldeído (Migneault *et al.*, 2004).

Garcia *et al.* (2021) investigaram a reticulação de células de *A. oryzae* IPT-301 com glutaraldeído e observaram elevada estabilidade operacional, além da preservação da atividade de transfrutossilacção ao longo de 12 ciclos consecutivos em batelada. Esses resultados evidenciam o potencial das células microbianas reticuladas como biocatalisadores promissores para sistemas de produção de fruto-oligossacarídeos (FOS), mesmo na ausência de estudos voltados à otimização dos parâmetros do processo. É importante ressaltar que, em comparação com outras técnicas de imobilização, a reticulação utiliza a própria estrutura celular como suporte, eliminando a necessidade de materiais externos que podem causar restrições disfuncionais. (Ribeiro *et al.*, 2024).

Em uma análise bibliométrica não há muitos trabalhos que relacionem a reticulação com glutaraldeído a produção de FOS, no Apêndice A constam apenas dois artigos como uma ligação direta ao assunto, tendo sucesso na produção de FOS em reatores batelada e contínuo, sendo eles trabalhos do mesmo grupo de pesquisa, o

Grupo de Pesquisa em Tecnologia Enzimática e Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas.

Embora o glutaraldeído seja frequentemente considerado um gargalo na imobilização de células produtoras de FOS, devido à sua toxicidade potencial (Kang, 2016), estudos recentes demonstram que o glutaraldeído, quando utilizado como agente de reticulação ou imobilização, pode aumentar a estabilidade térmica, resistência ao pH e permitir múltiplos ciclos de reutilização sem perda significativa de atividade enzimática (Abd-elnaeem *et al.*, 2025; Muluaem *et al.*, 2025). Em particular, Muluaem *et al.* (2025) mostraram que enzimas reticuladas com glutaraldeído mantiveram até 69% da atividade após 12 ciclos de reutilização, reforçando a segurança e eficiência do composto em sistemas biotecnológicos.

O avanço de métodos analíticos e tecnologias permite a detecção rápida e sensível da presença de glutaraldeído. Diversas abordagens, baseadas em princípios distintos, têm sido propostas para essa finalidade, conforme apresentado no Apêndice B.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS

4.1.1 Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo

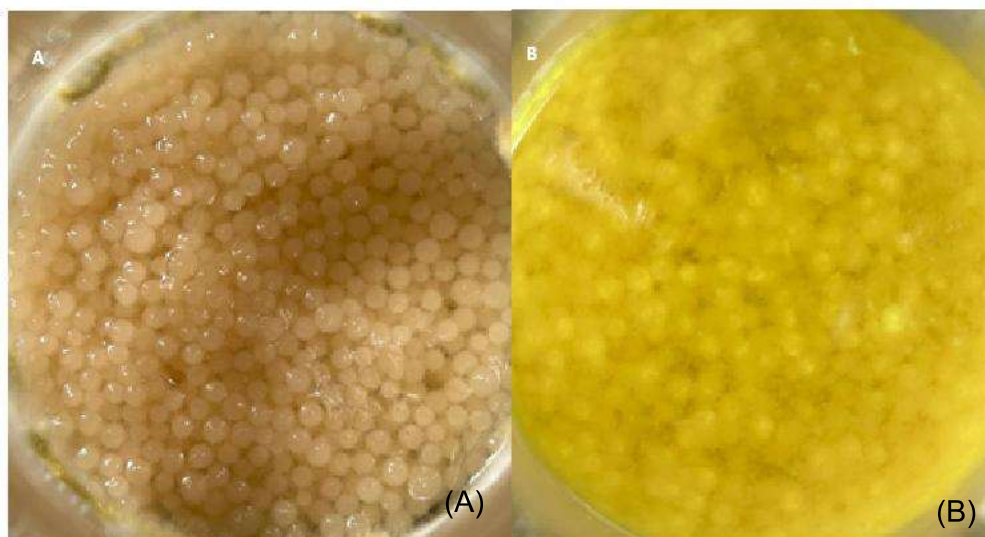
A biomassa catalítica foi produzida por cultivo celular submerso a partir do fungo *A. oryzae* IPT-301 utilizando meio de cultura sintético, pH 5,5, constituído por: sacarose (150 g L^{-1}), extrato de levedura ($5,0 \text{ g L}^{-1}$), NaNO_3 ($5,0 \text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ g L}^{-1}$). Um volume de 50 mL do meio de cultura foi adicionado em frascos Erlenmeyers, vedados com algodão e esterilizados em autoclave por 15 minutos a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e 2,022 atm. Os frascos foram incubados em agitador orbital do tipo *shaker*, inoculando-se 500 mL de suspensão de esporos na concentração de 1×10^7 esporos mL^{-1} . O cultivo celular foi conduzido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm ao decorrer de 64 horas de processo, utilizando sacarose comercial como principal fonte de carbono (Cuervo-fernandez *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2019; Ottoni *et al.*, 2012). O conteúdo total do frasco foi filtrado à vácuo e o material retido (biomassa catalítica) foi lavado abundantemente com água destilada.

4.1.2 Imobilização de células íntegras com glutaraldeído

Os ensaios de imobilização das células íntegras foram realizados de acordo com a adaptação dos métodos de reticulação descritos por Garcia (2018), Garcia *et al.* (2021) e Gonçalves *et al.* (2020). Em frasco Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 1,5 g de biomassa úmida, oriunda do cultivo celular submerso após filtração à vácuo. Posteriormente, adicionou-se solução aquosa de glutaraldeído 25 % (v.v⁻¹) (Dinâmica®), previamente dissolvido em solução tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, totalizando um volume reacional de 150 mL. A reação de imobilização foi conduzida por 60 minutos em agitador orbital do tipo shaker (Tecnal®, modelo TE 4200) e finalizada, por mais 30 minutos, pela adição de 1,5 mL de borohidreto de sódio (NaBH_4) (Neon®) 100 g L^{-1} , previamente dissolvido em 40 mL de solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®).

Ao término da reação de imobilização, a suspensão resultante foi cuidadosamente filtrada à vácuo utilizando papel de filtro do tipo Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm. As células imobilizadas (Figura 5) foram lavadas abundantemente com água destilada e preservadas sob refrigeração a 4°C em solução tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 5,5) para a realização dos ensaios de atividade enzimática.

Figura 5- Comparação de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 (A) não imobilizadas e (B) imobilizadas por reticulação com glutaraldeído



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Legenda: a) Células íntegras de *Aspergillus oryzae* IPT-301 não reticuladas

b) Células íntegras de *Aspergillus oryzae* IPT-301 reticuladas com solução de glutaraldeído (25 %, v.v⁻¹)

4.2 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE ESTABILIDADE EM REATOR

4.2.1 Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado para complementar os estudos de otimização das variáveis de imobilização, cuja matriz de experimentos foi elaborada pelo Protimiza®

(Tabela 1). Foram realizados 11 ensaios com triplicata no ponto central para o estudo de dois fatores (velocidade de agitação e massa de biomassa), cada um composto por três níveis. O modelo estatístico para a superfície de resposta foi ajustado para a variável resposta (Y) e (Z) isto é, a atividade de transfrutossilção das células íntegras reticuladas ($U.g^{-1}$) e concentração de glicose ($g.L^{-1}$), respectivamente.

Tabela 1- Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais para as variáveis de massa e agitação em reator batelada. Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Ensaio	Massa (g)	Velocidade (rpm)	Massa (cod.)	Velocidade (cod.)
1	1	150	-1	-1
2	3	150	1	-1
3	1	250	-1	1
4	3	250	1	1
5	1	200	-1,41	0
6	3	200	1,41	0
7	2	150	0	-1,41
8	2	250	0	1,41
9	1,5	175	-1,41	-1,41
10	2,5	225	1,41	1,41
11	2	200	0	0

Fonte: Elaborada pela autora utilizando Protimiza ®.

4.2.2 Ensaios de estabilidade operacional em reator batelada

A biomassa catalítica imobilizada por reticulação foi adicionada em meio reacional contendo 3,7 mL de solução de sacarose comercial 47 % (m/v) e 1,2 mL de tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5, à 50°C . A atividade enzimática do biocatalisador heterogêneo foi avaliada mediante a coleta de amostras em intervalos de tempo predefinidos ao decorrer de 48 h de reação em modo batelada. Foram obtidos dados experimentais para elaboração dos perfis de atividade enzimática, consumo de substrato e formação de produto para diferentes velocidades de agitação e concentração de biomassa. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.3 Ensaios de estabilidade térmica

Aproximadamente 1,5 g de células biocatalíticas, foi adicionado em frascos tipo Erlenmeyer com 150 mL de solução de meio reacional, pH 5,5, constituído por sacarose comercial 473 g L⁻¹. Os frascos foram incubados em banho Dubnoff (Lab-Line®, modelo 3540) variando a temperatura, em 190 rpm por 48h. A atividade enzimática do biocatalisador foi avaliada mediante a coleta de amostras em intervalos de tempo predefinidos ao decorrer do tempo em modo batelada nas temperaturas de 40, 45, 55 e 60 °C. Foram obtidos dados experimentais para a (i) obtenção dos perfis de atividade enzimática em diferentes temperaturas reacionais e (ii) estimativa dos parâmetros cinéticos (tempo de meia-vida, constante de desativação térmica de primeira ordem e energia de desativação térmica) e termodinâmicos (variações de energia de Gibbs, entalpia e entropia de desativação térmica) de acordo com procedimentos descritos por Saqib *et al.* (2010), Ferreira *et al.* (2018), Gonçalves *et al.* (2020) e Araújo *et al.* (2022). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Foram avaliados a influência de diferentes velocidades de agitação (150, 175, 200, 225 e 250 rpm) no processo de estabilidade operacional em reator batelada. Os ensaios foram realizados conforme método descrito no Tópico 4.2.2.

A estimativa da constante de desativação térmica k_D (min⁻¹) foi realizada por meio do ajuste de curvas utilizando splines cúbicos suavizados aos dados de atividade residual em função do tempo de incubação (Equação 5). Essa abordagem não pressupõe um modelo cinético específico, como o proposto por Sadana e Henley (1987), mas sim utiliza uma interpolação polinomial segmentada que permite capturar com maior precisão a variação da atividade enzimática ao longo do tempo, mesmo em sistemas com comportamento não linear ou com ruído experimental (Maisincho Asqui *et al.*, 2022)

Para isso, os dados de atividade foram transformados em logaritmo natural, e a função spline foi ajustada sobre $\ln(A_t)$ em função do tempo. A derivada da spline representa a taxa de variação da atividade logarítmica, e a constante de inativação térmica foi estimada como.

$$k_D = -\frac{d}{dt} \ln(A_t) \Big|_{t=t_0} \quad (5)$$

onde A_t é a atividade de transfrutossilacção no tempo t , e t_0 é o tempo inicial da incubação. Essa abordagem permite uma estimativa local de k_D , reduzindo o impacto de ruídos experimentais e variações não lineares nos dados.

A partir dos valores encontrados de k_D , foi possível determinar a energia de ativação de desnaturação térmica, E_D (kJ mol^{-1}), para as células imobilizadas por reticulação, realizando a linearização da Equação de Arrhenius (Equação 6).

$$\ln(k_D) = \ln(A_T) - \frac{E_D}{RT} \quad (6)$$

O tempo de meia-vida ($t_{\frac{1}{2}}$, em min), as variações de entalpia de ativação de desnaturação térmica (ΔH_D , em kJ mol^{-1}), energias de Gibbs de ativação de desnaturação (ΔG_D , em kJ mol^{-1}) e variações de entropia de ativação de desnaturação térmica (ΔS_D , em $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) foram calculados utilizando as Equações (7) – (10), respectivamente, onde h é a constante de Planck ($11,04 \times 10^{-36} \text{ J}\cdot\text{min}$), k_B é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$), R é a constante universal dos gases ideais ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) e T refere-se aos valores experimentais de temperatura (K) (Faria *et al.*, 2021; Saqid *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2015).

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k_D} \quad (7)$$

$$\Delta H_D = E_D - RT \quad (8)$$

$$\Delta G_D = (-RT) \ln\left(\frac{k_D h}{k_B T}\right) \quad (9)$$

$$\Delta S_D = \frac{(\Delta H_D - \Delta G_D)}{T} \quad (10)$$

4.2.6 Ensaios para avaliação da concentração de biomassa

Foram avaliados a variação de diferentes massas de biomassa (1, 1.5, 2, 2.5 e 3 g) no processo de estabilidade operacional em reator batelada. Os ensaios foram realizados conforme método descrito no Tópico 4.2.2.

4.2.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e o tratamento dos dados experimentais foram submetidos ao teste de Tukey pela metodologia ANOVA, a um nível de significância de 5%. O teste de Tukey avaliou a diferença significativa entre os dados experimentais, verificando-os um a um.

4.2.8 Análise Bibliométrica

A análise bibliométrica foi conduzida com o objetivo de mapear o panorama científico relacionado à produção de fruto-oligossacarídeos (FOS), técnicas de imobilização celular e aplicação em sistemas reacionais. Para isso, foram utilizadas as bases de dados científicas Web of Science, PubMed, SciELO, Lilacs e o portal de periódicos da CAPES, abrangendo literatura nacional e internacional.

Os dados obtidos foram processados no software VOSviewer®, ferramenta especializada em análise bibliométrica e visualização de redes científicas. O VOSviewer aplica métodos quantitativos baseados em estatística e matemática para mensurar a co-ocorrência de termos, autores e publicações. A partir dos títulos e palavras-chave dos artigos, foram gerados mapas de sobreposição que evidenciam as relações entre os temas pesquisados.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática de transfrutoseilação (A_T) foi determinada conforme procedimento descrito por Cuervo-Fernandez *et al.* (2007), Ottoni *et al.* (2012) e Cunha *et al.* (2019). Para isso, 1g do biocatalisador (células microbianas imobilizada), foi incubado com 3,7 ml de solução de sacarose 47 % ($m v^{-1}$) e 1,2 ml de tampão tris-acetato 0,2 mol L^{-1} , pH 5,5. A reação foi conduzida em banho Dubnoff a 50 °C, 190 rpm por 1 h e interrompida pela imersão do meio reacional em água em ebulição por 10 min, seguido por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min para desnaturação enzimática. Uma unidade (1U) de atividade de transfrutoseilação foi definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol (1 μmol) de frutose

por minuto sob condições experimentais estabelecidas (Cunha *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020).

Posteriormente, o meio reacional foi filtrado à vácuo e as concentrações de açúcares redutores e glicose foram quantificadas. A atividade AT (em U g⁻¹) foi calculada pela Equação (11)

$$A_T = \frac{F_T V_r}{t_r m_{ms}} \quad (11)$$

Em que F_T é a concentração molar de frutose transfrutossilada (em $\mu\text{mol L}^{-1}$), V_r é o volume do meio reacional (em L), t_r o tempo de reação (em min) e m_{ms} se refere à massa seca (em g) das células biocatalíticas.

4.3.2 Determinação da concentração de açúcares redutores

Para a quantificação da concentração de açúcares redutores (AR), presentes no meio reacional, utilizou-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). A solução de DNS (Solução A) foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇) em 200,0 mL de solução 2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH).

Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Solução B) constituída por 600 g L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O). Após a dissolução, ambas as soluções (A e B) foram misturadas e levadas ao agitador magnético com aquecimento (TECNAL®, modelo TE-0856) numa temperatura de aproximadamente 40°C até homogeneização total. O volume final da mistura foi aferido para 1 L em balão volumétrico (Solução DNS). A quantificação dos ARs foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 500 μL da amostra oriunda da reação enzimática, em 500 μL da solução DNS.

A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 15 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 4,0 mL de água destilada. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Bel®, modelo UVM51) a 540 nm usando cubeta de vidro, visando medir as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos ARs mediante auxílio da curva de calibração obtida para o método DNS. O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco (amostra controle), porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática de transfrutossilagem, por

água destilada. A concentração de frutose transfrutossilada (transferida) (FT) no meio reacional foi determinada pela Equação (12) (Chen *et al.*, 1996; Cunha *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2020). A curva de calibração assim como a descrição da metodologia se encontra no Apêndice D.

$$[FT] = 2[G] - [AR] \quad (12)$$

4.3.3 Determinação da concentração de glicose

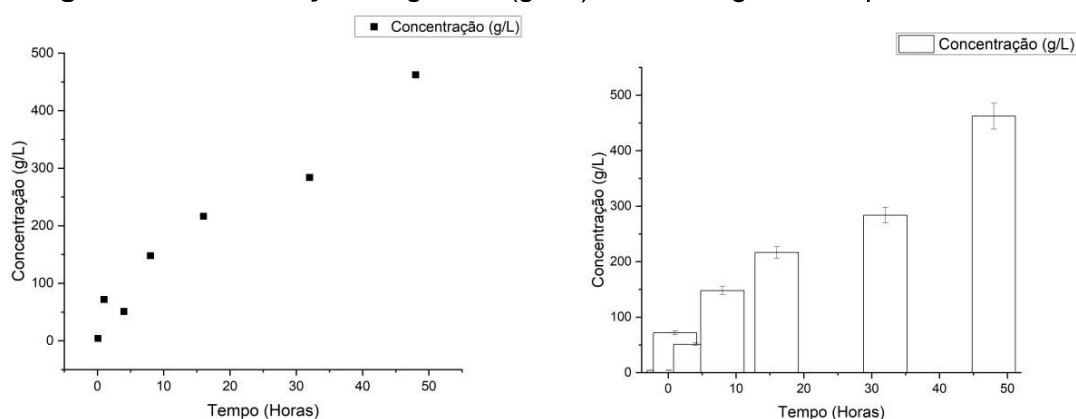
Para a quantificação da concentração de glicose (G), presente no meio reacional, utilizou-se o método GOD-PAP® (Cunha *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2021; Ganaie; Lateef; Gupta, 2014; Gonçalves *et al.*, 2020; Vega, Zúniga-Hansen, 2011). O método consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. A oxidação da glicose pela glicose oxidase produz peróxido de hidrogênio, oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem 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 no meio reacional foi realizada pela adição, em microtubos tipo Eppendorfs®, de 10 µL da amostra, oriunda da reação 43 enzimática, em 1,0 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min. As absorbâncias foram medidas com o auxílio de espectrofotômetro UV-Visível monofeixe (Bel Engineering®, modelo UV-M51) a 505 nm e, posteriormente, utilizadas para a obtenção das concentrações de glicose no meio reacional por meio do “fator f” estimado a partir da amostra padrão fornecida pelo fabricante. O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco (amostra controle), porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática, por água destilada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ESTABILIDADE EM REATOR BATELADA

Conforme apresentado na Figura 6, a concentração de glicose aumentou ao longo do tempo. O aumento da concentração ao longo do tempo pode ser devido ao maior tempo de contato entre substrato e complexo enzimático no microambiente celular e temperatura, fatores que levam ao aumento significativo da velocidade de reação (Muchendu, 2024). No entanto, essa mesma reação pode ser afetada pelo aumento de subprodutos no meio que podem se ligar a sítios inativos, alterando a estrutura e conseqüentemente diminuindo a atividade enzimática (Manikandan; Nagini, 2018).

Figura 6- Concentração de glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em ao longo do tempo de ensaio



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Origin®

Gonçalves *et al.* (2020) utilizaram células biocatalíticas imobilizadas por reticulação do fungo *A. oryzae* IPT-301 para avaliar o efeito da temperatura do meio reacional na atividade enzimática. Os dados experimentais indicaram que a taxa de hidrólise da sacarose foi significativamente maior na faixa de temperatura entre 30 °C e 35 °C. Para a análise estatística, foi aplicada uma Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey HSD (Honest Significant Difference), a fim de identificar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Esses testes tem como objetivo verificar se existem diferenças significativas entre as concentrações nos diferentes tempos de coleta.

A estatística F obtida foi de 0,121, e o p-valor associado foi de 0,886. Como o p-valor é significativamente maior que o nível de significância comumente adotado ($\alpha = 0,05$), não há evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula. A hipótese nula da ANOVA afirma que não há diferenças significativas entre as médias das concentrações verificadas.

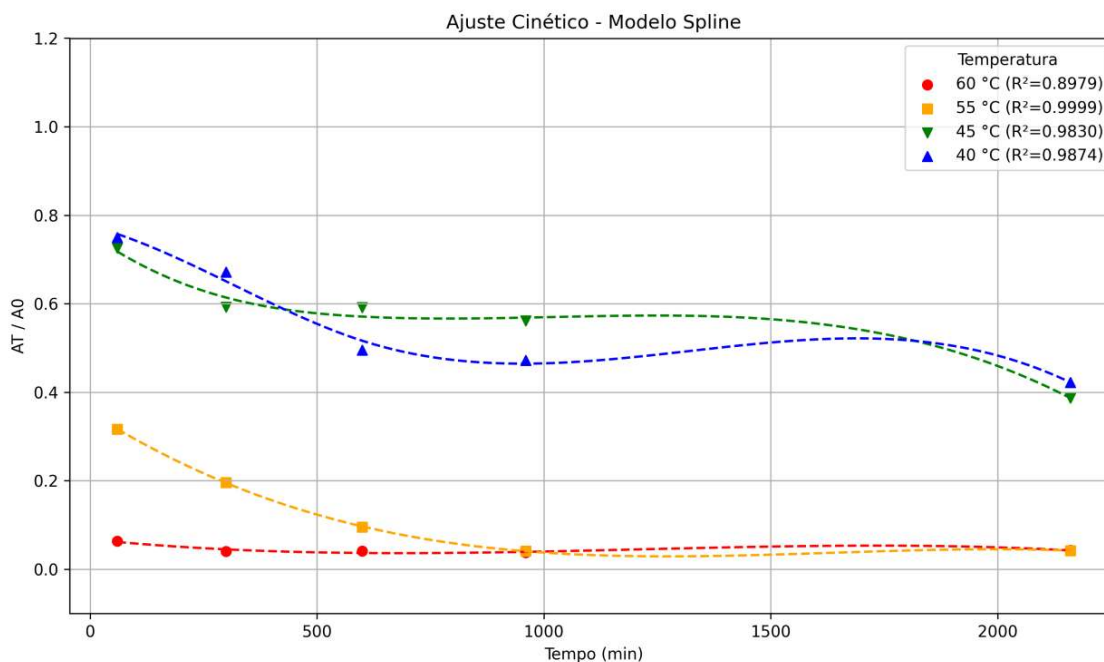
5.2 ESTUDO CINÉTICO E TERMODINÂMICO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A estabilidade térmica de enzimas é um fator determinante para sua aplicação em processos industriais, especialmente aqueles que envolvem temperatura e longos tempos de operação. Neste trabalho a cinética de inativação enzimática foi modelada utilizando o modelo ajuste de curvas utilizando o método matemático de splines cúbicos suavizados programado em python como mostra o Apêndice C, que utiliza uma interpolação polinomial segmentada que permite capturar com maior precisão a variação da atividade enzimática ao longo do tempo, mesmo em sistemas com comportamento não linear ou com ruído experimental (Maisincho Asqui *et al.*, 2022)

O modelo foi ajustado aos dados experimentais de atividade enzimática residual (AT/A_0) obtidos em quatro temperaturas distintas: 40°C, 45°C, 55°C e 60°C, como mostra da Figura 7. Os coeficientes de determinação (R^2) variaram entre 0.98 e 0.99, indicando que o modelo descreve adequadamente a cinética de desativação térmica.

O gráfico gerado evidencia a tendência de queda da atividade enzimática com o tempo, sendo essa redução significativamente mais acentuada em temperaturas elevadas. Esse comportamento é característico da desativação térmica enzimática, que ocorre quando o calor promove alterações estruturais irreversíveis na enzima, comprometendo sua função catalítica (Assis *et al.*, 2021). A elevação da temperatura pode romper interações não covalentes essenciais como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals levando à desnaturação parcial ou total da proteína, esse processo é amplamente descrito por Nelson e Cox (2021).

Figura 7- Ajuste do modelo Splines Cúbicos Suavizados para diferentes temperaturas



Fonte: Elaborado pela autora, 2025. Gráfico gerado no ambiente PyCharm utilizando biblioteca Matplotlib

Em um estudo recente conduzido por Santos (2024), modelos cinéticos clássicos incluindo o modelo de Sadana-Henley foram aplicados para estimar a constante de desativação térmica k_D de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas. No entanto, os ajustes realizados apresentaram coeficientes de determinação (R^2) relativamente baixos, especialmente em temperaturas intermediárias. Esses resultados indicam que os modelos paramétricos tradicionais podem não capturar adequadamente a complexidade da cinética de inativação térmica em sistemas biológicos heterogêneos, onde há variações não lineares e ruído experimental. Essa técnica evita a imposição de um modelo cinético específico e melhora a precisão da estimativa de k_D especialmente em faixas de temperatura onde os modelos clássicos falham em representar adequadamente os dados experimentais. Além disso, o uso de splines é recomendado em literatura recente para modelagem de dados biológicos complexos, como em Maisincho Asqui *et al.* (2022), que destacam sua aplicabilidade em sistemas com comportamento não linear e variabilidade experimental.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos e termodinâmicos estimados para a FTase presente nas células imobilizadas por reticulação, incubadas em diferentes

temperaturas. A aplicação de splines para a modelagem dos dados permitiu uma estimativa mais precisa da constante de desnaturação térmica (k_D), especialmente em faixas de temperatura onde os modelos cinéticos clássicos não se ajustam adequadamente aos dados experimentais.

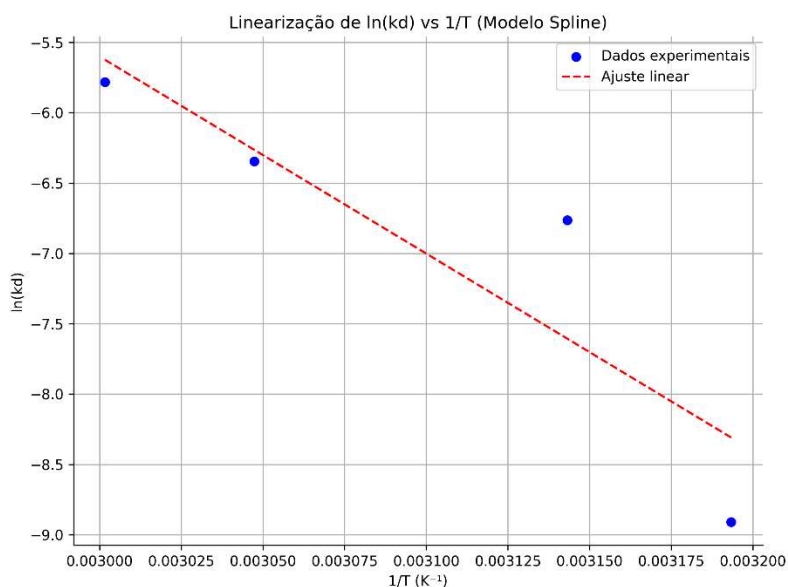
Tabela 2- Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a FTase presente nas células integras imobilizada por reticulação, incubada em diferentes temperaturas

T (°C)	R ²	K _D (min ⁻¹)	ln (K _D) (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	E _D (kJ mol ⁻¹)	ΔH _D (kJ mol ⁻¹)	ΔG _D (kJ mol ⁻¹)	ΔS _D (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
40	0,98	0,00013	-8,94	5331,90		727,36	32,84	2,21
45	0,98	0,0011	-6,81	630,13	729,96	727,32	27,76	2,19
55	0,99	0,0017	-6,37	407,73		727,24	27,53	2,13
60	0,89	0,003	-5,80	231,04		727,19	26,41	2,10

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

O modelo linear ajustado descreve muito bem a relação entre $\ln(k_D)$ e $1/T$, o que é esperado para processos de inativação térmica que seguem a equação de Arrhenius, como apresentado na Figura 8. A inclinação negativa da reta confirma que a constante de inativação aumenta com a temperatura, ou seja, a enzima se torna menos estável termicamente em temperaturas mais altas (Muchendu, 2024).

Figura 8- Curva de ajuste cinético para determinação da energia de ativação



Fonte: Elaborado pela autora, 2025. Gráfico gerado no ambiente PyCharm utilizando biblioteca Matplotlib.

A energia de ativação para a inativação térmica (E_D) da FTase determinada neste trabalho foi de 729,97 kJ/mol, valor significativamente superior ao obtido por Garcia (2018) para a FTase aderida à biomassa livre, que foi de 73,44 kJ/mol. Essa diferença indica que a enzima estudada neste trabalho apresenta elevada resistência à desnaturação térmica, exigindo uma quantidade muito maior de energia para iniciar o processo de inativação.

Segundo Santos (2024), valores de E_D superiores a 80 kJ/mol são indicativos de enzimas com alta termoestabilidade, o que posiciona a FTase deste estudo como um biocatalisador promissor para aplicações industriais em condições térmicas severas, como na produção de FOS. A energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica (ΔG) é amplamente reconhecida como o parâmetro termodinâmico mais confiável para avaliar a termoestabilidade de enzimas, pois considera simultaneamente os efeitos entálpicos e entrópicos do sistema (SOUZA *et al.*, 2015; SAQIB *et al.*, 2010).

Segundo Zhang *et al.* (2025), o aumento de ΔH (entalpia) observado na presença de oligossacarídeos como FOS, GOS e XOS indica uma elevação da barreira energética para a desnaturação térmica da lactoferrina (LF), o que está diretamente relacionado a um aumento de ΔG e, portanto, à maior estabilidade conformacional da proteína. É possível observar uma redução progressiva de ΔG_0 com o aumento da temperatura, passando de 32,84 kJ/mol para 26,42 kJ/mol, o que representa uma diminuição de aproximadamente 19,6% na energia necessária para que a enzima atinja o estado de transição rumo à inativação.

Esse comportamento é coerente com os resultados obtidos por Menossi *et al.* (2024), que observaram estabilidade operacional da FTase por até 12 horas em reator de leito fixo, e por Richard *et al.* (2025), que relataram valores positivos de ΔG_0 para FTase imobilizada em partículas de sabugo de milho tratadas quimicamente, indicando que a desnaturação térmica é um processo não espontâneo e que a enzima permanece predominantemente em seu estado nativo sob condições controladas.

Importante destacar que todos os valores de ΔG obtidos são positivos, o que significa que o processo de desnaturação não ocorre espontaneamente. Em termos termodinâmicos, isso indica que a enzima está em um estado estável, e que é necessário fornecer energia ao sistema para que a enzima perca sua estrutura funcional (Beg *et al.* 2018; Mensink *et al.* 2017). Quanto maior o valor de ΔG , mais

resistente é a enzima à desnaturação térmica, pois a barreira energética para a transição ao estado desnaturado é mais elevada (Zhang *et al.* 2025).

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) também reforça essa estabilidade, variando de 5331,90 minutos a 231,05 minutos conforme a temperatura aumenta, evidenciando que a enzima mantém sua atividade por períodos prolongados em temperaturas mais baixas.

5.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Para otimizar a atividade de transfrutossilacção utilizando *Aspergillus oryzae* IPT-301, foi aplicado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), uma metodologia estatística que permite avaliar simultaneamente os efeitos lineares, quadráticos e de interação entre variáveis operacionais (Rodrigues; lemma, 2009).

Neste estudo, as variáveis independentes foram a concentração de biomassa (X_1) e a velocidade de agitação (X_2), com o objetivo de maximizar a atividade enzimática em dois tempos distintos: 16h e 32h.

Tabela 3- Resultados dos ensaios experimentais com variação de concentração de biomassa (X_1) e velocidade de agitação (X_2), com respostas de atividade de transfrutossilacção em 16h (Y_1) e 32h (Y_2) e concentração de glicose em 16h (Z_1) e 32h (Z_2)

Ensaio	X_1 (m.m ⁻¹)	X_2 (rpm)	Y_1 (U g ⁻¹) (16h)	Y_2 (U g ⁻¹) (32h)	Z_1 (U g ⁻¹) (16h)	Z_2 (U g ⁻¹) (32h)
1	1	150	38,546	23,516	28,095	45,166
2	2	150	28,202	102,946	28,807	45,344
3	3	150	103,946	74,100	40,899	50,145
4	1,5	175	16,553	36,396	31,474	55,658
5	1	200	31,859	13,250	30,407	23,828
6	2	200	144,290	19,551	95,49	32,363
7	3	200	31,859	15,170	32,008	29,696
8	2,5	225	15,929	34,377	34,319	55,658
9	1	250	42,378	30,758	24,183	33,608
10	2	250	87,646	240,499	43,21	23,472
11	3	250	126,310	32,794	30,229	34,319

Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Nota: X_1 - concentração de biomassa (m.m⁻¹); X_2 - velocidade de agitação (em rpm); Y_1 - atividade de transfrutossilacção (U g⁻¹) em 16h; Y_2 - atividade de transfrutossilacção (U g⁻¹) em 32h; Z_1 - concentração de glicose (g/L) em 16h; Z_2 - concentração de glicose (g/L) em 32h.

Tal desempenho é comparável ao de Menossi *et al.* (2024), que também utilizaram células integras reticuladas com glutaraldeído, obtendo 300 U g^{-1} em 12h em reator de leito fixo com fluxo descontínuo. A maior atividade observada por Menossi *et al.* (2024), pode ser atribuída ao uso de um sistema contínuo com recirculação, que favorece o contato entre substrato e biocatalisador, além de condições operacionais otimizadas (como temperatura constante e fluxo controlado), que reduzem perdas por difusão e desnaturação. Por outro lado, Richard *et al.* (2025) utilizaram FTase extracelular imobilizada por adsorção em sabugo de milho, obtendo atividade máxima de $5,35 \text{ U g}^{-1}$. Embora o suporte seja sustentável e de baixo custo, a técnica de adsorção apresenta menor estabilidade e eficiência catalítica, com limitações na retenção da enzima e na difusão do substrato.

Assim, os resultados deste trabalho demonstram que o uso de células integras reticuladas com glutaraldeído é uma estratégia eficaz, capaz de alcançar atividades catalíticas elevadas, comparáveis às de sistemas altamente otimizados.

5.3.1 Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) para os dados de 16h revelou um excelente ajuste do modelo quadrático ($R^2 = 0,98$), com significância estatística global ($p < 0,01$), indicando que o modelo é adequado para representar o comportamento do sistema.

Os efeitos lineares de X_1 (biomassa) e X_2 (agitação), bem como o termo quadrático de X_2 e a interação $X_1 \cdot X_2$, foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), demonstrando que a resposta depende da sinergia entre essas variáveis. A ausência de significância no teste de falta de ajuste ($p > 0,05$) reforça a confiabilidade do modelo.

Para os dados de 32h, o modelo também apresentou bom ajuste ($R^2 = 0,97$) e significância global ($p < 0,01$). Neste caso, o efeito linear de X_2 foi mais influente que X_1 , com significância em $p < 0,01$, enquanto o efeito quadrático de X_1 teve menor relevância.

A interação $X_1 \cdot X_2$ foi marginalmente significativa, sugerindo que, embora a agitação seja predominante em tempos mais longos, a biomassa ainda exerce influência moderada. Estudos prévios indicam que a agitação favorece a dispersão de

substratos e reduz limitações difusionais, aumentando a eficiência enzimática (Pratto *et al.*, 2016).

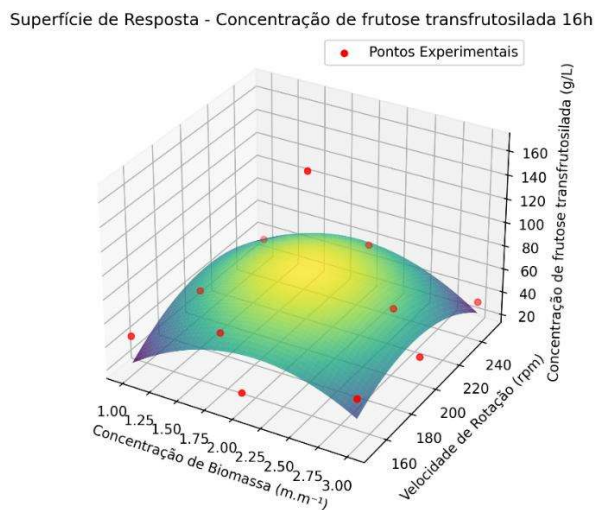
5.3.2 Superfícies de Resposta

As superfícies de resposta obtidas para 16h (Figura 9) apresentaram perfil parabólico com ponto máximo bem definido, correspondente à condição de 2% de biomassa e 200 rpm. A atividade de transfrutossilacção nesta condição foi de 144,29 U g⁻¹, valor compatível com estudos que relatam atividades superiores a 340 U g⁻¹ para *A. oryzae* IPT-301 (Maiorano *et al.*, 2019).

A superfície de resposta plana em relação à biomassa observada em sistemas fermentativos ou enzimáticos pode indicar que, acima de determinado limite, o aumento da concentração de biomassa não resulta em ganho proporcional de atividade catalítica. Esse comportamento é frequentemente atribuído à saturação dos sítios ativos da enzima ou a limitações difusionais internas, como demonstrado por Muñiz-Márquez *et al.* (2016), que observaram que o aumento da carga celular de *A. oryzae* não elevou proporcionalmente a produção de fruto-oligossacarídeos em fermentação sólida. Ademakinwa *et al.* (2017) também relataram que, em sistemas com alta densidade de biomassa, a competição por substrato e o empacotamento celular podem limitar a eficiência catalítica.

Por outro lado, a sensibilidade à agitação está diretamente associada à necessidade de manter o sistema sob condições adequadas de fluxo, favorecendo a homogeneização do meio reacional e prevenindo a formação de gradientes de concentração. Farid *et al.* (2015) demonstraram que a velocidade de agitação exerce influência significativa sobre os processos de transferência de massa e sobre o contato entre substrato e enzima, sendo um parâmetro crítico para a maximização da atividade das Ftases. Da mesma forma, Charoenwongpaiboon *et al.* (2024) destacaram que, em sistemas de enzimas imobilizadas, a agitação adequada é fundamental para garantir a difusão eficiente do substrato até os sítios ativos, especialmente quando há barreiras físicas como suportes sólidos.

Figura 9- Influência da Biomassa e Agitação na Produção de FTase



Fonte: Da autora, 2025. Gráfico gerado no ambiente PyCharm

Essa interpretação está alinhada com os resultados apresentados por Wu *et al.* (2025), que observaram que o aumento da biomassa (massa seca de células de *Aspergillus niger* FS054) além de certo ponto não resultou em aumento proporcional da atividade da frutossiltransferase, sugerindo saturação enzimática ou limitação difusional. Além disso, os autores destacam que a velocidade de agitação influencia diretamente a transferência de massa e a oxigenação do meio, sendo essencial para manter a eficiência catalítica e evitar gradientes de concentração que comprometem a homogeneidade do sistema.

Complementarmente, Charoenwongpaiboon *et al.* (2024) discutem que, em sistemas de enzimas imobilizadas, o excesso de carga proteica pode saturar o suporte, reduzindo a eficiência de imobilização e a atividade catalítica. A agitação adequada é fundamental para garantir o contato entre substrato e enzima, especialmente em sistemas heterogêneos, como os que envolvem suportes sólidos.

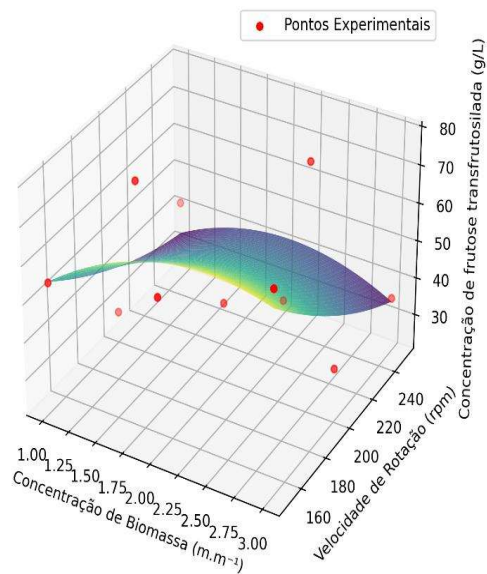
Para o tempo de 32 horas (Figura 10), observou-se uma superfície de resposta mais plana em relação à biomassa, sugerindo que, nesse intervalo, a concentração de biomassa deixa de ser o fator limitante. Por outro lado, a maior inclinação na direção de X_2 (agitação) evidencia que a intensidade de mistura passa a ser determinante para a manutenção da atividade enzimática, o que está de acordo com os resultados obtidos por Menossi *et al.* (2024), que demonstraram que velocidades

de agitação superiores a 200 rpm favorecem a formação de ligações cruzadas eficientes entre enzima e micélio, aumentando a estabilidade do biocatalisador.

A condição ótima de 2% de biomassa e 250 rpm, que resultou em atividade de $240,50 \text{ U g}^{-1}$, reforça a importância de se trabalhar com níveis adequados de carga enzimática e intensidade de mistura, especialmente em sistemas com tempo limitado de reação. Garcia (2018) também observou que a reticulação da biomassa com glutaraldeído promoveu um aumento significativo na termoestabilidade e na resistência ao arraste enzimático, permitindo maior retenção da atividade ao longo dos ciclos reacionais.

Figura 10- Influência da Biomassa e Agitação na Produção de FTase em 32h

Superfície de Resposta - Concentração de frutose transfrutossilada 32h



Fonte: Da autora, 2025. Gráfico gerado no ambiente PyCharm

A maior influência da agitação em tempos prolongados pode estar relacionada à melhoria na dispersão dos substratos e à minimização de efeitos inibitórios causados por produtos acumulados.

Os resultados obtidos demonstram que a condição ótima para 16h foi de 2% (m/m) de biomassa e 200 rpm, enquanto para 32h foi de 2% (m/m) de biomassa e 250 rpm.

Essas diferenças indicam que o ponto ótimo varia ao longo do processo, sendo necessário realizar ajustes dinâmicos nas condições operacionais para maximizar a produtividade. A significância estatística dos modelos reforça a confiabilidade das conclusões e valida a aplicação do DCCR na otimização da transfrutossilatação com *A. oryzae* IPT-301.

Além disso, a superfície de resposta plana em relação à biomassa pode indicar que, acima de determinado limite, o aumento da concentração de biomassa não resulta em ganho proporcional de atividade, possivelmente devido à saturação dos sítios catalíticos ou limitações difusionais internas. Esse comportamento foi observado por Muñiz-Márquez *et al.* (2016), ao estudarem a produção de fruto-oligossacarídeos por *Aspergillus oryzae* em fermentação sólida, onde o aumento da carga celular não elevou proporcionalmente a atividade enzimática. Ademakinwa *et al.* (2017) também relataram que, em sistemas com alta densidade de biomassa, a competição por substrato e o empacotamento celular podem limitar a eficiência catalítica. Já a sensibilidade à agitação pode estar relacionada à necessidade de manter o sistema em regime de fluxo adequado para evitar gradientes de concentração e garantir a homogeneidade do meio reacional. Farid *et al.* (2015) demonstraram que a velocidade de agitação influencia diretamente a transferência de massa e o contato entre substrato e enzima, sendo essencial para maximizar a atividade da frutossiltransferase. Em sistemas com enzimas imobilizadas, como os estudados por Charoenwongpaiboon *et al.* (2024), a agitação adequada é fundamental para garantir a difusão eficiente do substrato até os sítios ativos, especialmente quando há barreiras físicas como suportes sólidos.

6 CONCLUSÃO

A presente dissertação avaliou a viabilidade de utilizar células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizadas por reticulação para a síntese de fruto-oligossacarídeos (FOS) cultivado em modo batelada. Os resultados demonstram de forma conclusiva a eficiência catalítica da enzima intracelular frutossiltransferase (FTases), validando a abordagem de imobilização como uma estratégia promissora para otimizar o processo de produção de FOS.

Os achados principais do estudo confirmam que as células imobilizadas mantiveram uma atividade catalítica robusta, superando as limitações associadas ao uso de enzimas livres, como a instabilidade e a dificuldade de recuperação. A imobilização permitiu a reutilização do biocatalisador, um fator crucial para a redução de custos operacionais e para a sustentabilidade de um processo industrial. A síntese de FOS, um prebiótico de alto valor agregado, foi bem-sucedida, indicando o potencial da aplicação em escala industrial para atender à crescente demanda por ingredientes funcionais no mercado de alimentos e nutracêuticos.

Em suma, este trabalho não apenas alcançou seus objetivos ao comprovar a eficácia da imobilização de *A. oryzae* IPT-301 para a produção de FOS, mas também estabeleceu uma base sólida para a continuidade da pesquisa.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade deste trabalho, são propostas as seguintes sugestões:

- Avaliação em sistemas contínuos como leito fluidizado.
- Estudo da reutilização do biocatalisador em ciclos sucessivos de reação para avaliar a estabilidade operacional e a viabilidade econômica do processo em longo prazo.
- Análise da seletividade e perfil de FOS produzidos para caracterizar os tipos de fruto-oligossacarídeos gerados (GF2, GF3, GF4, etc.) sob diferentes condições operacionais, visando aplicações específicas na indústria alimentícia ou farmacêutica.
- Exploração de outras técnicas de imobilização para comparar a reticulação com glutaraldeído com outras metodologias, como encapsulamento ou adsorção, para verificar possíveis melhorias na atividade, estabilidade ou custo do biocatalisador.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO, L. S. *et al.* Yacon syrup reduces postprandial glycemic response to breakfast: a randomized, crossover, double-blind clinical trial. **Food Research International**, v. 126, p. 108682, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108682
- ANJUM, F.; RISHI, V.; AHMAD, F. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1476, n. 1, p. 75–84, 2000. DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00215-0
- ASSIS, S. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Imobilização de enzimas: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.
- ANTOSOVÁ, M. *et al.* 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
- ANTOSOVÁ, M. *et al.* Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology, Bratislava**, v. 135, p. 58–63, 2008.
- ARAUJO, P. Z.; VALDEON, D. H.; DAZ, M; PEROTTI, N. I. Immobilization of Fructofuranosidase from *Aureobasidium sp.* Onto TiO₂ and Its Encapsulation on Gellan Gum for FOS Production. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, 2019.
- BALLESTEROS, A O.; FERNANDEZ-ARROJO, L; GUTIERREZ-ALONSO, P; RODRIGUEZ-COLINAS, B; ALCALDE, M; PLUO, F J. Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, 2013.
- BELMONTE-IZQUIERDO, R.; *et al.* Advances in fungal biocatalysts for FOS production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2023.
- BHALLA, T; BANSULI; THAKUR, N; SAVITRI; THAKUR, Navdeep. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides. **LWT-Food Science and Technology**, 2017.
- BIE, Xiao-Ying; ZHU, Ming-Jun. Sucrose biotransformation by immobilized *Phaffia rhodozyma* and continuous neokestose production in a packed-bed reactor. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2016.
- BOBBIO, F.O; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2005.
- BRENA, B.; POMBO, P. G.; VIERA, F. B. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: GUISAN, J. M. (Ed.). Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition. **Springer Science+Business**, 2013. v. 1051, p. 1–375.

CABRAL, B. **Hidrólise de Sacarose por Invertase Imobilizada em Duolite A-568 por Adsorção e Ligação Cruzada**. 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

CASTRO, C. C.; NOBRE, C.; DUPREZ, M.-E.; DE WEIRELD, G.; HANTSON, A.-L. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructooligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 82-90, 2017.

CHALANE, S *et al.* Optimized endodextranase-epoxy CIM® disk reactor for the continuous production of molecular weight-controlled prebiotic isomaltoligosaccharides. **Process Biochemistry**, 2017.

CHEN, W. C.; LIU, C. H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, Taiwan, v. 18, p. 153-160, 1996.

CHEN, Su-Ching; SHEU, Dey-Chyi; D, Kow-Jen. Production of fructooligosaccharides using β -fructofuranosidase immobilized onto chitosan-coated magnetic nanoparticles. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2014.

COONEY, M. J. Kinetic Measurements for enzyme immobilization. In: MINTEER, S. D. (Ed.). **Enzyme Stabilization and Immobilization**. Humana Press, St. Louis, MO, USA. v. 53, p. 1689–1699.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar. *Companhia Nacional de Abastecimento*, 2023.

CHAROENWONGPAIBOON, T.; CHUENCHOM, L.; WONGKONGKATHEP, P.; PONGSAWASDI, P. Improving the thermostability and modulating the inulin profile of inulosucrase through rational glycine-to-proline substitution. **RSC Advances**, [S. I.], v. 14, n. 6, p. 3652–3662, 2024.

CREMASCO, M. A. **Fundamentos de transferência de massa**. Campinas: Editora da Unicamp, 1998.

CUERVO-FERNÁNDEZ, R. *et al.* Screening of β -fructofuranosidase producing microorganisms and effects of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 87-93, 2007.

CUNNINGHAM, J.; *et al.* Dietary fibers and metabolic health: a review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2021.

DÍAS, Giancarlo S. *et al.* 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**, 2022.

DRABINSKÁ, N.; *et al.* FOS supplementation in children with celiac disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2020.

- DOU, Y.; *et al.* Enzymatic synthesis of FOS from sucrose using fungal enzymes. **Biotechnology Advances**, 2022.
- DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. San Diego: Academic, 1995.
- DOMINGUEZ, A *et al.* New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, 2012.
- DUAN, C.; *et al.* Kinetic modeling of fructosyltransferase reactions. **Biochemical Engineering Journal**, 1994.
- DUARTE, L. *et al.* A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase. **Process Biochemistry**, 2017.
- EIJSSINK, V. G. H.; BJORND AHL, T. C.; SVENDSEN, A.; VANDENBERGHE, I. Rational engineering of enzyme stability. **Journal of Biotechnology**, v. 113, n. 1-3, p. 105–120, 2005.
- ERDOS, Balazs *et al.* Artificial Neural Network-Assisted Spectrophotometric Method for Monitoring Fructo-oligosaccharides Production. **Food and Bioprocess Technology**, 2018.
- EULER, A.; *et al.* Effects of FOS supplementation on infant microbiota. **Pediatric Research**, 2005.
- FERNANDEZ-ARROJO, L. *et al.* Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, 2013.
- FOGLER, H. S. **Elements of chemical reaction engineering**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- FLORES-MALTOS, D. A. *et al.* Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 259-267, 2014.
- GANAIE, M. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 12-17, 2013.
- GANAIE, 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.
- GARCIA, R. L. **Imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, caracterização e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2018. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2018.
- GARCIA, R. L. *et al.* Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high transfructosylation activity: optimization of the immobilization variables,

characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, p. 273–285, 2021.

GUARNER, F.; *et al.* Fructooligosaccharides and gut microbiota modulation. **Nutrition Reviews**, 2024.

GUISAN, J. M. Immobilization of Enzymes and Cells. **Springer**, 2013. v. 1051.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, 2003.

ILLANES, R. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. **Springer**, 1999.

JUNG, K. M. *et al.* Studies on the production of fructooligosaccharides by fermentation of the fungus *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 111, p. 220–225, 2011.

JUNG, K. M.; *et al.* Mechanism of FOS formation by *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation Technology**, 1989.

KANG, H. I. Toxicological aspects of glutaraldehyde in bioprocesses. **Journal of Chromatography A**, 2016.

KHUENPET, K.; *et al.* Sweetness profile of fructooligosaccharides. **Food Research International**, 2015.

KHADEKAR, Deepa C. *et al.* Kinetics of sucrose conversion to fructooligosaccharides using enzyme (invertase) under free condition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2014.

KIM, Jung-Ho *et al.* Development of a continuous L-lysine bioconversion system for cadaverine production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2017.

KOVAČS, Zoltan *et al.* Enzymatic production of fructooligosaccharides from inexpensive and abundant substrates using a membrane reactor system. **Separation Science and Technology**, 2016.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. 3. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

LONG, Jie *et al.* Co-immobilization of β -fructofuranosidase and invertase on magnetic nanoparticles for the efficient synthesis of fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. São Paulo: Sarvier, 2021.

MA, Jian-Hua; CUI, Xiu-Juan; GAO, Ling; LI, Wei; ZHAO, Jin-Long. Characterization of a new fructosyltransferase from *Fusarium proliferatum* and its use for the

production of fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2015.

MARTINS, A. B. *et al.* Production and characterization of an intracellular β -fructofuranosidase from *Candida milleri* for the synthesis of fructooligosaccharides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2014.

MOLINA, J. A.; VELASQUEZ, J.; CAMPO, A. D.; STREHAIAN, G.; MARTINEZ, I. Thermoactive enzymes: characterization of an alkaline phosphatase from *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2007.

MULUALEM, T.; *et al.* Stability of glutaraldehyde-crosslinked enzymes. **Biotechnology Reports**, 2025.

PARK, Kyung-Soo; KIM, Hyun-Joo; CHO, Yoon-Hee; KWON, Hwa-Soon. Invertase production by *Zymomonas mobilis* and its application for the synthesis of fructooligosaccharides. **Bioresource Technology**, 2011.

PATIÑO, D.; MATA, E.; RAMOS, A. C. Production of fructooligosaccharides from *Tamarindus indica* seeds by *Aspergillus niger* using response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.

PAUL, S.; SHAH, S. D.; BATCHA, M. Fructooligosaccharides: production and application. **Journal of Food Science and Technology**, 2013.

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**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 43-4314 mar. 2018

PRATTO, M.; *et al.* Efeitos da agitação na atividade enzimática. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2016.

RAHIM, A.; *et al.* Natural sources of fructooligosaccharides and their health benefits. **Food Chemistry**, 2021.

REIS, J. A. *et al.* Influence of pH on the production of fructooligosaccharides by *Aspergillus oryzae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2015.

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

RESEARCH AND MARKET. Global FOS Market Trends and Forecast. **Research and Market**, 2024.

RODRIGUES, A. P. S. *et al.* Kinetics and modeling of fructooligosaccharides production using free and immobilized *Aureobasidium pullulans* cells. **Biochemical Engineering Journal**, 2016.

- RODRIGUES, Ana P. S. *et al.* Production of fructooligosaccharides using an immobilized biocatalyst. **Bioresource Technology**, 2017.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 2009
- ROSHANRAVAN, B.; *et al.* Prebiotics and insulin resistance in diabetic patients. **Diabetes & Metabolism**, 2017
- SABIO, K.; TIBURCIO, J. F.; PIZARRO, A. L.; NAGY, M. V. Characterization of the fructooligosaccharides synthesis from sucrose by the purified enzyme *Bacillus subtilis*. **International Journal of Food Microbiology**, 2019.
- SAFAEI, N.; MOEZZI, F.; KAZEMI, M. Synthesis of fructooligosaccharides using crude invertase of *Zymomonas mobilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 2018.
- SANTOS-MORIANO, P.; *et al.* Sensory properties of FOS in food applications. **LWT - Food Science and Technology**, 2015.
- SANTOS, Érica Daniely. **Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em suportes inorgânicos e sua aplicação como biocatalisadores para a produção de fruto-oligossacarídeos**. 2024. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2024.
- SHIMONAKA, M.; *et al.* Dietary FOS and blood glucose modulation. **Journal of Functional Foods**, 2020
- SHOHEIB, M.; ABOULENEIN, M. A. Production of fructooligosaccharides by *Pichia pastoris* using a high cell density fermentation strategy. **Journal of Biotechnology**, 2015.
- SILVA, T. S. *et al.* Comparison of the performance of different supports in the immobilization of *Aspergillus oryzae* cells for fructooligosaccharides production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2019.
- SINGH, R. *et al.* Fructooligosaccharide production from invertase of *Aspergillus niger* immobilized on carrageenan beads. **Food Chemistry**, 2016.
- SOARES, R. B. *et al.* Production of fructooligosaccharides using enzymatic hydrolysis of sucrose. **Process Biochemistry**, 2020.
- TAM, K. K. H. *et al.* Enzymatic synthesis of oligosaccharides: A review of current approaches and applications. **Bioresource Technology**, 2019.
- TAVARES, D. M. *et al.* Effect of temperature on the production of fructooligosaccharides from sugarcane bagasse by *Penicillium oxalicum*. **Biochemical Engineering Journal**, 2015.

THORPE, S. M.; GARCIA, J. E.; OLIVEIRA, R. S.; BRANDAO, M. J. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans* on calcium alginate beads for synthesis of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, 2019.

VERIFIED MARKET REPORTS. Fructooligosaccharides Market Analysis and Forecast. **Verified Market Reports**, 2024.

VASQUEZ, P. C. *et al.* Optimization of fructooligosaccharides production from sugarcane juice by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, 2018.

WANG, Y.; XU, Q.; ZHAO, R.; LIU, D.; ZHANG, Z. Biocatalytic production of fructooligosaccharides from sucrose using a novel β -fructofuranosidase from *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DE PALAVRAS CHAVES

Titulo	Autores	Revista	Ano	Total de Citações	DOI
Enzymatic Trends of Fructooligosaccharides Production by Microorganisms	Ganaie, Mohd Anis; Lateef, Agbaje; Gupta, Uma Shanker	APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY	2014	69	10.1007/s12010-013-0661-9
Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides	Vega-Paulino, R. J.; Zuniga-Hansen, M. E.	JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B-ENZYMATIC	2012	61	10.1016/j.molcatb.2011.12.007
Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from <i>Aspergillus aculeatus</i>	Lorenzoni, Andre S. G.; Aydos, Luiza F.; Klein, Manuela P.; Rodrigues, Rafael C.; Hertz, Plinho F.	CARBOHYDRATE POLYMERS	2014	60	10.1016/j.carbpol.2013.12.038
Immobilization of yeast inulinase on chitosan beads for the hydrolysis of inulin in a batch system	Singh, R. S.; Singh, R. P.; Kennedy, J. F.	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	2017	57	10.1016/j.ijbiomac.2016.11.030
Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides	Ganaie, Mohd Anis; Rawat, Hemant Kumar; Wani, Owais Ahmad; Gupta, Uma Shanker; Kango, Naveen	PROCESS BIOCHEMISTRY	2014	56	10.1016/j.procbio.2014.01.026
New improved method for fructooligosaccharides production by <i>Aureobasidium pullulans</i>	Dominguez, Ana; Nobre, Clarisse; Rodrigues, Ligia R.; Peres, Antonio M.; Torres, Duarte; Rocha, Isabel; Lima, Nelson; Teixeira, Jose	CARBOHYDRATE POLYMERS	2012	55	10.1016/j.carbpol.2012.03.091
Manufacturing of Short-Chain Fructooligosaccharides: from Laboratory to Industrial Scale	Jose Sanchez-Martinez, Maria; Soto-Jover, Sonia; Antolinos, Vera; Benito Martinez-Hernandez, Gines; Lopez-Gomez, Antonio	FOOD ENGINEERING REVIEWS	2020	50	10.1007/s12393-020-09209-0

Titulo	Autores	Revista	Ano	Total de Citações	DOI
Fructo-oligosaccharides production by an <i>Aspergillus aculeatus</i> commercial enzyme preparation with fructosyltransferase activity covalently immobilized on Fe ₃ O ₄ -chitosan-magnetic nanoparticles	de Oliveira, Rodrigo Lira; da Silva, Marcos Fellipe; da Silva, Suzana Pedroza; Vaz de Araujo, Ana Claudia; Fernandes Lima Cavalcanti, Jorge Vinicius; Converti, Attilio; Porto, Tatiana Souza	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	2020	50	10.1016/j.ijbiomac.2020.02.152
Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides	Fernandez-Arrojo, Lucia; Rodriguez-Colinas, Barbara; Gutierrez-Alonso, Patricia; Fernandez-Lobato, Maria; Alcalde, Miguel; Ballesteros, Antonio O.; Plou, Francisco J.	PROCESS BIOCHEMISTRY	2013	46	10.1016/j.procbio.2013.02.015
Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials	Rodriguez-Restrepo, Yeimy A.; Orrego, Carlos E.	ENVIRONMENTAL CHEMISTRY LETTERS	2020	44	10.1007/s10311-020-00988-w
A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase	Duarte, Lovaine Silva; Schoeffer, Jessie da Natividade; Glock Lorenzoni, Andre Soibelman; Rodrigues, Rafael C.; Rodrigues, Eliseu; Hertz, Plinho Francisco	PROCESS BIOCHEMISTRY	2017	42	10.1016/j.procbio.2017.01.015
Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors	Lorenzoni, Andre S. G.; Aydos, Luiza F.; Klein, Manuela P.; Ayub, Marco A. Z.; Rodrigues, Rafael C.; Hertz, Plinho F.	JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B-ENZYMATIC	2015	40	10.1016/j.molcatb.2014.11.002
A close look at the structural features and reaction conditions that modulate the synthesis of low and high molecular weight fructans by levansucrases	Ortiz-Soto, Maria Elena; Porrás-Dominguez, Jaime R.; Seibel, Juergen; Lopez-Munguia, Agustin	CARBOHYDRATE RATE POLYMERS	2019	39	10.1016/j.carbpol.2019.05.014
Inulinase immobilized gold-magnetic nanoparticles as a magnetically recyclable biocatalyst for facial and efficient inulin biotransformation to high fructose syrup	Mohammadi, Maryam; Mokarram, Reza Rezaei; Ghorbani, Marjan; Hamishehkar, Hamed	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	2019	39	10.1016/j.ijbiomac.2018.11.160

Título	Autores	Revista	Ano	Total de Citações	DOI
PRODUCTION OF FRUCTOSYLTRANSFERASE BY A LOCAL ISOLATE OF ASPERGILLUS NIGER IN BOTH SUBMERGED AND SOLID SUBSTRATE MEDIA	Lateef, A.; Oloke, J. K.; Gueguim-Kana, E. B.; Raimi, O. R.	ACTA ALIMENTARIA	2012	34	10.1556/AAlim.41.2012.1.12
Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system	Tian, Feng; Karboune, Salwa; Hill, Andrea	INNOVATIVE FOOD SCIENCE & EMERGING TECHNOLOGIES	2014	30	10.1016/j.ifset.2013.12.004
Microbial co-culturing strategies for fructooligosaccharide production	Castro, Cristiana C.; Nobre, Clarisse; De Weireld, Guy; Hantson, Anne-Lise	NEW BIOTECHNOLOGY	2019	29	10.1016/j.nbt.2019.01.009
Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from date by-products using an immobilized crude enzyme preparation of β -D-fructofuranosidase from <i>Aspergillus awamori</i> NBRC 4033	Smaali, Issam; Jazzar, Souhir; Soussi, Asma; Muzard, Murielle; Aubry, Nathalie; Marzouki, M. Nejib	BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING	2012	29	10.1007/s12257-011-0388-9
Fructose production from inulin using fungal inulinase immobilized on 3-aminopropyl-triethoxysilane functionalized multiwalled carbon nanotubes	Singh, Ram Sarup; Chauhan, Kanika; Kennedy, John F.	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	2019	28	10.1016/j.ijbiomac.2018.11.281
Recent advances in β -galactosidase and fructosyltransferase immobilization technology	Ureta, Maria Micaela; Martins, Goncalo Nuno; Figueira, Onofre; Pires, Pedro Filipe; Castilho, Paula Cristina; Gomez-Zavaglia, Andrea	CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION	2021	27	10.1080/10408398.2020.1783639
Vinyl sulfone-activated silica for efficient covalent immobilization of alkaline unstable enzymes: application to levansucrase for fructooligosaccharide synthesis	Santos-Moriano, P.; Monsalve-Ledesma, L.; Ortega-Munoz, M.; Fernandez-Arrojo, L.; Ballesteros, A. O.; Santoyo-Gonzalez, F.; Plou, F. J.	RSC ADVANCES	2016	27	10.1039/c6ra14046g
Production of fructooligosaccharides using β -fructofuranosidase immobilized onto chitosan-coated magnetic nanoparticles	Chen, Su-Ching; Sheu, Dey-Chyi; Duan, Kow-Jen	JOURNAL OF THE TAIWAN INSTITUTE OF CHEMICAL ENGINEERS	2014	27	10.1016/j.jtice.2013.10.003

Título	Autores	Revista	Ano	Total de Citações	DOI
Screening and selection of potential carriers to immobilize <i>Aureobasidium pullulans</i> cells for fructo-oligosaccharides production	Castro, C. C.; Nobre, C.; Duprez, M. -E.; De Weireld, G.; Hantson, A. -L.	BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL	2017	26	10.1016/j.bej.2016.11.011
Co-immobilization of β -fructofuranosidase and glucose oxidase improves the stability of Bi-enzymes and the production of lactosucrose	Long, Jie; Pan, Ting; Xie, Zhengjun; Xu, Xueming; Jin, Zhengyu	LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY	2020	25	10.1016/j.lwt.2020.109460
Kinetics of sucrose conversion to fructo-oligosaccharides using enzyme (invertase) under free condition	Khandekar, Deepa C.; Palai, Tapas; Agarwal, Aman; Bhattacharya, Prashant K.	BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING	2014	25	10.1007/s00449-014-1230-5
Purification and biochemical characterization of a novel β -fructofuranosidase from <i>Penicillium oxalicum</i> with transfructosylating activity producing neokestose	Xu, Qiangsheng; Zheng, Xiaoqun; Huang, Meiping; Wu, Min; Yan, Yusi; Pan, Jiamao; Yang, Qi; Duan, Cheng-Jie; Liu, Jun-Liang; Feng, Jia-Xun	PROCESS BIOCHEMISTRY	2015	24	10.1016/j.procbio.2015.04.020
Invertase of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides	Bhalla, Tek Chand; Bansuli; Thakur, Neerja; Savitri; Thakur, Navdeep	LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY	2017	23	10.1016/j.lwt.2016.11.034
Utilization of cassava wastes in the production of fructosyltransferase by <i>Rhizopus stolonifer</i> LAU 07	Lateef, A.; Kana, E. B. Gueguim	ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL LETTERS	2012	23	
Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides	Fernandez-Arrojo, Lucia; Rodriguez-Colinas, Barbara; Gutierrez-Alonso, Patricia; Fernandez-Lobato, Maria; Alcalde, Miguel; Ballesteros, Antonio O.; Plou, Francisco J.	PROCESS BIOCHEMISTRY	2013	46	10.1016/j.procbio.2013.02.015
Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors	Lorenzoni, Andre S. G.; Aydos, Luiza F.; Klein, Manuela P.; Ayub, Marco A. Z.; Rodrigues, Rafael C.; Hertz, Plinho F.	JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B-ENZYMATIC	2015	40	10.1016/j.molcatb.2014.11.002

Titulo	Autores	Revista	Ano	Total de Citações	DOI
Recent advances in β -galactosidase and fructosyltransferase immobilization technology	Ureta, Maria Micaela; Martins, Goncalo Nuno; Figueira, Onofre; Pires, Pedro Filipe; Castilho, Paula Cristina; Gomez-Zavaglia, Andrea	CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION	2021	27	10.1080/10408398.2020.1783639
Vinyl sulfone-activated silica for efficient covalent immobilization of alkaline unstable enzymes: application to levansucrase for fructooligosaccharide synthesis	Santos-Moriano, P.; Monsalve-Ledesma, L.; Ortega-Munoz, M.; Fernandez-Arrojo, L.; Ballesteros, A. O.; Santoyo-Gonzalez, F.; Plou, F. J.	RSC ADVANCES	2016	27	10.1039/c6ra14046g
A Comparative Study on Immobilization of Fructosyltransferase in Biodegradable Polymers by Electrospinning	Gabrielczyk, Jakub; Duensing, Thilo; Buchholz, Stefanie; Schwinges, Alexander; Joerdening, Hans-Joachim	APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY	2018	20	10.1007/s12010-018-2694-6
Enzymatic production of fructooligosaccharides from inexpensive and abundant substrates using a membrane reactor system	Rehman, Amad Ur; Kovacs, Zoltan; Quitmann, Hendrich; Ebrahimi, Mehrdad; Czermak, Peter	SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY	2016	20	10.1080/01496395.2016.1167740
Immobilization of the β -fructofuranosidase from <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> by Entrapment in Polyvinyl Alcohol and Its Application to Neo-Fructooligosaccharides Production	Miguez, Noa; Gimeno-Perez, Maria; Fernandez-Polo, David; Cervantes, Fadia V.; Ballesteros, Antonio O.; Fernandez-Lobato, Maria; Ribeiro, Maria H.; Plou, Francisco J.	CATALYSTS	2018	17	10.3390/catal8050201
Development of a continuous L-lysine bioconversion system for cadaverine production	Kim, Jung-Ho; Seo, Hyung-Min; Sathiyarayanan, Ganesan; Bhatia, Shashi Kant; Song, Hun-Suk; Kim, Junyoung; Jeon, Jong-Min; Yoon, Jeong-Jun; Kim, Yun-Gon; Park, Kyungmoon; Yang, Yung-Hun	JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY	2017	17	10.1016/j.jiec.2016.09.038

Titulo	Autores	Revista	Ano	Total de Citações	DOI
Optimized endodextranase-epoxy CIM® disk reactor for the continuous production of molecular weight-controlled prebiotic isomalto-oligosaccharides	Chalane, Seltanna; Delattre, Cedric; Michaud, Philippe; Lebert, Andre; Gardarin, Christine; Kothari, Damini; Creuly, Catherine; Goyal, Arun; Strancar, Aleg; Pierre, Guillaume	PROCESS BIOCHEMISTRY	2017	11	10.1016/j.procbio.2017.04.017
Kinetic/thermodynamic study of immobilized β -fructofuranosidase from <i>Aspergillus tamaraii</i> URM4634 in chitosan beads and application on invert sugar production in packed bed reactor	de Oliveira, Rodrigo Lira; Vilela dos Santos, Vinicius Luis; da Silva, Marcos Fellype; Porto, Tatiana Souza	FOOD RESEARCH INTERNATIONAL	2020	10	10.1016/j.foodres.2020.109730
An improved method for the production of fructooligosaccharides by immobilized - fructofuranosidase from <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Mouelhi, Refka; Abidi, Ferid; Marzouki, Mohamed Nejib	BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY	2016	10	10.1002/bab.1360
Artificial Neural Network-Assisted Spectrophotometric Method for Monitoring Fructo-oligosaccharides Production	Erdos, Balazs; Grachten, Maarten; Czermak, Peter; Kovacs, Zoltan	FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY	2018	6	10.1007/s11947-017-2011-3
Continuous production of fructo-oligosaccharides using selectively immobilized fructosyltransferase from <i>Aspergillus aculeatus</i> onto PuroLite® A109	Veljkovic, Milica; Stepanovic, Relja; Banjanac, Katarina; Corovic, Marija; Milivojevic, Ana; Simovic, Milica; Milivojevic, Milan; Bezbradica, Dejan	JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY	2023	5	10.1016/j.jiec.2022.09.051
Sucrose biotransformation by immobilized <i>Phaffia rhodozyma</i> and continuous neokestose production in a packed-bed reactor	Bie, Xiao-Ying; Zhu, Ming-Jun	BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION	2016	4	10.1080/10242422.2016.1247813
Heterofunctional epoxy support development for immobilization of fructosyltransferase from Pectinex® Ultra SP-L: batch and continuous production of fructo-oligosaccharides	Veljkovic, Milica; Simovic, Milica; Banjanac, Katarina; Corovic, Marija; Milivojevic, Ana; Milivojevic, Milan; Bezbradica, Dejan	REACTION CHEMISTRY & ENGINEERING	2022	3	10.1039/d2re00182a

Titulo	Autores	Revista	Ano	Total de Citações	DOI
Study on the transfructosylation activity of <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 cells in a packed bed reactor aiming at fructooligosaccharide production	Dias, Giancarlo S.; Santos, Erica D.; Xavier, Michelle Ca; Almeida, Alex F.; Silva, Elda S.; Maiorano, Alfredo E.; Perna, Rafael F.; Morales, Sergio Av	JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	2022	2	10.1002/jctb.7163
Immobilisation of Endoinulinase on Polyhydroxybutyrate Microfibrils	Beran, Milos; Pinkrova, Jitka; Urban, Marian; Drahorad, Josef	CZECH JOURNAL OF FOOD SCIENCES	2016	2	10.17221/72/2016-CJFS
Invertase Immobilization on Magnetite Nanoparticles for Efficient Fructooligosaccharide Generation: A Comprehensive Kinetic Analysis and Reactor Design Strategy	Melo, David Polania; Bravo, Andres Hernandez; Cruz, Juan C.; Reyes, Luis H.	CHEMENGINEERING	2023	1	10.3390/chemengineering7030055
Techno-economic comparison of different reactor types used in the manufacture of fructooligosaccharides from sucrose	Vacharanukrauh, Treerat; Plubwungklam, Sasina; Pichyangkura, Rath; Soottitantawat, Apinan	ASIA-PACIFIC JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING	2023	1	10.1002/apj.2936
Immobilization of Fructofuranosidase from <i>Aureobasidium</i> sp. Onto TiO ₂ and Its Encapsulation on Gellan Gum for FOS Production	Valdeon, Daniel H.; Araujo, Paula Z.; Daz, Mirta; Perotti, Nora I.	INTERNATIONAL JOURNAL OF CHEMICAL REACTOR ENGINEERING	2019	1	10.1515/ijcre-2018-0135
An Exploration of various Fructooligosaccharides production methods using novel engineered enzymes with innovative core-shell chitosan beads	Vacharanukrauh, Treerat; Plubwungklam, Sasina; Puangpathanachai, Manatsanan; Wangpaiboon, Karan; Pichyangkura, Rath; Soottitantawat, Apinan	LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY	2024	0	10.1016/j.lwt.2024.116200

Titulo	Autores	Revista	Ano	Total de Citações	DOI
CROSS-LINKED WHOLE CELLS FOR THE SUCROSE TRANSFRUCTOSYLATION REACTION IN A CONTINUOUS REACTOR	Ribeiro, Beatriz Menossi; De Sandre Junior, Leandro Da Rin; Dias, Giancarlo De Souza; Xavier, Michelle Da Cunha Abreu; De Almeida, Alex Fernando; Da Silva, Elda Sabino; Maiorano, Alfredo Eduardo; Perna, Rafael Firmani; Morales, Sergio Andres Villalba	CHEMICAL INDUSTRY & CHEMICAL ENGINEERING QUARTERLY	2023	0	10.2298/CIC EQ221220015M

Fonte: Da Autora, utilizando o software Vosviewer

**APÊNDICE B - ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE
GLUTERALDEÍDO**

Método	Artigo de Referência	Autores	Número de citações	DOI
Cromatografia gasosa de microextração em fase sólida (HS-SPME)	Determination of glutaraldehyde in water samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,2,2-trifluoroethylhydrazine	Kang, HI e Shin, HS	11	10.1016/j.chroma.2016.04.049
Espectrometria de massa (GC-MS)	Determination of glutaraldehyde in water samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,2,2-trifluoroethylhydrazine	Kang, HI e Shin, HS	11	10.1016/j.chroma.2016.04.049
Extinção de fluorescência	Detection of glutaraldehyde in aqueous environments based on fluorescence quenching of a conjugated polymer with pendant protonated primary amino groups	B. Pranaidadet, A. Padarauskas, A. Dikčius, R. Ragauskas	13	10.1039/C7TC01195D
Eletroforese capilar	Rapid capillary electrophoretic determination of glutaraldehyde in photographic developers using a cationic polymer coating	B. Pranaidadet, A. Padarauskas, A. Dikčius, R. Ragauskas	19	10.1016/j.aca.2003.11.028
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	Reductive amination of glutaraldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone using 2-picoline borane and high-performance liquid chromatographic analysis	Shigehisa Uchiyama, Hironari Sakamoto, Akiko Ohno, Yohei Inaba, Hideki Nakagome e Naoki Kunugita	13	10.1039/c2an35230c
Derivatização com dinitrofenil-hidrazina (DNPH)	Fast specific separation and sensitive quantification of bactericidal and sporicidal aldehydes by high-performance liquid chromatography: example of glutaraldehyde determination	M.-C. Menetum, D. Gueylard, M.-H. Fievet, A. Thuillier	16	10.1016/S0378-4347(96)00455-0

Fonte: Da Autora, utilizando o software Vosviewer

APÊNDICE C - CÓDIGO PYTHON PARA AJUSTE DO MODELO SPLINES CÚBICOS

SUAVIZADOS

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.interpolate import UnivariateSpline
from sklearn.metrics import r2_score

# Dados experimentais de AT/A0 por temperatura
dados_atividade = {
    '60 °C': {
        'tempo': np.array([60, 300, 600, 960, 2160]),
        'atividade': np.array([0.063248949, 0.040402824, 0.041021454, 0.037688535,
                                0.042542112])
    },
    '55 °C': {
        'tempo': np.array([60, 300, 600, 960, 2160]),
        'atividade': np.array([0.316307547, 0.196405015, 0.095182968, 0.041165973,
                                0.042237077])
    },
    '45 °C': {
        'tempo': np.array([60, 300, 600, 960, 2160]),
        'atividade': np.array([0.725712857, 0.592559296, 0.591609855, 0.561217419,
                                0.387140277])
    },
    '40 °C': {
        'tempo': np.array([60, 300, 600, 960, 2160]),
        'atividade': np.array([0.749792089, 0.671878189, 0.495529724, 0.471921947,
                                0.422141045])
    }
}

# Cores e marcadores
cores = {'60 °C': 'red', '55 °C': 'orange', '45 °C': 'green', '40 °C': 'blue'}
marcadores = {'60 °C': 'o', '55 °C': 's', '45 °C': 'v', '40 °C': '^'}

# Criar figura
plt.figure(figsize=(10, 6))

# Ajuste spline e plotagem
for temp, dados in dados_atividade.items():
    tempo = dados['tempo']
    atividade = dados['atividade']
    cor = cores[temp]
    marcador = marcadores[temp]

# Ajuste spline
spline = UnivariateSpline(tempo, atividade, s=0.001)
tempo_fit = np.linspace(min(tempo), max(tempo), 300)

```

```
atividade_fit = spline(tempo_fit)

# Calcular R2
atividade_pred = spline(tempo)
r2 = r2_score(atividade, atividade_pred)

# Plotar dados e ajuste
plt.scatter(tempo, atividade, color=cor, marker=marcador, label=f"{temp}
(R2={r2:.4f})")
plt.plot(tempo_fit, atividade_fit, color=cor, linestyle='--')

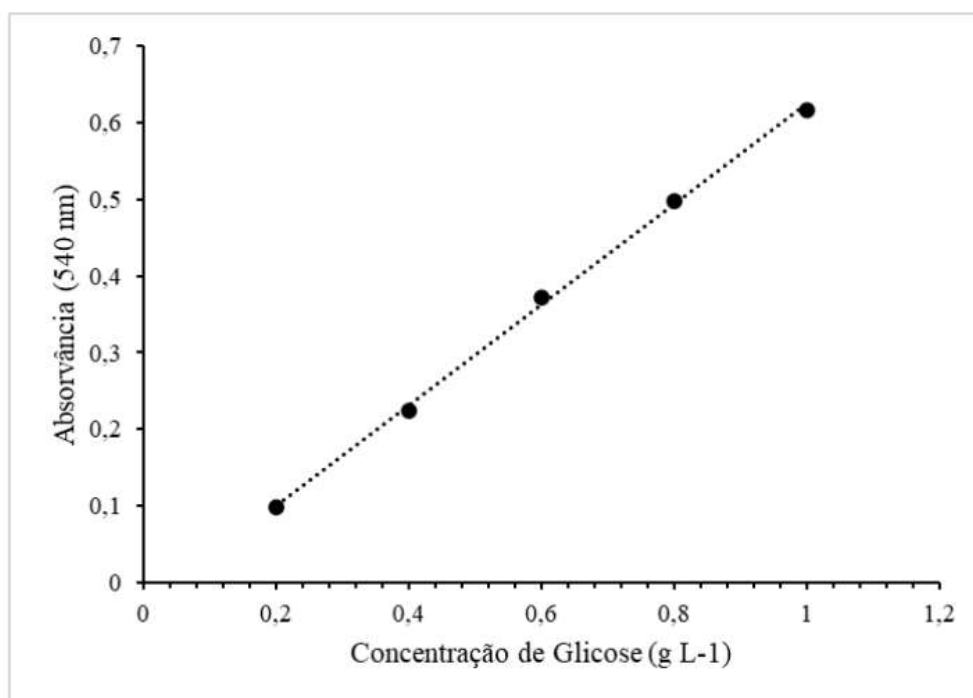
# Configurações do gráfico
plt.xlabel("Tempo (min)")
plt.ylabel("AT / A0")
plt.title("Ajuste Cinético - Modelo Spline")
plt.ylim(-0.1, 1.2)
plt.legend(title="Temperatura")
plt.grid(True)
plt.tight_layout()
plt.savefig("ajuste_cinetico_modelo_spline.png", dpi=300)
```

APÊNDICE D - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR

Para obtenção da curva de calibração (Figura 11), inicialmente foi preparada solução padrão- mãe de glicose anidra na concentração de 1 g L^{-1} . Posteriormente, foram realizadas diluições para obtenção de soluções com concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 g L^{-1} . Após, realizou-se o mesmo processo que se deu com as amostras e com os valores de absorvâncias, plotou-se um gráfico de dispersão, em que o eixo X representou a concentração de glicose (g L^{-1}) e o eixo Y, as absorvâncias medidas e a partir disso, foi gerada a equação da reta correlacionando os termos de variável dependente (Y) com concentração, o coeficiente angular (a) com a absorvância e a variável independente (X) com a absorvância (Equação 8). O valor do coeficiente de correlação (R^2) obtido por meio do ajuste linear foi 0,9987.

$$Y = aX + b \therefore [g L^{-1}] = a [ABS] + b \quad (8)$$

Figura 11- Curva de calibração obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação da concentração de açúcares redutores



Fonte: Autora (2025)