



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Higor de Bitencourt Rodrigues

**Imobilização de Xilose Isomerase de *Streptomyces* sp. *F-1* em Microrreator
Capilar de Sílica**

Florianópolis - SC
2023

Higor de Bitencourt Rodrigues

**Imobilização de Xilose Isomerase de *Streptomyces* sp. F-1 em Microrreator
Capilar de Sílica**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Cíntia Soares, Dr.^a
Coorientadores: Prof. Natan Padoin, Dr.
Prof.^a Jaciane Lutz Ienczak,
Dr.^a

Florianópolis - SC

2023

Rodrigues, Higor de Bitencourt

Imobilização de Xilose Isomerase de *Streptomyces* sp. F-1 em Microrreator Capilar de Sílica / Higor de Bitencourt Rodrigues ; orientador, Cíntia Soares, coorientador, Natan Padoin, coorientador, Jaciane Lutz Ienczak, 2023.

82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Microrreator. 3. Imobilização enzimática. 4. Xilose (glicose) isomerase. I. Soares, Cíntia. II. Padoin, Natan. III. Ienczak, Jaciane Lutz IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Higor de Bitencourt Rodrigues

Imobilização de Xilose Isomerase de *Streptomyces* sp. F-1 em Microrreator Capilar de Sílica

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 28 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Diogo Robl, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Debora Trichez, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.^a Cíntia Soares, Dr.^a

Orientadora

Florianópolis – SC

2023

Dedico aos verdadeiros amigos, família e aos
professores que me incentivaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo.

Aos meus queridos pais, Nádia Denise de Bitencourt Rodrigues e Vilmar Guarda Rodrigues, por todo o amor, ensinamento e incentivo incondicional e aos demais familiares pelo apoio, em especial ao meu irmão Rycher de Bitencourt Rodrigues pela irmandade.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Cíntia Soares, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Natan Padoin, pelos valiosos ensinamentos que levarei não somente à carreira acadêmica como para vida, pela atenção às necessidades da pesquisa, incentivo e confiança depositada.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Jaciane Lutz Ienczak, pelos ensinamentos, confiança e apoio à pesquisa.

Aos companheiros de laboratório, Ana Paula, Camila, Carla Corina, Jesús, Jéssica, Juliana, Lays, Luis, Lusitâneo, Victor, Wilker, Larissa, Monique, Maria Alice, Maria Fernanda, Nicole, Kelvin e Gabriela pela amizade e carinho.

Aos companheiros “remotos” de pesquisa, Renan e Ederson, pela assistência.

Aos membros da banca avaliadora pelo aceite do convite e gentileza em avaliar este trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Ao CNPEM pelo apoio ao projeto.

Ao LabMAC (Laboratório de Materiais e Computação Científica) por ser um lugar acolhedor, com todas as condições (ótimas) para a realização da pesquisa.

Ao LIEB (Laboratório de Engenharia Biológica) por fornecer materiais, equipamentos e reagentes específicos. Aproveito aqui para agradecer aos prezados colegas deste laboratório Marcel, Rosana, Lauren, Isabela, Juliana, Liana e Karina, por sempre serem atenciosos comigo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química por todo o aprendizado extraído com os professores, amparo à pesquisa e pela oportunidade.

“... todas as sementes que você semeou, talvez até já esquecidas por você, irão encarnar-se e crescer; aquele que recebeu de você transmitirá a outro. E como você sabe que participação terá na futura solução dos destinos da humanidade?”

(DOSTOIÉVSKI, 1867, p. 453-454)

RESUMO

Microrreatores são dispositivos em microescala (com canais de tamanho característico $< 1000 \mu\text{m}$) usados para desempenhar reações químicas sob fluxo contínuo. Possuem uma alta razão entre a área superficial e o volume do microrreator, o que permite a obtenção de maior eficiência na transferência de massa e aumento na taxa de transferência de calor, entre muitas outras vantagens. Uma aplicação da tecnologia, em conjunto com a técnica de imobilização enzimática (fixação de enzimas em um suporte sólido), consiste no aumento da eficiência de reações catalisadas por enzimas. Uma enzima industrialmente relevante é a xilose (glicose) isomerase, que desempenha um importante papel na transformação de glicose em frutose usada na produção de xarope de milho rico em frutose, onde é empregada na forma imobilizada em quantidades superiores a 107 ton por ano, e de xilose em xilulose, a qual tem sido exaustivamente estudada para aplicação no processo de produção de etanol de segunda geração (E2G) no setor de energia renovável. Um *gap* importante é o equilíbrio químico dessa reação que favorece a formação de xilose em relação à xilulose em uma proporção de 5:1. O uso de microrreatores pode superar desafios relacionados a taxa da reação química (com o aumento da transferência de massa) e ainda modificar a razão do equilíbrio (através da remoção contínua do produto). Baseado no exposto, neste estudo, um microrreator capilar foi empregado para a imobilização de xilose isomerase visando a conversão dos substratos frutose e xilose em seus isômeros, glicose e xilulose, respectivamente, a fim de se obter respostas referentes ao emprego do microrreator em comparação com a enzima livre em termos de desempenho dessas reações sob condições idênticas. Neste contexto, as reações de isomerização foram realizadas utilizando xilose isomerase obtida de uma nova cepa do gênero *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. *F-1*) imobilizada na superfície de um microrreator capilar operando sob fluxo contínuo. As reações foram avaliadas em condições pré-estipuladas de temperatura, pH e concentração de íon com a enzima livre e imobilizada. Pode-se constatar que o método de imobilização foi bem-sucedido. Ao operar o microrreator com xilose isomerase imobilizada usando frutose sob fluxo contínuo à $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e à $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, os valores de K_m foram de 0,088 M e 25,477 M e de V_m foram de $0,264 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,955 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Com a enzima livre, o valor de K_m foi de 3,282 M e de V_m foi de $0,848 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para a operação com xilose, o microrreator com a enzima imobilizada sob fluxo contínuo à $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ apresentou valores de K_m e V_m (em média) de 0,033 M e $0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Com a enzima livre, os valores foram de 0,045 M e $0,307 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. As variações nos valores de K_m e V_m observados para a xilose isomerase imobilizada em comparação com a xilose isomerase livre sugerem que limitações na transferência de massa podem ter ocorrido devido à imobilização, indicando que para determinação de um potencial cinético superior da enzima imobilizada no microrreator em relação à sua forma livre é necessário a elaboração de um método de imobilização mais robusto.

Palavras-chave: Microrreator, xilose (glicose) isomerase, imobilização enzimática.

ABSTRACT

Microreactors are microscale devices (with characteristic channel sizes < 1000 μm) used to perform chemical reactions under continuous flow. They have a high ratio of surface area to volume, which allows for greater mass transfer efficiency and increased heat transfer rate, among many other advantages. One application of this technology, combined with the technique of enzyme immobilization (fixing enzymes on a solid support), is the increased efficiency of enzyme-catalyzed reactions. One industrially relevant enzyme is xylose (glucose) isomerase, which plays an important role in the conversion of glucose to fructose used in the production of high fructose corn syrup, where it is employed in immobilized form in quantities exceeding 107 tons per year. Additionally, it is utilized in the conversion of xylose to xylulose, which has been extensively studied for application in the second-generation ethanol production (E2G) process in the renewable energy sector. An important gap is the chemical equilibrium of this reaction, which favors the formation of xylose over xylulose in a ratio of 5:1. The use of microreactors can overcome challenges related to the rate of the chemical reaction (by increasing mass transfer) and modify the equilibrium ratio (through continuous product removal). Based on the above, in this study, a capillary microreactor was employed for the immobilization of xylose isomerase aiming to convert fructose and xylose substrates into their isomers, glucose and xylulose, respectively, in order to obtain responses regarding the use of the microreactor in comparison to free xylose isomerase in terms of the performance of these reactions under identical conditions. In this context, the isomerization reaction of fructose to glucose and xylose to xylulose was carried out using xylose isomerase obtained from a new strain of the *Streptomyces* genus (*Streptomyces* sp. *F-1*), immobilized on the surface of a capillary microreactor operating under continuous flow. The effect of the reaction was evaluated using pre-established conditions of temperature, pH, and ion concentration with immobilized xylose isomerase and free xylose isomerase. It was found that the immobilization method was successful. When operating the microreactor with immobilized xylose isomerase using fructose under continuous flow at $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, the K_m values were 0.088 M and 25.477 M, and the V_m values were $0.264 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $0.955 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. For free xylose isomerase, the K_m value was 3.282 M, and the V_m value was $0.848 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$. Regarding the operation with xylose, the microreactor with immobilized xylose isomerase under continuous flow at $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ showed average K_m and V_m values of 0.033 M and $0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. For free xylose isomerase, the values were 0.045 M and $0.307 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The variations in the K_m and V_m values observed for the immobilized xylose isomerase compared to the free xylose isomerase suggest that limitations in mass transfer may have occurred due to immobilization, indicating that for the determination of a superior kinetic potential of the enzyme immobilized in the microreactor compared to its free form, the development of a more robust immobilization method is required.

Keywords: Microreactor; xylose (glucose) isomerase; enzyme immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Isomerização reversível de: a) D-glicose em D-frutose; e, b) D-xilose em D-xilulose catalisada por D-xilose (glicose) isomerase	23
Figura 2 – Arranjo quaternário de xilose isomerase: estrutura tetramérica formada por dois dímeros (subunidades idênticas)	25
Figura 3 – Produção de HFCS em três etapas.....	34
Figura 4 – a) Microrreator de dimetil polissiloxano (PDMS); b) e c) microrreatores do tipo <i>chip</i> de sílica comerciais; d) e e) capilares de sílica comerciais utilizados nesta pesquisa	37
Figura 5 – Demonstração de um processo em larga escala comparado às vantagens da síntese em microrreatores: a) desenvolvimento do processo em larga escala; e b) desenvolvimento do processo em microescala (representando a produção de etanol/E2G ou HFCS)	16
Figura 6 – Projetos típicos de estrutura interna de microcanais: a) superfície interna revestida; b) leito empacotado; e c) canal monolítico.....	19
Figura 7 – Procedimento convencional de revestimento de superfície com APTES e agente reticulante gluteraldeído	20
Figura 8 – Fluxograma com as etapas da pesquisa: 1. ^a etapa de modificação química seguida da 2. ^a etapa de imobilização de xilose isomerase e das etapas subsequentes de caracterização dos materiais e de reações de isomerização	23
Figura 9 – Sistema inerte montado para silanização da sílica amorfa	26
Figura 10 – <i>Serum bottle</i> contendo a sílica amorfa e solução a 2% de APTES	27
Figura 11 – Esquema para funcionalização com agente reticulante gluteraldeído....	28
Figura 12 – Sílica amorfa: a) após silanização; e, b) após ativação com agente reticulante gluteraldeído	28
Figura 13 – Sistema inerte montado para a lâmina de microscopia	29
Figura 14 – Erlenmeyer contendo a lâmina de microscopia com solução a 2% de APTES	30
Figura 15 – Processo de hidroxilação dos microrreatores capilares	31
Figura 16 – Sistema inerte montado para o microrreator capilar.....	32
Figura 17 – Microrreator capilar conectado à seringa com tubo de silicone após inserção da solução a 2% de APTES.....	32
Figura 18 – Funcionalização do microrreator com agente reticulante gluteraldeído .	33

Figura 19 – Sistema de troca térmica: a) trocador de calor desmontado; b) microrreator acoplado ao trocador de calor	40
Figura 20 – <i>Set-up</i> para ensaios com o microrreator	40
Figura 21 – Análise de FTIR das amostras de cada etapa da modificação química da sílica amorfa até imobilização de xilose isomerase, e da enzima livre	44
Figura 22 – Imagem de CLSM da lâmina de microscopia: a) sem modificação química e submetida à imobilização da enzima; b) modificada quimicamente e submetida à imobilização da enzima	45
Figura 23 – Imagens de MEV no interior do microrreator: a) e b) sem modificação química; c) e d) com modificação química e com a enzima imobilizada	47
Figura 24 – a) Imagens de MEV do interior do microrreator com xilose isomerase imobilizada; b) imagens de CLSM da lâmina de microscopia modificada quimicamente e com a enzima imobilizada.	47
Figura 25 – Análise de MEV-FEG do interior do microrreator funcionalizado com 10% de APTES em tolueno e com enzima imobilizada com diferentes ampliações: a) $\times 2000$; b) $\times 8000$; c) $\times 1500$; e d) $\times 400$	48
Figura 26 – Imagens de CLSM: a) capilar modificado quimicamente e com NH_2 – ADN imobilizado; b) capilar sem modificação química e sem NH_2 – DNA imobilizado.....	49
Figura 27 – Imagens de MEV da modificação química da superfície interna do capilar	50
Figura 28 – Resistência térmica de xilose isomerase a 60 °C em função do tempo .	51
Figura 29 – Velocidade inicial da enzima em função da concentração de frutose	52
Figura 30 – Diagrama de Lineweaver-Burk de xilose isomerase usando frutose como substrato.....	52
Figura 31 – Modelo de Hanes aplicado usando xilose como substrato.....	54
Figura 32 – Resistência térmica de xilose isomerase imobilizada no microrreator a 60 °C em um período de 12 h	56
Figura 33 – Gráfico de Lineweaver-Burk de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	58
Figura 34 – Gráfico de Lineweaver-Burk de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato em fluxo contínuo a $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	59
Figura 35 – Ajuste dos dados ao modelo de Hanes de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando xilose como substrato em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	61

Figura 36 – Comparação da resistência térmica da enzima livre e imobilizada no microrreator a 60 °C ao longo do tempo	62
Figura A1 – Velocidade inicial de xilose isomerase em função da concentração de xilose.....	81
Figura A2 – Gráfico de Michaelis-Menten de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato em fluxo contínuo a 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	81
Figura A3 – Gráfico de Michaelis-Menten de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato em fluxo contínuo a 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	82
Figura A4 – Velocidade inicial de xilose isomerase imobilizada no microrreator em função da concentração de xilose em fluxo contínuo a 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de atividade de xilose imobilizada no microrreator usando diferentes concentrações de frutose em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	57
Tabela 2 – Valores de atividade de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando diferentes concentrações de frutose em fluxo contínuo a $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	58
Tabela 3 – Atividade de xilose isomerase imobilizada no microrreator para diferentes concentrações de xilose em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	61
Tabela 4 – Parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com a enzima livre e imobilizada em modo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (2 μL -fMR) e $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (4 μL -fMR)	63
Tabela 5 – Parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com xilose isomerase livre e imobilizada em modo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (2 μL -xMRa e 2 μL -xMRb)	64
Tabela A1 – Resistência térmica de xilose isomerase a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h usando frutose como substrato	79
Tabela A2 – Valores de atividade de xilose isomerase para diferentes concentrações de frutose	79
Tabela A3 – Valores de atividade de xilose isomerase usando diferentes concentrações de xilose	80
Tabela A4 – Resistência térmica de xilose isomerase imobilizada no microrreator a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ em um período de 12 h usando frutose como substrato	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[E_n]$	Concentração de enzima
$[E_n]_t$	Concentração total de enzima
$[P]$	Concentração do produto
$[S]$	Concentração de substrato
$[SE_n]$	Concentração que equivale a $[S][E_n]/K_m$
μ -IMERs	<i>Microfluidic immobilized enzyme reactor</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APTES	3-Aminopropil trietoxisilano
A_s	Área superficial
CLSM	Microscopia Confocal a Laser
CMC	Carboximetilcelulose
E_n	Enzima
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
HFCS	Xarope de milho rico em frutose
$k_1; k_2; k_{-1}; k_{-2}$	Constantes de velocidade
k_{cat}	Constante de velocidade para formação de $P + E_n$
kDa	Quilodalton
k_{La}	Coeficiente de transferência de massa volumétrico
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_{mf}	Constante de Michaelis-Menten da reação direta
K_{mr}	Constante de Michaelis-Mente da reação inversa
LMS	Leito Móvel Simulado
MEMS	<i>Microelectromechanical systems</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
MM_{glic}	Massa molecular de glicose
mTAS	<i>Micro total analysis systems</i>
MTES	Metiltriétoxissilano
P	Produto
PAMAM	Poli(amidoamina)
PDMS	Dimetil polissiloxano
pH	Potencial hidrogeniônico

PI	Intensificação de processos
PNNL	Pacific Northwest National Laboratory
Q	Vazão
S	Substrato
SICF	Isomerização e cofermentação simultâneas
SIF	Isomerização e fermentação simultânea
SSICF	Sacarificação isomerização e cofermentação simultâneas
t_r	Tempo de residência
UFLC	<i>Ultra-fast liquid chromatography</i>
V	Volume do reator
v_0	Velocidade inicial da reação
V_m	Velocidade máxima
V_{mf}	Velocidade máxima da reação direta
V_{mr}	Velocidade máxima da reação inversa
V_P	Volume de produto deixando o microrreator
v_{0f}	Velocidade inicial da reação direta
v_{0r}	Velocidade inicial da reação inversa
XE_n	Complexo substrato/produto-enzima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo geral	20
1.1.2	Objetivos específicos	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	ENZIMAS: ASPECTOS GERAIS	21
2.2	XILOSE (GLICOSE) ISOMERASE.....	22
2.2.1	Xilose isomerase (XylA2F1) de <i>Streptomyces</i> sp. F-1	24
2.3	CINÉTICA DA REAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO REALIZADA POR XILOSE ISOMERASE	25
2.4	IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DE XILOSE ISOMERASE	30
2.4.1	Produção de xarope de milho rico em frutose (HFCS)	32
2.4.2	Produção de etanol de segunda geração (E2G)	34
2.5	TECNOLOGIA DE MICRORREACTORES	36
2.5.1	Vantagens dos microrreatores	39
2.5.1.1	<i>Transferência aprimorada de calor e massa</i>	40
2.5.1.2	<i>Alta seletividade e controle</i>	41
2.5.1.3	<i>Redução de impacto ambiental</i>	41
2.5.1.4	<i>Rotas sintéticas menos perigosas</i>	41
2.5.1.5	<i>Redução de custos</i>	42
2.5.1.6	<i>Baixa complexidade de escalonamento</i>	43
2.5.2	Microrreatores enzimáticos	17
2.6	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MICRORREACTORES	18
2.6.1	Funcionalização de superfície de sílica com 3-aminopropil trietoxissilano (APTES) para imobilização de enzimas	19
2.7	IMOBILIZAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE E USO DE MICRORREACTORES ENZIMÁTICOS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE E2G: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	MATERIAIS.....	24
3.2	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DOS MATERIAIS DE SÍLICA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE.....	25

3.2.1	Modificação química da sílica amorfa	25
3.2.2	Modificação química da lâmina de microscopia	28
3.2.3	Modificação química dos microrreatores capilares	30
3.3	IMOBILIZAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE	33
3.3.1	Imobilização de xilose isomerase na sílica amorfa	34
3.3.2	Imobilização de xilose isomerase na lâmina de microscopia	34
3.3.3	Imobilização de xilose isomerase nos microrreatores capilares	34
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS DE SÍLICA.....	35
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
3.5.1	Atividade de xilose isomerase	36
3.5.2	Medição da concentração de xilose isomerase	37
3.6	EXPERIMENTOS COM XILOSE ISOMERASE LIVRE (EM MODO BATELADA)	37
3.6.1	Resistência térmica de xilose isomerase livre a 60 °C	37
3.6.2	Ensaio de isomerização de xilose isomerase livre usando frutose como substrato	38
3.6.3	Ensaio de isomerização de xilose isomerase livre usando xilose como substrato	38
3.7	EXPERIMENTOS COM XILOSE ISOMERASE IMOBILIZADA (EM MODO CONTÍNUO).....	38
3.7.1	Resistência térmica de xilose isomerase imobilizada a 60°C	38
3.7.2	Ensaio de isomerização de xilose isomerase imobilizada usando frutose como substrato	39
3.7.3	Ensaio de isomerização de xilose isomerase imobilizada usando xilose como substrato	39
3.7.4	Set-up para ensaios com o microrreator	39
3.8	ANÁLISE CINÉTICA DOS DADOS DE ISOMERIZAÇÃO	41
3.8.2	Parâmetros cinéticos da catálise de xilose isomerase usando frutose como substrato	41
3.8.3	Parâmetros cinéticos da catálise de xilose isomerase usando xilose como substrato	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1	AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS DE SÍLICA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE	43

4.1.1	Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	43
4.1.2	Análise de microscopia confocal a laser (CLSM).....	45
4.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
4.2	AVALIAÇÃO CATALÍTICA DE XILOSE ISOMERASE (XYLA2F1) LIVRE ..	50
4.2.1	Resistência térmica de xilose isomerase a 60 °C (usando frutose como substrato).....	50
4.2.2	Determinação dos parâmetros cinéticos de xilose isomerase livre usando frutose como substrato.....	51
4.2.3	Determinação dos parâmetros cinéticos de xilose isomerase usando xilose como substrato	53
4.3	PARÂMETROS CINÉTICOS DE XILOSE ISOMERASE (XYLA2F1) IMOBILIZADA EM MICRORREATOR.....	55
4.3.1	Imobilização de xilose isomerase no microrreator	55
4.3.2	Resistência térmica de xilose isomerase imobilizada a 60 °C (usando frutose como substrato)	55
4.3.3	Determinação dos parâmetros cinéticos de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato.....	57
4.3.3.1	<i>Parâmetros para ensaio em fluxo contínuo a 2 µL·min⁻¹</i>	57
4.3.3.2	<i>Parâmetros para ensaio em fluxo contínuo a 4 µL·min⁻¹</i>	58
4.3.4	Determinação dos parâmetros cinéticos de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando xilose como substrato.....	60
4.4	RELAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS BATELADA (COM ENZIMA LIVRE) E CONTÍNUO (NO MICRORREATOR).....	62
4.4.1	Relação entre a resistência térmica de xilose isomerase livre e imobilizada a 60 °C.....	62
4.4.2	Relação dos parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com frutose ..	63
4.4.3	Relação dos parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com xilose ...	64
5	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE	79

1 INTRODUÇÃO

Microrreatores, em linhas gerais, são dispositivos em microescala usados para desempenhar reações químicas geralmente sob fluxo contínuo. Os reagentes escoam em microcanais de tamanho característico $< 1000 \mu\text{m}$ e são regidos, principalmente, por uma física de escoamento laminar e transferência de massa essencialmente por difusão. A redução da escala, por sua vez, proporciona uma alta razão entre a área superficial e o volume do microrreator e é este o aspecto que tem gerado maior interesse pela comunidade científica. Essa característica proporciona maior eficiência na transferência de massa, principalmente para reações que ocorrem no domínio difusivo (que tendem a aumentar sua velocidade em dimensões reduzidas). Além disso, os microrreatores propiciam um aumento na taxa de transferência de calor, alta seletividade e controle de reações químicas, redução do impacto ambiental, redução de custos, rotas de sínteses mais seguras e baixa complexidade de escalonamento (LAURENTI; VIANNA JR., 2015; SURYAWANSHI *et al.*, 2018). A tecnologia de microrreatores (e o uso de fluxo contínuo) é um ótimo recurso para a intensificação de processos (PI, na sigla em inglês de *Process Intensification*) e promissor para áreas da engenharia química e biotecnologia (MIYAZAKI; MAEDA, 2006). Uma aplicação da tecnologia é o chamado “ μ -IMERs” (*Microfluidic Immobilized Enzyme Reactors*), utilizado para muitos propósitos, entre eles, e de interesse nesta pesquisa, para o aumento da eficiência de reações catalisadas por enzimas (SURYAWANSHI *et al.*, 2018).

A conversão de glicose em frutose é amplamente executada por indústrias de alimentos e de bebidas para a produção de xarope de milho rico em frutose (HFCS, na sigla em inglês de *High Fructose Corn Syrup*), principal adoçante empregado nesses setores industriais. Esta conversão é realizada por meio de uma reação de isomerização reversível efetuada pela enzima: xilose (glicose) isomerase (D-xilose cetol-isomerase, EC 5.3.1.5) (YANG *et al.*, 2020). Xilose isomerase é usada industrialmente de forma imobilizada para a produção de HFCS em reatores contínuos de leito empacotado com múltiplos estágios (ZITTAN; POULSEN; HEMMINGSEN, 1975), excedendo 107 ton por ano (FILICE; ARAGON; PALOMO, 2016).

Enzimas imobilizadas têm melhorado muito o desempenho técnico de processos industriais e sua economia e consiste em manter a enzima fisicamente ligada e/ou aprisionada em meios físicos (suportes sólidos). A principal vantagem

reside na possibilidade de sua separação dos produtos das reações bioquímicas e reutilização, além de possível aumento da estabilidade, da atividade e da seletividade (ZHU *et al.*, 2020). Xilose isomerase, como o próprio nome sugere, também catalisa a reação de isomerização reversível de xilose em xilulose, outra conversão relevante industrialmente, neste caso, para o setor de energia renovável. A interconversão de xilose em xilulose por meio de xilose isomerase tem proporcionado estudos para aplicação da enzima no processo de conversão de monômeros obtidos da fração de hemicelulose de biomassas lignocelulósicas em etanol de segunda geração (E2G) (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996; SINGH; SINGH; SACHAN, 2019).

Resumidamente, uma das etapas de produção de E2G é a sacarificação das fibras de celulose provenientes da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis. No entanto, a estrutura da biomassa detém outro importante carboidrato, a hemicelulose, que tem sido negligenciada para a formação de etanol (LIMAYEM; RICKE, 2012; SAHA; COTTA, 2012) devido à dificuldade de fermentar os monômeros de pentoses obtidos da hidrólise desta fração (xilose e arabinose, majoritariamente). A principal levedura usada na etapa de fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, não é capaz de assimilar os açúcares de pentose. A fim de contornar este problema, o uso de xilose isomerase tem sido estudado para atuar no processo de produção de E2G realizando a isomerização de xilose em xilulose, açúcar facilmente assimilado por *S. cerevisiae*. Outro obstáculo, agora referente a enzima, é que o equilíbrio químico da reação de isomerização é de 5:1 xilose/xilulose e precisa ser ajustado para a obtenção de alta conversão de xilulose (MILESSI *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2012).

Alguns procedimentos têm sido testados na literatura visando superar estes obstáculos, como, por exemplo, o processo de isomerização e fermentação simultâneas (SIF, em inglês, para *Simultaneous Isomerization and Fermentation*), de isomerização e cofermentação simultâneas (SICF, em inglês, para *Simultaneous Isomerization and Co-Fermentation*) e de sacarificação, isomerização e cofermentação simultâneas (SSICF, em inglês, para *Simultaneous Saccharification Isomerization and Co-Fermentation*). Outro procedimento possível é a adição do composto borato durante a reação de isomerização (sabe-se que o borato influencia o equilíbrio da reação química devido à sua capacidade de criar complexos com estes açúcares, tanto com a xilose quanto com a xilulose) (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000; CHIANG *et al.*, 1981; GUILHERME *et al.*, 2022; HOCHSTER; WATSON, 1954;

HSIAO *et al.*, 1982; MILESSI *et al.*, 2020, 2018a; RAMOS *et al.*, 2021; RAO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; UMEMOTO; SHIBATA; ARAKI, 2012).

Não obstante, o uso de microrreator e de fluxo contínuo podem ajudar a superar o *gap* relacionado ao rendimento da reação bioquímica (com o aumento da transferência de massa) e modificar a razão do equilíbrio (por meio da remoção contínua do produto) (HOMMES; HEERES; YUE, 2019).

De acordo com a busca realizada na literatura verificou-se a escassez de trabalhos referentes ao uso de microrreatores para a reação de isomerização por xilose isomerase. Os trabalhos desenvolvidos na literatura com a enzima limitam-se: i) à aplicação de técnicas e suportes para a imobilização mais eficiente da enzima (SINGH; JAJOO; BHASIN, 2020); ii) ao estudo cinético das reações de isomerização com a enzima imobilizada empregando simulações e dados experimentais em batelada ou em fluxo contínuo e, ainda, considerando a difusão intrapartícula (SILVA *et al.*, 2006; DEHKORDI; TEHRANY; SAFARI, 2009; GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000); iii) à sua utilização em processos SIF e SSICF visando o aumento na conversão de xilose em xilulose e, conseqüentemente, de etanol (GUILHERME *et al.*, 2022; MILESSI *et al.*, 2020); e iv) na investigação de novas cepas para a produção de xilose isomerase mais suscetível a reações SIF e/ou SICF ou com melhor atividade enzimática (combinado a técnicas de imobilização e suportes inovadores) (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000; JIA *et al.*, 2018).

Com base no exposto, este trabalho teve o objetivo de imobilizar a enzima xilose isomerase (*XylA2F1*) obtida de uma nova cepa do gênero *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. *F-1*) na superfície interna de um microrreator capilar e realizar a reação de isomerização de frutose em glicose e xilose em xilulose sob fluxo contínuo, além de avaliar o efeito das reações em condições de temperatura, pH e concentração de íon constantes. Xilose isomerase usada neste trabalho foi produzida por Miyamoto *et al.* (2020) e seus parâmetros cinéticos foram definidos utilizando xilose como substrato em diferentes temperaturas, pHs e concentrações de íons. A enzima demonstrou potencial biotecnológico promissor, com uma identidade de sequência de 95% ao homólogo de *Streptomyces murinus* (produtora de xilose isomerase, que então é usada na Sweetzyme® e comercializada pela Novozymes).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu em imobilizar a enzima xilose isomerase (*XylA2F1*) na superfície interna de um microrreator capilar e avaliar seu desempenho para a reação de isomerização de frutose em glicose e xilose em xilulose.

1.1.2 Objetivos específicos

Visando atingir o objetivo geral desta pesquisa científica, os seguintes objetivos específicos foram elencados:

- avaliar se a funcionalização química no interior do microcanal foi efetiva por meio de caracterizações qualitativas;
- verificar se a enzima imobilizada à 60 °C apresenta resistência térmica por um período de 12 h (tempo necessário para a aquisição dos dados dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada no microrreator);
- identificar se o sistema microrreacional contendo a enzima imobilizada apresenta potencial cinético superior ao sistema que emprega a enzima livre.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENZIMAS: ASPECTOS GERAIS

Enzimas são catalisadores biológicos que promovem modificações de espécies químicas em seres vivos (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). São capazes de catalisar reações biológicas complexas com alta especificidade, atividade e seletividade em condições brandas com pouca formação de subprodutos, tornando-as muito atrativas para usos biotecnológicos. Podem ser utilizadas livres em solução, em agregados com entidades (outras enzimas, leveduras, etc.) ou imobilizadas em superfícies. Dentre estes, os catalisadores imobilizados têm melhorado muito o desempenho técnico de processos industriais e sua economia (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Além disso, enzimas são cruciais para o progresso de muitos setores industriais, como alimentício, de bebidas, de produtos farmacêuticos, de diagnóstico, de terapia, de cuidados pessoais, de ração animal, de detergentes, de papel e celulose, têxteis, de couro, de produtos químicos e de biocombustíveis (RUIZ-VILLAFÁN; RODRÍGUEZ-SANOJA; SÁNCHEZ, 2023).

As principais enzimas têm sido utilizadas em ampla quantidade para os processos de fabricação de detergentes, têxteis, couro, celulose, papel e biocombustíveis. O mercado dessas enzimas gerou uma receita de US\$ 1,2 bilhão em 2011 e continua em crescimento, atingindo US\$ 9,9 bilhões em 2019. Estima-se que o mercado cresça a uma taxa anual de 7,1%, alcançando US\$ 14,9 bilhões até o ano de 2027. Das mais de 3.000 enzimas conhecidas, somente 5% atendem à demanda comercial de mais de 500 produtos (RUIZ-VILLAFÁN; RODRÍGUEZ-SANOJA; SÁNCHEZ, 2023). A viabilidade industrial de enzimas depende de sua produção em grandes quantidades, o que usualmente não ocorre: a quantidade de enzima produzida ou isolada de suas fontes naturais (animais, plantas e microrganismos) é pequena. A expressão heteróloga para produção de enzimas têm sido considerada uma ferramenta poderosa para a viabilização industrial de enzimas por permitir um alto rendimento (NAKAPONG *et al.*, 2022; ZAFAR *et al.*, 2022).

Enzimas são, na sua maioria, proteínas com peso molecular que varia de 5 kDa a 5.000 kDa, com valores típicos na faixa de 20 kDa a 100 kDa. São consideradas ainda polipeptídeos e sua estrutura corresponde a uma sequência linear de blocos de aminoácidos unidos por ligações amida. O que diferencia as enzimas em relação às

proteínas, em termos de estrutura, é a capacidade da cadeia polipeptídica em adotar uma conformação tridimensional única. Também, diferente das proteínas, as enzimas possuem atividade catalítica e a estrutura responsável é chamada de sítio ativo e corresponde a cerca de 10% a 20% de seu volume total (BUGG, 2012). Algumas enzimas possuem um ou mais sítios alostéricos que permitem a ligação de um ligante capaz de interferir na ligação de outro ligante em outro sítio (podendo ativar ou inibir a atividade enzimática). Os efeitos alostéricos geralmente requerem interações entre subunidades de proteínas oligoméricas (VOET; VOET; PRATT, 2008).

Os principais fatores que afetam a velocidade de reações catalisadas por enzimas são a concentração de enzima, a concentração de ligantes (substratos, produtos, inibidores e ativadores), o pH, a força iônica, a atividade de água, a regulação alostérica, os cofatores e a temperatura. Para o caso de xilose (glicose) isomerase, a presença de um cátion metálico divalente atua como um ativador e o xilitol e o sorbitol são dois grandes inibidores (KOVALEVSKY *et al.*, 2012; NAM, 2021; VASANTI DESHPANDE; RAO, 2006). Quando todos esses fatores são propriamente analisados pode-se ter uma excelente compreensão sobre a natureza de uma reação enzimática (SEGEL, 1976).

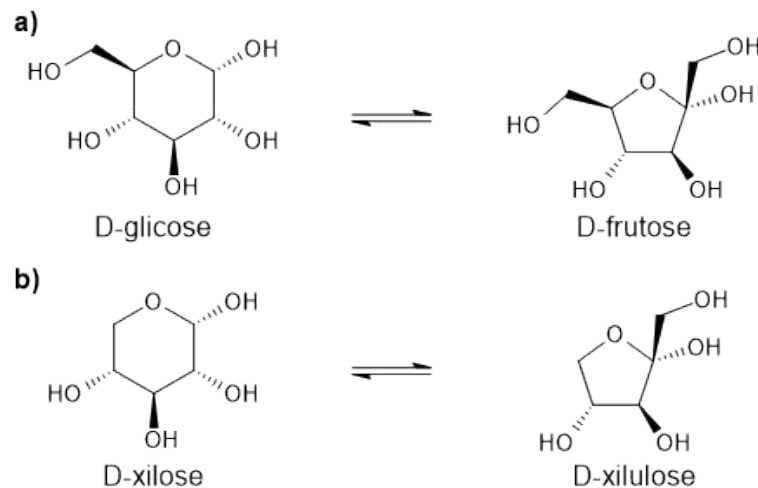
2.2 XILOSE (GLICOSE) ISOMERASE

D-xilose (glicose) isomerase (D-xilose cetol-isomerase, EC 5.3.1.5) é uma enzima que catalisa a reação de isomerização reversível de D-glicose e D-xilose em D-frutose e D-xilulose, respectivamente (Figura 1) (VASANTI DESHPANDE; RAO, 2006). A maioria dos açúcares naturais é isômero “D” (SCHERMANN, 2008). Visando não ser repetitivo, no decorrer do documento evitar-se-á empregar o prefixo “D”.

Xilose isomerase é uma importante enzima para a indústria de alimentos, pois desempenha um papel fundamental na produção de HFCS. Em suma, ela age sobre o xarope de milho (alto teor de glicose) para produzir uma mistura de glicose e frutose (YANG *et al.*, 2020). Além disso, é uma enzima capaz de auxiliar no cenário global de busca por fontes de energia renováveis, pois possibilita a produção de E2G (RAMOS *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2012). Para este último, a interconversão de xilose em xilulose por xilose isomerase tem possibilitado estudos com esta enzima para aplicação no processo de conversão dos monômeros obtidos da fração de hemicelulose de biomassas lignocelulósicas em E2G (BHOSALE; RAO;

DESHPANDE, 1996; SINGH; SINGH; SACHAN, 2019). Em comparação com a reação de isomerização química (uso de catalisadores inorgânicos), a reação enzimática é mais específica e realizada em condições mais brandas (WANG *et al.*, 2019).

Figura 1 – Isomerização reversível de: a) D-glicose em D-frutose; e, b) D-xilose em D-xilulose catalisada por D-xilose (glicose) isomerase



Fonte: adaptado de NAM (2022)

Grande parte de xiloses isomerasas comerciais são produzidas por espécies de *Streptomyces* ou *Actinoplanes* (domínio Bacteria) (SHARMA; XU; QIN, 2021). Xilose isomerase de espécie bacteriana é, em termos de estrutura, um tetrâmero de subunidades idênticas, cada uma com massa molar de 43 kDa, resultando em uma massa molar total em torno de 173 kDa (NAM, 2021; SILVA *et al.*, 2012). Como a enzima é produzida intracelularmente por estes microrganismos e a glicose não é o seu substrato preferencial — a xilose o é, sendo que a afinidade de xilose isomerase por xilose é ~ 160 vezes maior do que para glicose (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996) — seu custo é relativamente alto, sobretudo quando comparada a enzimas como a α -amilase e glicoamilase, que realizam a hidrólise do amido de milho no então mencionado xarope de milho (FILICE; ARAGON; PALOMO, 2016; YANG *et al.*, 2020). Assim, por décadas, xilose isomerase é usada industrialmente em sua forma imobilizada para minimizar o custo do biocatalisador e aprimorar a eficiência de utilização (maximizar a recuperação). Dois exemplos de preparações comerciais de xiloses isomerasas são a Sweetzyme[®], comercializada pela Novozymes, e

GenSweet[®], comercializada pela DuPont Industrial Biosciences (BASSO; SERBAN, 2020).

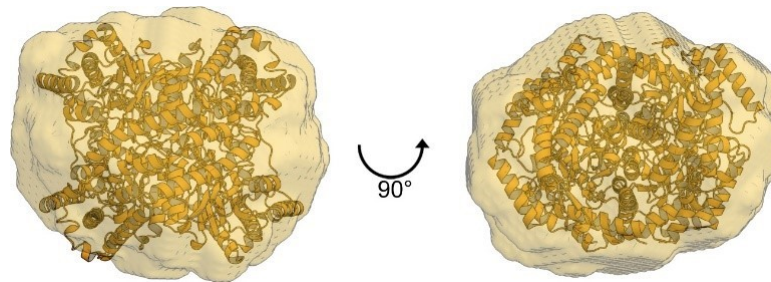
Para a isomerização de substratos, xilose isomerase requer a presença de um cátion metálico divalente, geralmente os íons Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} , ou qualquer combinação destes para máxima atividade. Os íons de metal se ligam a dois sítios de ligação de metal distintos presentes no sítio ativo da enzima (NAM, 2021; VASANTI DESHPANDE; RAO, 2006). Além da presença de cátions divalentes, a máxima atividade pode ser encontrada junto ao efeito combinado de pH e temperatura. O pH ideal de operação de xilose isomerase está geralmente entre 7,0 a 9,0 e a temperatura ótima varia de 60 °C a 80 °C e aumenta na presença de Co^{2+} . A maioria das xiloses isomerases comerciais possui uma temperatura ótima de 60 °C a 65 °C (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996).

2.2.1 Xilose isomerase (*XylA2F1*) de *Streptomyces* sp. F-1

Linhagens de *Streptomyces* são excelentes produtoras de xilose isomerase. Miyamoto *et al.* (2020) utilizaram os genes de uma nova cepa do gênero *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. F-1), isolada por Melo *et al.* (2017), e realizaram a expressão heteróloga dos genes *XylA1F1* e *XylA2F1* em *Escherichia coli*. Para o presente projeto, o gene *XylA2F1* (1167 bp, código de acesso GenBank: WP_070026415.1) (Figura 2) foi selecionado para a produção de xilose isomerase devido ao potencial biotecnológico apresentado (para o processo de produção de xarope ou fermentação de açúcares da lignocelulose). Os autores observaram que esse gene é altamente semelhante ao homólogo de *Streptomyces murinus* (Sweetzyme[®]), apresentando identidade de 95%. Além disso, a enzima se mostrou extremamente estável à altas temperaturas, apresentando máxima atividade a 75 °C, condição favorável para aplicação industrial.

Miyamoto *et al.* (2020) demonstraram que o maior rendimento de isomerização de substrato foi alcançado com a presença de íons Mg^{2+} e elevadas atividades foram observadas com a presença de íons Co^{2+} . Por outro lado, os íons Fe^{2+} e Mn^{2+} apresentaram efeito de inibição. O efeito combinado de pH junto aos íons Mg^{2+} e Co^{2+} mostrou uma dependência para atividade máxima em pH entre 8,0 a 9,5.

Figura 2 – Arranjo quaternário de xilose isomerase: estrutura tetramérica formada por dois dímeros (subunidades idênticas)



Fonte: MIYAMOTO *et al.* (2020)

2.3 CINÉTICA DA REAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO REALIZADA POR XILOSE ISOMERASE

Por definição, a isomerização é um processo químico que converte um composto em seu isômero óptico (dextrogiro “D” ou levogiro “L”) ou geométrico (GORAIN *et al.*, 2018).

É comum na literatura que a reação de isomerização da xilose em xilulose (e vice-versa) realizada pela enzima xilose isomerase seja descrita pela cinética reversível de Michaelis-Menten. A mesma cinética descreve a conversão de glicose em frutose (e vice-versa) (ABU-REESH, 1997; GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000; ROMAN *et al.*, 1985).

Dehkordi, Tehrany e Safari (2009) realizaram o estudo cinético da Sweetzyme® para a reação de isomerização de glicose em frutose. Neste estudo, os autores assumiram a cinética reversível de Michaelis-Menten e evidenciaram a ocorrência de pequenos desvios no modelo cinético para baixas conversões fracionárias (< 10%). Conforme a conversão aumentava, os desvios reduziam e a conversão se ajustava perfeitamente ao modelo cinético de Michaelis-Menten. No estudo de Giordano, Giordano e Cooney (2000), a equação de Michaelis-Menten para a reação reversível de glicose em frutose usando a enzima comercial também se mostrou precisa o suficiente para ajustar-se aos resultados experimentais.

Não obstante, a reação de isomerização realizada por xilose isomerase também pode ser expressa por meio do modelo cinético reversível de Briggs-Haldane e são encontrados exemplos na literatura para tal. Este modelo assume a cinética de Michaelis-Menten reversível sob condição de estado pseudo-estacionário, o qual

permite a simplificação da cinética para a expressão de Michaelis-Menten simplificada para um único substrato (CONVERTI; BORGHI, 1997). O modelo de Briggs-Haldane foi utilizado para o tratamento dos dados obtidos neste estudo e é referenciado no documento como a expressão de Michaelis-Menten simplificada para um único substrato.

Roman *et al.* (1985) determinaram as taxas inerentes e parâmetros cinéticos da reação de isomerização de xilose em xilulose com Sweetzyme® comendo o leite empacotado de um reator de coluna sob refluxo. Para o tratamento dos dados foi assumida a cinética reversível de Briggs-Haldane, a qual permitiu a simplificação da cinética para a expressão de Michaelis-Menten simplificada para um único substrato. Os dados obtidos ajustaram-se à expressão simplificada. No estudo de Silva *et al.* (2006) foi apresentada uma modelagem matemática e metodologia numérica para prever o comportamento e o desempenho de unidades reativas de um leite móvel simulado (LMS) para a reação de isomerização de glicose em frutose utilizando Sweetzyme®. Para a determinação dos parâmetros cinéticos da reação de isomerização foi empregado o modelo cinético reversível de Briggs-Haldane foi empregado. O estudo mostrou que os valores dos parâmetros cinéticos obtidos coincidiram com os encontrados na literatura, confirmando a validade da expressão de Briggs-Haldane adotada para a estimativa da cinética da reação de isomerização. Dando seguimento, o esquema da reação de isomerização de xilose em xilulose (e vice-versa) ou glicose em frutose (e vice-versa) pode ser representada pela seguinte reação:



onde S , En e P representam o substrato, a enzima e o produto, respectivamente, e XEn o complexo intermediário da reação substrato/produto-enzima (DEHKORDI; TEHRANY; SAFARI, 2009). Considerando que a velocidade de formação de XEn em $P + En$ é elevada em comparação à velocidade em que ocorre a dissociação de XEn em $S + En$, então S , P e En não estarão em condição de equilíbrio. Portanto, se a enzima estiver presente na reação em quantidades catalíticas, isto é, $S \gg En$, um

estado pseudo-estacionário será estabelecido, onde o complexo XEn será constante com o tempo. Nesta condição, a reação pode ser representada como (SEGEL, 1976):



A partir dessa expressão obtém-se a equação de Michaelis-Menten simplificada para um único substrato formando um único produto (SEGEL, 1976):

$$v_0 = \frac{[S]V_m}{K_m + [S]} \quad (3)$$

onde v_0 representa a velocidade inicial da reação, $[S]$ e $[P]$ a concentração de substrato e produto, respectivamente, e os termos V_m e K_m representam a velocidade máxima da reação (ex., em condição de saturação) e a constante de Michaelis-Menten, respectivamente. Portanto, de acordo com a Equação (3), quando apenas o substrato ou o produto estiver inicialmente presente na solução, considerando conversões fracionárias muito pequenas, tem-se como velocidades das reações (ROMAN *et al.*, 1985):

$$v_{of} = \frac{[S]V_{mf}}{K_{mf} + [S]} \quad (4)$$

$$v_{or} = \frac{[P]V_{mr}}{K_{mr} + [P]} \quad (5)$$

onde v_{of} e v_{or} são a velocidade inicial da reação direta (*forward*, em inglês) e a velocidade inicial da reação inversa (*reverse*, em inglês), respectivamente. Os termos K_{mf} , K_{mr} , V_{mf} , e V_{mr} representam a constante de Michaelis-Menten da reação direta, constante de Michaelis-Menten da reação inversa, velocidade máxima da reação direta e velocidade máxima da reação inversa, respectivamente. A reação direta pode considerar tanto a glicose quanto a frutose e, por consequência, a reação inversa será de frutose ou glicose, respectivamente. De forma análoga, a reação direta pode

considerar tanto a xilose quanto a xilulose e, por consequência, a reação inversa será de xilulose ou xilose, respectivamente (DEHKORDI; TEHRANY; SAFARI, 2009).

A equação de Michaelis-Menten descreve a curva obtida quando a velocidade inicial *versus* a concentração de substrato é representada assumindo que a reação reversível é insignificante (SEGEL, 1976). Os parâmetros cinéticos obtidos nas Equações (4) e (5) podem ser avaliados a partir de gráficos duplo recíproco ou de Lineweaver-Burk, onde as velocidades das reações iniciais para as reações direta e/ou inversa são traçadas com as concentrações iniciais de substrato e/ou produto, respectivamente (SILVA *et al.*, 2006; ROMAN *et al.*, 1985). A representação dos gráficos está baseada no rearranjo das Equações (4) ou (5) na forma de equações lineares, obtendo-se, assim, as respectivas velocidades iniciais das reações descritas pelas Equações (6) e (7) (SEGEL, 1976):

$$\frac{1}{v_{of}} = \frac{K_{mf}}{V_{mf}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{mf}} \quad (6)$$

$$\frac{1}{v_{or}} = \frac{K_{mr}}{V_{mr}} \frac{1}{[P]} + \frac{1}{V_{mr}} \quad (7)$$

Em linhas gerais, as Equações (6) e (7) podem ser representadas somente com os termos K_m e V_m quando se considera exclusivamente a formação do produto a partir de um único substrato S (SEGEL, 1976), isto é:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (8)$$

Os parâmetros cinéticos obtidos nas Equações (4) e (5) também podem ser avaliados a partir do modelo de Hanes. O modelo de Hanes é semelhante ao de Lineweaver-Burk, porém, na Equação (8), que serve como base para o modelo de Lineweaver-Burk, ambos os lados são multiplicados pelo termo $[S]$:

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} [S] \quad (9)$$

Em suma, como a variável independente S está presente em ambos os lados da equação, é inevitável que haja certo grau de correlação em um gráfico S/v_0 em função de S . Desse modo, o modelo reduz o efeito de erros associados (comparado ao modelo de Lineweaver-Burk) (BISSWANGER, 2008). Os resultados experimentais foram avaliados utilizando tanto o modelo de Lineweaver-Burk como o modelo de Hanes, de acordo com a conformidade dos dados em relação a cada um desses modelos.

Voltando ao esquema de reação (2), um novo termo aparece: o k_{cat} , que representa a constante da lei de velocidade para formação de $P + E_n$ (conhecido como *turnover number*, em inglês). É um parâmetro que descreve a quantidade máxima de substrato S convertida em produto P por unidade de tempo e por sítio ativo (LI *et al.*, 2022). Através dele e das outras duas constantes de velocidade (k_1 e k_{-1}) obtém-se o valor de K_m (SEGEL, 1976):

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \therefore [SE_n] = \frac{[S][E_n]}{K_m} \therefore k_1[S][E_n] = (k_{-1} + k_{cat})[SE_n] \quad (10)$$

Em resumo, a constante de Michaelis-Menten, K_m , equivale a concentração de substrato em que a velocidade da reação resulta em metade da velocidade máxima, V_m (SEGEL, 1976):

$$K_m = [S], \quad v_0 = \frac{[S]V_m}{[S] + K_m} \therefore v_0 = \frac{1}{2} V_m \quad (11)$$

Dessa forma, a relação V_m/K_m expressa a afinidade relativa da enzima em questão pelo substrato, ou seja, quanto maior o valor de K_m , maior é a quantidade de substrato necessária para que o V_m da reação seja alcançado e, conseqüentemente, menor é a afinidade do biocatalisador com o substrato. Ao contrário, quanto menor o valor de K_m , menor é a quantidade de substrato necessária em direção ao V_m da reação e maior é a afinidade do substrato com a enzima.

O interesse no valor numérico de K_m está diretamente relacionado com a determinação da afinidade relativa entre o substrato e o biocatalisador e, assim, no controle da concentração de substrato que fornece o melhor rendimento da reação. Por exemplo, não há nenhum sentido fisiológico em manter a quantidade de substrato

muito maior que o valor da constante de Michaelis-Menten, já que a velocidade inicial não se aproxima da máxima velocidade da biocatálise (SEGEL, 1976).

Outro aspecto importante a ser observado é o valor da razão k_{cat}/K_m . A partir da reação (2) tem-se que a velocidade da reação instantânea depende diretamente da concentração de SE_n (SEGEL, 1976):

$$v_0 = k_{cat}[SE_n] \quad (12)$$

onde a concentração total de enzima é dada por (SEGEL, 1976):

$$[E_n]_t = [SE_n] + [E_n] \quad (13)$$

Se a velocidade da reação instantânea é representada pela Equação (12), então a velocidade máxima da reação pode ser expressa por (SEGEL, 1976):

$$V_m = k_{cat}[E_n]_t \quad (14)$$

Logo, substituindo o termo V_m na Equação (3), tem-se (SEGEL, 1976):

$$v_0 = \frac{[S](k_{cat}[E_n]_t)}{K_m + [S]} \therefore v_0 = \frac{k_{cat}}{K_m} [E_n]_t [S] \quad (15)$$

Portanto, a velocidade de reação depende da relação k_{cat}/K_m . Se a enzima atuar em mais de um substrato, como é o caso para xilose isomerase, os valores de k_{cat}/K_m representam a especificidade da enzima para cada substrato. Em outras palavras, quanto maior o valor desta relação, mais específica a enzima é para aquele substrato. Dessa forma, espera-se sempre um valor baixo para o K_m e alto para o k_{cat} em uma reação enzimática (LORSCH, 2014).

2.4 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DE XILOSE ISOMERASE

A biomassa lignocelulósica é considerada um ótimo recurso sustentável com potencial para fornecer combustíveis renováveis ou produtos químicos de base biológica (WANG *et al.*, 2019) sem competir com a produção de alimentos. É uma

complexa rede tridimensional constituída majoritariamente por celulose (30% – 50%), lignina (30% – 50%) e hemicelulose (25% – 30%) (ZHAO *et al.*, 2020). Tem sido de muito interesse de pesquisadores explorar rotas térmicas, químicas ou biológicas para converter açúcares derivados da biomassa em produtos químicos e combustíveis baseado no conceito de biorrefinarias. É bem conhecido que a glicose e a xilose são os dois principais açúcares que compõe os carboidratos da biomassa (WANG *et al.*, 2019).

A conversão bioquímica de glicose em frutose é realizada industrialmente para a produção de xarope de milho rico em frutose (HFCS) usando xilose isomerase imobilizada em reatores contínuos de leito empacotado com múltiplos estágios (ZITTAN; POULSEN; HEMMINGSEN, 1975), excedendo 107 ton por ano (FILICE; ARAGON; PALOMO, 2016; SHARMA; XU; QIN, 2021; YANG *et al.*, 2020).

Conforme citado anteriormente, esta enzima também pode ser usada para a isomerização de xilose (obtida do fracionamento da hemicelulose) em xilulose para produção de E2G. A hemicelulose (que constitui de 25% a 30% da biomassa lignocelulósica) tem como principal açúcar a xilose, sendo esse o segundo açúcar mais comum na natureza e, portanto, considerado um recurso renovável bastante promissor. A xilose é um monômero de cinco carbonos que não é eficientemente metabolizado pela levedura convencional *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo de produção de bioetanol (HARNER *et al.*, 2015). Neste sentido, leveduras não-convencionais ou geneticamente modificadas são estudadas para o consumo desse açúcar. Porém, ainda existem dificuldades associadas ao uso destes organismos em escala industrial, além do efeito inibitório que sofrem por compostos gerados durante a etapa de fermentação (MARTINEZ-JIMENEZ *et al.*, 2021). Uma estratégia promissora para viabilizar a produção de E2G está na isomerização de xilose em xilulose, visto que este último pode ser facilmente utilizado por *S. cerevisiae* no processo de fermentação (MILESSI *et al.*, 2018b).

Sabe-se que o etanol é o biocombustível considerado para substituir a gasolina na indústria de transporte ou para ser usado como precursor de produtos químicos com alto valor agregado (OKOLIE *et al.*, 2021). Comercialmente, o etanol é produzido a partir de amido e materiais à base de açúcar, como milho e cana-de-açúcar, principais matérias-primas dos Estados Unidos e Brasil, respectivamente, e líderes na produção mundial de etanol (E1G), nesta ordem (SINGH *et al.*, 2022). A produção gera como subproduto enormes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar, sabugo

e palha de milho (biomassa lignocelulósica) que proporcionam também a produção de etanol de segunda geração (E2G) (GUILHERME *et al.*, 2022; SINGH *et al.*, 2022), a qual o Brasil detém a vanguarda sobre os Estados Unidos (QUEEN, 2023).

Em síntese, a produção de E2G tem uma série de vantagens sobre a produção convencional de etanol, pois trata-se de um recurso renovável disponível em abundância, matéria-prima de baixo custo, não competitivo com culturas alimentares e que gera menos emissão de gases do efeito estufa (SINGH *et al.*, 2022).

Entretanto, a aplicação de xilose isomerase para a produção de HFCS ou bioetanol encontra diversos obstáculos para maior viabilidade econômica e/ou eficiência no processo de produção, pois apresenta baixos rendimentos, baixas produtividades e custos. Neste sentido, a tecnologia de microrreatores apresenta-se como uma alternativa promissora para o aprimoramento de processos e contorno de obstáculos que envolvem a conversão de açúcares derivados da biomassa (C. DIMIAN; BILDEA; A. KISS, 2014; HOMMES; HEERES; YUE, 2019).

2.4.1 Produção de xarope de milho rico em frutose (HFCS)

Historicamente, a sacarose derivada da beterraba-sacarina (constituindo 40% de sua composição) e da cana-de-açúcar (60%) foi o principal adoçante no mundo até 1976. Devido à insuficiência de abastecimento de sacarose após a Revolução Cubana em 1958, xilose isomerase começou a receber importância comercial para a produção de HFCS para ser um substituto à sacarose. Mesmo com a afinidade da enzima sendo ~160 vezes menor para a glicose do que para a xilose, ela foi suficiente para ser comercialmente significativa. Além da insuficiência de abastecimento de sacarose, o aumento da demanda de açúcar, combinado ao alto custo de produção e pela consciência dos efeitos adversos à saúde pelo consumo de sacarose, também motivaram a procura por um substituto deste açúcar (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996).

Alguns fatores que levaram a substituição da sacarose precisamente pelo HFCS foram: (i) maior eficiência adoçante, visto que no equilíbrio (1:1) possui 1,3 vezes mais poder adoçante que a sacarose e 1,7 vezes mais que a glicose; (ii) mais econômico (levando em conta o poder adoçante, pois com menos quantidade de HFCS atinge-se o mesmo poder adoçante da sacarose); (iii) não possui sabor desagradável; e, (iv) não apresenta problemas de cristalização no processo de

produção. Outro fator determinante foi a frutose ter sido considerada uma alternativa mais saudável para diabéticos por não influenciar no nível de glicose no sangue (é reabsorvida lentamente pelo estômago) (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996). No entanto, vale ressaltar que o aumento do consumo de HFCS nos Estados Unidos (maior produtor de amido direcionado à produção de xaropes) coincidiu com o aumento da incidência de obesidade, diabetes e outras doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas, que desencadeou um debate sobre os riscos associados à saúde pelo consumo de HFCS que perduram até os dias atuais (CHANDRASEKARAN; BEENA, 2016). Em todo o caso, o HFCS é ainda amplamente utilizado na indústria de alimentos, tornando xilose isomerase uma enzima industrialmente relevante para a etapa crucial de conversão da glicose em frutose (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996; KOGNOU *et al.*, 2022).

O HFCS é produzido, principalmente, a partir do amido de milho em três etapas: 1) liquefação do amido pela enzima α -amilase; 2) sacarificação do amido combinado com ação das enzimas amiloglucosidase e uma enzima desramificadora (que catalisa a hidrólise de ligações α -1,6-glicosídicas em amilopectina e/ou glicogênio e polímeros relacionados); e 3) isomerização da glicose por xilose isomerase (em sua forma imobilizada) (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996). No mercado, variações do HFCS são encontradas, como o HFCS-90, HFCS-55 e HFCS-42, que correspondem às proporções de frutose em suas composições, isto é, 90%, 55% e 42%, respectivamente (KOGNOU *et al.*, 2022). O HFCS-90 é o principal produto dessas reações químicas e é misturado com xarope de glicose para obtenção de HFCS-42 e HFCS-55 (Figura 3) (CHANDRASEKARAN; BEENA, 2016).

A conversão de glicose em frutose por xilose isomerase pode ser aprimorada por meio do uso de altas temperaturas e de pH ácido (condição essa que evita o risco a ataques microbianos, dificulta a formação de subprodutos e diminui o tempo de isomerização). Entretanto, essa condição frequentemente acompanha a inativação da enzima e, conseqüentemente, afeta o progresso da reação. Há também outros fatores que afetam o avanço da reação, como a baixa afinidade de xilose isomerase por glicose (em comparação com xilose), a dependência de íons (Mg^{2+} , Co^{2+} , etc.) e concentrações ideais de frutose que são formadas na reação. Dessa forma, para superar esses problemas e possibilitar o uso de xilose isomerase a altas temperaturas e pH ácido, processos aprimorados foram desenvolvidos. Algumas das melhorias incluem a triagem de novas cepas superprodutoras de xilose isomerase, a otimização

das condições de crescimento do microrganismo produtor, a mutação, a fusão de protoplastos, a engenharia enzimática, a imobilização e a coimobilização (CHANDRASEKARAN; BEENA, 2016).

Figura 3 – Produção de HFCS em três etapas



Fonte: adaptado de CHANDRASEKARAN; BEENA (2016)

O mercado de xilose isomerase é maior em sua forma imobilizada e na literatura há inúmeros estudos dedicados à imobilização da enzima (SINGH; JAJOO; BHASIN, 2020; ZHAO *et al.*, 2016). Além disto, tem sido assunto de grande interesse para o aprimoramento da eficiência enzimática (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996).

Baseado no exposto, no presente trabalho a conversão de frutose em glicose (reação inversa) foi avaliada ao invés da reação direta (glicose em frutose) visando facilitar a quantificação pela medição de glicose formada por meio do uso de kit comercial disponível.

2.4.2 Produção de etanol de segunda geração (E2G)

A produção tradicional de E2G utiliza quatro principais etapas: i) o pré-tratamento da matéria-prima (que consiste na separação das fibras de celulose da hemicelulose e lignina, do bagaço); ii) hidrólise dos polissacarídeos em açúcares

fermentáveis (sacarificação); iii) fermentação; e iv) destilação. Durante a sacarificação da celulose são gerados, principalmente, açúcares de hexose, como a glicose, que então é fermentada em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, principal levedura industrial usada para a etapa de fermentação (LIMAYEM; RICKE, 2012; SAHA; COTTA, 2012)). Porém, é de suma importância para maior viabilidade econômica do E2G a cofermentação dos açúcares provenientes tanto da celulose quanto da hemicelulose (CHEN; FU, 2016; SAHA; COTTA, 2012). No entanto, durante a sacarificação da hemicelulose são gerados, principalmente, açúcares de pentose, como a xilose, a qual *S. cerevisiae* apresenta dificuldade de utilização (*S. cerevisiae* só é capaz de assimilar açúcares de hexose). Em contrapartida, *S. cerevisiae* é capaz de assimilar o isômero de xilose obtido a partir de xilose isomerase, a xilulose (MILESSI *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2012). Todavia, um *gap* para o sucesso econômico deste processo consiste no equilíbrio químico da reação de isomerização reversível (da xilose em xilulose por xilose isomerase) que permite um rendimento na razão de 5:1 xilose/xilulose (LIMAYEM; RICKE, 2012; SAHA; COTTA, 2012).

Existem procedimentos descritos na literatura para deslocar o equilíbrio da reação de xilose em xilulose a fim de aumentar a conversão de xilulose. Um modo possível para isto é por meio do processo de isomerização e fermentação simultâneas (SIF, em inglês, para *Simultaneous Isomerization and Fermentation*), que consiste na conversão da xilose em xilulose por xilose isomerase, simultânea à fermentação da xilulose por *S. cerevisiae*. Essa abordagem “remove” continuamente a xilulose do meio reacional, pois a converte em etanol, não permitindo que o equilíbrio químico seja estabelecido (MILESSI *et al.*, 2020, 2018a; RAMOS *et al.*, 2021; RAO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012). Outras variações do processo SIF correspondem aos processos de isomerização e cofermentação simultâneas (SICF, em inglês, para *Simultaneous Isomerization and Co-Fermentation*) e de sacarificação, isomerização e cofermentação simultâneas (SSICF, em inglês, para *Simultaneous Saccharification Isomerization and Co-Fermentation*). O SICF consiste no uso tanto de glicose quanto de xilose no meio reacional. Semelhante ao SIF, a xilose será convertida em xilulose por xilose isomerase, simultâneo à cofermentação da xilulose e glicose por *S. cerevisiae* (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000). O SSICF é idêntico ao método anterior, porém, o processo antecede uma etapa de sacarificação de frações de celulose e hemicelulose em, principalmente, glicose e xilose, respectivamente

(GUILHERME *et al.*, 2022). Outro procedimento possível para deslocar o equilíbrio da reação de xilose em xilulose consiste na adição do composto borato durante a reação de isomerização, onde o equilíbrio é deslocado em favor da formação de xilulose (CHIANG *et al.*, 1981; HOCHSTER; WATSON, 1954; HSIAO *et al.*, 1982; RAO *et al.*, 2008; UMEMOTO; SHIBATA; ARAKI, 2012).

2.5 TECNOLOGIA DE MICRORREACTORES

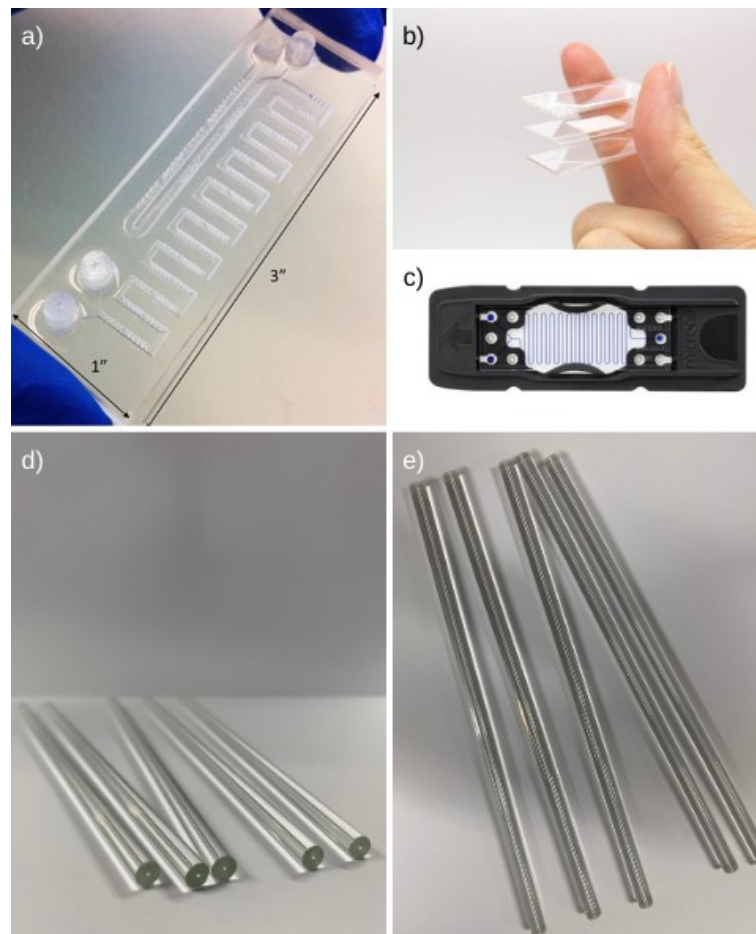
O termo microrreator representa uma ampla gama de dispositivos que possuem dimensões pequenas (URBAN; GOODALL; BRUCE, 2006), geralmente descritos como um dispositivo composto por microcanais com diâmetro característico menor que 1000 μm (LAURENTI; VIANNA JR., 2015; SURYAWANSHI *et al.*, 2018). A tecnologia de microrreatores é interdisciplinar, possuindo uma vasta abrangência de aplicação que combina campos da ciência e engenharia, o que atrai a atenção de pesquisadores de diversas áreas. A tecnologia é vantajosa para muitos processos químicos, como extrações e reações catalíticas, promissora para áreas da química, engenharia química e biotecnologia (MIYAZAKI; MAEDA, 2006). Palavras-chave como "MEMS" (*Microelectromechanical Systems*), "BioMEMS", "Lab-On-A-Chip", "mTAS" (*Micro Total Analysis Systems*) "μ-IMERS" (*Microfluidic Immobilized Enzyme Reactor*) e "microrreatores" são sinônimos para equipamentos microfluídicos utilizados para aplicações na intensificação de processos (SURYAWANSHI *et al.*, 2018).

O interesse em microrreatores se deve em função de suas vantagens em relação aos dispositivos de reação convencionais, como a alta razão entre a área superficial e o volume do microrreator (escoamentos multifásicos em microrreatores podem alcançar áreas superficiais na ordem de 10.000 m^2/m^3) (HOMMES; HEERES; YUE, 2019). Essa característica proporciona maior eficiência na transferência de calor e de massa e, conseqüentemente, maior rendimento e seletividade de produtos nas reações químicas. Além disso, permite melhor controle dos parâmetros de processos químicos, redução de subprodutos, dos desperdícios e no consumo de energia. Os microrreatores podem assumir *design* modular e ser escalonáveis em nível industrial, viabilizando o rápido desenvolvimento de um processo (SIGUEMOTO *et al.*, 2020).

Os modelos mais simples consistem em microrreatores do tipo *chip*, com geometrias e *design* variados, ou possuem a forma microcapilar (Figura 4) e são

fabricados a partir de diversos materiais (polímeros, silicone, metais, aço inoxidável, vidro e cerâmica) e procedimentos (SURYAWANSHI *et al.*, 2018). A confecção de microcapilares é feita a partir de um procedimento de formação de tubos adequado ao material e comprimento desejável, enquanto microrreatores do tipo *chip* são fabricados por diferentes técnicas, dependendo da complexidade requisitada, sendo as mais comuns: *micromachining*, *wet etching*, *injection molding*, *laser ablation microforming*, *soft lithography*, *photolithography*, *hot embossing*, *nanoimprinting*, *electroforming* e *micro-electrodischarge machining* (BOJANG; WU, 2020; SURYAWANSHI *et al.*, 2018).

Figura 4 – a) Microrreator de dimetil polissiloxano (PDMS); b) e c) microrreatores do tipo *chip* de sílica comerciais; d) e e) capilares de sílica comerciais utilizados nesta pesquisa



Fonte: adaptado de ZHANG *et al.* (2021) e site da Micronit® (letras b, c, d e e)

Os microrreatores são dispositivos desenvolvidos para a intensificação de processos (do inglês PI, *Process Intensification*). PI é definido como um conjunto de

princípios visando a inovação de projetos de processos e equipamentos convencionais usados na indústria com o objetivo de aumentar a eficiência do processo e da cadeia de produção, gerar menos despesas de capital e operação, maior qualidade de produtos, menos desperdícios e maior segurança no processo (DIMIAN; BILDEA; KISS, 2014). A miniaturização da escala permite o desenvolvimento de processos, além de compactos, mais versáteis, com alta eficiência e energeticamente econômicos (SIGUEMOTO *et al.*, 2020).

Não somente a tecnologia de microrreatores, mas sua aplicação em modo contínuo (chamado de *flow chemistry*, em inglês) tem sido um recurso para a intensificação de processos. A forma tradicional de se realizar ensaios no modo batelada não oferece as mesmas vantagens do que utilizando sistemas em fluxo contínuo, pois estes permitem rápida triagem de parâmetros de forma sistemática (com aumento da temperatura e concentração em rampa), qualidade consistente de produtos, processamento idêntico em cada elemento do volume e segurança do processo químico por utilizar um menor volume de reagentes, viabilizando o *design* de um processo inerentemente mais seguro (HOLTZE; BOEHLING, 2022).

Os microrreatores vêm sendo extensivamente empregados em outros estudos e alguns exemplos são apresentados para maior entendimento.

Leal *et al.* (2018) realizaram a fermentação da glicose e sacarose com células de *Saccharomyces cerevisiae* fixadas na parede de um microrreator em fluxo contínuo. O sistema demonstrou maior produtividade do que utilizando as células livres da levedura. Lopes *et al.* (2021) obtiveram também, para a mesma fermentação em fluxo contínuo, maior produtividade utilizando um milirreator triangular (composto de três canais triangulares com 3 mm de base e 2 mm de altura, barreiras triangulares com 1,5 mm de base e 1 mm de altura, espaçadas de 8,5 mm ao longo do canal de comprimento total de 415 mm, e uma entrada e uma saída com 4 mm de diâmetro) impresso em 3D com células de *S. cerevisiae* imobilizadas.

Nesta direção, a hidrólise de celulose em açúcares fermentescíveis também foi explorada em microrreatores. Chakraborty e Paramashetti (2017) obtiveram rendimentos superiores de glicose e açúcares redutores (além de economia de energia) na etapa de hidrólise da celulose por via enzimática utilizando uma estratégia de macro (10 mL) e microrreatores (200 µL – 400 µL) combinados.

Lin *et al.* (2022) realizaram a hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) em glicose utilizando um microrreator em fluxo contínuo com a enzima celulase fixada em

um complexo de dopamina e polietilenoimina usado para a funcionalização do microcanal. O sistema mostrou uma produção de glicose por unidade de tempo 97,2% maior do que em outros sistemas de reação (os quais foram mencionados no mesmo trabalho).

O Departamento de Energia do *Pacific Northwest National Laboratory* (PNNL) junto com a *Oregon State University* e *LanzaTech* em 2021 iniciaram o escalonamento de um processo patenteado de produção de combustível de avião ou diesel por meio de resíduos e de gases industriais usando tecnologia de microrreator. O catalisador no interior do microrreator converte em uma única etapa biocombustível (etanol) em n-buteno (processo que requer vários estágios). O projeto do reator em microcanal permite ainda redução de custos, enquanto oferece um sistema de processamento modular escalonável (HEDE, 2021).

2.5.1 Vantagens dos microrreatores

Uma pergunta bastante pertinente em relação ao uso de microrreatores em relação aos macrorreatores é “de que modo a redução da escala explica as vantagens que os microrreatores reservam?” Os tópicos a seguir elucidam sucintamente as vantagens mais relevantes deste sistema: transferência aprimorada de calor e massa, alta seletividade e controle, redução de impacto ambiental, rotas sintéticas menos perigosas, redução de custos e baixa complexidade de escalonamento.

Apesar das muitas vantagens que serão elucidadas a seguir, a abordagem da tecnologia enfrenta desafios para a implementação. Em linhas gerais, alguns estão relacionados à instalação da tecnologia em indústrias (de operação em batelada, principalmente) já consolidadas. A transição do processo em batelada para o uso de fluxo contínuo com microrreatores trará desafios quanto ao controle de qualidade e uniformidade do processo, além dos custos associados para a mudança (que requerem uma avaliação minuciosa de sua viabilidade para o processo em questão). Além disso, os desafios estendem-se também ao desenvolvimento de transformações sob o uso de fluxo contínuo no meio microrreacional, entupimento e dificuldades para a introdução de sólidos no sistema, à necessidade de automação para solução de problemas e *feedbacks* da linha de produção, falta de equipamentos em escala de bancada e piloto, integração com tecnologias já existentes e ao desenvolvimento de um critério de controle de qualidade específico para a manufatura sob fluxo contínuo

em microrreatores. Além disso, outras questões surgem, como o material do microrreator. Microrreatores de PDMS (um material muito comum para a produção de microdispositivos, essencialmente por meio da técnica de *soft lithography*), por exemplo, não são escalonáveis e abordagens inovadoras como moldagem por injeção e impressão 3D se mostram mais interessantes para a fabricação de microrreatores tanto para empreendimentos comerciais quanto para vieses acadêmicos (ELVIRA *et al.*, 2013; HOMMES; HEERES; YUE, 2019).

2.5.1.1 Transferência aprimorada de calor e massa

Microrreatores possuem alta eficiência na transferência de calor e massa devido à alta razão da área de superfície por volume do microrreator (A_s/V), que aumenta significativamente com a redução do diâmetro característico (KOCKMANN; ROBERGE, 2009). Em outras palavras, a redução da escala promove um aumento na eficiência de transferência de energia, pois existe aumento da área de contato para a troca térmica (LAURENTI; VIANNA JR., 2015) e também na eficiência de transferência de massa, uma vez que as taxas de transferência de massa em reações que ocorrem no domínio difusivo — característico de fluidos confinados em microcanais — tendem a aumentar em dimensões reduzidas (ELVIRA *et al.*, 2013). Os fluxos em sistemas multifásicos em microrreatores possuem em média um coeficiente de transferência de massa volumétrico (k_{La}) em fase líquida na ordem de 1 s^{-1} a 10 s^{-1} (HOMMES; HEERES; YUE, 2019).

Escoamentos laminares com ondulações mínimas ou pronunciadas caracterizam o regime de escoamento de fluidos em microcanais com valores de Reynolds geralmente menores que 250. Esse aspecto é favorável para que a transferência de massa ocorra essencialmente por difusão (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2002). O número de Reynolds, em se tratando de fluidos confinados em microcanais, é pequeno (< 250) porque o seu valor é diretamente proporcional ao diâmetro característico (LEE *et al.*, 2016). O número de Reynolds é um adimensional que identifica o regime de escoamento de fluidos (basicamente, se é laminar, transição ou turbulento) e relaciona as forças de inércia sobre as forças viscosas (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2002).

2.5.1.2 *Alta seletividade e controle*

Reações químicas e reações biológicas comumente formam subprodutos de acordo com as condições locais do reator. Portanto, o controle dessas condições permite reduzir a geração de produtos indesejáveis. Com o uso de microrreatores é possível o controle sobre as condições de forma bem localizada devido ao pequeno espaço. É possível, inclusive, aumentar a seletividade de um determinado produto de interesse (ELVIRA *et al.*, 2013).

2.5.1.3 *Redução de impacto ambiental*

A alta seletividade para a formação de produtos desejados proporcionada pelo uso dos microrreatores possibilita o uso de processos posteriores de purificação menos dispendiosos, o que conduz a redução no uso de compostos químicos em relação aos processos convencionais, configurando, assim, uma alternativa verde. A eficiência na transferência de calor reduz consideravelmente o consumo de energia, contribuindo para a sustentabilidade ambiental (ELVIRA *et al.*, 2013).

2.5.1.4 *Rotas sintéticas menos perigosas*

Sistemas com transferência de calor e de massa eficientes favorecem a performance de reações químicas altamente exotérmicas (HOMMES; HEERES; YUE, 2019). Em suma, a eficiência na transferência de calor e de massa favorece as reações limitadas pela transferência de massa e que usualmente são altamente exotérmicas ou multifásicas (SHALLAN; PRIEST, 2019). Para estes casos, o microespaço não oferece riscos consideráveis devido ao uso reduzido de reagentes e a rápida remoção de calor, até mesmo quando utilizado para a realização de reações com risco de explosão (HOMMES; HEERES; YUE, 2019). Existe um tamanho crítico (*quenching distance*, em inglês) que representa o menor espaço para que haja propagação de chama e a partir do qual, abaixo desse tamanho, a chama é suprimida. Devido ao pequeno diâmetro característico dos microrreatores, explosões podem ser evitadas em função dessa particularidade (HOMMES; HEERES; YUE, 2019).

Reações químicas em condições severas são geralmente realizadas, com certa dificuldade, em equipamentos de reação convencionais de laboratório e, portanto, são praticamente inviáveis na escala de planta piloto. O que determina a periculosidade dessas reações não são necessariamente os valores de temperatura, concentração ou pressão, e sim o tamanho do equipamento e o volume de processamento. Portanto, elas podem ser manuseadas com segurança em sistemas fechados com volumes internos reduzidos. Desse modo, a aplicação de microrreatores permite novas rotas químicas em condições de reação severas que não são viáveis em reatores convencionais em escala de planta piloto. Também, o alto grau de controle proporcionado pelos microrreatores se torna crucial para a operação segura, além de tornar o processo químico mais econômico (KOCKMANN; ROBERGE, 2009).

2.5.1.5 *Redução de custos*

As operações em fluxo contínuo geralmente demonstram redução de área útil por quilograma de produto fabricado, que se torna muito mais significativo com o uso de microrreatores. Além disso, a eficiente troca térmica proporcionada pelo uso de microrreatores permite que haja uma necessidade reduzida de equipamentos, como trocadores de calor (ELVIRA *et al.*, 2013). Economia operacional é obtida por meio do controle eficiente de parâmetros, como temperatura e pressão. Além disso, a capacidade de automação dos microrreatores reduz custos com mão de obra, enquanto mantém a qualidade do produto (se evita variabilidade no rendimento) (SHALLAN; PRIEST, 2019).

Para fins de pesquisa, a obtenção de informações acerca da cinética de reações em microrreatores exige o uso de volume reduzido de reagentes e é possível se obter mais informações quando comparado ao uso de reatores convencionais (proporcionam maior resolução temporal do progresso de uma reação. O que não acontece no modo em batelada, onde geralmente são coletados pontos em intervalos de tempo mais distanciados e analisados posteriormente) (ELVIRA *et al.*, 2013). O conceito de mTAS (descrito na introdução) é justamente a integração de métodos analíticos clássicos e elementos de detecção em uma configuração sequencial, visando a criação de um microdispositivo ideal capaz de executar todas as etapas essenciais para a extração de informações relevantes sobre analitos específicos de uma mistura complexa que incluem: preparação da amostra, reações químicas,

separações químicas e detecção de sinais (HASSAN *et al.*, 2010). Além disso, o uso de microrreatores possibilita a redução na geração de resíduos (podem permitir novas vias de reação com o uso mínimo ou nenhum de solventes) (SHALLAN; PRIEST, 2019).

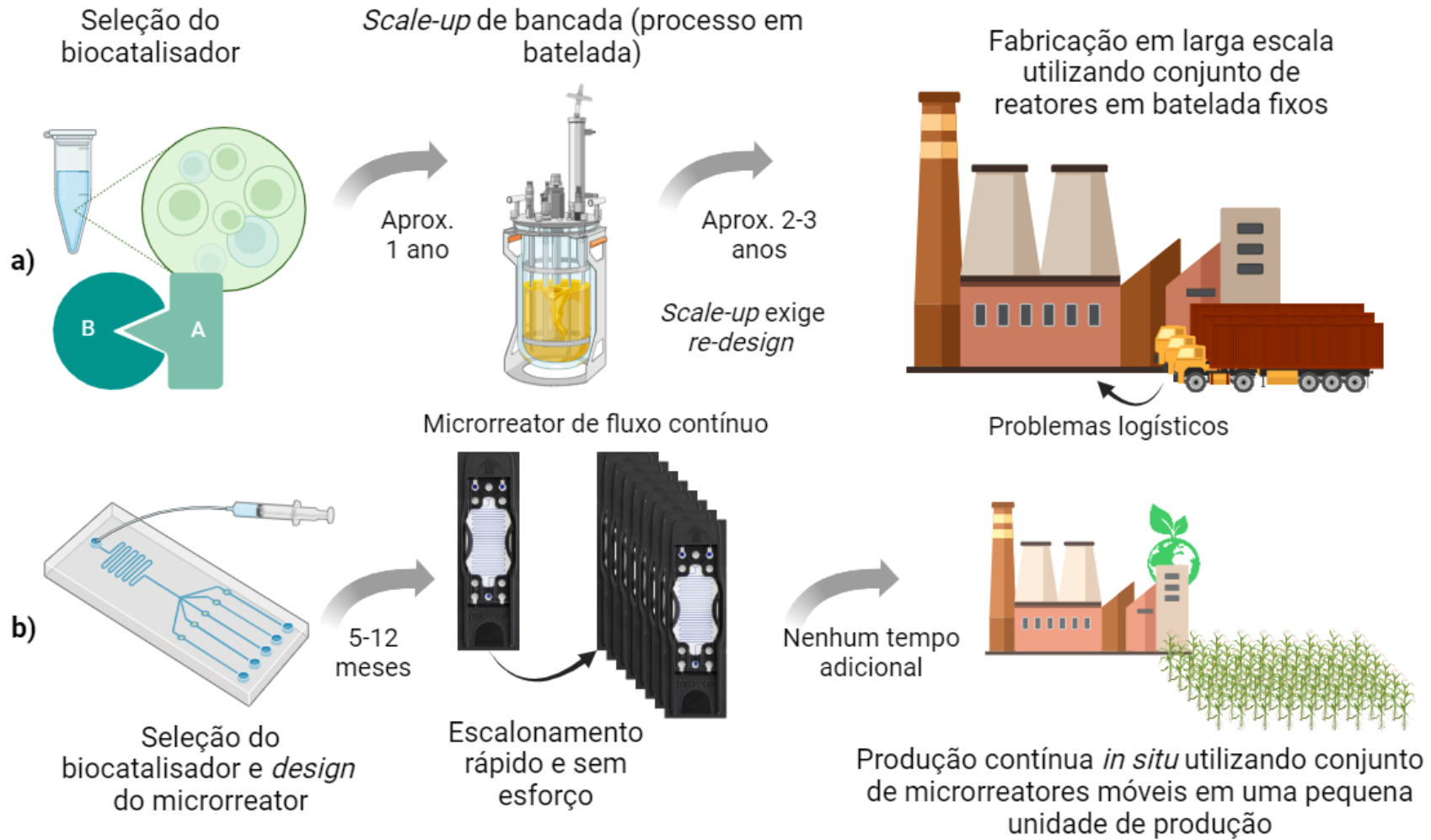
Apesar dos microrreatores serem mais dispendiosos em capital para a aquisição quando comparados aos reatores convencionais, a economia propiciada em termos de custos operacionais se sobressai (SHALLAN; PRIEST, 2019). Os benefícios do uso de microrreatores em relação a redução de despesas estendem-se desde o processamento das reações químicas até o escalonamento (ELVIRA *et al.*, 2013).

2.5.1.6 *Baixa complexidade de escalonamento*

Existem três estratégias de escalonamento que se destacam. São elas (usando os termos em inglês comuns na literatura): *consecutive numbering-up*, *parallel numbering-up* e sutil *scale-out*. A vantagem destas estratégias é permitir a obtenção das mesmas velocidades e rendimentos de produção obtidas em experimentos em bancada (com microrreator), enquanto mantém as propriedades hidrodinâmicas e taxas de transferência de calor e massa por meio da multiplicação das unidades de microrreatores (SHRIMAL; JADEJA; PATEL, 2020). Portanto, diferentemente do método convencional onde o processo químico deve ser reajustado cada vez que o volume da reação se torna maior, desde experimentos em bancada até a planta industrial, a tecnologia de microrreatores permite alcançar a produção de forma rápida e mais econômica, transferindo diretamente as condições operacionais otimizadas realizadas em um microrreator para um conjunto de unidades (Figura 5) (HAMIDOVIĆ; ENDER; SPRINGER, 2020).

O *consecutive numbering-up* consiste na distribuição de microrreatores em série. Os reagentes são alimentados no primeiro microrreator, geralmente a uma vazão elevada, e percorrem os microrreatores subsequentes passo a passo. Ao se utilizar essa estratégia é recomendado empregar microcanais longos o suficiente para manter o devido tempo de residência dos reagentes (por motivo de se utilizar altas vazões). Além disso, a necessidade de distribuidores de fluxo pode ser diminuída, o que auxilia na redução de custos e o controle da vazão. O *consecutive numbering-up* também pode auxiliar na redução de *hot spots* que geralmente ocorrem com reações

Figura 5 – Demonstração de um processo em larga escala comparado às vantagens da síntese em microrreatores: a) desenvolvimento do processo em larga escala; e b) desenvolvimento do processo em microescala (representando a produção de etanol/E2G ou HFCS)



Fonte: adaptado de HAMIDOVIĆ; ENDER; SPRINGER (2020) e WOHLGEMUTH *et al.* (2015)

rápidas e exotérmicas através da diminuição do fluxo. O estudo sobre a estratégia é limitado, mas comumente utilizado na prática. A capacidade de escalonamento é restringida devido a inabilidade de aumentar as taxas de fluxo ilimitadamente sem restrições (ZHANG *et al.*, 2017).

O *parallel numbering-up* é a disposição de microrreatores em paralelo uns aos outros e é considerado o método mais comum e promissor de escalonamento (SHRIMAL; JADEJA; PATEL, 2020). A vantagem da estratégia é permitir que as condições obtidas em bancada, utilizando uma unidade microreativa, sejam mantidas, isso porque as características hidrodinâmicas e de transferência de calor e de massa permanecem intactas. No entanto, requer distribuição e controle de fluxo complexos (ZHANG *et al.*, 2017). O arranjo necessita de um conjunto de bombas e válvulas para o controle da pressão de entrada de reagentes nos microrreatores. Porém, requer menos quantidades desses equipamentos em função da integração do processo (SHRIMAL; JADEJA; PATEL, 2020).

Por último, o sutil *scale-out* se caracteriza pelo aumento minucioso das dimensões, a fim de aumentar a quantidade de produto formado, mas sem perder as qualidades que o microespaço oferece. O aumento da escala somente é aceitável se mantiver as performances eficientes de mistura dos reagentes e de transferência de calor e massa características dos microrreatores. Por isso, a sutileza no aumento é crucial (SHRIMAL; JADEJA; PATEL, 2020).

2.5.2 Microrreatores enzimáticos

Os microrreatores enzimáticos foram desenvolvidos visando facilitar rotinas de análises bioquímicas e realizar conversões bioquímicas (e estudos cinéticos) (URBAN; GOODALL; BRUCE, 2006). No desenvolvimento desses processos, o uso de enzimas imobilizadas é preferível (MIYAZAKI; MAEDA, 2006). Existem diversos métodos para a imobilização de enzimas em suportes utilizando equipamentos de reação convencionais e essas técnicas também têm sido implementadas para a imobilização de enzimas no microespaço reacional (MIYAZAKI; MAEDA, 2006).

Imobilização enzimática refere-se a um conjunto de estratégias elaboradas para manter a enzima fisicamente ligada e/ou aprisionada em meios físicos (suportes sólidos) (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). A vantagem do emprego de enzimas imobilizadas reside na possibilidade de sua separação dos

produtos e reutilização, o que evita a contaminação por produtos e gastos operacionais gerais. Além disto, permite a recuperação da atividade, operações a longo prazo e o possível aumento da estabilidade, da atividade e da seletividade, vantagens que o uso de enzimas livres em solução ou em agregados com outras entidades não apresentam (ZHU *et al.*, 2020).

Em estudos de laboratório que envolvem o uso de enzimas imobilizadas, é possível alcançar rendimentos elevados quando os produtos são separados das enzimas em momentos específicos e os substratos são adicionados de forma contínua. Isto é, já que as enzimas não estão em solução com os produtos e podem ser reutilizadas. Portanto, a aplicação de enzimas imobilizadas em fluxo contínuo utilizando microrreatores têm atraído muito interesse para produções industriais (ZHU *et al.*, 2020).

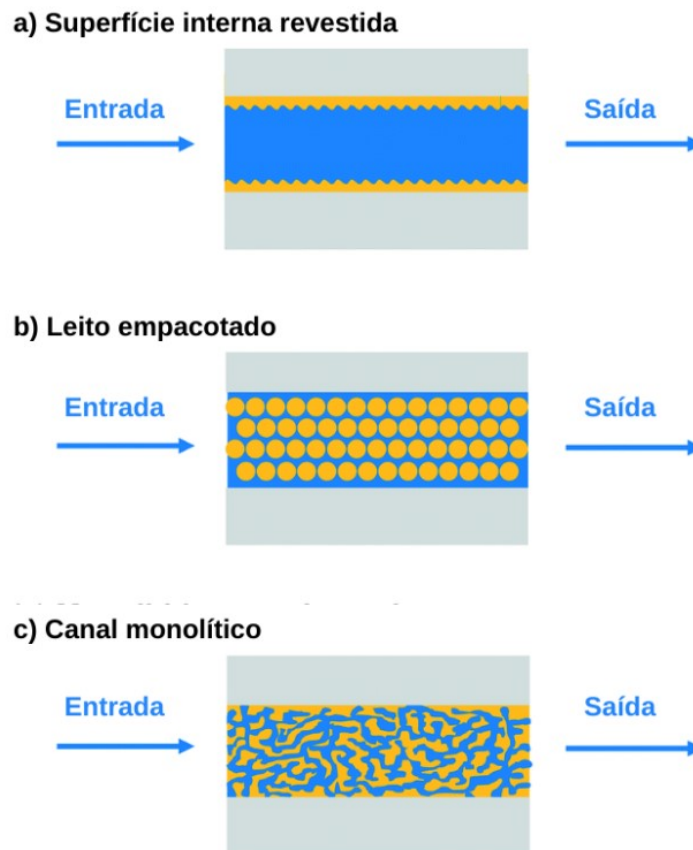
2.6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MICRORREACTORES

Usualmente, em microrreatores enzimáticos, as enzimas são imobilizadas na forma de um material em pó, formando um leito empacotado em monólito ou revestindo a superfície interna do microcanal (Figura 6) (ZHU *et al.*, 2020). De forma geral, a preparação de enzimas imobilizadas em um material em pó ou monólito (como suportes) empacotados dentro de um microrreator é significativamente mais fácil. No entanto, não são favoráveis para processamento em larga escala, pois são suscetíveis ao aumento de pressão (MIYAZAKI; MAEDA, 2006).

Métodos para a imobilização de enzimas na superfície interna de microcanais têm sido desenvolvidos por apresentarem uma alta área superficial (característico do próprio microssistema) e sem causar aumento de pressão (MIYAZAKI; MAEDA, 2006). É o *design* do microrreator que possibilita o uso de fluxo contínuo sem aumento de pressão. Microrreatores com a superfície interna revestida por um catalisador mantêm um *design* ótimo para estabelecer um padrão de escoamento (multifásico) bem definido, o que não acontece em microrreatores com leito empacotado ou monolíticos, e ainda permitem a reutilização (enquanto a enzima manter a atividade) (BASSO; SERBAN, 2020; HOMMES; HEERES; YUE, 2019). Nesse caso, a parede interna do microrreator requer modificações químicas para que a enzima possa se ligar à superfície.

Em microrreatores de sílica, o método mais utilizado para promover ligação covalente da enzima requer a hidroxilação do material por métodos abrasivos como, por exemplo, tratamento da superfície com ácidos, plasma de oxigênio e/ou UV/ozônio (GUNDA *et al.*, 2014) e ativação por 3-aminopropil trietoxissilano (APTES) e glutaraldeído (LAURENTI; VIANNA JR., 2015). O glutaraldeído é o reagente mais utilizado no projeto de biocatalisadores. É um ótimo agente reticulante (*crosslinker*, em inglês), tem sido usado em muitos casos como ativador de suportes, *crosslinker* entre enzimas e suportes e agente reticulante de proteínas (BARBOSA *et al.*, 2014).

Figura 6 – Projetos típicos de estrutura interna de microcanais: a) superfície interna revestida; b) leito empacotado; e c) canal monolítico



Fonte: adaptado de ZHU *et al.* (2020)

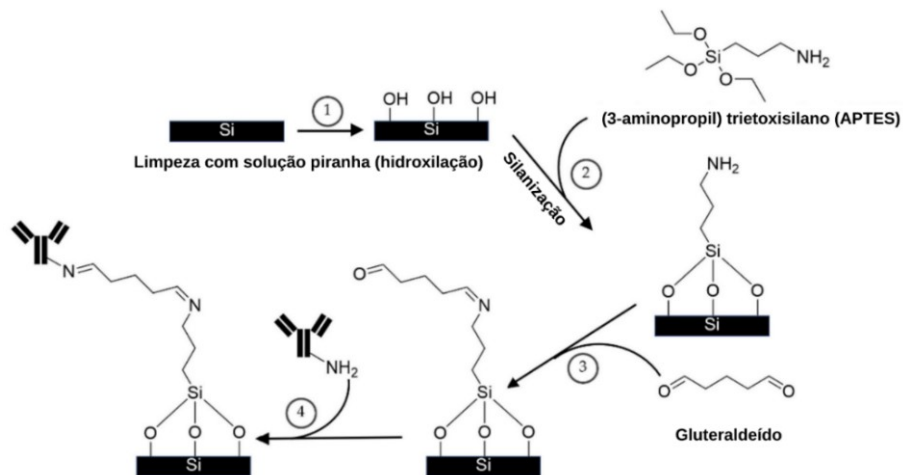
2.6.1 Funcionalização de superfície de sílica com 3-aminopropil trietoxissilano (APTES) para imobilização de enzimas

Silanos podem ser depositados em superfícies de sílica (ex., vidro de borossilicato) em fase líquida (aquosa ou orgânica) ou vapor, tipicamente, com o

objetivo de produzir uma película fina do material grafitado. A morfologia do filme pode afetar a acessibilidade de grupos reativos e alterar o grau de imobilização de moléculas (ex., enzimas). Portanto, a aplicação efetiva do silano é importante para o desempenho de processos com enzimas imobilizadas (WANG; VAUGHN, 2008).

Os fatores que influenciam a morfologia são: concentração de silano, a fase em que se encontra (líquida ou vapor), o solvente, o tempo de reação e a temperatura. Outro fator envolve a forma como ocorrem a hidrólise e a condensação do silano. É bem conhecido que a fonte de silano (ex., APTES) para interagir com a superfície de vidro precisa sofrer hidrólise, resultando, após condensação, em ligações Si – O – Si (siloxano) (Figura 7). Essa hidrólise pode ocorrer tanto em solução quanto na superfície do vidro e depende da quantidade de água presente no sistema (HOWARTER; YOUNGBLOOD, 2006). Após a hidrólise, os grupos silanóis formados devem reagir com os grupos hidroxilas da superfície do vidro levando à silanização (ligação Si – O – Si) (LIU *et al.*, 2013).

Figura 7 – Procedimento convencional de revestimento de superfície com APTES e agente reticulante glutaraldeído



Fonte: UDOMSOM *et al.* (2021)

A cinética da silanização é crucial para a formação de uma camada fina ou uma estrutura oligomérica (LIU *et al.*, 2013). Outro aspecto importante a ser mencionado é o aquecimento do sistema após a silanização. Em inglês o termo comumente utilizado é *annealing* ou cura (ZHANG *et al.*, 2016), que garante a ligação covalente do silano com a sílica. Do contrário, deve ser considerado que o silano pode estar adsorvido na superfície hidratada (WANG; VAUGHN, 2008).

2.7 IMOBILIZAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE E USO DE MICRORREADORES ENZIMÁTICOS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE E2G: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O uso de microrreatores em reações de isomerização de glicose em frutose e/ou xilose em xilulose por meio de xilose isomerase não foram explorados até então em outros estudos. Os trabalhos desenvolvidos na literatura com a enzima em questão limitam-se a aplicação de técnicas e suportes para a imobilização mais eficiente da enzima (SINGH; JAJOO; BHASIN, 2020; ZHAO *et al.*, 2020); ao estudo cinético das reações de isomerização com a enzima imobilizada empregando técnicas de modelagem e simulação e dados experimentais em batelada (DEHKORDI; TEHRANY; SAFARI, 2009) ou em fluxo contínuo (SILVA *et al.*, 2006) e, ainda, considerando a difusão intrapartícula (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000); e sua utilização em processos SIF e SSICF visando o aumento na conversão de xilose em xilulose e, conseqüentemente, de etanol (GUILHERME *et al.*, 2022; MILESSI *et al.*, 2020, 2018; RAMOS *et al.*, 2021; RAO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012). Também foram investigadas novas cepas para a produção de xiloses isomerases mais suscetíveis a reações SIF e/ou SICF (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000) ou com melhor atividade enzimática (combinado a técnicas de imobilização e suportes inovadores) (GUPTA; SRIVASTAVA, 2017; JIA *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2017; SHARMA; XU; QIN, 2021).

Por outro lado, o uso de microrreatores, no que diz respeito a reações de conversão de biomassa, é bastante estudado e Hommes, Heeres e Yue (2019) apresentaram uma extensa revisão sobre o assunto. Citando brevemente as principais abordagens do trabalho, destaca-se a produção de furanos (como, por exemplo, o 5-hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural (importantes blocos de construção de produtos químicos); a oxidação de biomassa ou derivados (por exemplo, o próprio HMF), que permite a produção de resinas, produtos farmacêuticos, aditivos alimentares e polímeros; a hidrodessoxigenação (HDO) de biomassa e seus derivados, para a produção de adoçantes e aditivos de alimentos (ex.: sorbitol, xilitol e arabitol); hidrogenólise de biomassa e seus derivados, que permite a produção de 2,5-dimetilfurano (DMF), um potencial biocombustível com alta densidade energética a partir do HMF; a síntese de biodiesel, a partir de reações de (trans)esterificação de triglicerídeos de óleo de plantas; as reações de epoxidação, para formação de um

epóxido, utilizado como lubrificante, estabilizante e aditivo de produtos farmacêuticos ou combustíveis; as reações de hidrólise de açúcares complexos em seus monômeros (ex.: glicose e xilose) e a reação de eterificação de HMF com etanol para a formação de 5-etoximetilfurfural (EMF), também potencial biocombustível.

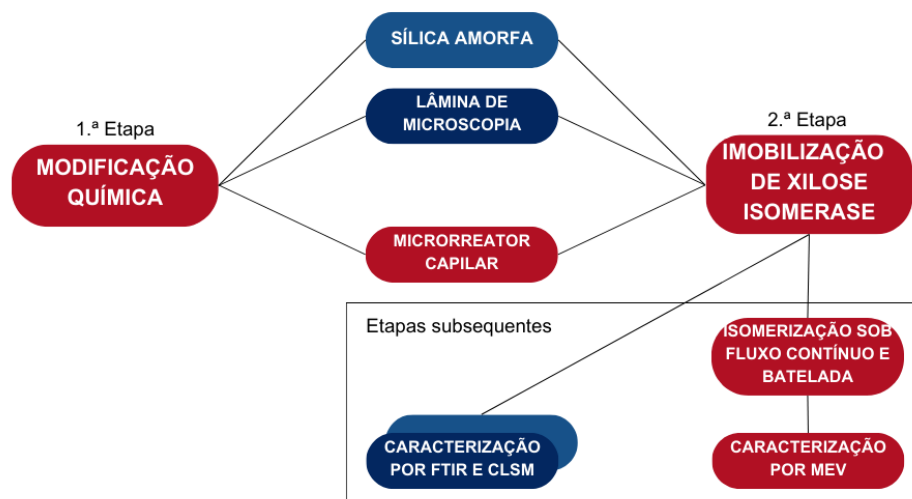
Baseado no exposto nesta revisão, neste trabalho realizou-se a reação de isomerização de frutose em glicose utilizando xilose isomerase obtida de nova cepa do gênero *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. *F-1*) imobilizada na superfície de microrreator sob fluxo contínuo e avaliou-se o efeito da reação nestas condições. Adicionalmente, uma técnica para funcionalização de microrreator de sílica e imobilização de xilose isomerase foi estudada. Desta forma, pretende-se usufruir das vantagens que a técnica de imobilização, o uso de microrreator e *flow-chemistry* proporcionam para uma reação bioquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Algumas etapas foram necessárias para atingir o objetivo central desta pesquisa científica e estes estão apresentados esquematicamente na Figura 8. A primeira consistiu na modificação química de sílica amorfa e lâmina de microscopia (materiais de sílica) para que, com base nos resultados, fosse possível modificar a superfície do microrreator capilar à base de sílica. A segunda etapa foi dedicada à imobilização de xilose isomerase na superfície deste sistema funcionalizado.

Na sequência, os microrreatores com xilose isomerase imobilizada foram submetidos a reações de isomerização em fluxo contínuo empregando frutose e xilose como substratos para a obtenção de glicose e xilulose, respectivamente. Em conjunto com os experimentos de isomerização em fluxo contínuo, experimentos similares em modo batelada com xilose isomerase livre foram realizados a fim de avaliar as diferenças entre os sistemas.

Figura 8 – Fluxograma com as etapas da pesquisa: 1.^a etapa de modificação química seguida da 2.^a etapa de imobilização de xilose isomerase e das etapas subsequentes de caracterização dos materiais e de reações de isomerização



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

A modificação química dos materiais à base de sílica, a imobilização de xilose isomerase e os experimentos em fluxo contínuo e batelada foram realizados no Laboratório de Materiais e Computação Científica (LabMAC) e no Laboratório de

Engenharia Biológica (LIEB), ambos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.1 MATERIAIS

Para a modificação química da lâmina de microscopia, da sílica amorfa e dos microrreatores capilares os seguintes reagentes foram utilizados: 3-aminopropil trietoxissilano (APTES) obtido da Sigma-Aldrich (Brasil); toluol P.A./ACS obtido da Synth (Brasil); peróxido de hidrogênio 35% P.A. (H_2O_2) da marca Neon; ácido sulfúrico P.A./ACS (H_2SO_4) (Neon); gluteraldeído 50% (Synth); hidróxido de sódio em micropérola P.A. (NaOH) (Neon) e ácido clorídrico 37% P.A./ACS (HCl) (Neon).

Os microrreatores capilares foram adquiridos da VHTEX (Brasil) e a lâmina de microscopia obtida da FirstLab (Brasil). A sílica amorfa foi produzida utilizando o reagente silicato C-325 obtido da MQB Chemical (Brasil) e ácido clorídrico.

Para as reações de isomerização com xilose isomerase imobilizada e livre foram utilizados os reagentes fosfato de sódio dibásico anidro (Synth) e fosfato de sódio monobásico anidro 98% P.A. (Neon) (para o preparo da solução tampão), sulfato de magnésio heptaidratado P.A./ACS ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) da marca Dinâmica e como soluções de substrato a D-frutose > 99% (levulose) obtida da Vetec Química Fina Ltda. (Brasil) e a D-xilose > 99% obtida da Biotec Reagentes Analíticos (Brasil). A solução de xilose isomerase foi gentilmente cedida pelo Grupo de Pesquisa da Dr.^a Leticia Zanphorlin do Laboratório Nacional de Biorrenováveis/Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNBR/CNPEM).

Para a determinação de concentração de glicose em soluções foi utilizado o kit Glicose-PP da marca Gold Analisa Diagnóstica. Para a construção da curva padrão nos ensaios de quantificação de glicose foi utilizada a D-glicose 99,5% obtida da Sigma-Aldrich.

A determinação de concentrações de xilose e xilulose em soluções foi realizada por meio de cromatografia líquida ultrarrápida (UFLC, na sigla em inglês de *Ultra-Fast Liquid Chromatography*) usando o cromatógrafo Shimadzu Prominence LC-20A (Shimadzu, Tóquio, Japão) com a coluna Bio-rad® Aminex HPX-87H (300 mm × 7,8 mm) e o detector de índice de refração diferencial modelo RID-20A. As amostras foram transferidas para *vials* e a injeção de 10 μ L de amostra foi eluída com 5 $mmol \cdot L^{-1}$ de H_2SO_4 em uma vazão de 0,5 $mL \cdot min^{-1}$. A temperatura do forno foi mantida a 35 °C e

o tempo de corrida foi de 42 min. Para a construção da curva padrão nos ensaios de quantificação de xilose e xilulose a D-xilose > 99%, obtida da Biotec Reagentes Analíticos (Brasil), e o padrão de xilulose, gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa da Dr.^a Leticia Zanphorlin (LNBR/CNPEM), foram utilizados.

Para a determinação de proteínas totais usou-se a solução de Bradford, a qual foi preparada com os reagentes azul de comassie brilliant blue G250 CAS:[6104-58-1] obtido da Êxodo Científica (Brasil), álcool etílico 95% P.A./ACS (Neon) e ácido fosfórico 85% P.A. obtidos da Cromato Produtos Químicos Ltda. (Brasil). Para a construção da curva padrão nos ensaios de quantificação de proteínas totais, a albumina sérica bovina (BSA, na sigla em inglês de *Bovine Serum Albumine*) obtida da Sigma-Aldrich foi utilizada. A BSA juntamente com a enzima lipase TLL obtida da Novozymes[®] foram utilizadas como referência para a imobilização de xilose isomerase em alguns ensaios.

3.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DOS MATERIAIS DE SÍLICA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE

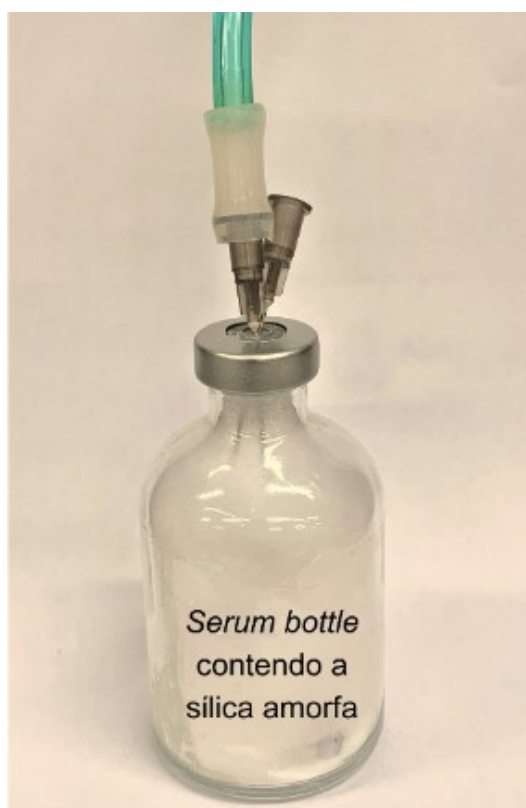
3.2.1 Modificação química da sílica amorfa

Para a preparação da sílica amorfa o procedimento descrito por Costa e Paranhos (2018) foi empregado. Em uma solução de silicato de sódio, submetida a agitação constante em um agitador magnético à temperatura ambiente, a solução 0,1 M de HCl foi adicionada gota a gota a fim de diminuir o pH da solução para 9. A solução gelificada foi mantida em repouso por 30 min e em temperatura ambiente. Em seguida, esta foi macerada em gral com pistilo e as frações obtidas foram dispersas em água deionizada e filtrada em um sistema de filtração com bomba de vácuo até atingir pH neutro, com lavagens consecutivas usando água deionizada. O filtrado obtido foi seco a 60 °C em estufa por 24 h.

Na sequência, a sílica amorfa foi submetida à silanização com o reagente APTES visando prover grupos amino livres (R – NH₂). Convém ressaltar que, para garantir que a superfície da sílica reagisse com o APTES com o mínimo de umidade (condição que favorece a silanização), condições de baixa umidade e ambiente inerte foram estabelecidas. Neste sentido, as vidrarias utilizadas para a sinalização foram pré-aquecidas a 110 °C para diminuição da umidade. *Serum bottles* (50 mL) foram

tampadas e lacradas com septo de borracha contendo a sílica amorfa (1 g) em seu interior. Em seguida, gás nitrogênio foi introduzido sob fluxo contínuo no interior dos frascos por meio de uma agulha e o ar liberado por outra agulha inserida no septo (Figura 9). As seringas e as agulhas foram pré-purgadas por, no mínimo, três vezes com gás nitrogênio antes de os reagentes serem coletados e alimentados na *serum bottle*. Esses cuidados foram executados também para a modificação química da lâmina de microscopia (item 3.2.2) e do microrreator (item 3.2.3).

Figura 9 – Sistema inerte montado para silanização da sílica amorfa



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

A solução à 2% de APTES foi preparada usando 20 mL de tolueno anidro (pré-aquecido a 100 °C – 120 °C para entrar em contato com a sílica e 0,4 mL APTES (em temperatura elevada). A solução (20 mL) foi então introduzida na *serum bottle* por meio de seringa com agulha penetrando o septo de borracha, mantendo-se somente a agulha para remoção de gases (nitrogênio e vapor de tolueno) (Figura 10).

Figura 10 – *Serum bottle* contendo a sílica amorfa e solução a 2% de APTES



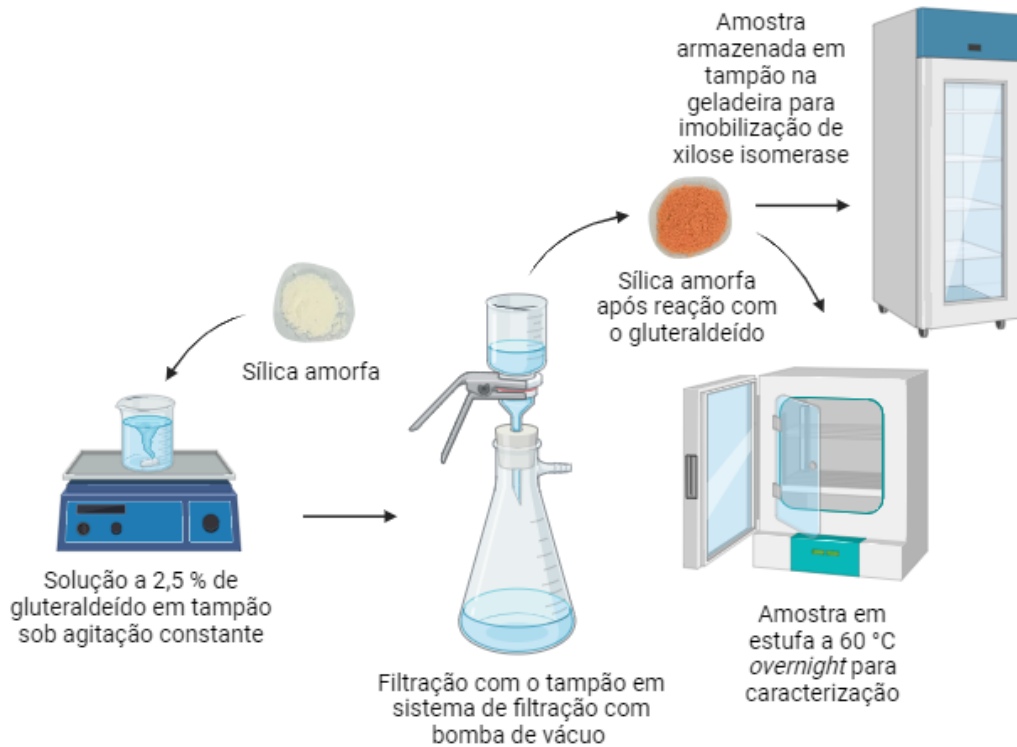
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

O sistema foi mantido em estufa a 70 °C por 24 h. Após, a sílica amorfa foi filtrada sob vácuo, enxaguada com 40 mL de tolueno, 40 mL de álcool etílico absoluto e água destilada em abundância e, finalmente, seca em estufa a 100 °C por 1 h.

Subsequentemente, a sílica amorfa foi ativada com 20 mL de solução a 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) sob agitação constante em um agitador magnético à temperatura ambiente por 1 h (Figura 11). Convém ressaltar que nesta etapa a coloração da sílica amorfa alterou para a região do laranja, o que indica a ocorrência da reação entre o glutaraldeído e os grupos amino livres providenciados pelo APTES (Hernández-Maya e Cañizares-Macías, 2018) (Figura 12).

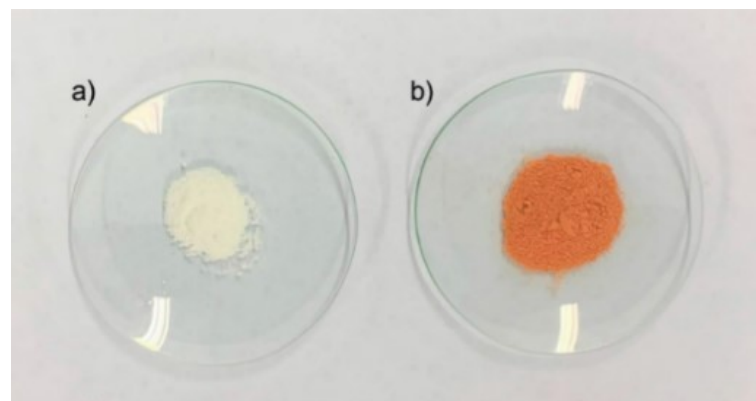
Em seguida, a mistura foi filtrada à vácuo e enxaguada três vezes com 100 mL do tampão fosfato de sódio (30 mM, pH 7,5) para remoção do glutaraldeído não ligado. Por fim, a sílica amorfa foi armazenada com tampão em microtubo na geladeira (~ 7 °C) para posterior imobilização de xilose isomerase e outra amostra separada para caracterização.

Figura 11 – Esquema para funcionalização com agente reticulante glutaraldeído



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura 12 – Sílica amorfa: a) após silanização; e, b) após ativação com agente reticulante glutaraldeído



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

3.2.2 Modificação química da lâmina de microscopia

A etapa de funcionalização da lâmina de microscopia foi realizada de modo semelhante à realizada na sílica amorfa, com algumas modificações. Primeiramente, a lâmina de microscopia foi inserida horizontalmente em placa de Petri com a parte

fosca voltada para baixo (isto serviu para localização da face em que a lâmina estava sendo funcionalizada) e imersa em 20 mL de solução piranha (razão 3:1 de ácido sulfúrico concentrado para peróxido de hidrogênio 35%) por 1 h em repouso. Esta etapa foi realizada com o intuito de remover componentes orgânicos e expor os grupos – OH presentes na sílica por um processo de hidroxilação. A lâmina foi, então, enxaguada com água destilada em abundância e seca em estufa a 110 °C por 1 h.

A montagem do sistema inerte para a lâmina de microscopia consistiu em tampar um frasco Erlenmeyer (500 mL) com rolha de borracha contendo a lâmina de microscopia com a parte fosca voltada para baixo. Em seguida, gás nitrogênio foi introduzido sob fluxo contínuo no interior do frasco por meio de uma agulha (comprimento de 100 mm) e o ar liberado por outra agulha inserida na rolha de borracha por aproximadamente 5 min (Figura 13).

Figura 13 – Sistema inerte montado para a lâmina de microscopia



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Enquanto o frasco Erlenmeyer estava sendo inertizado, a solução a 2% de APTES foi preparada como descrito previamente. A solução de APTES (20 mL) foi introduzida no Erlenmeyer com auxílio de seringa com agulha e o vapor de tolueno saturou o sistema (Figura 14).

O sistema foi colocado em estufa a 70 °C por 24 h. Na sequência, a lâmina de microscopia foi enxaguada com 40 mL de tolueno, 40 mL de álcool etílico absoluto e água destilada em abundância e, finalmente, seca em estufa a 100 °C por 1 h.

A lâmina de microscopia foi, então, ativada com 20 mL de solução a 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) e novamente colocada em repouso horizontalmente sobre placa de Petri com a parte fosca voltada para baixo por 1 h. Em seguida, a lâmina foi enxaguada três vezes com 40 mL do tampão para remoção de glutaraldeído não ligado. Por fim, foi armazenada com tampão em placa de Petri na geladeira para posterior imobilização de xilose isomerase.

Figura 14 – Erlenmeyer contendo a lâmina de microscopia com solução a 2% de APTES



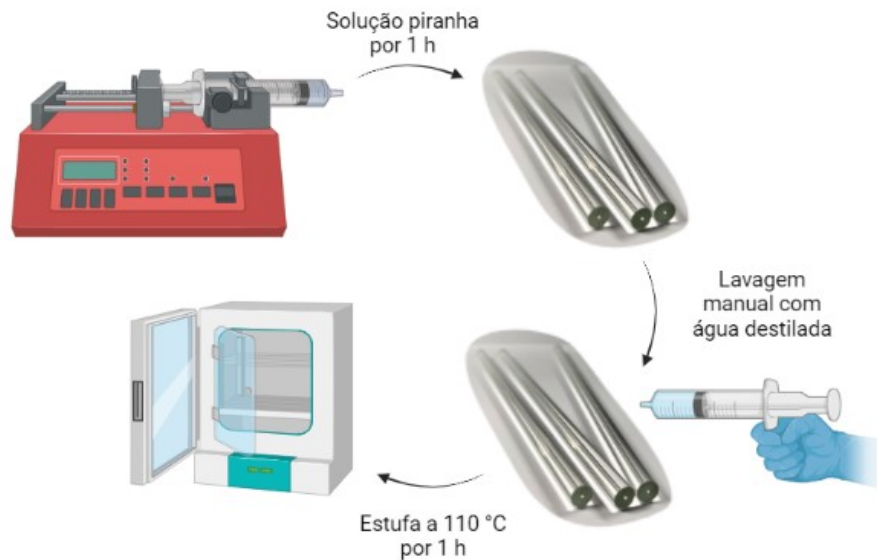
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

3.2.3 Modificação química dos microrreatores capilares

O microrreator capilar foi percolado 1 h com solução piranha sob fluxo contínuo utilizando uma bomba de seringa ($10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) e seringa conectada ao capilar com tubo de PTFE termorretrátil para hidroxilação. O excesso de ácido foi removido com água destilada. Para tanto, uma seringa foi conectada ao microrreator com o auxílio

de um tubo de silicone (4 mm × 6 mm) e água destilada foi alimentada no dispositivo até completar 100 mL e garantir o pH neutro do eluente. Após, o capilar foi seco em estufa a 110 °C por 1 h (Figura 15).

Figura 15 – Processo de hidroxilação dos microrreatores capilares



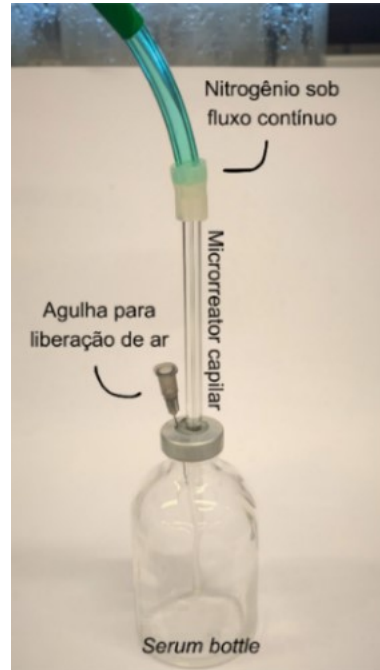
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Na sequência, a superfície interna do microrreator foi submetida à silanização com o reagente APTES em condição inerte, semelhante à mencionada anteriormente. Desta forma, inicialmente a *serum bottle* (50 mL) foi tampada e lacrada com um septo de borracha previamente perfurado com o diâmetro do capilar (0,6 mm × 4 mm). Este foi inserido na abertura do septo e, em seguida, gás nitrogênio foi introduzido sob fluxo contínuo no interior do microcanal (Figura 16) e o ar liberado por aproximadamente 5 min através de uma agulha inserida no septo.

Uma alíquota de 5 mL da solução a 2% de APTES foram adicionadas no interior do capilar conectado com tubo de silicone. O nitrogênio sob fluxo contínuo foi removido imediatamente antes da inserção da solução no microcanal a fim de evitar a entrada de ar. Assim, 5 mL da solução a 2% de APTES foram adicionados no interior da *serum bottle*, perfurando o septo de borracha com o auxílio de uma seringa e agulha a fim de manter a extremidade do capilar submersa. Essa submersão permitiu que qualquer pressão negativa formada mantivesse a solução no interior do microcanal. A agulha usada para liberar o ar foi mantida para exercer a função de

liberar vapor de tolueno saturado (Figura 17) e o sistema foi colocado em estufa a 70 °C por 24 h.

Figura 16 – Sistema inerte montado para o microrreator capilar



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura 17 – Microrreator capilar conectado à seringa com tubo de silicone após inserção da solução a 2% de APTES

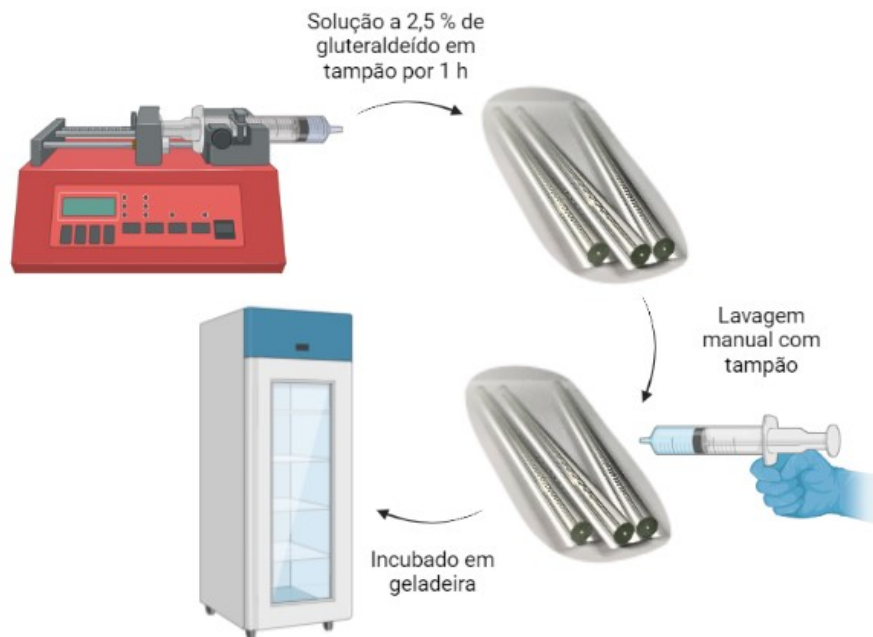


Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Por fim, o microrreator foi enxaguado com 40 mL de tolueno, 40 mL de álcool etílico absoluto e 40 mL de água destilada empregando, para tanto, uma seringa conectada ao capilar com tubo de silicone. Ao final, o microrreator foi seco em estufa a 100 °C por 1 h.

Em seguida, o microrreator foi ativado com uma solução a 2,5% de glutaraldeído (Figura 18) em tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) por 1 h utilizando bomba de seringa operando a uma vazão de $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (usando seringa e tubo de silicone conectada ao capilar). O microrreator foi, então, lavado com a solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com o auxílio de uma seringa conectada ao capilar com um tubo de silicone (4 mm \times 6 mm) até completar 40 mL e incubado com a solução tampão em geladeira até posterior uso (uma semana) utilizando Parafilm M[®] para vedar as extremidades.

Figura 18 – Funcionalização do microrreator com agente reticulante glutaraldeído



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE

Conforme comentado no tópico de fundamentação teórica (item 2.2.1), Miyamoto *et al.* (2020) utilizaram os genes de uma nova cepa do gênero *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. F-1) e realizaram a expressão heteróloga do gene *XylA2F1* (1167 bp e código de acesso GenBank: WP_070026415.1) em *Escherichia coli* para

produção de xilose isomerase que foi utilizada no presente projeto e gentilmente cedida pelo grupo de pesquisas da Dr.^a Leticia Zanphorlin. *Streptomyces* sp. *F-1* foi cultivada em meio ISP2 de acordo com Shirling e Gottlieb (1966) e isolada por Melo *et al.* (2017).

3.3.1 Imobilização de xilose isomerase na sílica amorfa

Na etapa de imobilização de xilose isomerase em sílica amorfa, 0,3 mL da solução da enzima ($0,94 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada em 0,1 g de sílica amorfa e incubada em microtubo de centrifugação em geladeira *overnight* (12 h). Após, a sílica amorfa foi filtrada à vácuo e enxaguada com 40 mL do tampão para remoção da enzima não ligada.

3.3.2 Imobilização de xilose isomerase na lâmina de microscopia

Para a imobilização na lâmina de microscopia, esta foi colocada na posição horizontal com a parte fosca voltada para baixo em placa de Petri e 0,2 mL da solução contendo xilose isomerase ($2,83 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi espalhada pela superfície. A placa de Petri contendo a lâmina com a enzima foi, então, tampada e armazenada em geladeira *overnight* (12 h). Após, a lâmina foi enxaguada com 40 mL do tampão para remoção da enzima não ligada. O mesmo procedimento foi realizado para a lâmina de microscopia não funcionalizada (controle) para posterior caracterização por análise de microscopia confocal a laser (CLSM) e comparação com a lâmina funcionalizada.

3.3.3 Imobilização de xilose isomerase nos microrreatores capilares

A imobilização da enzima nos microrreatores capilares funcionalizados foi efetuada logo antes do uso para os ensaios de isomerização para evitar a perda de atividade da enzima imobilizada. A solução de xilose isomerase era removida do ultrafreezer ($-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e descongelada em temperatura ambiente para a imobilização em cada microrreator. A atividade das amostras de xilose isomerase foi monitorada ao longo do tempo no ultrafreezer ($-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$) com o objetivo de retificar a estabilidade da enzima. Isso foi feito para garantir que a atividade da enzima seria a mesma

durante os experimentos planejados, que foram conduzidos em um período de um a dois meses.

Para a imobilização de xilose isomerase no microrreator, a solução de enzima foi adicionada no interior do microcanal utilizando uma seringa conectada com tubo de silicone e incubado em geladeira *overnight* (12 h), vedando as extremidades do microrreator com Parafilm M®.

Após, o microrreator foi lavado empregando o tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) até completar 40 mL. Por fim, o microrreator contendo a enzima imobilizada foi utilizado para a reação de isomerização de frutose em glicose ou xilose em xilulose.

Xilose isomerase imobilizada foi quantificada medindo-se a concentração da enzima na solução de acoplamento antes e após a incubação no microrreator pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A quantidade de enzima imobilizada foi calculada pela diferença em conformidade com a metodologia proposta por Wei *et al.* (2018).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS DE SÍLICA

A técnica de caracterização por FTIR foi realizada a fim de identificar a presença de grupos funcionais característicos das reações da sílica com o APTES, o gluteraldeído e com xilose isomerase. A sílica amorfa atuou como material à base de sílica para representar o microrreator capilar nas análises de FTIR, uma vez que a análise de FTIR do microrreator moído (em forma de pó) apresentou muitas interferências na leitura.

Como já mencionado, em cada estágio da reação foram coletadas alíquotas de: i) sílica amorfa; ii) sílica amorfa silanizada com APTES; iii) sílica amorfa com APTES e ativada com gluteraldeído e iv) sílica amorfa com APTES, ativada com gluteraldeído e ligada com xilose isomerase. Além disto, a análise de FTIR da enzima livre solubilizada em tampão (solução a 20 mM de fosfato de sódio e solução a 150 mM de NaCl a pH 7,4) também foi realizada (ANUAR *et al.*, 2013). Os espectros foram coletados no intervalo de 4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1} utilizando o espectrofotômetro AGILENT TECHNOLOGIES – Cary 600 Series FTIR *Spectrometer* disponível na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As técnicas de caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) foram empregadas para o estudo da morfologia da superfície interna do microrreator funcionalizado e para avaliar a presença da enzima imobilizada. Para análise, o microrreator foi cortado transversalmente para expor as superfícies internas do microcanal. Os ensaios de MEV e MEV-FEG foram realizados no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) usando um microscópio eletrônico de alta resolução da marca Jeol, modelo JSM – 6701 F, com tensão aplicada de 10 kV.

Para visualizar e verificar a distribuição de xilose isomerase imobilizada na superfície da sílica, CLSM foi realizada sobre a superfície da lâmina de microscopia com e sem a enzima imobilizada. Para tanto, FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (Molecular Probes®, EUA) foi utilizado como indicador de proteína e a verificação da fluorescência foi realizada usando o equipamento DMI6000 B (Leica®) com uma lente objetiva de 63 vezes com processamento de imagem no *software* Leica Application Suite X (LAS X) e faixa de comprimento de onda de excitação $^{450/610}$ conforme descrito em Deng *et al.* (2015).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Atividade de xilose isomerase

A atividade da enzima foi determinada seguindo o protocolo descrito por Miyamoto *et al.* (2020) medindo-se a velocidade inicial de isomerização de frutose em glicose e/ou xilose em xilulose em, no mínimo, duplicata. Uma unidade de atividade enzimática (definida como 1 U) correspondeu à quantidade de xilose isomerase que catalisou a conversão de 1 μmol de frutose/xilose em glicose/xilulose por 1 min nas condições de ensaio descritas a seguir e calculada de acordo com a Equação (16):

$$\text{Atividade (U}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{\frac{[P]}{t}}{MM_{\text{glic}}} \quad (16)$$

onde $[P]$ é o produto formado, glicose ou xilose ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), t é o tempo da reação (10 min) e MM_{glic} é a massa molecular de glicose ($\text{g}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$). Para o cálculo da atividade em fluxo contínuo (no microrreator) o t considerado foi o tempo de residência (t_r):

$$t_r = \frac{V_P}{Q} \quad (17)$$

onde V_P é o volume de produto que deixa o microrreator (μL) e Q a vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$).

Uma solução a 200 mM de frutose ou a 20 mM de xilose foi preparada com tampão de fosfato de sódio (30 mM em pH 7,5) e 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A reação foi realizada por 10 min a 60 °C, interrompida por aquecimento a 99 °C por 1 min e quantificada com kit Glicose-PP da Analisa[®], para formação de glicose, e com o UFLC para a formação de xilulose. A concentração de enzima usada na solução foi de 0,009 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o volume final da reação de 100 μL (MIYAMOTO *et al.*, 2020).

3.5.2 Medição da concentração de xilose isomerase

A quantificação de proteínas totais para a determinação da concentração de xilose isomerase nos experimentos com a enzima livre e a determinação da quantidade de enzima imobilizada nos microrreatores foi realizada pelo método de Bradford em, no mínimo, duplicata (BRADFORD, 1976). Este método se baseia na formação de um complexo estável entre o corante azul de *comassie brilliant blue* G250 e a proteína, resultando em uma mudança na coloração da solução de castanho para tons de azul (quanto mais intenso, maior a presença de proteína), variação medida por espectrofotometria a 595 nm. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão para a curva de calibração.

3.6 EXPERIMENTOS COM XILOSE ISOMERASE LIVRE (EM MODO BATELADA)

3.6.1 Resistência térmica de xilose isomerase livre a 60 °C

Ensaio de atividade da enzima livre foram realizados com concentração de frutose de 200 mM em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MIYAMOTO *et al.*, 2020). Os ensaios foram realizados com a

enzima mantida a 60 °C durante 12 h para avaliar o decréscimo de atividade da enzima ao longo do tempo como parâmetro para a enzima imobilizada.

3.6.2 Ensaio de isomerização de xilose isomerase livre usando frutose como substrato

Ensaio de atividade de frutose em glicose por xilose isomerase livre foram realizados com concentrações de frutose de 80 mM – 2,5 M em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como parâmetro para a enzima imobilizada (MIYAMOTO *et al.*, 2020).

3.6.3 Ensaio de isomerização de xilose isomerase livre usando xilose como substrato

Ensaio de atividade de xilose em xilulose por xilose isomerase livre foram realizados com concentrações de xilose de 20 mM – 1 M em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MIYAMOTO *et al.*, 2020), como parâmetro para a enzima imobilizada.

3.7 EXPERIMENTOS COM XILOSE ISOMERASE IMOBILIZADA (EM MODO CONTÍNUO)

3.7.1 Resistência térmica de xilose isomerase imobilizada a 60°C

Ensaio de resistência térmica da enzima imobilizada foi realizado em fluxo contínuo a 60 °C usando vazão de $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e concentração de frutose de 200 mM em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O ensaio foi realizado durante 12 h para avaliar o decréscimo de atividade da enzima ao longo do tempo a 60 °C, coletando-se amostras na saída do microrreator.

Convém salientar que este ensaio foi realizado até 12 h visto que foi o tempo necessário para coletar todos os dados cinéticos utilizando a enzima imobilizada no microrreator. Desta forma, foi possível avaliar se a atividade da enzima decresceria

neste intervalo de tempo e não influenciaria nos resultados obtidos (itens 4.3.3 e 4.3.4).

3.7.2 Ensaios de isomerização de xilose isomerase imobilizada usando frutose como substrato

Ensaios de isomerização de frutose em glicose por xilose isomerase imobilizada no microrreator foram realizados em fluxo contínuo a 60 °C usando vazões de 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e concentrações de frutose de 80 mM – 2,5 M em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ baseado nos experimentos de Miyamoto *et al.* (2020) com a enzima livre.

3.7.3 Ensaios de isomerização de xilose isomerase imobilizada usando xilose como substrato

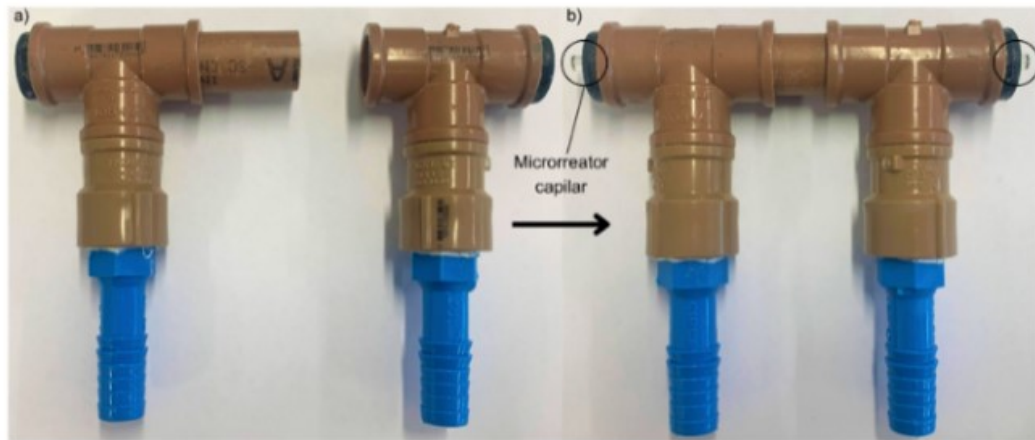
Ensaios de isomerização de xilose em xilulose por xilose isomerase imobilizada no microrreator foram realizados em fluxo contínuo a 60 °C empregando uma vazão de 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e concentrações de xilose de 20 mM – 1 M em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ baseado nos experimentos de Miyamoto *et al.* (2020) com a enzima livre.

3.7.4 Set-up para ensaios com o microrreator

Um protótipo contendo um sistema de troca térmica com tubos de PVC foi projetado para os ensaios em fluxo contínuo a 60 °C utilizando o microrreator capilar.

O trocador de calor foi construído usando tubos e conexões de PVC (20 mm × 1/2") e montado de modo a permitir que os microrreatores pudessem ser encaixados no dispositivo. O encaixe do microrreator foi realizado por meio de um cilindro de borracha 5/8" perfurada com o diâmetro do capilar e coladas aos tubos de PVC.

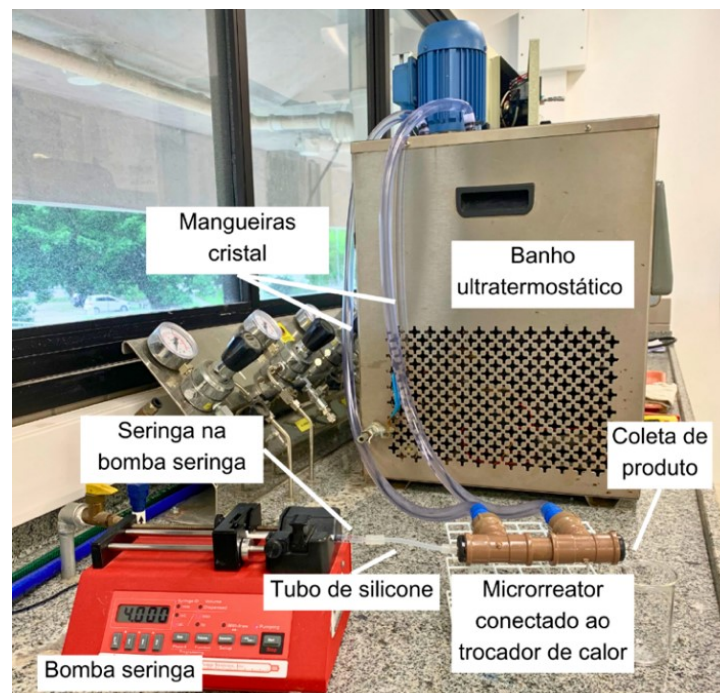
Figura 19 – Sistema de troca térmica: a) trocador de calor desmontado; b) microrreator acoplado ao trocador de calor



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

O microrreator acoplado ao trocador de calor permaneceu com as extremidades para fora da ponteira (em torno de 0,5 cm) para que um extremo se conectasse à seringa com tubo de silicone e à bomba de seringa e o outro lado usado para as coletas de produto. Nas saídas do trocador de calor foram empregadas conexões para mangueira de 1/2" e estas conectadas a mangueiras cristal (1/2" × 1,5 mm) acopladas na saída e na entrada de um circulador de um banho ultratermostático.

Figura 20 – Set-up para ensaios com o microrreator



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

3.8 ANÁLISE CINÉTICA DOS DADOS DE ISOMERIZAÇÃO

3.8.2 Parâmetros cinéticos da catálise de xilose isomerase usando frutose como substrato

Os dados de $v_0 \times [S]$ obtidos nos experimentos de isomerização com a enzima livre e imobilizada usando frutose como substrato foram avaliados a partir do gráfico de Lineweaver-Burk (Equação 8). Assim, por meio do ajuste linear de $1/v_0 \times 1/[S]$ foi possível determinar K_m e V_m , onde o valor que interceptou o eixo y correspondeu a $1/V_m$ e o valor que interceptou o eixo x correspondeu a $-1/K_m$. E, por conseguinte, o k_{cat} e a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) foram calculados pela (Equação 14).

3.8.3 Parâmetros cinéticos da catálise de xilose isomerase usando xilose como substrato

Os dados de $v_0 \times [S]$ obtidos nos experimentos de isomerização com a enzima livre e imobilizada usando xilose como substrato foram avaliados a partir do modelo de Hanes (Equação 9). Este modelo apresentou melhor ajuste aos dados experimentais obtidos utilizando xilose como substrato que o modelo de Lineweaver-Burk. Assim, por meio do ajuste linear aos valores de $[S]/v_0 \times [S]$, foi possível determinar K_m e V_m , onde o valor que interceptou o eixo y correspondeu a K_m/V_m e o valor que interceptou o eixo x correspondeu a $-K_m$. O coeficiente angular da reta foi representado por $1/V_m$. Finalmente, k_{cat} e a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) foram determinados por meio da Equação (14).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS DE SÍLICA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE

4.1.1 Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

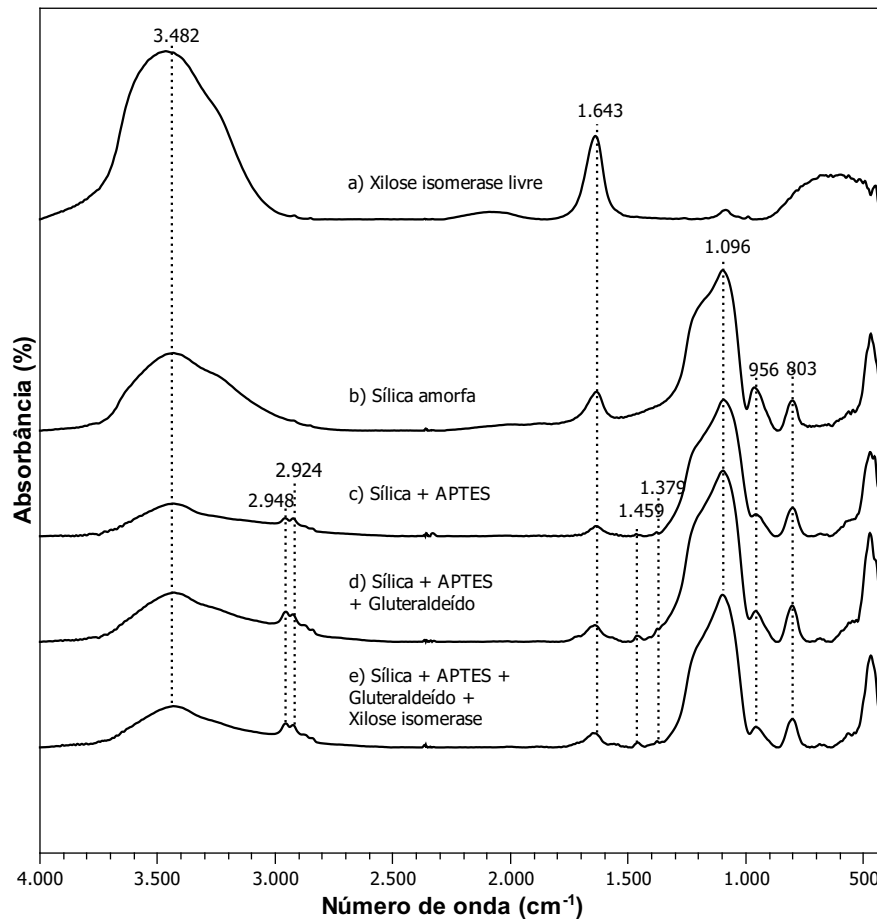
Conforme citado, existe a necessidade de modificar a estrutura química das superfícies dos materiais de sílica para garantir a imobilização de enzimas. Neste sentido, testes foram realizados com diferentes materiais e metodologias para este propósito. Os resultados de caracterização por FTIR da modificação química da sílica amorfa estão apresentados na Figura 21. Nesta figura também são apresentados os resultados da imobilização de xilose isomerase e da enzima livre em solução, além da sílica amorfa sem modificação química (controle) visando sua comparação.

Na Figura 21 os picos nas regiões de 1096 cm^{-1} e 803 cm^{-1} correspondem a absorção para ligações Si – O – Si simétricas e assimétricas, respectivamente. O pico em 956 cm^{-1} pode ser atribuído às vibrações Si – H ou Si – O(H) (TUAN *et al.*, 2013).

Nesta mesma figura é possível observar que as amostras de sílica possuem a banda característica em 1643 cm^{-1} – 1633 cm^{-1} em comum com a enzima livre em solução. Esta faixa da banda é característica da vibração C = N e pode estar associada a ligação do gluteraldeído com o APTES, com um pequeno desvio de 1633 cm^{-1} para 1643 cm^{-1} a partir da amostra de sílica amorfa silanizada e funcionalizada com agente reticulante gluteraldeído (Figura 21d) e, no caso da amostra de xilose isomerase livre em solução (Figura 21a), aos grupos amida de xilose isomerase. Entretanto, esta banda está presente na amostra de sílica amorfa e pode estar associada a algum ruído na leitura (TUAN *et al.*, 2013). Observa-se ainda que pequenas bandas em 1459 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} (Figura 21c, 21d e 21e) estão relacionadas as vibrações de CH_3 do grupo etóxi ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$) a partir da silanização da sílica amorfa. Bandas em 2948 cm^{-1} e 2924 cm^{-1} associadas a vibrações C – H de grupos propil ancorado também podem ser visualizadas (KARADE *et al.*, 2021; TUAN *et al.*, 2013). A intensidade dessas bandas aumenta com a adição de gluteraldeído na amostra de sílica amorfa silanizada e funcionalizada com agente reticulante

gluteraldeído (Figura 21d), o que pode estar relacionado com o surgimento da ligação C = O (TUAN *et al.*, 2013).

Figura 21 – Análise de FTIR das amostras de cada etapa da modificação química da sílica amorfa até imobilização de xilose isomerase, e da enzima livre



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

As bandas observadas na faixa de 1643 cm⁻¹ a 1379 cm⁻¹ podem estar relacionadas ao estiramento e flexão de NH₂ junto ao grupo C – N. A região da banda 3482 cm⁻¹ (3700 cm⁻¹ a 3050 cm⁻¹) está relacionada a absorção de água (estiramentos O – H) (KARADE *et al.*, 2021; TUAN *et al.*, 2013).

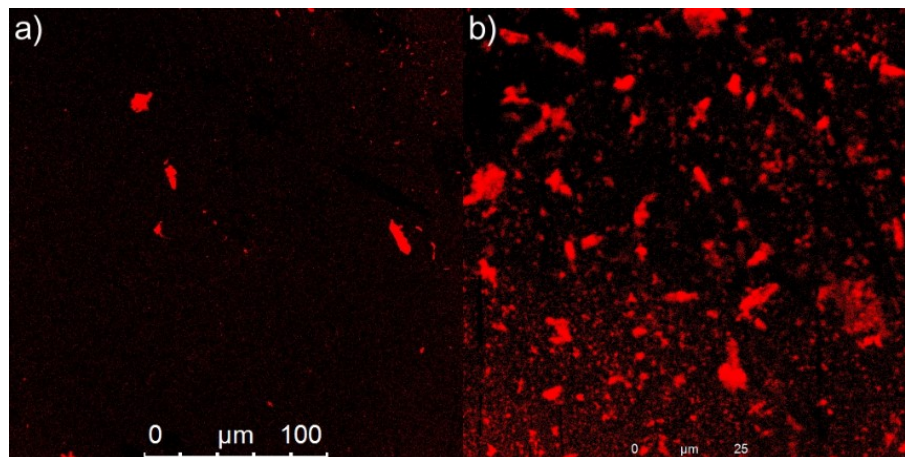
As bandas representadas nas Figuras 21d e 21e não demonstraram diferenças significativas entre si. Isso sugere a possibilidade de que o acoplamento da enzima no suporte tenha sido substancialmente baixa ou não tenha de fato ocorrido, sendo necessária a realização de análises adicionais a fim de verificar esta situação.

4.1.2 Análise de microscopia confocal a laser (CLSM)

A técnica de CLSM foi utilizada para verificar a configuração de xilose isomerase absorvida na superfície da lâmina de microscopia modificada quimicamente e submetida à imobilização da enzima (Figura 22).

Na Figura 22 é possível observar o indicador de proteína ligado às enzimas representado pela cor vermelha. Para o caso sem modificação química e submetida à imobilização da enzima (Figura 22a) a ampliação em 100 μm possibilitou a observação de pontos vermelhos que podem ser de algum resíduo orgânico. Para a lâmina modificada quimicamente e submetida à imobilização de xilose isomerase (Figura 22b), pode-se verificar aglomerados proteicos. Esta configuração em aglomerados possivelmente tomou forma durante a etapa de silanização e será abordada de maneira mais aprofundada no próximo item (4.1.3) que trata da caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Figura 22 – Imagem de CLSM da lâmina de microscopia: a) sem modificação química e submetida à imobilização da enzima; b) modificada quimicamente e submetida à imobilização da enzima



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de MEV (Figura 23) detalham a morfologia do interior do microrreator capilar com e sem modificação química e com a imobilização de xilose isomerase. É possível identificar diferenças quanto a rugosidade quando se compara

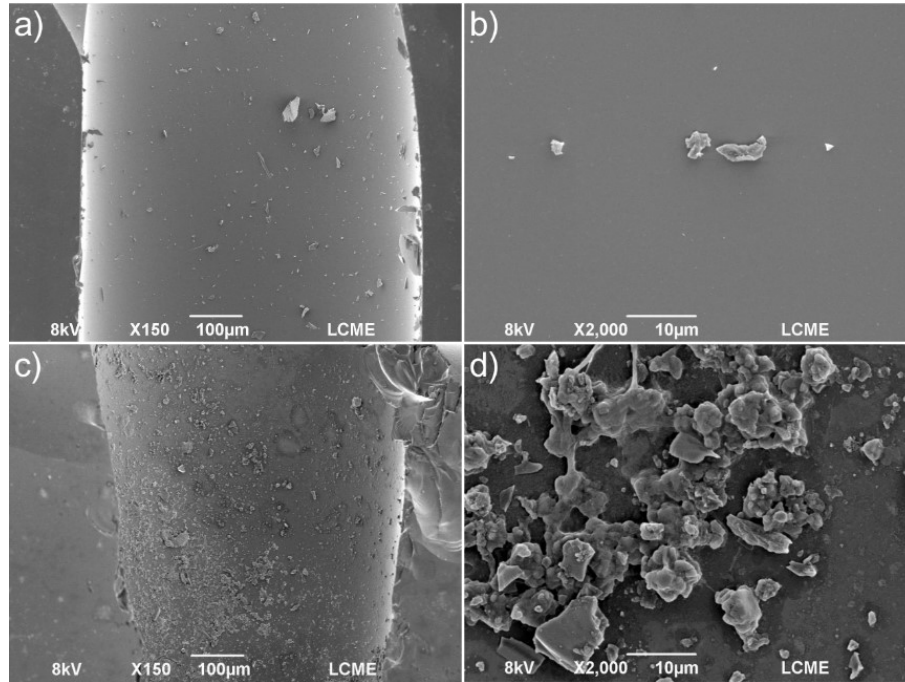
o microcanal não funcionalizado (Figura 23a e 23b) com o microcanal funcionalizado e com a enzima imobilizada (Figura 23c e 23d).

Existem inúmeros estudos que visam aprofundar a compreensão das rotas da reação de silanização e a relação delas com a morfologia do filme de silano, os quais são altamente dependentes das condições da reação. Estes investigaram o impacto no grau de silanização, a influência da acessibilidade aos grupos reativos ($-NH_2$), a escolha do solvente, a temperatura, o tempo de reação e a presença de água. O objetivo destes trabalhos foi desenvolver um método de deposição de silano mais eficiente e com potencial para aplicações mais eficazes (CHANG *et al.*, 2022; HOWARTER; YOUNGBLOOD, 2006; KRASNOSLOBODTSEV; SMIRNOV, 2002; LIU *et al.*, 2013; MIRANDA; MARTÍNEZ; DE BEULE, 2020; PASTERNAK; AMY; CHABAL, 2008; WANG; VAUGHN, 2008; WHITE; TRIPP, 2000; ZHANG *et al.*, 2016). Em termos gerais, os estudos indicaram que a silanização é favorecida em temperaturas que variam entre 70 °C e 75 °C e com a mínima presença de água (embora haja algumas contradições a esse respeito). Para alcançar essas condições, é necessário criar um ambiente inerte utilizando nitrogênio e realizar uma etapa de aquecimento prévio do material (e também uma posterior, mas com o objetivo de converter ligações de hidrogênio em ligações covalentes). Além disso, é recomendado um tempo prolongado de reação (até 24 h para saturação) e uma concentração de APTES de 33% e/ou 2% em tolueno ou em uma mistura de tolueno e metanol. Todas essas condições são necessárias para permitir a formação de um filme de silano homogêneo, com baixa rugosidade (parâmetro associado à formação de multicamadas e que dificultam a acessibilidade aos grupos reativos $-NH_2$) e com alta concentração de grupos silanóis. Estes aspectos foram considerados neste trabalho, conforme pode ser constatado na metodologia adotada para modificação química dos materiais à base de sílica.

Entretanto, é provável que a metodologia usada não tenha resultado na formação de um filme de silano homogêneo, mas em uma baixa acessibilidade do agente reticulante glutaraldeído, seguido da enzima xilose isomerase, aos grupos reativos $-NH_2$. Esse fato pode ser observado nas imagens obtidas por CLSM e MEV (Figuras 22b, e 23c e 23d, respectivamente) que indicam a presença de aglomerados ou crescimento dos grupos silanóis em multicamadas (no caso da análise CLSM, a presença das enzimas ligadas aos grupos silanóis na configuração de aglomerados). Essa observação é destacada na Figura 24 e estão circuladas na imagem. A análise

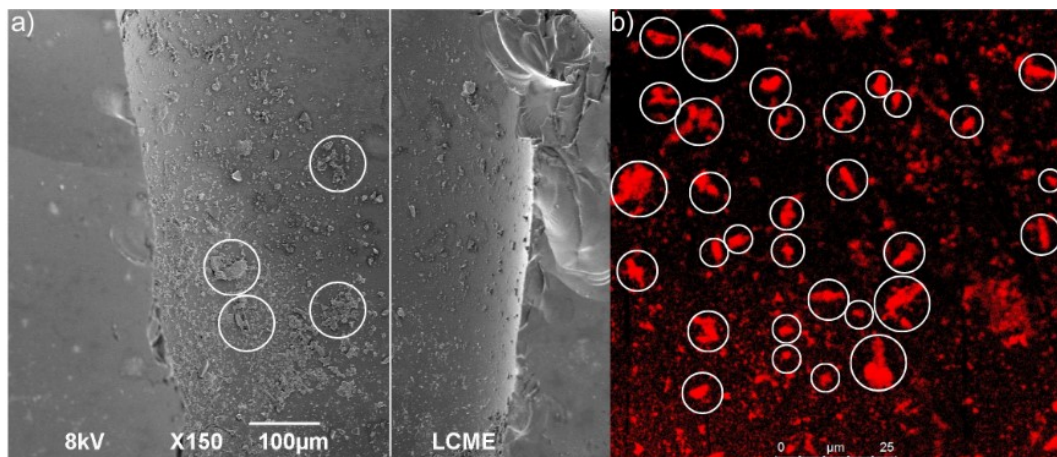
por MEV revelou até mesmo uma diferença evidente entre um lado mais "grafitado" (esquerdo) que o outro (direito), separados por uma linha na imagem.

Figura 23 – Imagens de MEV no interior do microrreator: a) e b) sem modificação química; c) e d) com modificação química e com a enzima imobilizada



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura 24 – a) Imagens de MEV do interior do microrreator com xilose isomerase imobilizada; b) imagens de CLSM da lâmina de microscopia modificada quimicamente e com a enzima imobilizada.

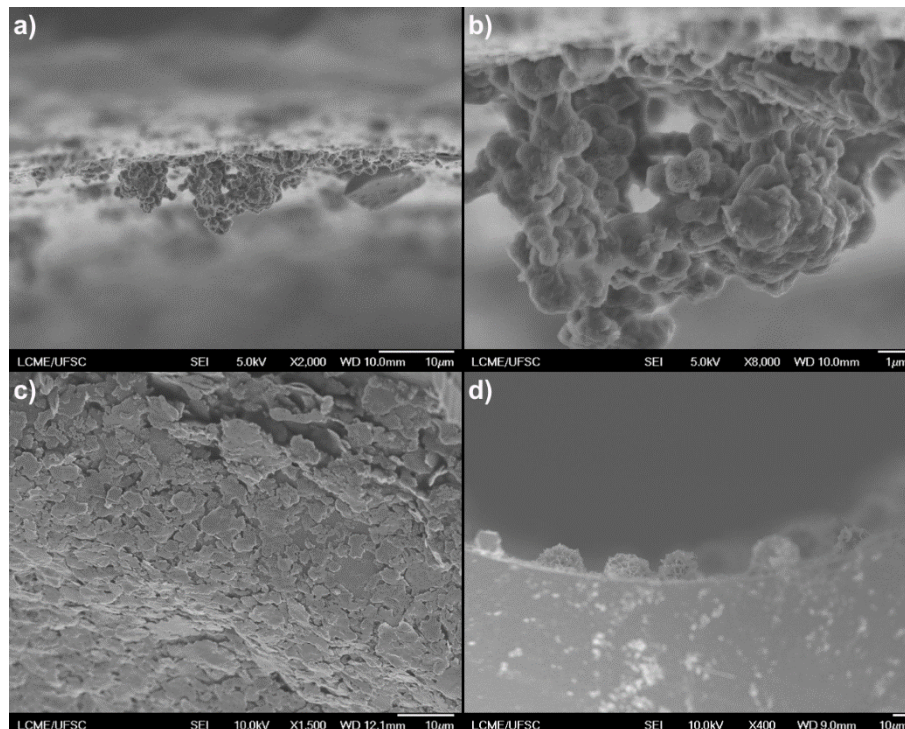


Fonte: elaborado pelo autor (2023)

A análise por MEV-FEG foi realizada em um ensaio utilizando 10% de APTES em tolueno durante 12 h à temperatura ambiente, sem inertização e sob fluxo contínuo. Nessa análise também foi observada a formação de aglomerados, conforme ilustrado na Figura 25.

Figura 25 – Análise de MEV-FEG do interior do microrreator funcionalizado com 10% de APTES em tolueno e com enzima imobilizada com diferentes ampliações:

a) $\times 2000$; b) $\times 8000$; c) $\times 1500$; e d) $\times 400$.

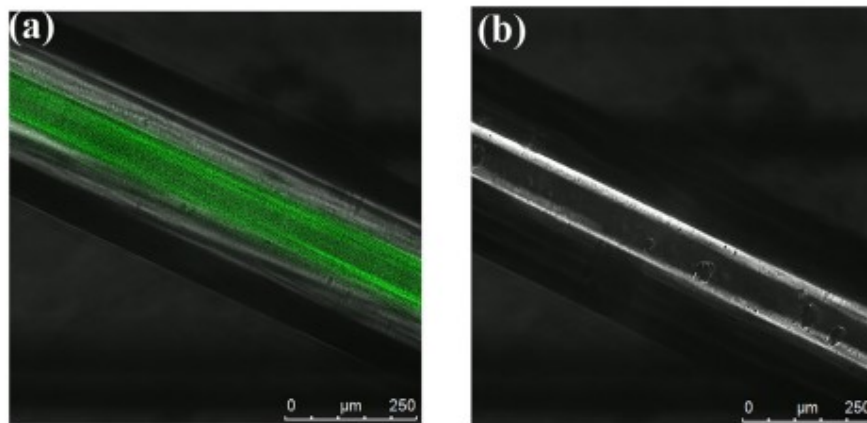


Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Com base nas caracterizações e na análise das imagens obtidas por CLSM e MEV (e MEV-FEG) utilizando a metodologia empregada neste trabalho, sugere-se que a montagem do sistema inerte não tenha sido efetiva para a reação de silanização. Especula-se que a etapa de silanização possa ter contribuído para a falta de eficiência na imobilização da enzima devido a formação de multicamadas ou aglomerados de silanóis. Esperava-se a formação de um filme homogêneo de grupos silanóis, o qual possibilitaria a imobilização uniforme das enzimas em maior quantidade e sem comprometer a atividade por obstrução dos sítios ativos (como ocorre com enzimas aglomeradas). A formação desses filmes homogêneos pode ser encontrada na literatura em pesquisas como de Wu *et al.* (2018) e Miyazaki *et al.* (2003).

No trabalho de Wu *et al.* (2018), uma metodologia semelhante à utilizada neste estudo foi empregada para a imobilização de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita simples e resultou em uma imagem de CLSM com uma aparência uniforme da solução de ácidos nucleicos imobilizados (Figura 26a). Em resumo, após lavagem da parede interna de um capilar de sílica com solução básica e ácida, seguida pelo tratamento químico com uma solução de 10% de APTES em tolueno por 4 h a 25 °C e posterior funcionalização com gluteraldeído e poli(amidoamina) (PAMAM) para a imobilização de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita simples, foi possível visualizar o DNA.

Figura 26 – Imagens de CLSM: a) capilar modificado quimicamente e com NH₂ – ADN imobilizado; b) capilar sem modificação química e sem NH₂ – DNA imobilizado.

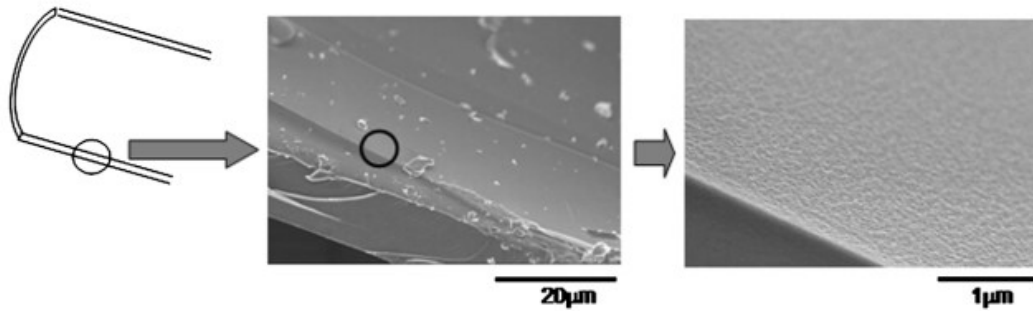


Fonte: WU *et al.* (2018)

A metodologia aplicada para a imobilização de uma enzima serino protease no trabalho de Miyazaki *et al.* (2003), também semelhante à empregada neste estudo, apresentou um resultado de MEV com aparência mais homogênea. Em resumo, após a lavagem da parede interna de um capilar de sílica com solução ácida, seguida pelo tratamento químico com uma solução de 3% de APTES e metiltrietoxissilano (MTES) em 95% etanol em água por 1 h a 25 °C, foi obtida a Figura 27 por MEV.

Os dois trabalhos citados anteriormente não forneceram valores da quantidade de enzimas imobilizadas, tampouco das soluções proteicas utilizadas. No entanto, diversos outros estudos que empregaram metodologias semelhantes obtiveram sucesso na imobilização (ANUAR *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-MAYA; CAÑIZARES-MACÍAS, 2018; WEI *et al.*, 2018).

Figura 27 – Imagens de MEV da modificação química da superfície interna do capilar



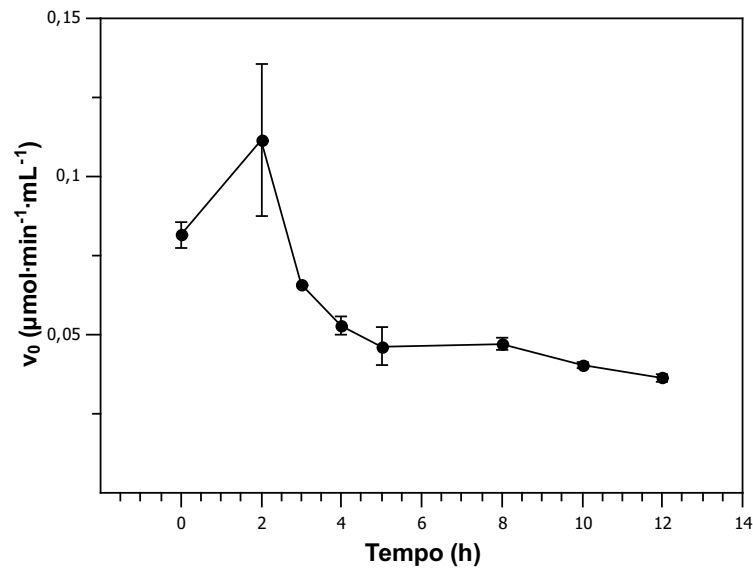
Fonte: MIYAZAKI *et al.* (2003)

4.2 AVALIAÇÃO CATALÍTICA DE XILOSE ISOMERASE (XYLA2F1) LIVRE

4.2.1 Resistência térmica de xilose isomerase a 60 °C (usando frutose como substrato)

Primeiramente, xilose isomerase ($0,082 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi mantida a 60 °C em banho termostático durante um período de 12 h e alíquotas foram retiradas para a determinação da atividade neste período. A atividade da enzima foi determinada no mesmo sistema a 60 °C utilizando 200 mM de frutose em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ usando $0,009 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de enzima. Na Tabela A1 (Apêndice) a resistência térmica de xilose isomerase é apresentada em função do tempo com a média e o desvio padrão dos valores obtidos em duplicata e na Figura 28 a representação gráfica desses dados da resistência térmica em função do tempo.

Figura 28 – Resistência térmica de xilose isomerase a 60 °C em função do tempo



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

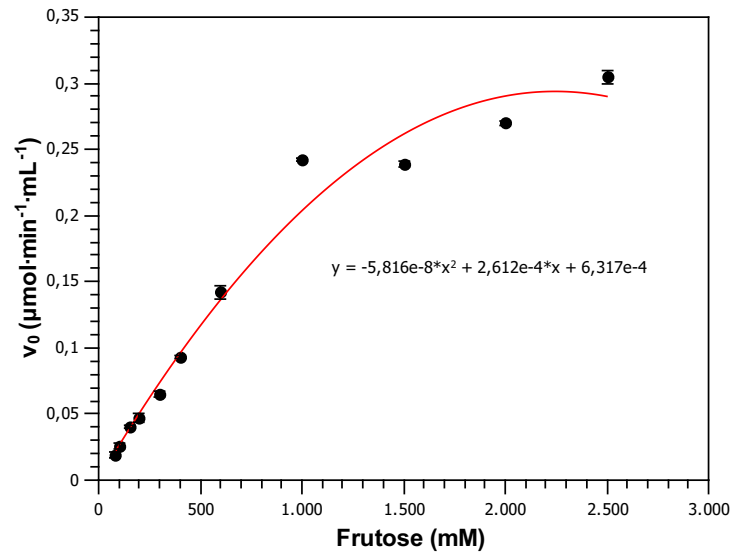
Este ensaio foi realizado com o propósito de comparação com os resultados obtidos em ensaio posterior conduzido em modo contínuo com xilose isomerase imobilizada. Pode-se constatar que a resistência térmica da enzima livre em solução apresentou um decréscimo de 55,782% entre o tempo inicial (0 h) e final (12 h). O objetivo deste experimento será melhor explicado no item 4.3.2. Foi considerado que a resistência térmica se preservou utilizando posteriormente xilose como substrato e o mesmo teste não foi conduzido com este substrato.

4.2.2 Determinação dos parâmetros cinéticos de xilose isomerase livre usando frutose como substrato

A enzima xilose isomerase ($0,047 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi submetida a ensaios de atividade em banho termostático a 60 °C utilizando na solução diferentes concentrações de frutose (80 mM – 2500 mM) em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ usando $0,009 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de xilose isomerase.

Na Tabela A2 a média e o desvio padrão dos valores de atividade obtidos em triplicata são apresentados. Na Figura 29 pode-se observar o comportamento da velocidade inicial de xilose isomerase em função da concentração de substrato, a qual obedece a cinética de Michaelis-Menten.

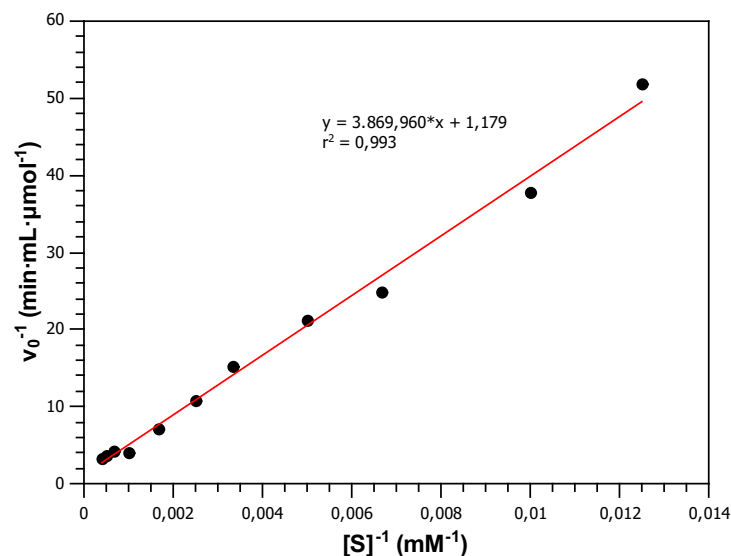
Figura 29 – Velocidade inicial da enzima em função da concentração de frutose



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

A Figura 29 apresenta o ajuste aos dados experimentais empregando o modelo de Michaelis-Menten. A partir do diagrama de Lineweaver-Burk, os parâmetros cinéticos K_m e V_m foram determinados. Neste, o inverso das velocidades de reação inicial (v_0^{-1}) são plotadas em função do inverso das concentrações iniciais de frutose (Figura 30).

Figura 30 – Diagrama de Lineweaver-Burk de xilose isomerase usando frutose como substrato



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Neste estudo, os valores de K_m e V_m obtidos foram, respectivamente, 3,282 M e 0,848 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou 84,851 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. É possível perceber que o ensaio experimental não cobriu o valor de K_m igual a 3,282 M em concentração de substrato utilizado, sendo necessário cobrir este valor para estimar parâmetros cinéticos mais realísticos, no entanto, para fim de comparação com a performance de xilose isomerase imobilizada, a faixa de concentração foi mantida.

O valor de k_{cat} foi calculado por meio da Equação (14) usando a concentração total de enzima ($[E_n]_t$) e V_m . A expressão representa o número de moléculas de substrato convertidas em produto por molécula de enzima por unidade de tempo (s^{-1}). Para este estudo, o valor obtido para k_{cat} foi de 67,400 s^{-1} . Com base neste valor, a eficiência catalítica foi facilmente obtida pela relação k_{cat}/K_m . Neste estudo em particular obteve-se um valor de 0,021 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$.

A enzima utilizada neste estudo foi desenvolvida pelo grupo de trabalho coordenado pela pesquisadora Dr.^a Letícia Zanphorlin. Trata-se de uma nova xilose isomerase (*XylA2F1*) que foi previamente estudada por Miyamoto *et al.* (2020). O estudo prévio não foi realizado com o substrato frutose, somente xilose. Por se tratar de um estudo inédito com esta enzima, não existe a possibilidade de comparação dos parâmetros obtidos para esta enzima em específico. Entretanto, no estudo de Rengasamy *et al.* (2020) com xilose isomerase livre de *Streptomyces lividans* RSU26, os valores de K_m e V_m para a conversão de frutose em glicose (a 65 °C e pH 7,5 com combinação de íons 10 mM de Mg^{2+} e 1 mM de Co^{2+}) foram, respectivamente, 0,488 M e 2,544 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. O valor obtido para k_{cat} foi de 12,720 s^{-1} e a relação k_{cat}/K_m foi de 0,260 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$.

4.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de xilose isomerase usando xilose como substrato

Xilose isomerase (0,258 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi submetida a ensaios de atividade em banho termostático a 60 °C utilizando diferentes concentrações de xilose (20 mM – 1000 mM) em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ usando 0,009 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ da enzima.

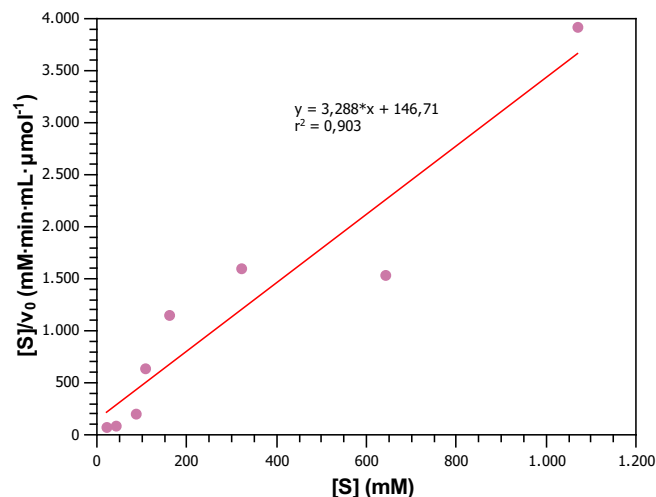
Na Tabela A3 e Figura A1 estão apresentadas a média e o desvio padrão dos valores obtidos em duplicata e o comportamento da velocidade inicial de xilose

isomerase em função da concentração de substrato. Observa-se claramente na Figura A1 que a curva obtida não descreve adequadamente o comportamento característico de Michaelis-Menten simplificado, portanto, optou-se por avaliar a cinética obtida baseando-se no modelo de Hanes que apresentou comportamento mais linear, ao invés do modelo de Lineweaver-Burk.

Como a variável independente S está presente em ambos os lados da equação, utilizando o modelo de Hanes é inevitável que haja certo grau de correlação em um gráfico S/v_0 em função de S . Desse modo, o modelo reduz o efeito de erros associados (comparado ao modelo de Lineweaver-Burk).

A Equação (9) descreve o modelo de Hanes, o que permite determinar os parâmetros cinéticos K_m e V_m a partir da Figura 31.

Figura 31 – Modelo de Hanes aplicado usando xilose como substrato



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Para este estudo, os valores de K_m e V_m obtidos foram, respectivamente, 0,045 M e 0,307 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$. O valor de k_{cat} da enzima foi calculado através da Equação (14) usando a concentração total de enzima ($[E_n]_t$) e V_m . A expressão representa o número de moléculas de substrato convertidas em produto por molécula de enzima por unidade de tempo (s^{-1}). Para este estudo, o valor obtido para k_{cat} foi de 24,162 s^{-1} . Com base neste valor, a eficiência catalítica foi facilmente obtida pela relação k_{cat}/K_m . Neste estudo em particular obteve-se um valor de 0,548 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$.

No trabalho de Miyamoto *et al.* (2020) os valores de K_m e V_m para conversão de xilose em xilulose (a 75 °C e pH 9,5 com combinação de íons 10 mM de Mg^{2+} e 10

mM de Co^{2+}) foram, respectivamente, 0,049 M e $0,131 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. O valor obtido para k_{cat} foi de $0,010 \text{ s}^{-1}$ e a relação k_{cat}/K_m obtida foi de $0,210 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$.

4.3 PARÂMETROS CINÉTICOS DE XILOSE ISOMERASE (XYLA2F1) IMOBILIZADA EM MICRORREATOR

4.3.1 Imobilização de xilose isomerase no microrreator

A concentração de $4,496 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de xilose isomerase com atividade de $0,064 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ medida usando 100 mM de frutose foi submetida a imobilização *overnight* (12 h) no interior do microrreator capilar sob refrigeração. A solução de enzima incubada, após a imobilização, foi removida e a concentração e atividade foram determinadas com o intuito de verificar se tais valores sofreram alteração após imobilização, ou seja, a quantificação de proteínas totais foi realizada visando a determinação da concentração de xilose isomerase pelo método de Bradford na solução antes e após a etapa de imobilização.

Apesar de repetidas tentativas não foi possível determinar a quantidade de xilose isomerase imobilizada, muito provavelmente por se tratar de um valor abaixo do limite de detecção do método. Desse modo, não foi possível comparar a eficiência em mg de catalisador ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) entre os dois sistemas, isto é, contínuo no microrreator e em batelada. Em adição, o cálculo de k_{cat} para o fluxo contínuo também não pode ser realizado.

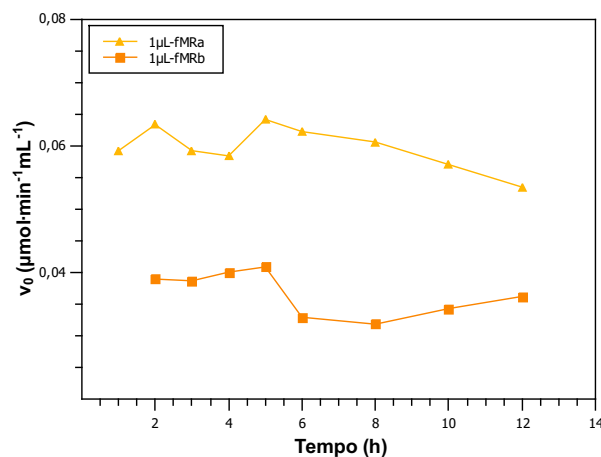
4.3.2 Resistência térmica de xilose isomerase imobilizada a 60 °C (usando frutose como substrato)

O microrreator com xilose isomerase ($0,082 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) imobilizada foi mantido a 60 °C em banho termostático durante um período de 12 h. Frutose ($200 \text{ mM} - 36,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi alimentada no microrreator sob fluxo contínuo a uma vazão de $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e alíquotas coletadas em função do tempo.

A Figura 32 apresenta o comportamento da conversão de frutose em glicose por xilose isomerase em função de atividade por tempo e a Tabela A4 os valores

obtidos. Importante destacar que o experimento foi realizado em dias diferentes e a imobilização nos dois microrreatores executada no mesmo dia (somente para este caso). Para estes ensaios, 1 μ L-fMRa representa o primeiro experimento com o microrreator e o 1 μ L-fMRb o segundo experimento, realizado em um intervalo de 48 h após o primeiro ensaio. Nesse intervalo de 48 h houve perda de atividade de xilose isomerase livre utilizada para a imobilização e, portanto, não foi possível determinar a média e o desvio padrão (entre o 1 μ L-fMRa e 1 μ L-fMRb). A atividade da enzima livre variou de 0,064 U·mL⁻¹ para 0,047 U·mL⁻¹ usando 100 mM de frutose, a qual foi considerada como referência para o microrreator com a enzima imobilizada.

Figura 32 – Resistência térmica de xilose isomerase imobilizada no microrreator a 60 °C em um período de 12 h



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

O objetivo em estimar a resistência térmica da enzima imobilizada e livre a 60 °C durante 12 h foi motivado pelo tempo necessário para a realização de outros ensaios com xilose isomerase imobilizada (itens 4.3.3 e 4.3.4). Isso se deve ao fato de que a coleta de dados para a determinação dos parâmetros cinéticos utilizando o microrreator exigia um tempo de aproximadamente 12 h para obtenção de uma quantidade suficiente de amostra para medição da conversão de frutose em glicose (ou xilose em xilulose). Durante esse tempo, o microrreator operava a 60 °C enquanto as concentrações de substrato variavam. O experimento mostra que no período de 12 h a atividade da enzima imobilizada não mudou consideravelmente, o que é bom para a aquisição dos parâmetros cinéticos nos próximos ensaios com a enzima imobilizada, que levaram este mesmo tempo.

4.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato

Xilose isomerase ($2,829 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e atividade de $0,047 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi submetida à imobilização *overnight* (14 h) no interior do microrreator capilar sob refrigeração e, após, o microrreator foi submetido a ensaios de isomerização em fluxo contínuo a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Diferentes concentrações de frutose (80 mM – 2500 mM) em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram alimentadas no microrreator sob fluxo contínuo a $2 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $4 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, nomeados como 2 μL -fMR e 4 μL -fMR, respectivamente.

4.3.3.1 Parâmetros para ensaio em fluxo contínuo a $2 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Os parâmetros cinéticos obtidos a $2 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ estão apresentados na Tabela 1 e o comportamento da velocidade inicial de xilose isomerase imobilizada em função da concentração de substrato está representado na Figura A2.

A partir do diagrama de Lineweaver-Burk, os parâmetros cinéticos K_m e V_m foram determinados (Figura 33).

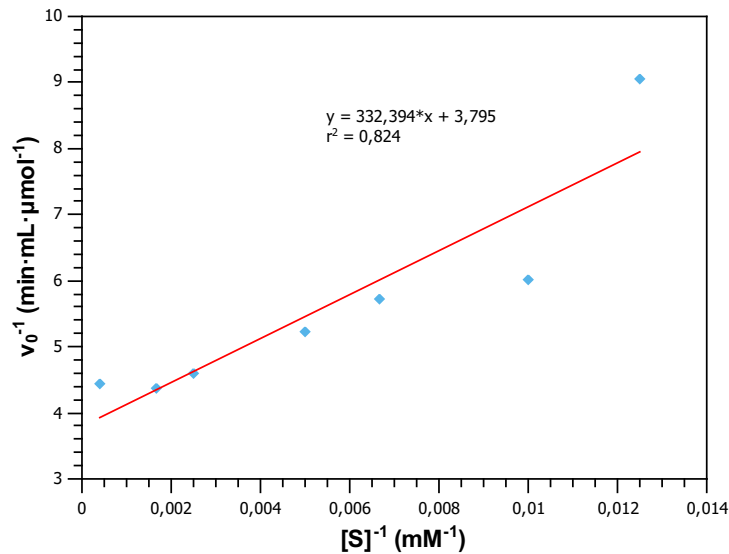
Neste estudo, os valores de K_m e V_m obtidos foram, respectivamente, 0,088 M e $0,264 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabela 1 – Valores de atividade de xilose imobilizada no microrreator usando diferentes concentrações de frutose em fluxo contínuo a $2 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Frutose (mM – $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Atividade ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)
80 – 14,412	0,199	0,110
100 – 18,015	0,300	0,166
150 – 27,023	0,314	0,175
200 – 36,030	0,344	0,191
400 – 72,060	0,392	0,217
600 – 108,090	0,412	0,229
2500 – 450,375	0,406	0,226

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura 33 – Gráfico de Lineweaver-Burk de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

4.3.3.2 Parâmetros para ensaio em fluxo contínuo a $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

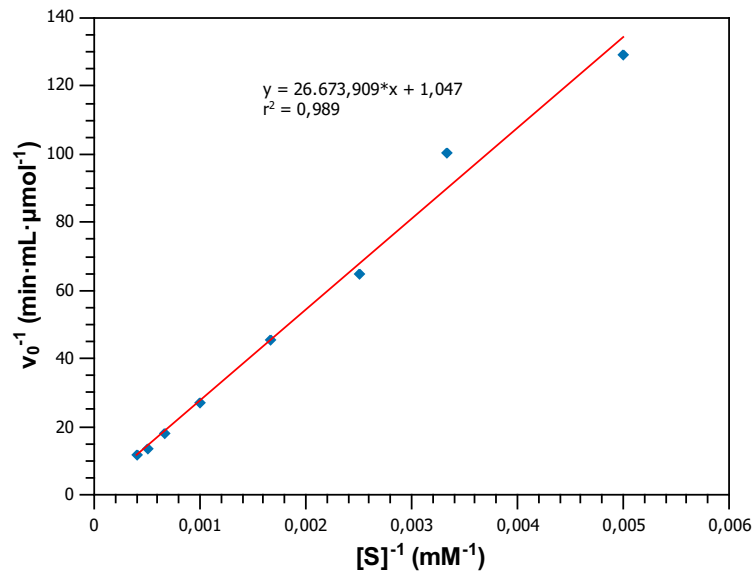
Os parâmetros cinéticos obtidos a $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ em duplicata (Tabela 2) estão representados na Tabela 2 e o comportamento da velocidade inicial de xilose isomerase imobilizada em função da concentração de substrato na Figura A3. Ressalta-se que somente a partir de 200 mM verificou-se conversão em glicose.

Tabela 2 – Valores de atividade de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando diferentes concentrações de frutose em fluxo contínuo a $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Frutose (mM – g·L ⁻¹)	Glicose (g·L ⁻¹)	Atividade (U·mL ⁻¹)
200 – 36,030	0,021 ± 0,004	0,008
300 – 54,045	0,027 ± 0,007	0,010
400 – 72,060	0,042 ± 0,007	0,015
600 – 108,090	0,059 ± 0,004	0,022
1000 – 180,150	0,099 ± 0,006	0,037
1500 – 270,225	0,148 ± 0,006	0,055
2000 – 360,300	0,202 ± 0,006	0,075
2500 – 450,375	0,234 ± 0,008	0,087

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura 34 – Gráfico de Lineweaver-Burk de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato em fluxo contínuo a $4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

A partir do diagrama de Lineweaver-Burk, os parâmetros cinéticos K_m e V_m foram determinados (Figura 34) e os valores de K_m e V_m obtidos foram, respectivamente, 25,477 M e $0,955 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$.

As réplicas foram obtidas do seguinte modo: em um dia, o microrreator funcionalizado foi submetido à imobilização da enzima ($2,829 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e atividade de $0,047 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) e finda esta etapa utilizado nos ensaios de isomerização. Em outro dia, o mesmo ensaio foi realizado com outro microrreator funcionalizado.

O ineditismo deste experimento impossibilitou a realização de comparações com a literatura existente, embora haja um vasto conhecimento sobre a imobilização de xilose isomerase em suportes diversos (GUPTA; SRIVASTAVA, 2017; JIN *et al.*, 2017; SINGH; JAJOO; BHASIN, 2020), incluindo a imobilização de xilose isomerase em microesferas utilizando dispositivo microfluídico duplo coaxial (ZHAO *et al.*, 2016). No entanto, o uso direto da enzima atuando no espaço microrreacional ainda não havia sido explorado.

4.3.4 Determinação dos parâmetros cinéticos de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando xilose como substrato

Xilose isomerase ($2,829 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e atividade de $0,258 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi submetida a imobilização *overnight* (12 h) no interior do microrreator capilar sob refrigeração. Transcorridas as 12 h, o microrreator foi submetido a ensaios de isomerização em fluxo contínuo a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Para tanto, soluções de xilose em diferentes concentrações (20 mM – 600 mM) em solução tampão fosfato de sódio (30 mM e pH 7,5) com 10 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram alimentadas no microrreator sob fluxo contínuo a uma vazão de $2 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A Tabela 3 apresenta os valores obtidos e na Figura A4 o comportamento da conversão de xilose em xilulose em função do tempo é representado. Para estes ensaios, 2 μL -xMRa representa o primeiro experimento com o microrreator e o 2 μL -xMRb o segundo experimento, referente à duplicata. Neste caso, optou-se por representá-los separadamente ao invés de estabelecer uma média.

As réplicas foram obtidas da seguinte maneira: em um dia, o microrreator funcionalizado foi submetido à imobilização da enzima ($2,829 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e atividade de $0,258 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ao término desta etapa, utilizado para os ensaios de isomerização. Em outro dia, o mesmo ensaio foi realizado com outro microrreator funcionalizado.

Os resultados experimentais foram ajustados empregando o modelo de Hanes (Figura 35) visto que o ajuste pelo modelo de Lineweaver-Burk não apresentou comportamento linear. Desta forma, empregando o modelo de Hanes foi possível determinar os parâmetros cinéticos K_m e V_m .

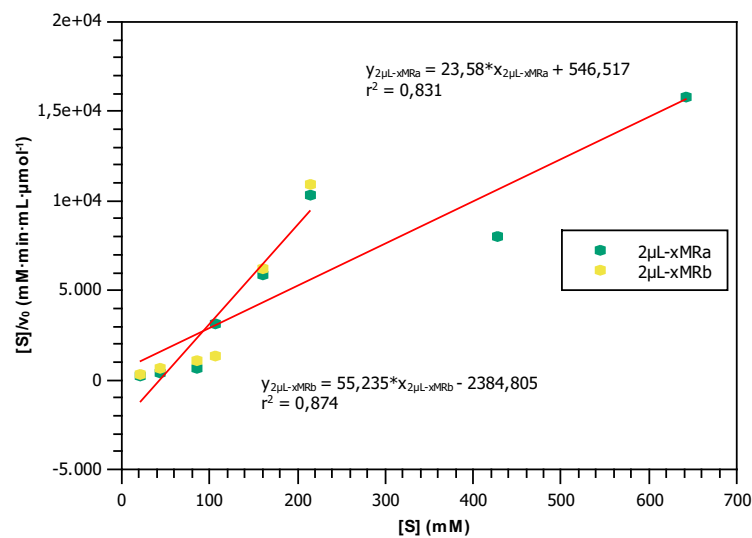
Para o estudo de caso 2 μL -xMRa, os resultados de K_m e V_m obtidos foram, respectivamente, 0,023 M e $0,042 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para o estudo de caso 2 μL -xMRb os resultados de K_m e V_m obtidos foram, respectivamente, 0,043 M e $0,018 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabela 3 – Atividade de xilose isomerase imobilizada no microrreator para diferentes concentrações de xilose em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Xilose (mM – g·L ⁻¹)	2 μL -xMRa xilulose (g·L ⁻¹)	2 μL -xMRb xilulose (g·L ⁻¹)	Atividade 2 μL -xMRa (U·mL ⁻¹)	Atividade 2 μL -xMRb (U·mL ⁻¹)
20 – 3,003	0,691	0,489	0,088	0,062
40 – 6,005	0,838	0,537	0,106	0,068
80 – 12,01	0,988	0,617	0,125	0,078
100 – 15,013	0,268	0,630	0,034	0,080
150 – 22,52	0,215	0,204	0,027	0,026
200 – 30,026	0,164	0,154	0,021	0,020
400 – 60,052	0,420	–	0,053	–
600 – 90,078	0,320	–	0,041	–

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura 35 – Ajuste dos dados ao modelo de Hanes de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando xilose como substrato em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$



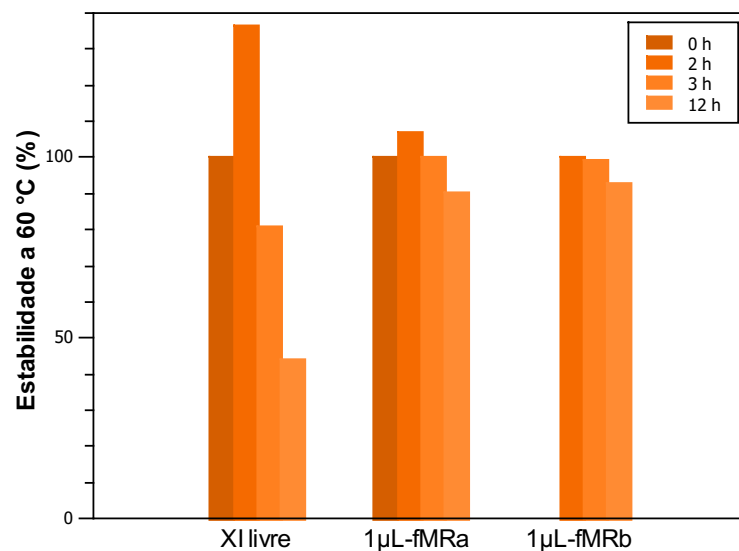
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

4.4 RELAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS BATELADA (COM ENZIMA LIVRE) E CONTÍNUO (NO MICRORREATOR)

4.4.1 Relação entre a resistência térmica de xilose isomerase livre e imobilizada a 60 °C

Os ensaios de resistência térmica demonstraram que xilose isomerase livre em solução apresentou um decréscimo de estabilidade de 55,782% entre o tempo inicial (0 h) e final (12 h). Por outro lado, a resistência térmica da mesma enzima imobilizada no 1 μ L-fMRa e no 1 μ L-fMRb para o mesmo intervalo de tempo (1 h a 12 h) mostrou um decréscimo de 9,828% e 6,888%, respectivamente (Figura 36). O tempo 0 h na Figura 36 para xilose isomerase imobilizada condiz com 1 h nos dados obtidos e foi representado desta forma para facilitar a demonstração da estabilidade.

Figura 36 – Comparação da resistência térmica da enzima livre e imobilizada no microrreator a 60 °C ao longo do tempo



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

A mobilidade reduzida da enzima devido às ligações covalentes com a superfície interna do microrreator pode ser o motivo pelo qual xilose isomerase imobilizada demonstrou maior estabilidade que a enzima livre (WELTZ *et al.*, 2020).

4.4.2 Relação dos parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com frutose

Na Tabela 4 estão apresentados os valores dos parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com xilose isomerase livre e imobilizada no microrreator.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com a enzima livre e imobilizada em modo contínuo a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (2 μL -fMR) e $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (4 μL -fMR)

Parâmetros cinéticos	Xilose isomerase		
	livre	2 μL -fMR	4 μL -fMR
K_m (M)	3,282	0,088	25,477
V_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0,848	0,264	0,955

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Pode-se observar que xilose isomerase livre possui um valor de K_m intermediário (3,282 M) e um valor de V_m relativamente baixo ($0,848 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$). Isso sugere que a enzima possui uma afinidade moderada pelo substrato. Para xilose isomerase em 2 μL -fMR, observa-se um valor de K_m muito baixo (0,088 M), o que indica uma alta afinidade entre a enzima e o substrato neste sistema. Além disso, o valor de V_m diminuiu para $0,264 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que significa que a enzima está menos eficiente na conversão de frutose em glicose. Para o caso de xilose isomerase em 4 μL -fMR, observa-se um valor de K_m muito alto (25,477 M), indicando uma baixa afinidade entre a enzima e o substrato neste sistema. No entanto, o valor de V_m aumentou para $0,955 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que sugere uma maior eficiência da enzima na conversão do substrato em produto, apesar da baixa afinidade. O possível motivo para estes valores é uma inibição que será melhor comentado no tópico a seguir (item 4.4.3).

As vazões de $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ foram escolhidas com base nos ensaios realizados como um tempo de residência adequado para a reação ocorrer (dentro da faixa de resistência térmica de xilose isomerase, ou seja, durante 12 horas) e ser possível também quantificar um valor substancial de produto formado. Como a aquisição dos dados a $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando frutose como substrato já pode-se observar dificuldade de quantificar um valor substancial de produto formado, nos testes com xilose como substrato optou-se por realizá-los somente a $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.4.3 Relação dos parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com xilose

Na Tabela 5 estão apresentados os valores dos parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com xilose isomerase livre e imobilizada no microrreator em comparação com aqueles obtidos no trabalho de Miyamoto *et al.* (2020), o qual utilizou a enzima livre e obteve os parâmetros cinéticos utilizando xilose como substrato.

Tabela 5 – Parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com xilose isomerase livre e imobilizada em modo contínuo a $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (2 μL -xMRa e 2 μL -xMRb)

Parâmetros cinéticos	Xilose isomerase livre de Miyamoto <i>et al.</i> (2020)	Xilose isomerase livre	2 μL -xMRa	2 μL -xMRb
	K_m (M)	0,049	0,045	0,023
V_m ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0,131	0,307	0,042	0,018

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

A partir dos dados da Tabela 5 é possível comparar os ensaios realizados no presente estudo com os realizados por Miyamoto *et al.* (2020), ambos utilizando xilose isomerase (*XylA2F1*) livre. Apesar de ser a mesma enzima, pode-se observar uma pequena diferença no valor de K_m (de 0,045 M para 0,049 M, respectivamente). No entanto, xilose isomerase livre utilizada no estudo de Miyamoto *et al.* (2020) apresentou um valor de V_m menor ($0,131 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) em comparação com xilose isomerase livre empregada neste trabalho ($0,307 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Para a enzima *XylA2F1* nos sistemas 2 μL -xMRa e 2 μL -xMRb (Tabela 5), valores mais baixos de K_m (0,023 M e 0,043 M, respectivamente) são observados, o que sugere uma maior afinidade da enzima pelo substrato, tanto em comparação com xilose isomerase livre neste trabalho, quanto para a de Miyamoto *et al.* (2020). Entretanto, apresentam valores de V_m muito mais baixos ($0,042 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,018 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente). Isso sugere que a enzima imobilizada no microrreator foi menos eficiente na conversão de xilose em xilulose quando comparada com a enzima livre.

Em estudo conduzido por Patel *et al.* (2014) foi definido que após a imobilização de enzimas os valores de V_m reduzam devido às limitações na transferência de massa do substrato até o sítio ativo da enzima, o que pode ser atribuído para os estudos de

caso 2 μ L-xMRa e 2 μ L-xMRb, apesar de manterem o valor de K_m preservado, relativamente próximo ao de xilose isomerase livre. Além disso, uma inibição por parte dos reagentes químicos utilizados durante a imobilização pode ter sido originada, visto que não se conhece ao certo todos os inibidores desta enzima (convém salientar que xilose isomerase desenvolvida apresenta uma identidade de sequência de 95% ao homólogo de *Streptomyces murinus*). Sabe-se apenas que esta enzima apresenta redução da atividade (por inibição) na presença de etanol e xilitol (MIYAMOTO *et al.*, 2020).

Essa mesma observação pode ser aplicada aos estudos de caso 2 μ L-fMR e 4 μ L-fMR. Para o estudo de caso 2 μ L-fMR, embora a afinidade da enzima tenha aumentado em comparação com xilose isomerase livre (Tabela 5), a velocidade máxima foi reduzida. No estudo de caso 4 μ L-fMR, apesar da afinidade de xilose isomerase ter diminuído em comparação com a enzima livre, a velocidade máxima apresentou um aumento. Isso sugere que a enzima pode demonstrar diferentes níveis de eficiência catalítica de acordo com as condições experimentais impostas.

5 CONCLUSÕES

A imobilização de xilose isomerase utilizando as técnicas descritas neste estudo foi bem-sucedida. No entanto, devido ao limite de detecção e possível limitação do método utilizado para imobilização, não foi possível determinar a quantidade de enzima imobilizada.

Após a imobilização, diferenças nos valores de K_m e V_m em comparação com a enzima livre foram observadas. Ainda, foi necessário um ajuste no modelo cinético inicialmente utilizado para frutose (de Lineweaver-Burk para o modelo de Hanes) quando a cinética com xilose, tanto para xilose isomerase livre quanto imobilizada, foi avaliada.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que é possível imobilizar xilose isomerase em um microrreator. No entanto, são necessários estudos cinéticos mais aprofundados para confirmar se a enzima imobilizada no meio microrreacional sob fluxo contínuo apresenta um potencial cinético superior em comparação à enzima livre. Os valores de K_m e V_m observados variaram significativamente, sugerindo possíveis limitações de transferência de massa devido à imobilização da enzima ou ao uso da enzima no microrreator. Portanto, investigações adicionais são necessárias para melhor compreender as implicações da imobilização na atividade da enzima e determinar se essa abordagem pode resultar em um desempenho superior de xilose isomerase em relação à sua forma livre.

Este estudo representa um trabalho precursor na área de microrreatores e abre oportunidades para estudos futuros. Os microrreatores apresentam um potencial significativo, permitindo avanços na síntese (bio)química com potencial de aumento no rendimento de produtos de alto valor agregado. A capacidade de miniaturização e o controle preciso das reações (bio)químicas nesses sistemas possibilitam a realização de experimentos com alta velocidade e eficiência, contribuindo para a sustentabilidade e a redução do impacto ambiental.

REFERÊNCIAS

- ABU-REESH, I.M. Predicting the performance of immobilized enzyme reactors using reversible Michaelis–Menten kinetics. **Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 17, n. August 1997, p. 131–137, 1997.
- ANUAR, Sabiqah Tuan *et al.* The development of a capillary microreactor for transesterification reactions using lipase immobilized onto a silica monolith. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 92, n. August 2013, p. 62–70, 2013.
- BARBOSA, Oveimar *et al.* Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, [s. l.], n. 4, p. 1583–1600, 2014.
- BASSO, Alessandra; SERBAN, Simona. Overview of Immobilized Enzymes' Applications in Pharmaceutical, Chemical, and Food Industry. *Em*: GUISAN, Jose M. *et al.* (org.). **Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols**. 4. ed. [S. l.]: Springer Science+Business Media, 2020. v. 2100, p. 27–63.
- BHOSALE, Snehalata H.; RAO, Mala B.; DESHPANDE, Vasanti v. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 280–300, 1996.
- BIRD, R. Byron; STEWART, Warren E.; LIGHTFOOT, Edwin N. Shell Momentum Balances and Velocity Distributions in Laminar Flow. *Em*: BIRD, R. Byron; STEWART, Warren E.; LIGHTFOOT, Edwin N. (org.). **Transport Phenomena**. 2. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2002. p. 40–74.
- BISSWANGER, Hans. Enzyme Kinetics. *Em*: BISSWANGER, Hans (org.). **Enzyme Kinetics: Principles and Methods**. 2. ed. [S. l.]: Wiley-VCH, 2008. p. 59–193.
- BOJANG, Adama A.; WU, Ho-Shing. Design, Fundamental Principles of Fabrication and Applications of Microreactors. **Processes**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 891, 2020.
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRENA, Beatriz; GONZÁLEZ-POMBO, Paula; BATISTA-VIERA, Francisco. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Em*: GUISAN, Jose M. (org.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 3. ed. [S. l.]: Springer Science+Business Media, 2013. v. 1051, p. 15–31.
- BUGG, T. D. H. All Enzymes Are Proteins. *Em*: BUGG, T. D. H. (org.). **Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry**. 3. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd., 2012. p. 7–25.
- C. DIMIAN, Alexandre; BILDEA, Costin S.; A. KISS, Anton. Process Intensification. *Em*: C. DIMIAN, Alexandre; BILDEA, Costin S.; A. KISS, Anton (org.). **Computer Aided Chemical Engineering**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier B.V., 2014. v. 35, p. 397–448.

CHAKRABORTY, Saikat; SINGH, Prasun Kumar; PARAMASHETTI, Pawan. Microreactor-based mixing strategy suppresses product inhibition to enhance sugar yields in enzymatic hydrolysis for cellulosic biofuel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 237, n. August 2017, p. 99–107, 2017.

CHANDRAKANT, Priya; BISARIA, Virendra S. Application of a Compatible Xylose Isomerase in Simultaneous Bioconversion of Glucose and Xylose to Ethanol. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 32–39, 2000.

CHANDRASEKARAN, Muthusamy; BEENA, P. S. Enzymes in Confectioneries. *Em: CHANDRASEKARAN, Muthusamy (org.). Enzymes in Food and Beverage Processing*. 1. ed. [S. l.]: Taylor & Francis Group, 2016. p. 205–225.

CHANG, Ya Ching *et al.* Surface co-silanization engineering to enhance amine functionality for adhesive heterojunction and antimicrobial application. **Composites Science and Technology**, [s. l.], v. 218, 2022.

CHEN, Hongzhang; FU, Xiaoguo. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 57, n. May 2016, p. 468–478, 2016.

CHIANG, Lin-Chang *et al.* Enzymatic and Microbial Preparation of D-Xylulose from D-Xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 66–69, 1981.

CONVERTI, Attilio; BORGHI, Marco Del. Simultaneous effects of immobilization and substrate protection on the thermodynamics of glucose isomerase activity and inactivation. *Enzyme and Microbial Technology*, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 511–517, 1997.

COSTA, José Arnaldo Santana; PARANHOS, Caio Marcio. Systematic evaluation of amorphous silica production from rice husk ashes. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 192, n. August 2018, p. 688–697, 2018.

DA SILVA, Eduardo Alberto Borges *et al.* Glucose isomerization in simulated moving bed reactor by Glucose isomerase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 491–502, 2006.

DEHKORDI, Asghar Molaei; TEHRANY, Mehrdad Shoai; SAFARI, Iman. Kinetics of Glucose Isomerization to Fructose by Immobilized Glucose Isomerase (Sweetzyme IT). **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 3271–3278, 2009.

DENG, Manfeng *et al.* High catalytic activity of immobilized laccase on core–shell magnetic nanoparticles by dopamine self-polymerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 112, n. February 2015, p. 15–24, 2015.

ELVIRA, Katherine S. *et al.* The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis. **Nature Chemistry**, [s. l.], v. 5, n. November 2013, p. 905–915, 2013.

FILICE, Marco; ARAGON, Caio C.; PALOMO, Jose M. Enzyme Engineering and Protein Modifications. *Em*: CHANDRASEKARAN, Muthusamy (org.). **Enzymes in Food and Beverage Processing**. [S. l.]: Taylor & Francis Group, 2016. p. 99–113.

GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. A study on intra-particle diffusion effects in enzymatic reactions: glucose-fructose isomerization. **Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 23, n. August 2000, p. 159–166, 2000.

GORAIN, Bapi *et al.* Drug-Excipient Interaction and Incompatibilities. *Em*: TEKADE, Rakesh K. (org.). **Dosage Form Design Parameters**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. v. 2, p. 363–402.

GUILHERME, Ederson Paulo Xavier *et al.* Simultaneous saccharification isomerization and Co-fermentation – SSICF: A new process concept for second-generation ethanol biorefineries combining immobilized recombinant enzymes and non-GMO *Saccharomyces*. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 182, n. January 2022, p. 274–284, 2022.

GUNDA, Naga Siva Kumar *et al.* Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 305, n. June 2014, p. 522–530, 2014.

GUPTA, Arun; SRIVASTAVA, S. K. Study of cross-linked enzyme aggregate of glucose isomerase of *Streptomyces thermotrophicus* immobilized on magnetic particle. **Journal of Biochemical Technology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 1102–1106, 2017.

HAMIDOVIĆ, Medina; ENDER, Ferenc; SPRINGER, Andreas. A novel Enzymatic Microreactor: Towards Transforming the Pharmaceutical Industry. *Em*: BADNJEVIĆ, A.; ŠKRBIĆ, R.; GURBETA POKVIĆ, L. (org.). **IFMBE Proceedings**. [S. l.]: Springer, Cham, 2020. v. 73, p. 303–308.

HARNER, Nicole K. *et al.* Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 1–20, 2015.

HASSAN, Ali Abou *et al.* Microfluidics for Inorganic Chemistry. **Angewandte Chemie**, [s. l.], v. 49, n. 36, p. 1–18, 2010.

HEDE, Karyn. PNNL: Faster, cheaper ethanol-to-jet-fuel on the horizon. **Ethanol Producer Magazine**. Disponível em: <<https://ethanolproducer.com/articles/18507/pnnl-faster-cheaper-ethanol-to-jet-fuel-on-the-horizon>>. Acesso em: 13/07/2023.

HERNÁNDEZ-MAYA, Francisco M.; CAÑIZARES-MACÍAS, María P. Evaluation of the activity of β -glucosidase immobilized on polydimethylsiloxane (PDMS) with a microfluidic flow injection analyzer with embedded optical fibers. **Talanta**, [s. l.], v. 185, n. August 2018, p. 53–60, 2018.

HOCHSTER, R. M.; WATSON, R. W. Enzymatic Isomerization of D-Xylose to D-Xylulose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 120–129, 1954.

HOLTZE, Christian; BOEHLING, Ralf. Batch or flow chemistry? – a current industrial opinion on process selection. **Current Opinion in Chemical Engineering**, [s. l.], v. 36, n. June 2022, p. 100798, 2022.

HOMMES, Arne; HEERES, Hero Jan; YUE, Jun. Catalytic Transformation of Biomass Derivatives to Value-Added Chemicals and Fuels in Continuous Flow Microreactors. **ChemCatChem**, [s. l.], v. 11, n. October 2019, p. 4671–4708, 2019.

HOWARTER, John A.; YOUNGBLOOD, Jeffrey P. Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyl triethoxysilane. **Langmuir**, [s. l.], v. 22, n. 26, p. 11142–11147, 2006.

HSIAO, Hung-Yu *et al.* Effects of borate on isomerization and yeast fermentation of high xylulose solution and acid hydrolysate of hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 25–31, 1982.

JIA, Dong-Xu *et al.* Whole cell immobilization of refractory glucose isomerase using tris(hydroxymethyl)phosphine as crosslinker for preparation of high fructose corn syrup at elevated temperature. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 126, n. 2, p. 176–182, 2018.

JIN, Li-Qun *et al.* Immobilization of Recombinant Glucose Isomerase for Efficient Production of High Fructose Corn Syrup. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 183, n. September 2017, p. 293–306, 2017.

KARADE, V. C. *et al.* APTES monolayer coverage on self-assembled magnetic nanospheres for controlled release of anticancer drug Nintedanib. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021.

KOCKMANN, Norbert; ROBERGE, Dominique M. Harsh Reaction Conditions in Continuous-Flow Microreactors for Pharmaceutical Production. **Chem. Eng. Technol.**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 1682–1694, 2009.

KOGNOU, Aristide Laurel Mokale *et al.* High-fructose corn syrup production and its new applications for 5-hydroxymethylfurfural and value-added furan derivatives: Promises and challenges. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 148–160, 2022.

KOVALEVSKY, Andrey *et al.* Inhibition of d-xylose isomerase by polyols: atomic details by joint X-ray/neutron crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, [s. l.], v. 68, n. 9, p. 1201–1206, 2012.

KRASNOSLOBODTSEV, Alexey V.; SMIRNOV, Sergei N. Effect of water on silanization of silica by trimethoxysilanes. **Langmuir**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 3181–3184, 2002.

LAURENTI, Enzo; VIANNA JR., Ardson dos Santos. Enzymatic microreactors in biocatalysis: history, features, and future perspectives. **Biocatalysis**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 148–165, 2015.

LEE, Chia-Yen *et al.* Passive mixers in microfluidic systems: A review. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 288, n. March 2016, p. 146–160, 2016.

LI, Zhenghong *et al.* High-throughput and reliable acquisition of in vivo turnover number fuels precise metabolic engineering. **Synthetic and Systems Biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 541–543, 2022.

LIMAYEM, Alya; RICKE, Steven C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LIN, Kai *et al.* Efficient production of sugar via continuous enzymatic hydrolysis in a microreactor loaded with cellulase. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 445, n. October 2022, p. 136633, 2022.

LIU, Yue *et al.* Kinetics of (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) Silanization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Langmuir**, [s. l.], v. 29, n. 49, p. 15275–15282, 2013.

LOPES, Mariana G. M. *et al.* Three-dimensional-printed millireactor with yeast immobilized in calcium-alginate film for application in fermentation processes. **American Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 1–14, 2021.

LORSCH, Jon R. Practical Steady-State Enzyme Kinetics. *Em*: LORSCH, Jon R. (org.). **Methods in Enzymology**. [S. l.]: Academic Press Inc., 2014. v. 536, p. 3–15.

MARTINEZ-JIMENEZ, Fernan David *et al.* Exploiting the Non-conventional Yeast *Spathaspora passalidarum* as a Platform for Hemicellulosic Hydrolysate Conversion into Bioproducts: a Mini Review. **BioEnergy Research**, [s. l.], v. 14, n. June 2021, p. 689–708, 2021.

MELO, Ricardo Rodrigues de *et al.* Draft genome sequence of *Streptomyces* sp. strain F1, a potential source for glycoside hydrolases isolated from Brazilian soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 612–614, 2017.

Microfluidic chips. **Micronit**, 2023. Disponível em: <<https://store.micronit.com/microfluidic-chips.html>>. Acesso em: 14/06/2023

MILESSI, Thais S. *et al.* Continuous 2G ethanol production from xylose in a fixed-bed reactor by native *Saccharomyces cerevisiae* strain through simultaneous isomerization and fermentation. **Springer Nature B.V.**, [s. l.], v. 27, n. May 2020, p. 4429–4442, 2020.

MILESSI, Thais Suzane *et al.* Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 119, n. December 2018, p. 277–283, 2018a.

MILESSI, Thais Suzane *et al.* Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 119, p. 277–283, 2018b.

MIRANDA, Adelaide; MARTÍNEZ, Lidia; DE BEULE, Pieter A.A. Facile synthesis of an aminopropyl silane layer on Si/SiO₂ substrates using ethanol as APTES solvent. **MethodsX**, [s. l.], v. 7, 2020.

MIYAZAKI, Masaya *et al.* Simple method for preparation of nanostructure on microchannel surface and its usage for enzyme-immobilization. **Chemical Communications**, [s. l.], n. 5, p. 648–649, 2003.

MIYAZAKI, Masaya; MAEDA, Hideaki. Microchannel enzyme reactors and their applications for processing. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 463–470, 2006.

NAKAPONG, Santhana *et al.* Heterologous expression of 4 α -glucanotransferase: overproduction and properties for industrial applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 36, p. 1–21, 2022.

NAM, Ki Hyun. Crystal structure of the metal-free state of glucose isomerase reveals its minimal open configuration for metal binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 547, n. April 2021, p. 69–74, 2021.

NAM, Ki Hyun. Glucose Isomerase: Functions, Structures, and Applications. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 428, p. 1–12, 2022.

OKOLIE, Jude A. *et al.* Next-generation biofuels and platform biochemicals from lignocellulosic biomass. **International Journal of Energy Research**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 14145–14169, 2021.

PASTERNAK, Robert M.; AMY, Sandrine Rivillon; CHABAL, Yves J. Attachment of 3-(aminopropyl) triethoxysilane on silicon oxide surfaces: Dependence on solution temperature. **Langmuir**, [s. l.], v. 24, n. 22, p. 12963–12971, 2008.

PATEL, Sanjay K. S. *et al.* Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 639–647, 2014.

QUEEN, Francis. Etanol de segunda geração é combustível para o futuro. **Exame**, 2023. Disponível em: <<https://exame.com/bussola/etanol-de-segunda-geracao-e-combustivel-para-o-futuro/>>. Acesso em: 28/06/2023.

RAMOS, Márcio Daniel N. *et al.* Simultaneous Isomerization and Fermentation (SIF) of sugarcane bagasse hydrothermal hemicellulose hydrolysate. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 8029–8042, 2021.

RAO, Kripa *et al.* A Novel Technique that Enables Efficient Conduct of Simultaneous Isomerization and Fermentation (SIF) of Xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 146, n. March 2008, p. 101–117, 2008.

RENGASAMY, Sathya *et al.* Purification and kinetic behavior of glucose isomerase from *Streptomyces lividans* RSU26. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1117–1123, 2020.

ROMAN, Graciela N. *et al.* Kinetic studies of the enzymatic isomerization of xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 129–133, 1985.

RUIZ-VILLAFÁN, Beatriz; RODRÍGUEZ-SANOJA, Romina; SÁNCHEZ, Sergio. Useful microbial enzymes — an introduction. *Em*: GOUTAM BRAHMACHAR (org.). **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis, and Industrial Applications**. Second Editioned. [S. l.]: Academic Press, 2023. p. 50–72.

SAHA, Badal C.; COTTA, Michael A. Ethanol production from lignocellulosic biomass by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5. **Bioengineered**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 197–202, 2012.

SANTO, Eduardo Leal Isla *et al.* A novel method for bioethanol production using immobilized yeast cells in calcium-alginate films and hybrid composite pervaporation membrane. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 247, n. January 2018, p. 165–173, 2018.

SCHERMANN, Jean-Pierre. Sugars. *Em*: SCHERMANN, Jean-Pierre (org.). **Spectroscopy and Modelling of Biomolecular Building Blocks**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier, 2008. p. 297–307.

SEGEL, Irwin H. Enzymes. *Em*: SEGEL, Irwin H. (org.). **Biochemical Calculations**. 2. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc., 1976. p. 208–323.

SHALLAN, Aliaa I.; PRIEST, Craig. Microfluidic process intensification for synthesis and formulation in the pharmaceutical industry. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [s. l.], v. 142, n. August 2019, p. 107559, 2019.

SHARMA, Hem Kanta; XU, Chunbao (Charles); QIN, Wensheng. Isolation of Bacterial Strain with Xylanase and Xylose/Glucose Isomerase (GI) Activity and Whole Cell Immobilization for Improved Enzyme Production. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 12, n. February 2021, p. 833–845, 2021.

SHRIMAL, Preena; JADEJA, Girirajsinh; PATEL, Sanjaykumar. A review on novel methodologies for drug nanoparticle preparation: Microfluidic approach. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 153, n. January 2020, p. 728–756, 2020.

SIGUEMOTO, Érica S. *et al.* Residence time distribution of a capillary micro-reactor used for pharmaceutical synthesis. **Chemical Engineering and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 429–435, 2020.

SILVA, C. R. *et al.* An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 35–42, 2012.

SINGH, Saurabh *et al.* Deconstruction of lignocellulosic biomass for bioethanol production: Recent advances and future prospects. **Fuel**, [s. l.], v. 327, n. November 2022, p. 125109, 2022.

SINGH, Tanim Arpit; JAJOO, Anjana; BHASIN, Sheetal. Optimization of various encapsulation systems for efficient immobilization of actinobacterial glucose isomerase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 29, n. October 2020, p. 101766, 2020.

SINGH, Rachana; SINGH, Aditi; SACHAN, Shweta. Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes?. *Em*: KUDDUS, Mohammed (org.). **Enzymes in Food Biotechnology**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 827–843.

SURYAWANSHI, Prashant L. *et al.* A review on microreactors: Reactor fabrication, design, and cutting-edge applications. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 189, n. November 2018, p. 431–448, 2018.

UDOMSOM, Suruk *et al.* Novel Rapid Protein Coating Technique for Silicon Photonic Biosensor to Improve Surface Morphology and Increase Bioreceptor Density. **Coatings**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 595, 2021.

UMEMOTO, Yoshiaki; SHIBATA, Toshiyuki; ARAKI, Toshiyoshi. D-Xylose Isomerase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain XY-214, and D-Xylulose Production from β -1,3-Xylan. **Mar Biotechnol (NY)**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 10–20, 2012.

URBAN, Pawel L.; GOODALL, David M.; BRUCE, Neil C. Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 42–57, 2006.

VASANTI DESHPANDE; RAO, Mala. Glucose Isomerase. *Em*: PANDEY, Ashok *et al.* (org.). **Enzyme Technology**. 1. ed. [S. l.]: Springer Science+Business Media, Inc., 2006. p. 239–252.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. Protein Function: Myoglobin and Hemoglobin, Muscle Contraction, and Antibodies. *Em*: VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. (org.). **Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular Level**. 3rd. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2008. v. 1, p. 176–213.

WANG, Wei *et al.* Simultaneous upgrading of biomass-derived sugars to HMF/furfural via enzymatically isomerized ketose intermediates. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 12, n. 253, p. 1–9, 2019.

WANG, Wei; VAUGHN, Mark. W. Morphology and Amine Accessibility of (3-Aminopropyl) Triethoxysilane Films on Glass Surfaces. **Scanning**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 65–77, 2008.

WEI, Ce *et al.* Improving the performance of immobilized β -glucosidase using a microreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 125, n. 4, p. 377–384, 2018.

WELTZ, James S. *et al.* Reduced Enzyme Dynamics upon Multipoint Covalent Immobilization Leads to Stability-Activity Trade-off. **J. Am. Chem. Soc.**, [s. l.], v. 142, n. 7, p. 3463–3471, 2020.

WHITE, L. D.; TRIPP, C. P. Reaction of (3-aminopropyl) dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 232, p. 400–407, 2000.

WOHLGEMUTH, Roland *et al.* Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 302–314, 2015.

WU, Nan *et al.* DNA-directed trypsin immobilization on a polyamidoamine dendrimer-modified capillary to form a renewable immobilized enzyme microreactor. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 113, n. July 2018, p. 38–44, 2018.

YANG, Haiquan *et al.* Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Catalysis and Technologies. *Em*: SING, S.; PANDEY, A.; SINGHANIA, R.S.; LARROCHE, C.; LI, Z. (org.). **Elsevier**. [S. l.: s. n.], 2020. p. 335–361.

MIYAMOTO, Renan *et al.* Crystal structure of a novel xylose isomerase from *Streptomyces* sp. F-1 revealed the presence of unique features that differ from conventional classes. **BBA - General Subjects**, [s. l.], v. 1864, n. 5, p. 129549, 2020.

ZAFAR, Asma *et al.* Heterologous expression, molecular studies and biochemical characterization of a novel alkaline esterase gene from *Bacillus thuringiensis* for detergent industry. **RSC Advances**, [s. l.], v. 12, n. 53, p. 34482–34495, 2022.

ZHANG, Jisong *et al.* Design and Scaling Up of Microchemical Systems: A Review. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, [s. l.], v. 8, n. March 2017, p. 285–305, 2017.

ZHANG, Dezhi *et al.* Immobilization of cellulase on a silica gel substrate modified using a 3-APTES self-assembled monolayer. **SpringerPlus**, [s. l.], v. 5, n. 48, p. 1–20, 2016.

ZHAO, Zhe *et al.* Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 13, n. 21, p. 1–12, 2020.

ZHAO, Hong *et al.* Enhancement of glucose isomerase activity by immobilizing on silica/chitosan hybrid microspheres. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 126, n. April 2016, p. 18–23, 2016.

ZHU, Yujiao *et al.* Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis. **Reaction Chemistry and Engineering**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–192, 2020.

ZITTAN, L.; POULSEN, P. B.; HEMMINGSEN, St. H. Sweetzyme - A New Immobilized Glucose Isomerase. **Starch**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 236–241, 1975.

APÊNDICE

Tabela A1 – Resistência térmica de xilose isomerase a 60 °C durante 12 h usando frutose como substrato

Tempo (h)	Atividade (U·mL ⁻¹)
0	0,082 ± 0,004
2	0,111 ± 0,024
3	0,066 ± 0,000
4	0,053 ± 0,003
5	0,046 ± 0,006
8	0,047 ± 0,002
10	0,040 ± 0,001
12	0,036 ± 0,001

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Tabela A2 – Valores de atividade de xilose isomerase para diferentes concentrações de frutose

Frutose (mM – g·L ⁻¹)	Glicose (g·L ⁻¹)	Atividade (U·mL ⁻¹)
80 – 14,412	0,035 ± 0,002	0,019
100 – 18,015	0,048 ± 0,002	0,026
150 – 27,023	0,072 ± 0,001	0,040
200 – 36,030	0,085 ± 0,003	0,047
300 – 54,045	0,118 ± 0,002	0,065
400 – 72,060	0,167 ± 0,001	0,093
600 – 108,090	0,255 ± 0,005	0,142
1000 – 180,150	0,436 ± 0,001	0,242
1500 – 270,225	0,430 ± 0,002	0,239
2000 – 360,300	0,486 ± 0,002	0,270
2500 – 450,375	0,550 ± 0,005	0,305

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Tabela A3 – Valores de atividade de xilose isomerase usando diferentes concentrações de xilose

Xilose (mM – g·L⁻¹)	Xilulose (g·L⁻¹)	Atividade (U·mL⁻¹)
20 – 3,003	0,388 ± 0,004	0,258
40 – 6,005	0,761 ± 0,049	0,507
80 – 12,010	0,629 ± 0,018	0,419
100 – 15,013	0,250 ± 0,036	0,166
150 – 22,520	0,209 ± 0,010	0,139
300 – 45,039	0,300 ± 0,071	0,200
600 – 90,078	0,627 ± 0,051	0,417
1000 – 150,130	0,410 ± 0,099	0,273

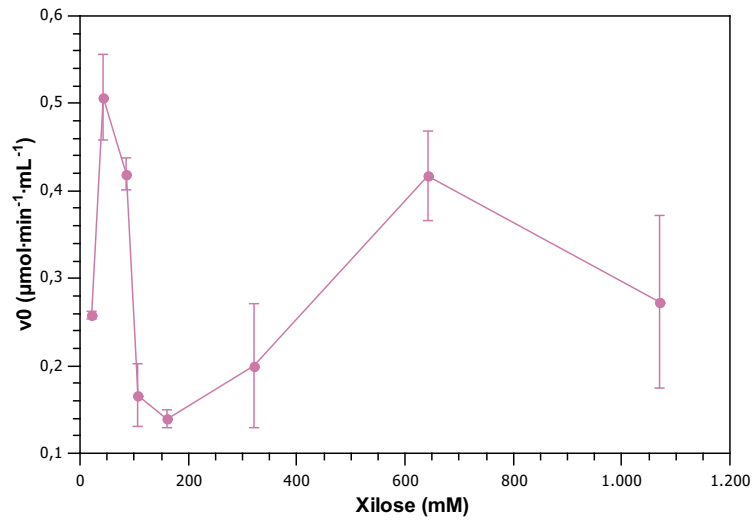
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Tabela A4 – Resistência térmica de xilose isomerase imobilizada no microrreator a 60 °C em um período de 12 h usando frutose como substrato

Tempo (h)	1µL-fMRa (U·mL⁻¹)	1µL-fMRb (U·mL⁻¹)
1	0,059	–
2	0,063	0,039
3	0,059	0,039
4	0,058	0,040
5	0,064	0,041
6	0,062	0,033
8	0,061	0,032
10	0,057	0,034
12	0,054	0,036

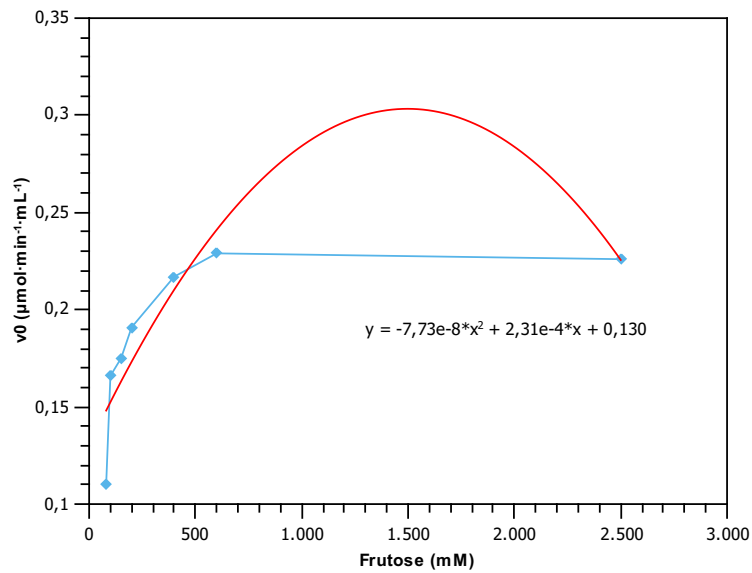
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura A1 – Velocidade inicial de xilose isomerase em função da concentração de xilose



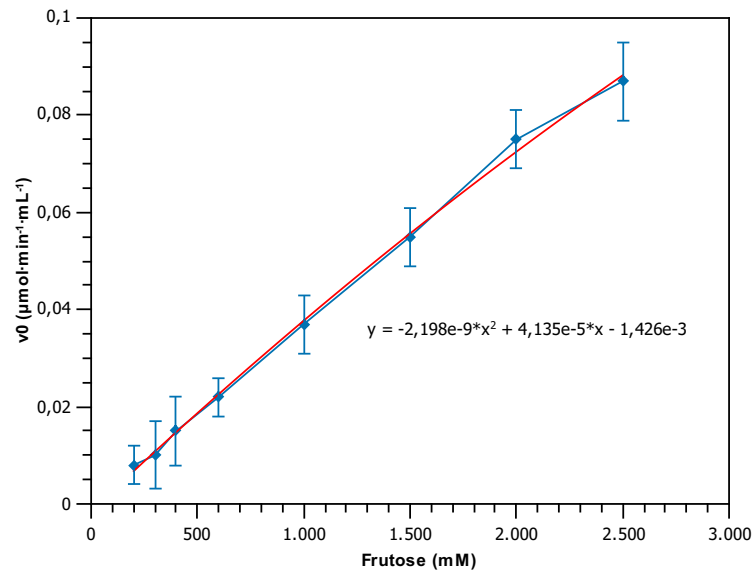
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura A2 – Gráfico de Michaelis-Menten de xilose isomerase imobilizada no microrreator usando frutose como substrato em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$



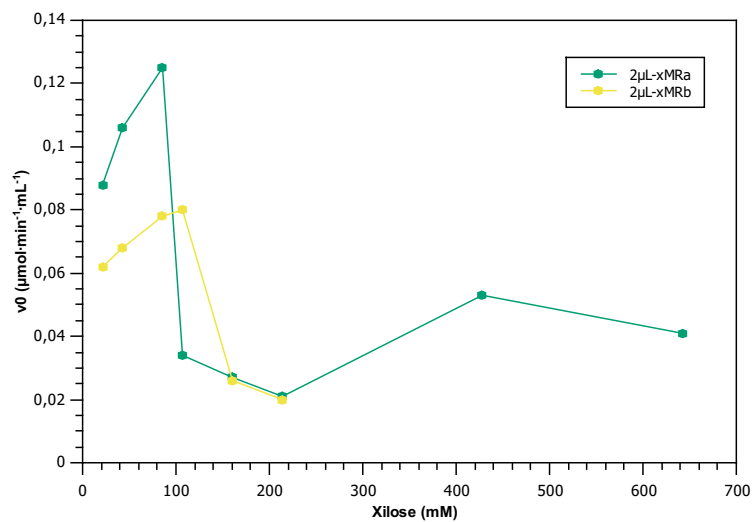
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura A3 – Gráfico de Michaelis-Menten de xilose isomerase immobilizada no microrreator usando frutose como substrato em fluxo contínuo a $4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura A4 – Velocidade inicial de xilose isomerase immobilizada no microrreator em função da concentração de xilose em fluxo contínuo a $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$



Fonte: elaborado pelo autor (2023)