

CAPÍTULO 5

SUPORTES POROSOS PARA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FTASE: *REVIEW*

Jéssica Barbosa Fanis
Sylma Carvalho Maestrelli

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são conhecidos por serem açúcares mais saudáveis quando comparados aos açúcares amplamente comercializados tendo em vista o seu baixo valor calórico, sua segurança de consumo aos diabéticos e sua atuação como prebiótico, proporcionando uma série de benefícios à saúde e nutrição humana, como o aumento da flora bacteriana intestinal, a diminuição dos níveis de colesterol e triglicerídeos e a melhora do sistema imunológico. Os FOS são compostos de origem natural e podem ser encontrados, embora em baixa concentração, em diversas espécies vegetais, o que inviabiliza a sua produção e comercialização em larga escala e estimula a busca por técnicas alternativas da sua produção nos setores alimentício e farmacêutico. Diante desse cenário, enzimas como a frutotransferase (FTase, E.C. 2.4.1.9), de *Aspergillus oryzae* IPT-301 podem catalisar a reação de transfrutosilação da sacarose para produção de FOS; contudo, o tempo de meia vida dessas enzimas extracelulares é curto e acaba comprometendo a produção de FOS em larga escala. Sendo assim, a imobilização dessas enzimas em suportes inertes e insolúveis é uma das maneiras de aumentar a sua estabilidade. Tais suportes atuarão como uma barreira protetora diante de condições adversas do meio reacional, contribuindo para o aumento do tempo de meia vida das enzimas e aumentando seu potencial de reuso. Além disso, a imobilização de enzimas permite a sua aplicação em processos contínuos, fator que implica diretamente na redução dos custos operacionais e no aumento da produtividade do processo. Para o bom desempenho da enzima imobilizada, deve-se considerar as características do suporte utilizado, tais como estabilidade química, resistência mecânica, retenção da atividade enzimática inicial, durabilidade e capacidade de reutilização, custo e facilidade de manuseio, além de outras. Este trabalho teve como objetivo fazer um *review* da literatura dos suportes inertes porosos para imobilização, por adsorção, de enzimas FTases extracelulares microbianas, abrangendo desde os materiais utilizados, bem como seu processamento, propriedades e sua aplicabilidade potencial como material de suporte das FTases para a reação de transfrutosilação da sacarose.

PALAVRAS-CHAVE: FOS. Suporte Enzimático. Catálise Heterogênea. Materiais Porosos.

1. INTRODUÇÃO

A constante busca pela implementação de alternativas sustentáveis no meio industrial, que condizem com os critérios estabelecidos pela Química Verde, em conjunto com a necessidade de obtenção de produtos específicos, tornam a implementação da tecnologia enzimática uma possibilidade cada vez mais atrativa às companhias (DENTI, 2021).

Devido às suas excelentes propriedades funcionais, as enzimas são capazes de catalisar processos químicos considerados complexos sob condições experimentais e ambientais mais favoráveis (GUISAN, 2006). Contudo, embora as enzimas se destaquem por sua atuação dentro da área de catálise, elas apresentam algumas características que não são tão adequadas para aplicações industriais, uma vez que atuam como catalisadores solúveis, geralmente instáveis e que podem ser facilmente inibidos por substratos e/ou produtos. Dessa forma, antes das enzimas

serem aplicadas em processos industriais, elas são tratadas de forma a garantir a melhor eficiência de suas propriedades na hora de sua aplicação.

Sendo assim, a imobilização se torna uma etapa crucial para o uso de enzimas na indústria. Partindo dessa premissa, muitos pesquisadores têm focado em compreender e controlar a imobilização de enzimas a fim de utilizar esse processo como uma poderosa ferramenta capaz de melhorar as propriedades enzimáticas, tais como estabilidade, atividade, seletividade, redução de inibições, entre outros (BARBOSA *et al.*, 2013).

Atualmente existe uma gama bastante diversificada de protocolos de imobilização enzimática que se diferenciam, basicamente, quanto ao tipo de suporte e sua eficiência. Todavia, ainda não há nenhum método ou suporte de imobilização que consiga ser unicamente aplicável a todas as enzimas conhecidas, sendo necessária a realização de um estudo prévio acerca das características do suporte e dos efeitos dos métodos empregados para a seleção da melhor técnica a ser utilizada em cada caso. De um modo geral, busca-se sempre pelo procedimento mais simples e barato.

Os principais componentes de um sistema enzimático imobilizado são: enzima, suporte e modo de fixação. A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada advém do suporte e, embora existam diferentes materiais que possam ser aplicados na imobilização enzimática, a sua escolha dependerá, fundamentalmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada (SOUZA *et al.*, 2016).

Os suportes podem ser classificados quanto à sua composição química de origem (em materiais orgânicos e inorgânicos) e/ou quanto à sua morfologia (em materiais porosos, não porosos e de estrutura em gel). Para que um material seja considerado adequado ao uso como suporte, é necessário que ele compreenda alguns requisitos básicos, tais como elevada área superficial, permeabilidade, biocompatibilidade, estabilidade química e mecânica sob condições operacionais, capacidade de regeneração, morfologia e composição, hidrofobicidade ou hidrofobicidade, resistência ao ataque microbiano e disponibilidade a baixo custo (SOUZA *et al.*, 2016; BRENA; VIERA, 2006).

O diâmetro médio e tipos de poros, bem como o tamanho médio das partículas são os principais fatores que determinam a área superficial específica e, dessa forma, afetam diretamente na capacidade de ligação das enzimas. Assim, suportes porosos são capazes de reter uma maior carga de enzima em decorrência de sua maior área superficial quando comparado a suportes não porosos, permitindo também que a enzima imobilizada receba uma maior proteção

do ambiente onde estará inserida. Ressalta-se ainda que os suportes porosos devem ter uma distribuição de poros controlada para otimizar a capacidade e as propriedades de fluxo (BRENA; VIERA, 2006).

Os materiais orgânicos, com destaque aos polímeros, compõem uma classe de suportes de suma importância para a imobilização enzimática. Se por um lado os polímeros sintéticos possuem uma ampla variedade de formas físicas e estruturas químicas a ser combinadas de acordo com as características desejadas, os polímeros naturais são geralmente mais acessíveis financeiramente e mais facilmente degradáveis, sendo a opção ambientalmente mais favorável (SOUZA *et al.*, 2016). Em consequência disso, os suportes porosos formados por matrizes orgânicas são preferidos para aplicações industriais.

Dessa forma, o presente estudo busca fazer um *review* acerca dos suportes porosos utilizados para imobilização enzimática com enfoque na enzima frutossiltransferase (FTase) para a catalisação das reações de transfrutossilacção da sacarose para produção de frutooligossacarídeos (FOS).

Para isso, foi necessário entender o consumo de açúcar na sociedade moderna e a busca da população por alimentos funcionais, em seguida expor as formas de produção dos FOS por meio das enzimas FTase e, com isso, determinar as características dos potenciais suportes a serem utilizados na imobilização das FTases.

2. JUSTIFICATIVA

De forma semelhante ao que ocorre com o álcool, o tabaco e outras drogas, o alto consumo de açúcares e demais alimentos de alto índice calórico tem contribuído fortemente para o desenvolvimento e/ou intensificação de problemas metabólicos, tais como obesidade, diabetes, hipertensão e problemas cardiovasculares. Isso fez com que a sociedade desenvolvesse uma significativa preocupação no que se refere a qualidade de vida e a saúde, acarretando um aumento do cuidado acerca dos alimentos que consomem (PASSOS; PARK, 2003).

Diante da procura dos consumidores por alimentos funcionais, os FOS se mostram como uma alternativa mais saudável e menos calórica aos açúcares tradicionalmente utilizados na dieta humana. Estes oligômeros de frutose têm se destacado tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia, uma vez que se tratam de açúcares prebióticos, que proporcionam uma série de benefícios à saúde e nutrição humana, como o aumento da flora bacteriana intestinal, a diminuição dos níveis de colesterol e triglicerídeos e a melhora do sistema imunológico como

um todo (PASSOS; PARK, 2003; ROCHA *et al.*, 2021). Assim sendo, o desenvolvimento de tecnologias que permitam a obtenção de açúcares mais saudáveis (como é o caso do FOS) em larga escala é de suma importância para a sociedade atual. A relevância deste trabalho está associada à coleta de informações sobre suportes que viabilizem a imobilização e prolonguem o tempo de meia vida de enzimas FTase, responsáveis pela produção do FOS.

O desenvolvimento de suportes de menor custo, inertes, insolúveis, quimicamente estáveis, reutilizáveis, que sejam reprodutíveis em escala industrial e que tenham compatibilidade com as enzimas FTase proporcionará maior velocidade de produção dos FOS, fazendo com que o mesmo se torne comercialmente e economicamente viável, acelerando o setor que mais vem ganhando forças entre os brasileiros: o dos alimentos saudáveis, que atingiu a marca de R\$100 bilhões em vendas no país no ano de 2020, segundo a Euromonitor Internacional (CNN BRASIL, 2021). Assim, o levantamento bibliográfico dentro da temática apresentada será importante para o desenvolvimento e amplitude do conhecimento acerca dos materiais porosos com aplicação biotecnológica, mais especificamente como suporte para a imobilização de enzimas aplicáveis na produção de biomoléculas de alto valor agregado e de interesse comercial.

3. A SOCIEDADE MODERNA E O CONSUMO DE AÇÚCAR

Mudanças nos hábitos alimentares têm sido observadas nas últimas décadas ao redor de todo o mundo, revelando a complexidade dos modelos de consumo e seus fatores determinantes (OLIVEIRA; THÉBAUD-MONY, 1997). Um assunto que vem sendo cada vez mais exposto em debates científicos é a alta ingestão de açúcar da população mundial considerando suas implicações à saúde humana, sobretudo no risco de obesidade (SLUIK *et al.*, 2016).

Estudos acerca das mudanças no padrão alimentar da população brasileira nos últimos anos destacam o aumento do consumo de carnes e alimentos industrializados e a redução do consumo de leguminosas, frutas e hortaliças (CLARO *et al.*, 2015). A corrida contra o tempo enfrentada pela sociedade moderna faz com que a população dê preferência ao consumo de alimentos rápidos, como os famosos *fast-foods* e demais refeições prontas que geralmente vêm acompanhadas de refrigerantes ou sucos industrializados, os quais apresentam alto índice calórico e uma elevada concentração de açúcares e derivados.

Partindo dessa realidade, é possível compreender um dos motivos pelo qual os brasileiros consomem cerca de 50% a mais de açúcar do que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Isso implica em um consumo diário médio de 80 gramas de açúcar

ao dia, o equivalente a 18 colheres de chá, sendo que o limite máximo aconselhado pela OMS para um adulto é de 12 colheres de chá do produto mencionado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

É notável que o excesso do consumo de açúcar o torna extremamente nocivo à saúde humana. Essa prática conciliada ao alto consumo de outros alimentos de elevado índice calórico contribuem consideravelmente para o aumento do risco de obesidade e propensão a doenças crônicas como diabetes, hipertensão e câncer. Em consequência disso, a sociedade moderna vem desenvolvendo uma preocupação cada vez mais nítida no que diz respeito à qualidade de vida e a saúde, trazendo um maior cuidado acerca dos alimentos consumidos.

A busca por alimentos funcionais que beneficiem a saúde humana para além de suas funções nutricionais básicas cresce diariamente. Diante disso, os FOS ganham destaque como uma excelente alternativa para os consumidores que prezam por uma alimentação mais saudável e menos calórica em substituição aos açúcares tradicionalmente utilizados na dieta humana.

4. A PRODUÇÃO DE FOS

Os frutooligossacarídeos, comumente nomeados como FOS, são açúcares não convencionais, não metabolizados pelo organismo humano e não calóricos (PASSOS; PARK, 2003). Por se tratarem de açúcares mais saudáveis se comparados aos açúcares amplamente comercializados (tendo em vista o seu baixo valor calórico, sua segurança de consumo aos diabéticos e sua atuação como prebiótico) e por apresentarem diversos benefícios à saúde e nutrição humana, os FOS estão se tornando alvo de interesse nas indústrias farmacêutica e alimentícia, com destaque na atuação como substitutos aos edulcorantes convencionais, o que torna necessário o desenvolvimento de processos em escala industrial que permitam a produção desses componentes.

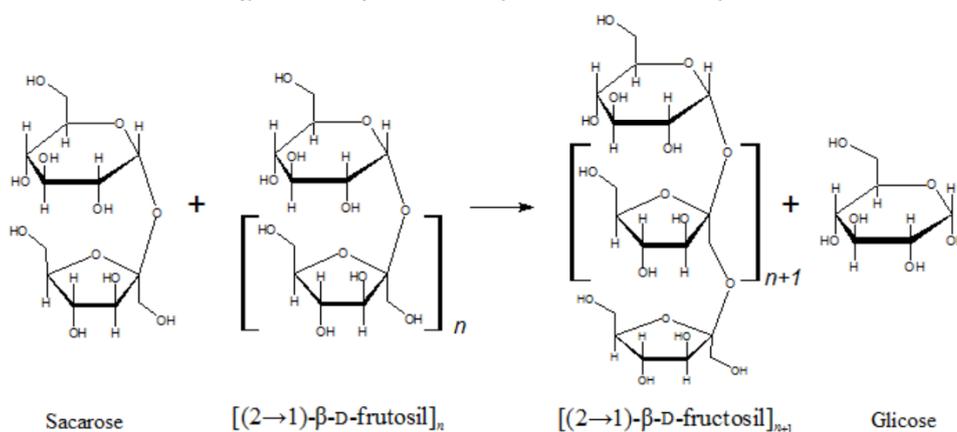
Os FOS são oligômeros de frutose formados por unidades frutose e que podem ser encontrados naturalmente, embora em pequenas quantidades, em alguns vegetais e frutas. Esses açúcares também podem ser obtidos pela ação catalítica de enzimas que exibem atividade de transfrutose, utilizando sacarose como substrato (GONÇALVES, 2019). Dessa forma, a produção de FOS em escala industrial ocorre mediante reação de transfrutose enzimática da sacarose.

As enzimas capazes de realizar tal ação de transfrutose são, principalmente, as frutose transferases e as β -frutofuranosidases. No entanto, as frutose transferases (FTase, E.C.

2.4.1.9) ganham ainda mais destaque na produção dos FOS em decorrência da sua ação catalítica, exibindo altas atividades de transfrutoseilação (PASSOS; PARK, 2003).

A reação de transfrutoseilação ocorre quando a FTase se conecta na posição β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, clivando-a e separando o grupo frutose do grupo glicosil. Em seguida, o grupo frutose se conecta a uma molécula aceptora apropriada, como a sacarose ou outras moléculas de FOS, produzindo um oligômero de frutose e liberando glicose no meio reacional (ROCHA *et al.*, 2021), conforme Figura 1.

Figura 2: Esquema da reação de transfrutoseilação.



Fonte: Cunha (2017, p. 25).

A produção industrial de FOS é realizada, basicamente, através de dois processos produtivos distintos. O primeiro deles consiste em um processo composto de duas etapas, sendo estas divididas em um processo fermentativo e um processo enzimático, onde primeiramente as enzimas são produzidas por fermentação e, em seguida, são aplicadas de forma livre ou imobilizada na etapa reacional. Já o segundo processo consiste em apenas uma etapa, na qual são utilizadas células completas de determinado micro-organismo, em suspensão ou imobilizado, sendo os FOS produzidos concomitantemente ao processo fermentativo (CUNHA, 2017).

Tendo em vista que a produção de biomassa é limitada pelos requerimentos do micro-organismo e que as condições ótimas de crescimento podem não ser as mesmas condições ótimas de produção dos FOS, os processos que consistem de duas etapas são preferidos. Além disso, a fim de determinar as melhores condições reacionais para produção em larga escala é necessário compreender sobre os valores ideais de pH, temperatura, concentração de substrato, estabilidade frente ao pH e à temperatura e os parâmetros cinéticos da enzima de interesse, para só então utilizá-las com ou sem ajustes mínimos para que a reação ocorra (CUNHA, 2017).

A temperatura operacional de produção de FOS pelo uso de FTase microbiana varia entre 50 e 60 °C, faixa na qual a viscosidade da solução altamente concentrada de sacarose é baixa o suficiente para não interferir na reação e influenciar de forma favorável na taxa de reação enzimática. Por outro lado, o pH ótimo da produção depende da fonte enzimática: para FTases isoladas a partir de alcachofras de Jerusalém, o pH ótimo está entre 3,5 e 5; para aquelas isoladas a partir de *Aspergillus oryzae* o pH ótimo se encontra entre 8 e 9; contudo, a maioria das FTases possuem faixa ótima de pH entre 5 e 6,5 (CUNHA, 2017). Logo, o ideal é realizar o melhor ajuste entre as condições reacionais citadas acima em acordo com o requerimento de cada produto desejado, atingindo as condições ótimas do processo de produção.

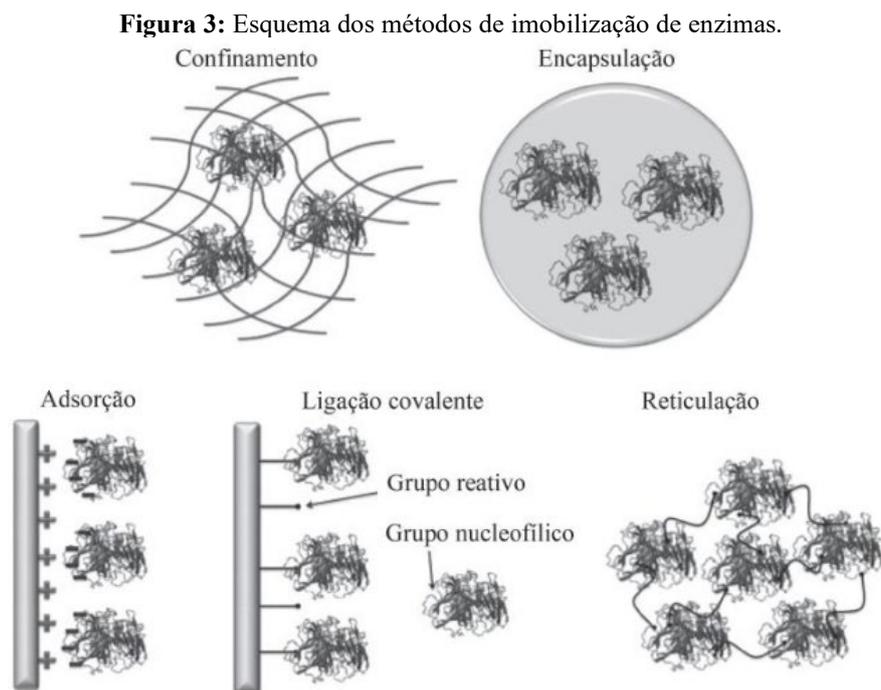
5. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: CARACTERÍSTICAS E MÉTODOS

O uso de enzimas em sua forma livre apresenta diversos problemas que se relacionam à baixa estabilidade operacional, seus elevados custos, à impossibilidade de reutilização da enzima e à dificuldade na recuperação dos produtos (GONÇALVES, 2019). Tais desvantagens tendem a dificultar a produção em larga escala e, conseqüentemente, a comercialização dos produtos enzimáticos. Todavia essas inconveniências podem ser amenizadas com o uso de diferentes técnicas de imobilização enzimática.

Imobilização é um termo genérico utilizado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. Para o caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos (SOUZA *et al.*, 2016), a qual pode ser usada de forma isolada ou em combinação com outras técnicas de estabilização de proteínas.

O principal interesse acerca da imobilização enzimática se encontra no alcance de biocatalisadores com atividade e estabilidade operacional que sejam pouco ou nada afetados durante o processo no qual as enzimas serão inseridas e que proporcionem o máximo de reutilização da enzima diante dos parâmetros que podem inativá-las, como temperatura do meio reacional, pH, solventes orgânicos e demais interferências, cooperando positivamente com o meio ambiente e otimizando ao máximo a produção industrial (QUEISSADA; SILVA, 2020).

As enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, dentre os quais Fernández-Fernández *et al.* (2013) classificam como: confinamento, encapsulação, adsorção, ligação covalente e reticulação (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Fernández-Fernández *et al.* (2013, p. 1812-1813).

A seleção do método ideal de imobilização para determinada aplicação deve ser baseada em parâmetros como atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada (SOUZA *et al.*, 2016).

6. SUPORTES POROSOS PARA PRODUÇÃO DE FOS: CARACTERÍSTICAS

A imobilização enzimática carrega consigo alguns benefícios e/ou vantagens diante do uso de enzimas livres nos quais se incluem o aumento da estabilidade operacional, a capacidade de implementação de processos enzimáticos contínuos, a possibilidade de recuperação e reutilização dos biocatalisadores, a redução dos custos operacionais e a ausência de biocatalisador na corrente de produto devido à facilidade na separação e seleção dos mesmos (GONÇALVES, 2019; SOUZA *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que, embora atualmente exista uma gama bastante diversificada de protocolos para imobilização enzimática, nenhum método ou suporte é unicamente aplicável a todas as enzimas conhecidas. Dessa forma, se faz necessário um estudo prévio acerca das características do suporte que se tem interesse e dos efeitos dos métodos empregados para a seleção da melhor técnica a ser utilizada em cada caso.

a. Suportes porosos poliméricos

Os polímeros, sejam naturais ou sintéticos, compõem a classe de suportes orgânicos, que é de suma importância no campo da imobilização enzimática (MENDES, 2009). Para fins comparativos, os polímeros sintéticos exibem uma grande variedade de formas físicas e estruturas químicas que podem ser re combinadas em busca do suporte ideal, ao passo que os polímeros naturais apresentam menores custos e maior facilidade de degradação quando descartados (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Diante de tais características, os suportes porosos poliméricos vêm sendo constantemente estudados e aplicados em experimentos para imobilização de enzimas FTase.

Gonçalves *et al.* (2019) utilizaram, para fins experimentais, a imobilização das enzimas FTase, produzidas a partir de *Aspergillus oryzae IPT-301*, por meio do encapsulamento em esferas de alginato de sódio. Utilizando $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como agentes de reticulação em diferentes concentrações, Gonçalves *et al.* (2019) conseguiram obter as condições ideais de encapsulação, considerando as atividades de transfrutoseilação (A_T). Dessa forma, o CaCl_2 mostrou-se mais eficiente como agente de reticulação do que o BaCl_2 , proporcionando baixas atividades hidrolíticas (A_H) e altas A_T , levando a maiores seletividades, ou seja, maiores relações A_T/A_H , e altos rendimentos de FOS. Ao comparar o uso de grânulos de alginato de sódio com a biomassa livre, os grânulos apresentaram melhor funcionalidade, manuseio e atividades de transfrutoseilação equivalentes ou até superiores em alguns casos, além de uma melhor seletividade.

Faria *et al.* (2019) estudou a imobilização de enzimas FTase produzidas por *Aspergillus oryzae IPT-301* em suportes feitos de esponja vegetal para a produção de FOS. Como forma de execução para seus experimentos, o caldo fermentado contendo FTases extracelulares foi imobilizado a partir de adaptações ao método de Sugahara e Varéa (2014). Utilizou-se de esponja vegetal previamente submetida a tratamento alcalino e seca a 40°C por 24h. Faria *et al.* (2019) calcularam os valores de rendimento de imobilização (IY %) e de atividade recuperada (RA %) o suporte de interesse. Com um IY de 34% e RA de 83,64%, a esponja vegetal apresentou a maior atividade recuperada considerando os suportes avaliados. Tais resultados indicam que a esponja vegetal é um suporte bastante promissor para a produção de FOS em processo descontínuo único.

Ganaie *et al.* (2014) focaram seus estudos e experimentos na imobilização de FTase em quitosana e também em alginato visando a produção contínua e eficiente de FOS. Para tal,

esferas de alginato foram desenvolvidas mantendo sua conformação esférica usando-se 0,3% (p/v) de alginato de sódio com 0,1% (p/v) de solução de CaCl_2 para maior atividade de transfrutossilação, ao passo que os grânulos de quitosana foram desenvolvidos misturando-se 0,1% (p/v) de quitosana em 10mL de solução de ácido acético glacial a 4% (p/v) sob agitação suave durante 1h. Após análise dos resultados, Ganaie *et al.* (2014) concluíram que tanto a quitosana quanto o alginato serviram como boas matrizes para aprisionar a FTase micelial durante a produção de FOS. No entanto, quando ambos os suportes foram utilizados para a produção de FOS, a eficiência de reciclagem dos grânulos de alginato foi mais bem sucedida em comparação com os grânulos de quitosana. Os dados obtidos pela análise de HPLC mostram 67,75% (p/p) de formação de FOS por grânulos de alginato e 42,79% (p/p) por esferas de quitosana em 36h de reação do substrato enzimático.

Estudos comparativos realizados por Araújo *et al.* (2021) determinaram o rendimento de imobilização (IY %) e a atividade recuperada (RA %) da FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilizada por adsorção em três diferentes suportes, dentre eles o polihidroxibutirato (PHB) e o farelo de soja. O PHB é um biopolímero com características que tornam sua aplicação bastante atraente para a imobilização de enzimas por adsorção, dentre os quais se destacam o seu baixo custo, a sua alta resistência mecânica e sua capacidade de regeneração, além de ser um material atóxico e inerte. Para o tratamento do suporte, o PHB foi lavado com etanol P.A. 95 % (v/v) na proporção de 1:10 (g de suporte: ml de caldo fermentado) sob agitação magnética a 25 °C por 6 horas. Ao término da lavagem, a solução foi filtrada a vácuo e o polímero armazenado em dessecador por 24 horas. Como resultados, Araújo *et al.* (2021) encontraram uma RA equivalente a 14% para o PHB e um IY de 41%, valores que permitem considerar o PHB como um potencial suporte aplicável na produção de FOS. O farelo de soja, por sua vez, destaca-se entre os materiais apresentados por sua alta disponibilidade, além de ser um material biodegradável e atóxico. Para o tratamento do suporte, o farelo de soja foi peneirado para classificação granulométrica entre 0,85 e 0,300 μm e seco em estufa a 60°C por 24h. Nesse estudo, Araújo *et al.* (2021) encontraram uma RA de 68% para o farelo de soja, bem como um IY de 36%, e, embora tenha sido o suporte com menor taxa de rendimento entre os demais, ele também foi o que apresentou a maior taxa de atividade recuperada.

Mussatto *et al.* (2009) testaram a aplicação de seis diferentes materiais com potencial aplicação na imobilização de enzimas *Aspergillus japonicus* para a produção de FOS. Dentre eles, a espuma de poliuretano e a fibra vegetal, a qual obteve maior destaque entre os demais. Para a execução do experimento, foram utilizadas amostras de 0,3 cm^3 tanto para a espuma de

poliuretano quanto para a fibra vegetal. As amostras foram previamente tratadas em fervura por 10 minutos, lavadas três vezes com água destilada e posteriormente secas durante a noite a 60°C. Antes do uso, as amostras foram levadas a autoclave a 121°C por 20 minutos. Em seus resultados, Mussatto *et al.* (2009) relataram que a espuma de poliuretano imobilizou uma maior quantidade de células em relação a outros suportes estudados, como a pedra-pomes, mas apresentou os piores resultados de fermentação, provavelmente devido a problemas de transferência de massa, pois esse material absorveu um volume maior de meio do que os demais avaliados. Em contrapartida, a fibra vegetal foi o melhor material utilizado na imobilização as enzimas *A. japonicus*, pois as mesmas permaneceram perfeitamente aderidas ao suporte durante o cultivo, permitindo uma alta produção de FOS. Além disso, a fibra vegetal é um material barato, mecanicamente forte e fácil de usar, não exigindo nenhum pré-tratamento severo ou de alto custo.

b. Suportes porosos cerâmicos

Os materiais cerâmicos compõem a classe de suportes denominados inorgânicos. Diante das diversas características que definem os suportes orgânicos (as quais foram citadas anteriormente), os suportes inorgânicos passam a ser considerados os mais apropriados para uso industrial, considerando suas características, dentre as quais destacam-se a sua elevada resistência mecânica, sua boa estabilidade térmica, sua alta resistência a solventes orgânicos e ao ataque de microrganismos (QUEISSADA; SILVA, 2020). Diante de tal relevância, os suportes porosos cerâmicos são constantemente aplicados em novos experimentos na busca pelos melhores resultados na imobilização de enzimas FTase.

Faria *et al.* (2019) estudou a imobilização de enzimas FTase produzidas por *Aspergillus oryzae IPT-301* em suportes de sílica gel visando a produção de FOS. O caldo fermentado contendo FTases extracelulares foi imobilizado a partir de adaptações ao método de Sugahara e Varéa (2014). Utilizou-se sílica gel seca a 60°C por 24h. Foram calculados os valores de rendimento de imobilização (IY %) e de atividade recuperada (RA %) para o suporte indicado. Com um IY equivalente a 85% e RA de 9,07%, a sílica gel apresentou o maior rendimento de imobilização e estabilidade operacional entre os suportes observados no estudo. Tais resultados sugerem que a sílica gel é um suporte promissor para a produção de FOS por reações descontínuas consecutivas. Dando sequência em seus estudos, Faria *et al.* (2020) confirmaram o potencial de aplicação da sílica gel como suporte para a imobilização de enzimas FTase na produção de FOS. Em seus experimentos, tanto a atividade de transfrutossilagem (A_T) quanto a atividade hidrolítica (A_H) foram determinadas de acordo com os métodos de Cuervo-Fernandez

et al. (2007), Ottoni *et al.* (2012) e Cunha *et al.* (2019). Como resultados, Faria *et al.* (2020) observaram que a A_T foi maximizada por meio do delineamento experimental em função dos pH's e temperaturas de reação. Além disso, a FTase imobilizada apresentou capacidade de reutilização por seis ciclos reacionais consecutivos e maior pH e estabilidade térmica do que a enzima solúvel. Sendo assim, tais resultados sugerem alto potencial de aplicação da sílica gel como suporte para imobilização de FTase visando a produção de FOS.

De forma complementar, os experimentos de Araújo *et al.* (2021) registraram a sílica como sendo o suporte (dentre os estudados) com o maior rendimento de imobilização (IY = 85%) e tal fato pode ser explicado por suas propriedades de hidrofiliçidade, alta porosidade e principalmente sua grande área superficial.

Por sua vez, Garcia *et al.* (2022) relataram o uso de um novo suporte para a imobilização de enzimas FTase obtido pela disposição de nióbio em pó de sílica gel com o objetivo de obter um biocatalisador altamente ativo para a produção de FOS. O suporte apresentou fases ortorrômbicas e monoclinicas de Nb_2O_5 distribuídas homogeneamente ao longo da amostra de sílica gel, formando uma mistura de material sílica-nióbia de partículas muito finas. O rendimento de imobilização (IY %) e a atividade recuperada (RA %) da enzima foram cerca de 57,7% e 87,8%, respectivamente. Tal resultado sugere uma melhora significativa na adsorção de FTase em sílica devido à adição de nióbio e alta aplicabilidade de suportes de sílica-nióbia para imobilização de enzimas FTase visando a produção de FOS.

Mussatto *et al.* (2009) testaram a aplicação de seis diferentes materiais com potencial aplicação na imobilização de enzimas *Aspergillus japonicus* para a produção de FOS, destacam-se os materiais cerâmicos advindos da espuma de vidro e da pedra-pomes. A pedra-pomes foi utilizada em forma de grânulos de malha 8-24, enquanto a espuma de vidro foi utilizada em formato de partículas que variavam seu diâmetro entre 2,36 e 3,35 mm. Para serem utilizados como suportes de imobilização, a pedra-pomes foi previamente tratada com fervura por 10 minutos, lavada três vezes com água destilada e seca durante a noite a 60°C, ao passo que as partículas de vidro foram secas a 105°C por 3h e então tratadas com solução de HNO_3 5% w/v a 65°C por 45 minutos para posterior lavagem com água destilada até neutralização e secagem a 90°C até peso constante. Antes do uso, ambos os materiais foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. Como resultado, Mussatto *et al.* (2009) verificaram que a espuma de vidro não foi capaz de imobilizar as células e se mostrou instável durante o processo de fermentação, desintegrando-se durante o processo de agitação devido ao contato entre as partículas de vidro com a parede do vaso, sendo considerado inadequado para a imobilização de enzimas durante

a produção de FOS. Em contrapartida, a pedra-pomes apresentou bons valores de fermentação, no entanto não foi capaz de imobilizar uma grande quantidade de células.

Além dos materiais cerâmicos citados que descrevem diretamente os resultados obtidos no processo de imobilização das enzimas FTase, foram encontrados outros materiais que se mostraram promissores no que diz respeito à imobilização enzimática, os quais podem ser aplicados em posteriores procedimentos experimentais visando a imobilização de enzimas FTase para a produção de FOS.

O óxido de grafeno (GO) possui uma grande área superficial específica e um número considerável de grupos funcionais, fatos que o torna um substrato ideal para estudo de aplicação em imobilização enzimática, relata Zhang *et al.* (2010). Em seus experimentos, Zhang *et al.* (2010) demonstraram que a imobilização de enzimas em folhas de GO pode ocorrer por meio da simples interação eletrostática, sem que se faça necessário o uso de agentes de reticulação ou modificações em sua superfície. A imobilização das enzimas peroxidase de rábano (HRP) e lisozima foi realizada por meio da incubação da folha de GO, com espessura aproximada de 1nm, juntamente das enzimas em solução tampão de fosfato 4°C e com base na observação por microscopia de força atômica (AFM), Zhang *et al.* (2010) verificaram que o desempenho catalítico das enzimas imobilizadas é determinado pela interação das moléculas da enzima com os grupos funcionais do GO e que a carga enzimática não interfere na atividade específica da enzima, logo, a chave para se obter melhor desempenho catalítico se concentra na retenção total da conformação da enzima imobilizada.

Zhang *et al.* (2011) estudaram a aplicação de nanocristais de óxido de zinco (ZnO) com diferentes morfologias como substratos para imobilização enzimática da peroxidase de rábano (HBR). Os nanocristais de ZnO foram preparados através de um procedimento hidrotérmico utilizando hidróxido de tetrametilamônio como agente mineralizante e o controle da morfologia desses nanocristais foi obtida por meio da variação na proporção de CH_3OH para H_2O utilizados como solventes no sistema de reação hidrotérmica. Os resultados encontrados por Zhang *et al.* (2011) mostraram que o *nanomultipod* tridimensional é mais apropriado para a imobilização de enzimas em reações catalíticas, considerando também as nanoesferas e os nanodiscos, fator de grande implicação para os diversos estudos em andamento acerca da temática de imobilização enzimática e suas aplicações.

7. METODOLOGIA

O presente trabalho pode ser classificado de acordo com Gil (2002) como sendo uma pesquisa de natureza exploratória, cujo objetivo principal é o aprimoramento de ideias e descoberta de novas intuições a respeito dos temas delimitados.

Para o desenvolvimento do trabalho foi necessária uma pesquisa de artigos científicos disponíveis no Portal Periódicos CAPES, bem como uma pesquisa em sites e noticiários a fim de garantir o maior número possível de informações comprovadas e atualizadas acerca dos temas interessados. Nesta pesquisa, foram selecionados trabalhos que abordam os frutooligossacarídeos (FOS), bem como suas aplicações, as vantagens do seu consumo diante dos demais açúcares conhecidos popularmente e as principais formas para sua produção. Além disso, trabalhos que abordam imobilização enzimática e suportes porosos (tipos, características, vantagens e desvantagens) foram de suma importância para a elaboração da presente pesquisa bibliográfica.

Todo o material citado foi previamente selecionado para estudo e utilizado como base referencial, de forma a garantir a elaboração do presente *review*.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa pesquisa bibliográfica fornecem um *review* acerca dos suportes porosos utilizados na imobilização enzimática, com destaque àqueles utilizados na imobilização das enzimas FTase, principais responsáveis pela produção dos frutooligossacarídeos (FOS). Esse trabalho permite um acesso rápido e conciso a respeito da temática abordada, facilitando a leitura e compreensão do assunto para aqueles que estão iniciando seus estudos na área.

Como pôde ser visto, há suportes mais adequados para aplicação prática na produção dos FOS que poderão vir a ser utilizados em estudos posteriores juntamente de aplicações práticas. Resumidamente, os principais resultados obtidos em relação aos suportes utilizados estão indicados na Tabela 1.

Tabela 4: Materiais utilizados como suporte, classificação e principais resultados obtidos.

Material suporte	Classificação	Principais resultados	Referências
Sílica gel	Cerâmica	Apresentou ótimo rendimento de imobilização e estabilidade operacional, sendo considerado um material promissor para a produção de FOS por reações descontínuas consecutivas, com capacidade de reutilização em até 6 ciclos.	Faria <i>et al.</i> (2019)
Esonja vegetal	Polímero	Apresentou boa atividade recuperada, sendo considerado um material promissor para a produção de FOS em um processo descontínuo único.	Faria <i>et al.</i> (2019)
Alginato de sódio	Polímero	Apresentou boa funcionalidade, manuseio e atividades de transfrutossilação equivalentes ou superiores ao uso da biomassa livre, além de garantir uma melhor seletividade.	Gonçalves <i>et al.</i> (2019)

Sílica-Nióbia	Compósito cerâmico	Apresentou melhora significativa na adsorção da enzima FTase diante dos suportes de sílica gel, aumentando sua taxa de atividade recuperada.	Garcia <i>et al.</i> (2022)
PHB	Polímero	Suporte atraente tendo em vista seu baixo custo, a alta resistência mecânica e sua capacidade de regeneração, além de ser um material atóxico e inerte. Possui média taxa de rendimento de imobilização e baixa taxa de atividade recuperada.	Araújo <i>et al.</i> (2021)
Farelo de soja	Polímero	Alta disponibilidade e boa taxa de atividade recuperada, contudo, apresenta baixa taxa de rendimento de imobilização.	Araújo <i>et al.</i> (2021)
Espuma de vidro	Cerâmica	Incapaz de imobilizar as células, mostrando-se instável durante os processos de fermentação. Logo, é considerado inadequado para uso como suporte na produção de FOS.	Mussatto <i>et al.</i> (2009)
Espuma de PU	Polímero	Imobiliza uma maior quantidade de células, no entanto, fornece baixos resultados de fermentação.	Mussatto <i>et al.</i> (2009)
Fibra vegetal	Polímero	Apresenta boa adesão no processo de imobilização das enzimas e alta produção de FOS.	Mussatto <i>et al.</i> (2009)
Pedra-Pomes	Cerâmica	Apresentaram bons valores de fermentação, contudo, são incapazes de imobilizar grande quantidade de células.	Mussatto <i>et al.</i> (2009)
Quitosana	Polímero	Mostrou-se como um material promissor atuando como suporte para a imobilização de enzimas FTase visando a produção de FOS.	Ganaie <i>et al.</i> (2014)
ZnO	Cerâmica	Nanocristais de ZnO foram testados em diferentes morfologias e concluiu-se que os <i>nanomultipods</i> apresentam a estrutura mais apropriada para aplicação no processo de imobilização de enzimas para reações catalíticas.	Zhang <i>et al.</i> (2011)
GO	Cerâmica	Material com grande área superficial específica e número considerável de grupos funcionais, tornando-o um material potencial para aplicação na imobilização enzimática de diversas proteínas.	Zhang <i>et al.</i> (2010)

Fonte: Autoria própria (2023).

Dentre os suportes inorgânicos aplicados na imobilização de enzimas por adsorção destaca-se significativamente a sílica gel, a qual apresenta baixo custo, alta resistência mecânica, estabilidade térmica e química, caráter altamente hidrofílico, e, principalmente, elevada área superficial específica (ARAÚJO *et al.*, 2021).

No entanto, a partir da análise do conteúdo da tabela e de todo o material descrito nos tópicos anteriores, constatou-se que a esponja vegetal, o alginato, o polihidroxibutirato e a fibra vegetal têm mostrado resultados bastante promissores em termos de taxa de atividade recuperada, nível de seletividade e, sobretudo, baixo custo.

Além destes, a sílica-nióbia apresentou melhora significativa na adsorção da enzima FTase diante dos suportes de sílica gel visando a produção de FOS, aumentando sua taxa de atividade recuperada e se destacando diante dos suportes listados acima.

Por fim, é válido ressaltar que os suportes de ZnO e GO, embora pouco explorados em estudos referentes a imobilização enzimática direcionados para a produção de FOS, apresentaram resultados satisfatórios e promissos diante de suas respectivas aplicações.

Levando isso em consideração, tais suportes se tornam alvo de estudos ainda mais aprofundados para posteriores aplicações experimentais.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de açúcares funcionais, como os frutooligossacarídeos (FOS), por via enzimática vem se apresentando como uma alternativa à substituição dos açúcares convencionais. Nos últimos anos, a imobilização de enzimas tem se destacado como uma poderosa ferramenta para a melhoria das propriedades enzimáticas, como a estabilidade e a possibilidade de reutilização, sobretudo nas áreas alimentícia e farmacêutica.

Conclui-se, portanto, que embora atualmente exista uma gama bastante diversificada de protocolos para imobilização de enzimas, incluindo as enzimas FTase visando a produção de FOS, nenhum método ou suporte pode ser considerado único e insubstituível para tal aplicação. Dessa forma, novos materiais estão sendo constantemente testados e aplicados em análises experimentais na incansável busca por métodos que permitam a obtenção de resultados ainda melhores do que aqueles encontrados até o momento, de forma a produzir os FOS em escala industrial com o melhor retorno e o menor custo possível.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, I. M. *et al.* Avaliação dos parâmetros de imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em diversos suportes. In: I WEB ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA QUÍMICA, 1, 2021, Diamantina. **Anais do I Web Encontro Nacional de Engenharia Química**. Even3, 2021, online. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/wendeq2021/345476-avaliacao-dos-parametros-de-imobilizacao-da-enzima-frutossiltransferase-extracelular-de-aspergillus-oryzae-ipt-301/>. Acessado em: Jul. 2022.

BARBOSA, O. *et al.* Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, [s. l.], 2013, v. 14, ed. 8, p. 2433-2462, 3 jul. 2013. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1021/bm400762h>. Acessado em: Mai. 2022.

BRENA, B. M.; VIERA, F. B. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: GUISAN, J. M. (ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2006. cap. 2, p. 15-30.

CLARO, R. M. *et al.* Consumo de alimentos não saudáveis relacionados a doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, ed. 2, p. 257-265, abr-jun 2015. DOI 10.5123/S1679-49742015000200008. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?pid=S1679-49742015000200008&script=sci_arttext&lng=en. Acessado em: Jun. 2022.

CNN BRASIL. **Venda de alimento saudável bate R\$ 100 bilhões em 2020, em meio à pandemia.** [s. l.]: Márcia de Chiara, 17 mar. 2021. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/business/com-pandemia-venda-de-alimento-saudavel-bate-r-100-bi/>. Acessado em: Mai. 2022.

CUNHA, J. S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de fructooligosacarídeos.** 2017. 96 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas - MG, 2017. Disponível em: <https://btdt.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1022>. Acessado em: Jul. 2022.

DALLA-VECCHIA, R. *et al.* Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004. DOI: 10.1590/S0100-40422004000400017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262738612_Synthetic_applications_of_immobilized_lipases_in_polymers. Acessado em: Ago. 2022.

DENTI, A. F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, v. 45, n. 171, p. 97-110, 13 out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.31512/persp.v.45.n.171.2021.168.p.97-110>. Acessado em: Ago. 2022.

FARIA, L. L. *et al.* Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, v. 43, p. 43–59, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03016-7>. Acessado em: Jul. 2022.

FARIA, L. L. *et al.* Immobilization of fructosyltransferase on sílica gel and vegetable sponge for fructooligosaccharides production. In: XXII NATIONAL BIOPROCESSES SYMPOSIUM (SINAFERM) XIII ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIOMASS SYMPOSIUM (SHEB), 2019, Uberlândia. **Anais do Simpósio Anual de Bioprocessos**. Campinas, Galoá, 2019. Disponível em: <https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-sheb-2019/papers/immobilization-of-fructosyltransferase-on-silica-gel-and-vegetable-sponge-for-fructooligosaccharides-production->. Acessado em: Jul. 2022.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. *et al.* Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.02.013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501200064X?casa_token=O4I5_PYbI-AAAAA:UxBOf11_Bi39CGWR6PhdUWcx8ZIAhHUobTflh7ANapJfQpJpPdHCx_2d26sn_OqfAiH2V7ynO5awLw. Acessado em: Ago. 2022.

GANAIÉ, M. A. *et al.* Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, [s. l.], 2014, v. 49, p. 840-844, mai. 2014. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.01.026. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511314000671>. Acessado em: Jul. 2022.

GARCIA, L. A. *et al.* Synthesis and characterization of a novel silica-niobia support for the immobilization of microbial fructosyltransferase aiming at fructooligosaccharides production.

Materials **Today Communications**, [s. l.], 2022, v. 31, 20 abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103588>. Acessado em: Jul. 2022.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002. 175 p.

GONÇALVES, M. C. P. **Imobilização de frutossiltransferase microbiana em gel de alginato e sua caracterização para a produção de frutooligossacarídeos**. 2019. 139 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas - MG, 2019. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1503>. Acessado em: Jul. 2022.

GONÇALVES, M. C. P. *et al.* Entrapment of glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT - 301 in calcium alginate for high transfructosylation activity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.95, n.10, p.2463-2472, set. 2020. DOI 10.1002/jctb.6429. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.6429>. Acessado em: Jul. 2022.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge?** In: GUIBAN, J. M. (ed.). *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2006. cap. 1, p. 1-13.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194 p. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/3877/2620.pdf?sequence=1>. Acessado em: Ago. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção Primária à Saúde (SAPS). **Saúde promove conscientização sobre o consumo de açúcar em webinar**. [S. l.], 3 jan. 2022. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/noticia/15359>. Acessado em: Mai. 2022.

MUSSATTO, S. I. *et al.* Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Research**. [s. l.], 2009, v. 344, p. 795-800, 21 abr. 2009. DOI: 10.1016/j.carres. 2009.01.025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19251252/>. Acessado em: Jul. 2022.

OLIVEIRA, S. P.; THÉBAUD-MONY, A. Estudo do consumo alimentar: em busca de uma abordagem multidisciplinar. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 201-208, abr. 1997. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/8BmYkMdPsVwLJXvBk98HbSH/?format=pdf&lang=pt>. Acessado em: Mai. 2022.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000200034>. Acessado em: Mai. 2022.

QUEISSADA, D. D.; DA SILVA, J. A. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 271–286, 2020. DOI: 10.14295/holos.v20i2.12378. Disponível em: <https://www.ceanesp.org.br/holos/article/view/12378>. Acessado em: Ago. 2022.

ROCHA, R. J. *et al.* Imobilização de frutossiltransferase microbiana em bagaço de cana e sabugo de milho para a produção de frutooligossacarídeos. In: I WEB ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA QUÍMICA, 1, 2021, Diamantina. **Anais do I Web Encontro Nacional de Engenharia Química**. Even3, 2021, online. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/wendeq2021/345335-imobilizacao-de-frutossiltransferase-microbiana-em-bagaco-de-cana-e-sabugo-de-milho-para-a-producao-de-frutooligos>. Acessado em: Mai. 2022.

SLUIK, D. *et al.* Total, free, and added sugar consumption and adherence to guidelines: the dutch national food consumption survey 2007–2010. **Nutrients**, [s. l.], ano 2016, v. 8, ed. 70, 28 jan. 2016. DOI 10.3390/nu8020070. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/8/2/70>. Acessado em: Jun. 2022.

SOUZA, L. T. de A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e aplicações**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2016. v. 4, cap. 15, p. 529-568.

ZHANG, J. *et al.* Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. **Langmuir Letter**, [s. l.], ano 2010, v. 26, ed. 9, p. 6083-6085, 18 mar. 2010. DOI 10.1021/la904014z. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la904014z>. Acessado em: Ago. 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Effect of substrate (ZnO) morphology on enzyme immobilization and its catalytic activity. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], 13 jul. 2011. DOI 10.1186/1556-276X-6-450. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21752255/>. Acessado em: Ago. 2022.