

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE DE *Aspergillus sp.* EM QUITOSANA E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONVERSÃO DE FENÓIS EM REATORES DE LEITO FIXOEverton Skoronski^{*a}, Mylena Fernandes^b, Agenor Furigo Júnior^b, Carlos Henrique Lemos Soares^c e Jair Juarez João^d^aDepartamento de Engenharia Ambiental, Universidade do Estado de Santa Catarina, 88520-000 Lages – SC, Brasil^bDepartamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis – SC, Brasil^cDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040970 Florianópolis – SC, Brasil^dDepartamento de Engenharia Química, Universidade do Sul de Santa Catarina, 88704-900 Tubarão – SC, Brasil

Recebido em 10/04/2013; aceito em 02/09/2013; publicado na web em 09/10/2013

IMMOBILIZATION OF LACCASE (*Aspergillus sp.*) ON CHITOSAN AND ITS APPLICATION IN THE BIOCONVERSION OF PHENOLS IN PACKED BED REACTORS. The immobilization of laccase on chitosan by cross-linking and application of the immobilized laccase in the bioconversion of phenolic compounds in batch and fixed bed reactors were studied. The process for immobilization of enzyme was optimized using a rotational central composite design. The optimized conditions to generate immobilized laccase with maximal activity were determined to be a glutaraldehyde concentration of 1.0% (v/v), a pH of 6.0, an immobilization time of 5.0 hours and an enzyme concentration of 5.2 g L⁻¹. In packed bed reactors, the activity of the immobilized enzyme is maintained for a longer time in the bioconversion of 2,6-dimethoxyphenol than in the bioconversion of syringaldazine.

Keywords: laccase; chitosan; packed bed reactors.

INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental causada por fenóis demanda atenção devido à sua elevada toxicidade para plantas e animais. Mesmo em baixas concentrações (< 1 mg L⁻¹), sua presença pode modificar o gosto e o sabor da água. Além disso, estes compostos são considerados persistentes e bioacumulativos no meio ambiente.¹

Fenóis são encontrados em diversos efluentes industriais como os provenientes das indústrias têxtil, papel e celulose, petroquímica, plástico, resinas, farmacêutica e de fabricação de pesticidas.² As concentrações típicas de fenóis nestes efluentes são entre 100 e 1000 mg L⁻¹.³ Devido a sua elevada toxicidade, os processos biológicos usados para remediação destes compostos apresentam baixa eficiência em concentrações acima de 100 mg L⁻¹.⁴ Assim, processos físico-químicos são utilizados como uma alternativa para remoção de fenóis em efluentes líquidos.⁵ No entanto, o elevado custo desses processos é um fator motivador ao estudo e desenvolvimento de novas metodologias de remediação de fenol em efluentes líquidos, sendo o tratamento enzimático um deles.

A oxidação de fenóis catalisada por enzimas (usando peroxidases e polifenoloxidases) vêm apresentando resultados promissores com relação à remediação destes compostos em efluentes líquidos.⁶⁻⁹ Polifenoloxidases são aplicadas na hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois e em seguida, na presença de oxigênio molecular, realizam a oxidação até *o*-quinonas. Estes compostos são então polimerizados e precipitados, sendo facilmente removidos por processos de coagulação e floculação.¹⁰

Lacases (EC 1.10.3.2) são polifenoloxidases que catalisam a oxidação de uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo mono e polifenóis, aminas, metoxifenóis e aminas aromáticas, com redução concomitante do oxigênio para água. A enzima utiliza o oxigênio dissolvido na água como acceptor final de elétrons, tornando este processo mais atrativo em relação àqueles que utilizam peroxidases, onde o peróxido de hidrogênio é o agente oxidante. As

lacases têm sido estudadas em várias aplicações biotecnológicas, como a biodegradação de xenobióticos e efluentes industriais, descoloração de corantes, bioremediação de solos contaminados, produção de etanol, clarificação de vinhos e chás e utilização em biosensores.¹¹⁻¹³

A aplicação de enzimas em processos industriais torna o processo mais atrativo quando elas podem ser imobilizadas em um suporte inerte, permitindo a sua fácil separação após a reação. Além deste fator, enzimas imobilizadas conferem maior estabilidade operacional ao catalisador e permitem a sua reutilização após uma série de ciclos reacionais.¹⁴ Após a imobilização, a enzima pode ser aplicada em reatores de leito fixo (PBR), que são largamente usados em processos envolvendo elevada capacidade produtiva.¹⁵⁻¹⁷ Embora um grande número de trabalhos envolvendo a aplicação de lacase na bioconversão de fenóis em sistemas batelada tenha sido publicado,^{7,18} não existem trabalhos relevantes que descrevam a aplicação de reatores contínuos para o propósito em questão. Além disso, estudos exploratórios com relação à avaliação da estabilidade da enzima na bioconversão de fenóis, o qual é um dos principais fatores para viabilizar sua aplicação ambiental, devem ser considerados no sentido de aproximar esta técnica de aplicações em escala real.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho da enzima lacase de *Aspergillus sp.* imobilizada na bioconversão de fenóis em reatores de leito fixo. Considerando as inúmeras variáveis envolvidas no procedimento de imobilização, optou-se pelo uso da ferramenta do planejamento experimental para otimização da imobilização da lacase em esferas de quitosana.

PARTE EXPERIMENTAL**Enzima**

Os experimentos foram realizados com lacase de *Aspergillus sp.* comercializada pela Novozymes (Dinamarca) como Denilite™. Como suporte foi utilizado quitosana (417963) adquirida da Sigma-Aldrich (Alemanha) com grau de desacetilação de 86,94 %. Foi ainda utilizado

*e-mail: skoronski@cav.udesc.br

glutaraldeído (25 %), siringaldazina e 2,6-dimetóxfenol. Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

Otimização do processo de imobilização

A quitosana (0,5 g) foi inicialmente dissolvida em 40 mL de ácido acético 5% (m/v). O gel obtido foi gotejado com o auxílio de uma bomba peristáltica em um banho de precipitação (NaOH 2 mol L⁻¹). As esferas foram mantidas nessa solução por 12 h. Após esse período, as esferas foram separadas e lavadas com água deionizada até a água de lavagem atingir pH por volta de 8,0. Em seguida, as esferas foram ativadas em solução de glutaraldeído (0,5 a 5% v/v) para formação de ligação cruzada. As esferas de quitosana ativadas foram lavadas com água deionizada para remover o excesso de aldeído. Essa operação foi conduzida até a água de lavagem apresentar um resultado negativo para o teste com reagente de Feder, preparado com tiosulfato de sódio e cloreto de mercúrio.¹⁹ As condições de imobilização da lacase foram otimizadas por meio de um planejamento experimental do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional) com replicata do ponto central, considerando como fatores a concentração de glutaraldeído (0,5 a 5% v/v), tempo (1 a 9 h), pH de imobilização (3,5 a 8,0) e concentração de enzima (1,0 a 10,0 g L⁻¹). Como variável resposta foi considerada a atividade enzimática do biocatalisador. Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do programa STATISTICA (StatSoft, Inc., version 7).

Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima foi medida utilizando siringaldazina como substrato padrão. Este método é baseado na oxidação da siringaldazina gerando sua quinona respectiva (absorção a 525 nm e $\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As determinações foram conduzidas em um espectrofotômetro UV-Vis (Varian 300 Carry). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de substrato por minuto.

Aplicação em reatores de leito fixo

A estabilidade operacional da enzima foi avaliada em reator de leito fixo (coluna de vidro medindo 8 mm de diâmetro e 200 mm de altura) empacotado com diferentes massas do biocatalisador de 0,5, 1,0 e 2,0 g, correspondendo a atividades enzimáticas em torno de 50, 100 e 200 U (medidas com siringaldazina), respectivamente. O reator foi provido de controle de temperatura (camisa externa de recirculação) que permitiu operar o sistema em três condições experimentais: 20, 30 e 40 °C (Figura 1). Dois substratos foram utilizados: siringaldazina dissolvido em tampão tartarato (pH 5,0) e

2,6-dimetóxfenol (DMP) dissolvido em tampão tartarato (pH 4,0). Em ambos os casos a concentração de substrato foi de 10 mg L⁻¹ e a vazão de alimentação do reator fixada em 50 mL h⁻¹. A geração do produto de oxidação foi monitorada a 525 nm no caso da siringaldazina e a 470 nm para os experimentos com DMP.

RESULTADOS

Imobilização da enzima lacase em quitosana

A matriz fatorial juntamente com os dados obtidos é apresentada na Tabela 1, incluindo ainda os dados preditos por um modelo de segunda ordem.

Com os dados experimentais apresentados na Tabela 1, foi possível gerar as seguintes superfícies de resposta como apresentado na Figura 2.

Tabela 1. Delineamento experimental aplicado, apresentando a combinação dos fatores envolvidos na imobilização da lacase na quitosana ([Glu] é a concentração de glutaraldeído em % (v/v) e [E] é a concentração de enzima em g L⁻¹) e os resultados experimentais obtidos

Teste	Fatores				Atividade (U g ⁻¹)	
	pH	[Glu] (%)	Tempo (h)	[E] (g L ⁻¹)	Experimental	Predito
1	4	1	2,5	2	15,19	15,67
2	4	1	2,5	6	46,85	42,15
3	4	1	5,5	2	35,20	30,09
4	4	1	5,5	6	85,01	86,14
5	6,5	1	2,5	2	10,89	7,27
6	6,5	1	2,5	6	29,60	32,93
7	6,5	1	5,5	2	23,48	25,62
8	6,5	1	5,5	6	103,38	80,85
9	4	4	2,5	2	20,27	35,89
10	4	4	2,5	6	46,68	46,53
11	4	4	5,5	2	34,52	32,84
12	4	4	5,5	6	80,30	73,06
13	6,5	4	2,5	2	15,30	23,20
14	6,5	4	2,5	6	36,28	33,02
15	6,5	4	5,5	2	29,13	24,08
16	6,5	4	5,5	6	68,40	63,47
17	5,5	0,5	4	4	21,47	42,59
18	5,5	5	4	4	48,59	44,98
19	3,5	3	4	4	63,85	61,38
20	8	3	4	4	54,68	61,42
21	5,5	3	1	4	31,93	16,54
22	5,5	3	9	4	51,08	59,92
23	5,5	3	4	1	20,27	3,23
24	5,5	3	4	10	15,62	23,07
25	5,5	3	4	4	32,22	41,94
26	5,5	3	4	4	41,90	41,94
27	5,5	3	4	4	46,33	41,94
28	5,5	3	4	4	40,21	41,94
29	5,5	3	4	4	40,75	41,94
30	5,5	3	4	4	38,43	41,94
31	5,5	3	4	4	32,22	41,94
32	5,5	3	4	4	40,34	41,94
33	5,5	3	4	4	46,56	41,94
34	5,5	3	4	4	40,33	41,94
35	5,5	3	4	4	40,75	41,94
36	5,5	3	4	4	39,43	41,94

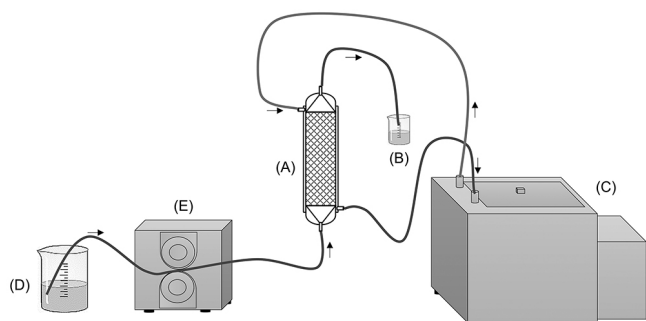


Figura 1. Diagrama esquemático mostrando os dispositivos empregados para avaliar a bioconversão dos compostos fenólicos com a lacase imobilizada em um reator contínuo (PBR). (A) reator de leito fixo, (B) coletor de amostras, (C) banho termostatizado, (D) solução de alimentação, (E) bomba peristáltica

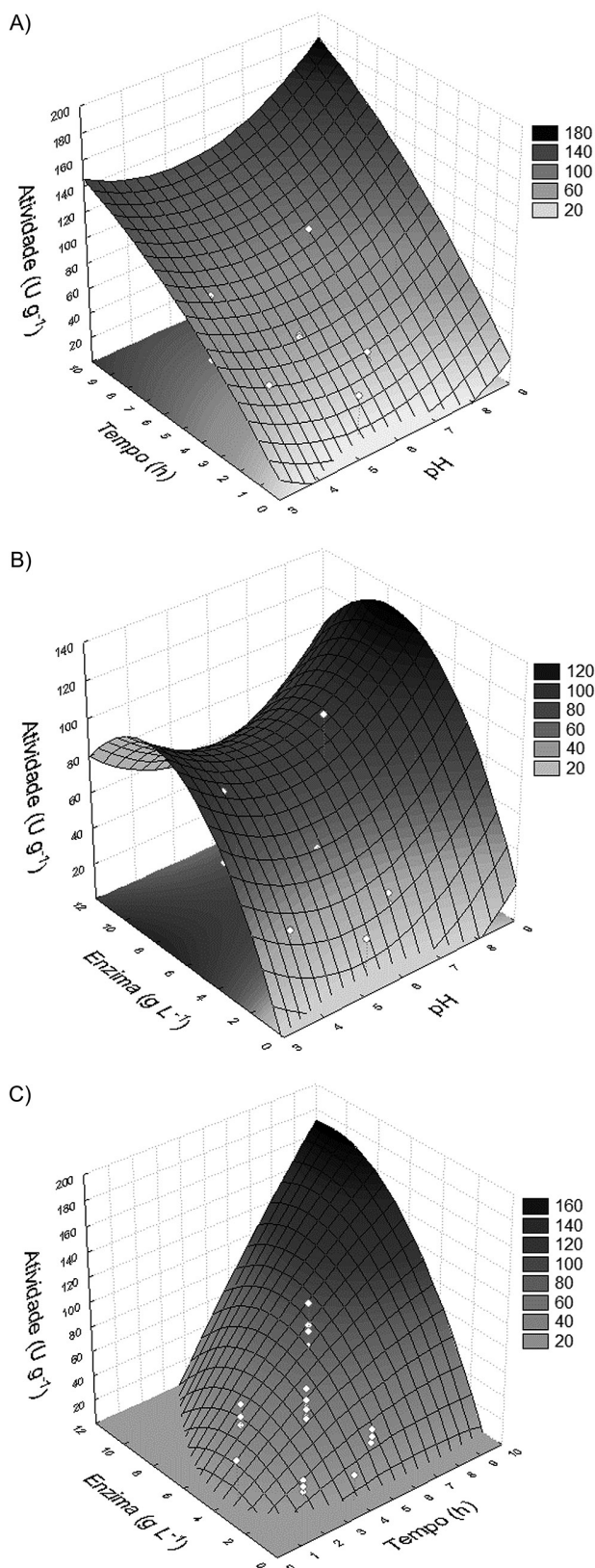


Figura 2. Superfícies de respostas apresentando as relações de efeito da concentração de glutaraldeído, pH e tempo de imobilização e concentração de enzima sobre a atividade enzimática

Os resultados demonstram que existem faixas de valores dos fatores experimentais que afetam de forma significativa a atividade da enzima obtida após o processo de imobilização. Este processo

envolve a ligação de resíduos de aminoácidos da enzima ao suporte. Uma vez que a enzima necessita conservar suas distâncias intermoleculares, o processo de imobilização torna a estrutura da enzima mais rígida. Assim, a enzima se torna mais resistente à presença de agentes desnaturantes. Entretanto, quando a quantidade de ligações cruzadas é elevada, devido a altas concentrações de glutaraldeído ou tempo prolongado de imobilização, existe um aumento na rigidez da enzima ligada, afetando negativamente a sua conformação e, como consequência, uma menor atividade enzimática é observada.

Para baixas concentrações de enzima, existe um menor número de ligações entre a enzima e o suporte, criando assim, um sistema com baixa atividade enzimática como apresentado nas Figuras 2-B) e C). Um aumento na atividade do sistema enzima-suporte foi observado para valores de concentração de enzima no meio entre 5,0 a 6,0 g L⁻¹. Isto pode ser ocasionado pela elevada quantidade de enzimas no meio, permitindo assim uma maior difusividade destas substâncias. De acordo com a Tabela 2, este é o fator mais significativo para o processo de imobilização.

Tabela 2. Tabela ANOVA para determinação das variáveis significativas

	SS	DF	MS	F	Valor-P
pH (L)	434,65	1	434,649	22,5601	0,000600
pH (Q)	958,04	1	958,039	49,7262	0,000021
Glu (L)	10,71	1	10,713	0,5561	0,471486
Glu (Q)	9,97	1	9,970	0,5175	0,486925
Tempo (L)	3057,23	1	3057,228	158,6827	<0,000001
Tempo (Q)	188,76	1	188,755	9,7972	0,009577
Enz (L)	5609,23	1	5609,232	291,1422	<0,000001
Enz (Q)	3090,23	1	3090,228	160,3955	<0,000001
pH x Glu	19,11	1	19,106	0,9917	0,340731
pH x Tempo	15,63	1	15,634	0,8115	0,386988
pH x Enz	0,68	1	0,681	0,0353	0,854327
Glu x Tempo	317,12	1	317,119	16,4598	0,001893
Glu x Enz	257,50	1	257,505	13,3655	0,003782
Tempo x Enz	874,38	1	874,385	45,3842	0,000032
Falta de Ajuste	2200,78	10	220,078	11,4229	0,000187
Erro puro	211,93	11	19,266	-	-
Total SS	14127,00	35	-	-	-

(valor-P < 0,05 e R² = 0,8291), MS: quadrados médios, SS: soma dos quadrados, DF: grau de liberdade, Glu: concentração de glutaraldeído e Enz: concentração de enzima.

Com relação ao tempo de imobilização, o segundo fator mais significativo de acordo com a análise de variância (Tabela 2), quando o tempo de imobilização é prolongado, um maior valor na atividade enzimática foi observado (Figura 2-A), e C)), demonstrando que o tempo de contato entre o suporte e a enzima é um importante fator para ser considerado neste sistema de imobilização.

Com relação ao pH e à concentração de glutaraldeído, foi observado que esses fatores são menos significativos com relação à atividade enzimática conferida ao biocatalisador. Em particular, a concentração de glutaraldeído, como fator isolado, não apresenta efeito significativo sobre o processo de imobilização. O fator concentração de glutaraldeído somente é significativo quando combinado com outros fatores como a concentração de enzimas e o tempo de imobilização (Tabela 2).

Estes resultados demonstram a importância da otimização das

condições experimentais, utilizando o DCCR como ferramenta de planejamento experimental, no sentido de se buscar as condições otimizadas de atividade catalítica no processo de imobilização.

Uma vez que os valores de P e F do modelo foram 0,000187 e 11,4229, respectivamente, o modelo estimado ajustou-se bem aos dados experimentais (Tabela 2). O coeficiente de determinação R^2 do modelo foi determinado, sendo igual a 0,8291.

A condição experimental que permitiu a produção de um biocatalisador com a mais elevada atividade enzimática envolveu a concentração de glutaraldeído de 1% (v/v), pH de imobilização igual a 6,0, concentração de enzima de 5,2 g L⁻¹ e tempo de imobilização de 5,0 horas. As esferas de quitosana contendo a enzima imobilizada sob as condições otimizadas de imobilização apresentaram uma massa média individual de 19,7 ± 0,1 mg, diâmetro médio de 3,1 ± 0,1 mm e massa específica média de 1,35 ± 0,03 g cm⁻³.

Aplicação da lacase imobilizada em reator de leito fixo

A estabilidade do biocatalisador obtido foi avaliada utilizando dois substratos típicos para enzima lacase, siringaldazina e DMP em reator de leito fixo.

As Figuras 3 a 5 apresentam os resultados do monitoramento do produto de bioconversão da siringaldazina, catalisada pela lacase imobilizada em quitosana empregando diferentes carregamentos de enzima (0,5 a 2,0 g) e temperatura (20 a 40 °C).

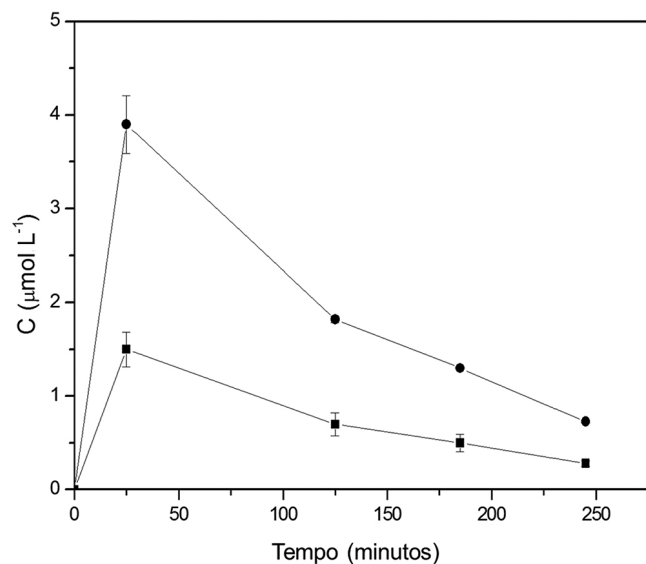


Figura 3. Valores de concentração do produto de oxidação da siringaldazina medido a 525 nm em amostras coletadas na saída do reator. O fluxo de alimentação foi de 50 mL h⁻¹, concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg L⁻¹ e temperatura de 20 °C. (■ 1,0 g, ● 2,0 g)

Em todas as condições avaliadas, verifica-se que o biocatalisador perde rapidamente a atividade enzimática ao longo do tempo. Esta desativação é maior quando se eleva a temperatura de operação do sistema. Analisando a aparência visual do biocatalisador antes e após sua aplicação no reator, foi constatada a modificação da coloração para tom mais escuro, devido à adsorção dos produtos de oxidação da siringaldazina no suporte (esferas de quitosana), que provavelmente atuou no sentido de reduzir a atividade catalítica da enzima. Além disso, a presença de um intermediário de reação que modifica quimicamente a enzima pode também ser responsável pelo efeito observado.

Os resultados demonstraram que o aumento da quantidade de biocatalisador adicionado ao reator promoveu um aumento na formação do produto em qualquer temperatura (20 a 40 °C).

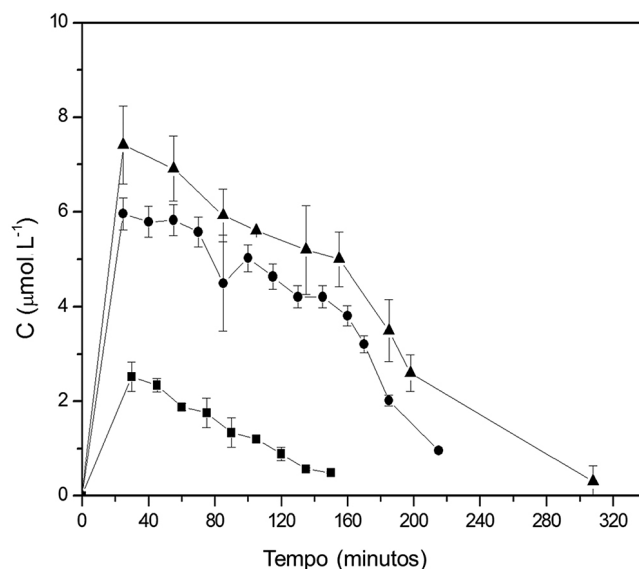


Figura 4. Valores de concentração do produto de oxidação da siringaldazina medido a 525 nm em amostras coletadas na saída do reator. O fluxo de alimentação foi de 50 mL h⁻¹, concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg L⁻¹ e temperatura de 30 °C. (■ 0,5 g, ● 1,0 g e ▲ 2,0 g)

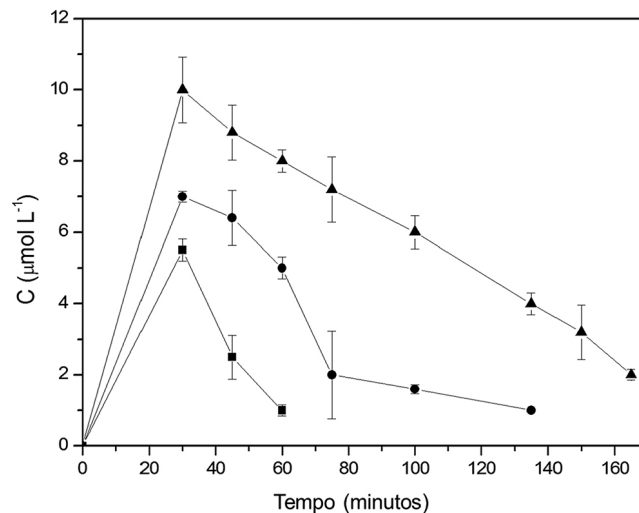


Figura 5. Valores de concentração do produto de oxidação da siringaldazina medido a 525 nm em amostras coletadas na saída do reator. O fluxo de alimentação foi de 50 mL h⁻¹, concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg L⁻¹ e temperatura de 40 °C. (■ 0,5 g, ● 1,0 g e ▲ 2,0 g)

Entretanto, associado ao aumento na taxa de bioconversão em função da temperatura ocorre aumento na perda de atividade do biocatalisador, que pode ser causada tanto pela geração de produto de oxidação adsorvido pelo suporte quanto pela degradação estrutural da enzima, em função da temperatura mais elevada. Estes valores são apresentados na Tabela 3.

Nos experimentos em que foi utilizado DMP como substrato modelo, foi observado uma maior estabilidade do biocatalisador ao longo do tempo, no sentido de manter a taxa de bioconversão do substrato. Os resultados são apresentados nas Figuras 6 a 8.

Foi observado que o aumento na quantidade de biocatalisador promoveu um aumento na bioconversão do substrato, semelhante ao comportamento dos experimentos que envolveram a utilização da siringaldazina como substrato padrão. As concentrações máximas

Tabela 3. Valores da concentração de produto formado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) pela oxidação da siringaldazina, nas condições de temperatura de 20 a 40 °C e quantidade de biocatalisador adicionado de 0,5 a 2,0 g

Quantidade de biocatalisador (g)	Temperatura (°C)		
	20	30	40
0,5	n.d.	2,52	5,51
1,0	1,52	5,96	7,02
2,0	4,05	7,41	10,05

n.d.: não detectado.

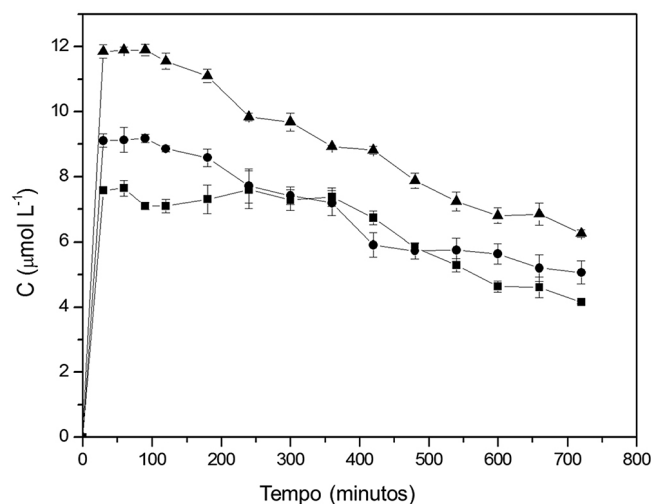


Figura 6. Concentração de produto de oxidação do DMP medido a 470 nm na corrente de saída do reator. A vazão de alimentação foi de 50 mL h⁻¹, a concentração de DMP na solução de alimentação igual a 10 mg L⁻¹ e a temperatura foi mantida a 20 °C. (■ 0,5 g, ● 1,0 g e ▲ 2,0 g de esferas)

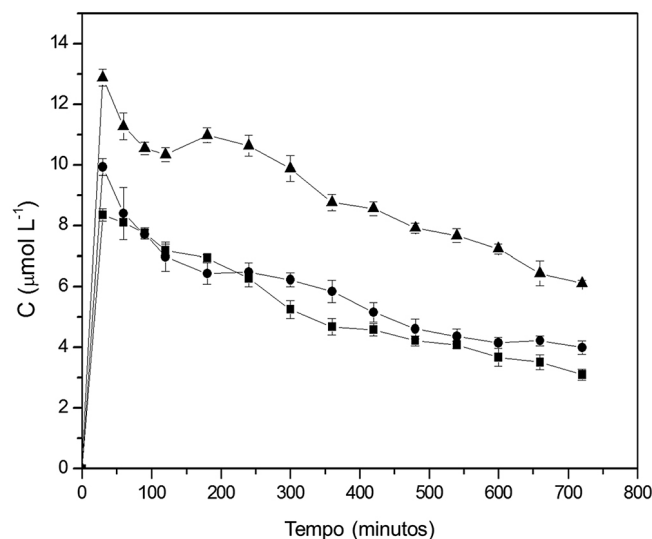


Figura 7. Concentração de produto de oxidação do DMP medido a 470 nm na corrente de saída do reator. A vazão de alimentação foi de 50 mL h⁻¹, a concentração de DMP na solução de alimentação igual a 10 mg L⁻¹ e a temperatura foi mantida a 30 °C. (■ 0,5 g, ● 1,0 g e ▲ 2,0 g de esferas)

obtidas nos experimentos conduzidos com DMP são apresentadas na Tabela 4.

Com relação à diminuição da capacidade de bioconversão no reator operado com DMP, ao longo do tempo, para uma quantidade de biocatalisador igual a 2,0 g, a concentração de produto diminui

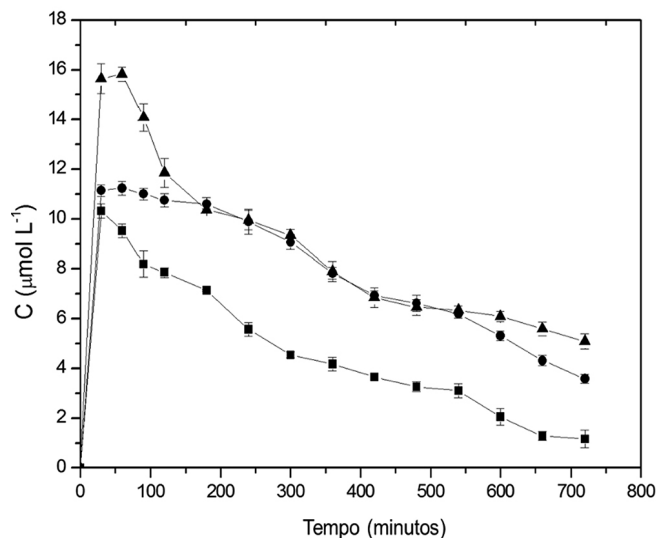


Figura 8. Concentração de produto de oxidação do DMP medido a 470 nm na corrente de saída do reator. A vazão de alimentação foi de 50 mL h⁻¹, a concentração de DMP na solução de alimentação igual a 10 mg L⁻¹ e a temperatura foi mantida a 40 °C. (■ 0,5 g, ● 1,0 g e ▲ 2,0 g de esferas)

Tabela 4. Valores da concentração de produto formado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) pela oxidação da DMP, nas condições de temperatura de 20 a 40 °C e quantidade de biocatalisador adicionado de 0,5 a 2,0 g

Quantidade de biocatalisador (g)	Temperatura (°C)		
	20	30	40
0,5	7,58	8,42	10,32
1,0	9,10	9,87	11,05
2,0	11,84	12,81	15,62

n.d.: não detectado.

de 11,84 para 6,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 720 minutos. Isto representa uma redução de aproximadamente 41% na atividade catalítica do biocatalisador, comparado à atividade máxima observada no início da operação do biorreator. Para outras quantidades de biocatalisador, a porcentagem de redução na atividade enzimática foi de 38 e 45% para quantidades de 1,0 e 0,5 g de esferas de quitosana com enzima, respectivamente. Esses valores foram calculados com base na redução da concentração do produto de oxidação, medido na saída do reator, que foi de 9,10 para 5,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a massa de 1,0 g e 7,58 para 4,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a massa de 0,5 g. Desta forma, uma menor massa de biocatalisador aplicada ao reator, quando sujeita à mesma carga de substrato, apresenta uma maior porcentagem de redução em sua atividade ao longo do tempo.

Para experimentos conduzidos a 30 °C, as reduções na atividade enzimática foram maiores que a 20 °C, atingindo valores de aproximadamente 50, 50 e 58% para massas de biocatalisador de 2,0, 1,0 e 0,5 g, respectivamente. Nesta condição experimental, foi observado novamente que a perda de atividade enzimática é similar nas maiores quantidades de biocatalisador utilizados (1,0 e 2,0 g), mas é maior na massa de 0,5 g.

Finalmente, para os experimentos conduzidos a 40 °C, a redução na atividade enzimática foi a mais acentuada dentre todas as condições experimentais testadas. Para as quantidades de enzima iguais a 1,0 e 2,0 g, as reduções foram de 68 e 60%, respectivamente. Para a massa de 0,5 g a redução na atividade enzimática foi de 86% (Figura 8).

O produto de oxidação do DMP apresentou uma coloração amarelada, permitindo seu monitoramento por espectrofotometria UV-VIS a 470 nm. No entanto, este composto é instável e em aproximadamente

3,0 h era convertido em composto insolúvel de coloração marrom formado pela polimerização de produtos de oxidação do DMP. Essa substância gerada na bioconversão foi provavelmente responsável pela redução na capacidade catalítica do biocatalisador devido à facilidade de ser adsorvida na superfície do biocatalisador. A adsorção desse composto foi verificada visualmente, observando a aparência das esferas de quitosana no início do processo e após 720 minutos de operação no reator.

CONCLUSÕES

A imobilização de lacase em quitosana nas condições otimizadas forneceu um sistema enzimático ativo para a bioconversão de substâncias fenólicas. Além de permitir o uso da enzima em diversos ciclos de oxidação, o processo de imobilização permitiu a aplicação da lacase em reatores PBR e favoreceu a estabilidade operacional do biocatalisador ao longo do tempo. Entre os dois substratos avaliados em fluxo contínuo, o desempenho do reator foi mais estável quando se utilizou como substrato DMP. A utilização de siringaldazina foi limitada devido à formação de compostos de oxidação que afetaram o desempenho do biocatalisador.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à NOVOZYMES por fornecer a enzima e à FAPESC, UNISUL e UFSC pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Russel, I. M.; Burton, S. G.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *389*, 161.
2. González, P. S.; Capozucca, C. E.; Tigier, H. A.; Milrad, S. R.; Agostini, E.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 647.
3. López-Molina, D.; Hiner, A. N. P.; Tudela, J.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J. N.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 738.
4. Hosseini, S. H.; Borghei, S. M.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 1027.
5. Moreno-Castilla, C.; Rivera-Utrilla, J.; Lopez-Ramón, M. V.; Carrasco-Marín, F.; *Carbon* **1995**, *33*, 845.
6. Durán, N.; Espósito, E.; *Appl. Catal., B* **2000**, *28*, 83.
7. Zhang, J.; Xu, Z.; Chen, H.; Zong, Y.; *Biochem. Eng. J.* **2009**, *45*, 54.
8. D'Annibale, A.; Stazi, S. R.; Vinciguerra, V.; Di Mattia, E.; Sermanni, G. G.; *Process Biochem.* **1999**, *34*, 697.
9. Xu, R.; Zhou, Q.; Li, F.; Zhang, B.; *Chem. Eng. J.* **2013**, *222*, 321.
10. Whiteley, C. G.; Lee, D. J.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *38*, 291.
11. Mayer, A. M.; Staples, R. C.; *Phytochemistry* **2002**, *60*, 551.
12. Couto, S. R.; Herrera, J. L. T.; *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 500.
13. Diaconu, M.; Litescu, S. C.; Radu, G. L.; *Sens. Actuators, B* **2010**, *145*, 800.
14. Fernandes, S. C.; de Oliveira I. R. W. Z.; Fatibello-Filho, O.; Spinelli, A.; Vieira, I. C. *Sens. Actuators, B* **2008**, *133*, 202.
15. Shuler, M.; Kargi, F.; *Bioprocess Engineering*, 2nd ed., Prentice Hall: New Jersey, 1992.
16. Cristóvão, R. O.; Tavares, A. P. M.; Ribeiro, A. S.; Loureiro, J. M.; Boaventura, R. A. R.; Macedo, E. A. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 4768.
17. Cabana, H.; Alexandre, C.; Agathos, S. N.; Jones, J. P.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3447.
18. Sadighi, A.; Faramarzi, M. A.; *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2013**, *44*, 156.
19. Morita, T.; Assumpção, R. W. V.; *Manual de soluções, reagentes e solventes*, Edgard Blüchner: São Paulo, 1995.