



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

ILOIR GAIO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DE
PECTINASES COMERCIAIS IMOBILIZADAS E SUBMETIDAS
AO TRATAMENTO COM GÁS LIQUEFEITO DE PETRÓLEO**

Tese submetida ao Programa de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Coorientadora: Prof^a Dr^a. Eunice Valduga

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Gaio, Iloir

Avaliação da Atividade e Estabilidade de Pectinases Comerciais Imobilizadas e Submetidas ao Tratamento com Gás Liquefeito de Petróleo / Iloir Gaio ; orientador, Agenor Furigo Junior ; coorientadora, Euice Valduga. - Florianópolis, SC, 2016.

224 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Pectinases. 3. gelatina. 4. Pectina liase. 5. Gás Liquefeito de Petróleo. I. Furigo Junior, Agenor. II. Valduga, Eunice. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Iloir Gaio

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DE
PECTINASES COMERCIAIS IMOBILIZADAS E SUBMETIDAS
AO TRATAMENTO COM GÁS LIQUEFEITO DE PETRÓLEO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Orientador

Prof^a. Dr^a Eunice Valduga
Coorientadora

Prof^a. Dr^a. Cíntia Soares
Coordenador

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira

Dr^a. Alexandra Valério

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

Prof^a. Dr^a. Geciane Toniazco Backes

Florianópolis SC, 27 de Abril de 2016

Dedico este trabalho aos educadores que utilizam a educação como ferramenta para levar o conhecimento aos seus semelhantes.

AGRADECIMENTOS

Aos Meus Queridos Pais Júlio e Maria Gaio (*in memoriam*)

Aos professores Agenor Furigo Jr. e Eunice Valduga pelo estímulo e orientação.

Aos professores dos programas de Pós-Graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, Gláucia M. Falcão de Aragão, Jorge Luiz Ninow, Haiko Hense, Leonel Teixeira Pinto, Luismar Marques Porto, Mara Gabriela Novy Quadri, Regina Vasconellos Antônio pelos ensinamentos e bons momentos de convivência.

Aos demais professores do programa que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos Colegas de disciplinas Estácio Jussie Odisi, Juliana Mariotto e Valdelúcia Grinevicius, pela amizade, convivência pelos momentos de estudos e aprendizado.

Aos demais colegas Afonso, Jonas, José, Júlia, Marcelo, Paulo, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas professores Fábio Garcia Penha, Jarbas Kleber Ferrari e Márcio Mazutti pelo auxílio e amizade.

Aos colegas de URI Erechim Naiane Marcon, Marceli Fernandes, Ilizandra Fernandes, Cindy Bustamante, Simone Golunski, Valéria B., Jonaina Pili, Tássio Benazzi (*in memoriam*), Gustavo Ceni, Juliana Soares, Graciele Kuhn, Nádia Nyari, Rosicler Colet, Juliana Flach, pelo convívio, colaboração e amizade.

Às bolsistas da URI Erechim Adriana Graboski, Debóra Z. Flores, Carolina Elisa Demaman Oro e Carolina Polina, pela amizade e pelo auxílio na realização da etapa experimental.

Aos colegas professores da URI – Erechim Rogério Marcos Dallago, Marcus V. Tres, Jamile Zeni, Eunice Valduga, Cláudio A. Zakrzewski, pelo auxílio, sugestões e colaborações durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal da central de materiais da URI - Erechim, pelo apoio técnico para a realização dos experimentos.

À Eliane Mírian Kaplan pelo amor, incentivo e companheirismo.

À Sandra Rigo e Roberto Rotta pelo apoio.

À Minhas queridas irmãs Geni Gaio Farias e Ivani Gaio Gazola pelo apoio.

Ao Jairo Gazola e Eduardo Gazola pela colaboração e amizade.

À LNF – Latino - americana pelo fornecimento das enzimas comerciais.

À Gelita pelo fornecimento da Gelatina.

À Empresa de Flexíveis Poliuretanos - Mannes

À UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina e URI – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI Erechim, pelo apoio na realização deste projeto.

Por mais íngreme que seja o caminho, sempre é possível chegar ao cume.

RESUMO

As enzimas pectinases têm sido amplamente utilizadas em muitos segmentos industriais, como indústria de alimentos, têxtil, papel, antifúngicos, entre outros. Com intuito de aumentar a viabilidade técnica e econômica na utilização destas enzimas em diversos processos, torna-se necessário buscar alternativas para aumentar a estabilidade e a atividade enzimática. Neste contexto, no presente estudo investigou-se a influência de gás liquefeito de petróleo (GLP) pressurizado, ou seja, os efeitos das variáveis pressão (30–190 bar), tempo de reação (1–6 h) e taxa de despressurização (20–100 bar/min) sobre as atividades enzimáticas de pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) de duas pectinases comerciais (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash), imobilizadas em suporte de gelatina-alginato de sódio e poliuretano, mediante o emprego de metodologia de planejamento de experimentos. Avaliou-se também o rendimento de imobilização, os ciclos de reutilização, a estabilidade térmica em baixas (- 80°C, -18 °C e 4 °C) e em altas temperaturas (25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C), a aplicação na clarificação de suco de pêssego e os ciclos de reutilização no processo de clarificação. O complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte de gelatina-alginato ao ser tratado com GLP, obteve aumento de 14 % da atividade de pectina liase (PMGL) e de 19 % de pectinametilsterase (PME) quando comparada com a atividade inicial da enzima, nas condições de 110 bar de pressão, tempo de reação de 3,5 h e despressurização de 60 bar/min. Da mesma forma, obteve-se um incremento na atividade residual de pectina liase (Pectinex® Mash) de 38 % quando submetida a uma pressão de 190 bar por 1 hora e despressurizada a uma taxa de 20 bar/min de 11 % sobre a atividade de pectinametilsterase a 110 bar por 3,5 h e despressurizada a uma taxa de 60 bar/min⁻¹. O complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte de Poliuretano (PU) ao ser tratado com GLP obteve aumento de 56% de atividade de pectinametilsterase (PME) quando comparada com a atividade inicial da enzima, nas condições de 190 bar pressão, tempo de reação de 6 h e despressurização de 20 bar/min. O complexo enzimático Pectinex® Mash teve 3 % de aumento de atividade de pectinametilsterase (PME) quando comparado com a atividade inicial da enzima, nas condições de 110 bar de pressão por 3,5 h e despressurizada a uma taxa de 60 bar/min. Após o tratamento em GLP o extrato enzimático Pectinex® Mash imobilizado em gelatina-alginato manteve aproximadamente 60 % da atividade residual de

PMGL até o 6º ciclo de reuso. No entanto, os imobilizados de PME (Pectinex® Mash) e PMGL (Pectinex® Ultra SP-L) mantiveram suas atividades de aproximadamente 40 % até o 5º e 3º ciclo, respectivamente. A PME do complexo Pectinex® Ultra SP-L apresentou aproximadamente 67 % de atividade residual no 2º ciclo. A estabilidade térmica dos complexos enzimáticos estudados foram avaliados em diferentes temperaturas, nas formas livre, imobilizada e imobilizada/tratada com gás GLP pressurizado. De modo geral, as enzimas do complexo Pectinex® Mash mostraram-se estáveis em todas as temperaturas estudadas, enquanto que as enzimas do complexo Pectinex® Ultra SP-L não mostraram resposta em algumas temperaturas altas. Este comportamento pode ser devido a rápida desnaturação da proteína que estrutura a enzima. Observou-se um aumento da estabilidade para as enzimas tratadas com fluido pressurizado (GLP), mostrando influencia do gás sobre a estabilidade e atividade enzimática. O gás GLP influenciou positivamente na clarificação de suco de pêssego, pois na concentração de enzima de 0,00125 %, a enzima PME clarificou 26 % a mais o suco em relação ao padrão (apenas imobilizada), e a enzima PMGL clarificou 52,6 % a mais. Desse modo, é possível inferir que a enzima PMGL do complexo comercial Pectinex® Ultra SP-L mostrou melhores resultados. Resultados semelhantes foram obtidos para o complexo Pectinex® Mash. As enzimas (PME e PMGL) do complexo Pectinex® Mash imobilizadas e tratadas com gás GLP apresentaram atividade relativa até o 7º ciclo de utilização tanto para clarificação quanto para redução de turbidez, quando a atividade relativa atingiu 40%. Estes resultados mostram o potencial de aplicação de enzimas imobilizadas e tratadas com gás GLP.

Palavras-chave: Pectinases, gelatina, poliuretano, Pectina liase, Pectinametilesterase, Gás Liquefeito de Petróleo.

ABSTRACT

Pectinase enzymes have been widely used in many industries, such as the food, textiles, paper and anti-fungal sectors, to name a few. In order to increase these enzymes' technical and economical viability in various processes, it is necessary to search for alternatives that will increase both the enzymatic activity and stability. In this context, this study has investigated the influence of pressurized liquefied petroleum gas (LPG), or in other words, the effects of variables such as; pressure (30-190 bar), reaction time (1-6h) and depressurization (20-100 bar/min⁻¹) on pectin lyase (PMGL) and pectin methylesterase (PME) enzymatic activities from two commercial pectinases (Pectinex™ Ultra SP-L and Pectinex™ Mash) immobilised in sodium alginate-gelatin and polyurethane carrier, employing the experiments planning methodology. There have been evaluations of immobilization yield, reuse cycles, thermal stability in low (-80°C, -18°C and 4°C) and high temperatures (25°C, 30°C, 40°C, 50°C and 60°C), as well as clarification applied on peach juice and the reuse cycles on the clarification process. The enzymatic complex Pectinex™ Ultra SP-L immobilized in an alginate-gelatin carrier and treated with LPG had a 14% increase on pectin lyase (PMGL) activity and a 19% increase on pectin methylesterase (PME) activity when compared to the enzyme's initial activity at 110bar pressure, 3h30m reaction time and 60bar/min⁻¹ depressurization level. In the same way, there was a 38% increase on the pectin lyase (Pectinex™ Mash) residual activity when submitted to 190bar pressure for 1 hour and depressurized at a 20bar/min⁻¹ rate and at 11% on the pectin methylesterase activity at 110bar for 3h30m and depressurized at a 60bar/min⁻¹ rate. The enzymatic complex Pectinex™ Ultra SP-L immobilized with Polyurethane (PU) carrier, when treated with LPG, had a 56% increase on pectin methylesterase (PME) activity when compared to the enzyme's initial activity with 190bar pressure, 6h reaction time and 20bar/min⁻¹ depressurization. The enzymatic complex Pectinex™ Mash had a 3% pectin methylesterase (PME) activity increase when compared to the enzyme's initial activity at 100bar pressure for 3h30min and depressurized at a 60 bar/min⁻¹ rate. After the LPG treatment, the enzymatic extract Pectinex™ Mash immobilized in alginate-gelatin kept approximately 60% of PGML residual activity up until reuse cycle 6. However, the immobilized pectinases from PME (Pectinex™ Mash) and PMGL (Pectinex™ Ultra SP-L) maintained their activities at approximately 40% up to cycles 5 and 3, respectively. The Pectinex™

Ultra SP-L complex's PME presented approximately 67% residual activity on cycle 2. The enzymatic complex thermal stability was assessed at different temperatures in free, immobilized and immobilized/treated forms with pressurized LPG gas. On the whole, the Pectinex™ Mash complex enzymes have presented stability for all studied temperatures, whereas the Pectinex™ Ultra SP-L complex enzymes have not responded under some high temperatures. It has been noticed a stability increase for the enzymes treated with pressurized fluid (LPG), presenting a gas influence on both the enzymatic stability and activity. The LPG gas influenced the peach juice clarification positively, since the PME enzyme clarified 26% more juice in relation to the only-immobilized pattern and the PMGL enzyme clarified 52.6% more, both at a 0.00125% enzyme concentration level. Thus, it is possible to deduce that the PMGL enzyme of the Pectinex™ Ultra SP-L commercial complex presented better results. Similar results have been obtained for the Pectinex™ Mash complex. The (PME and PMGL) enzymes from the Pectinex™ Mash complex immobilized and treated with LPG gas presented relative activity up until usage cycle 7 for the clarification, as well as for the turbidity reduction when the relative activity reached 40%. Such results present a potential for the implementation of enzymes immobilized and treated with LPG gas.

Keywords: Pectinases, Gelatin, Polyurethane, Pectin Lyase, Pectin Methylsterase, Liquefied Petroleum Gas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modo de ação da pectinaesterase (JAYANI et al., 2005).....	43
Figura 2 - Modo de ação da pectina liase na substância pectica (YADAV et al., 2009).....	45
Figura 3 - Modo de ação da poligalacturonase (SATHYANARAYANA e PANDA, 2003).....	46
Figura 4 - Mecanismo de reação da pectinametilsterase sobre a pectina (WONG, 1995).....	47
Figura 5 - Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química de substâncias pecticas (GUMMANDI e PANDA, 2003).....	48
Figura 6 - Métodos de imobilização de enzimas em diferentes suportes (DALLA-VECCHIA et al., 2004).....	55
Figura 7 - Modelo “caixa de ovo” para a formação do gel de alginato com íons cálcio (FUNDUEANU et al., 1999).....	59
Figura 8 - Esquema da determinação da atividade da enzima pectina liase (PMGL).....	89
Figura 9 - Esquema da determinação da atividade da enzima pectinametilsterase (PME).....	90
Figura 10 - Fluxograma de imobilização das pectinases em suporte gelatina-alginato.....	105
Figura 11 - Apresentação esquemática do procedimento de imobilização da pectinase em suporte de poliuretano (PU).....	106
Figura 12 - Diagrama do tratamento enzimático com fluido pressurizado (GLP).....	111
Figura 13 - Diagrama esquemático do aparato utilizado no tratamento das enzimas com o fluido pressurizado. A - reservatório de solvente; B - banho termostático; C - bomba de seringa; D - reator/célula de aço; E - Indicador de pressão; F - Transdutor de pressão; G - válvula micrométrica.....	113
Figura 14 - Aparato utilizado no tratamento das enzimas com o fluido pressurizado. 1- Banho Termostático; 2- Bomba de seringa; 3- Transdutor de pressão, temperatura e agitação; 4- Reator/célula de aço equipada com manômetro e manta de aquecimento; 5- Cilindro contendo gás GLP.....	113
Figura 15 - Detalhes da célula montada e acoplada ao equipamento de alta pressão (a) e em (b) da célula de aço inoxidável com capacidade para 36 g de imobilizado pectinolítico.....	114

Figura 16 - Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2 ³ para a atividade residual de PME do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L.....	118
Figura 17 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade residual de pectina liase (Pectinex® Ultra SP-L) submetida ao tratamento com GLP pressurizado: (a) tempo e pressão; (b) taxa de despressurização e pressão; (c) despressurização (R) e tempo, respectivamente.....	121
Figura 18 - Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do planejamento fatorial 2 ³ para a atividade enzimática de pectinametilsterase (PME) do complexo Pectinex® Mash.....	124
Figura 19 - Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2 ³ para a atividade enzimática de pectina liase (PMGL) do complexo Pectinex® Mash.....	126
Figura 20 - Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2 ³ para a atividade enzimática de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L.....	129
Figura 21 - Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2 ³ para a atividade enzimática de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L.....	131
Figura 22 - Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2 ³ para a atividade enzimática de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash.....	133
Figura 23 - Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2 ³ para a atividade enzimática de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash.....	135
Figura 24 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização (Ensaio 1 PMGL: 190 bar, tempo de 1 h e 20 bar/min; Ensaio 2 PME: 110 bar, tempo de 3,5 h e 60 bar/min).....	136
Figura 25 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização (Ensaio 1	

PMGL: 30 bar, tempo de 1 h e 100 bar/min; Ensaio 2 PME: 110 bar, tempo de 3,5 h e 60 bar/min).....	137
Figura 26 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial (Pectinex® Mash) imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização na clarificação de suco de pêssigo nas condições de ensaio Mash PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min ⁻¹ ; Mash PMGL Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min ⁻¹	174
Figura 27 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial (Pectinex® Mash) imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização redução de turbidez de suco de pêssigo nas condições de ensaio Mash PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min ⁻¹ ; Mash PMGL Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min ⁻¹	174
Figura 28 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial (Pectinex® Ultra SP-L) imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização na clarificação de suco de pêssigo nas condições de ensaio Ultra PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min ⁻¹ ; Ultra SP -L PMGL Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min ⁻¹	175
Figura 29 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial (Pectinex® Ultra SP-L) imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização redução de turbidez de suco de pêssigo nas condições de ensaio Ultra SP -L PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min ⁻¹ ; Ultra SP -LPMGL Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min ⁻¹	176

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades críticas de vários solventes (Wen et al., 2009).....	64
Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados nos planejamentos 1 e 2 para os dois complexos enzimáticos em estudo (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L).....	92
Tabela 3 - Matriz do DCCR (valores reais) com a resposta em termos de atividade enzimática de PME, PMGL, proteína e atividade específica de PME e PMGL, em função do pH e temperatura, da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L.....	94
Tabela 4 - Tabela 4 – Matriz do DCCR (valores reais) com a resposta em termos de atividade enzimática de PME, PMGL, proteína e atividade específica de PME e PMGL, em função do pH e temperatura, da pectinase comercial Pectinex® Mash.....	97
Tabela 5 - Valores de K_M e V_{Max} obtidos para as enzimas PME e PMGL dos complexos Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L estudados.....	99
Tabela 6 - Comparação das atividades enzimáticas de PMGL e PME dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash livre e imobilizado em suporte de gelatina-alginato e poliuretano.....	107
Tabela 7 - Resultados referente ao rendimento de imobilização em gelatina-alginato para os complexos enzimáticos Pectinex® Ultra SP-L e Mash (enzimas PMGL e PME).....	108
Tabela 8 - Variáveis e níveis experimentais avaliados nos planejamentos para GLP pressurizado.....	115
Tabela 9 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado GLP e resposta em atividade residual de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte gelatina-alginato.....	117
Tabela 10 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte gelatina-alginato.....	120
Tabela 11 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectinametilesterase (PME) do complexo	

enzimático comercial Pectinex® Mash immobilizada em suporte gelatina-alginato.....	123
Tabela 12 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash immobilizada em suporte gelatina-alginato.....	125
Tabela 13 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado GLP e resposta em atividade residual de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L immobilizada em suporte de poliuretano.....	128
Tabela 14 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L immobilizada em suporte de poliuretano.....	130
Tabela 15 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash immobilizada em suporte de poliuretano.....	132
Tabela 16 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash immobilizada em suporte de poliuretano.....	134
Tabela 17 - Parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash.....	150
Tabela 18 - Parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PME do complexo Pectinex® Mash.....	151
Tabela 19 - Parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L.....	152
Tabela 20 - Parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PME do complexo Pectinex® Ultra SP-L.....	153
Tabela 21 - Resultados obtidos para clarificação de suco de pêssgo utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash em diferentes concentrações.....	160
Tabela 22 - Resultados obtidos para redução da turbidez de suco de pêssgo utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial	

Pectinex [®] Ultra SP-L e Pectinex [®] Mash em diferentes concentrações.....	162
Tabela 23 – Resultados obtidos para sólidos solúveis totais de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex [®] Ultra SP-L e Pectinex [®] Mash em diferentes concentrações.....	164
Tabela 24 – Resultados obtidos para viscosidade de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex [®] Ultra SP-L e Pectinex [®] Mash em diferentes concentrações.....	166
Tabela 25 – Resultados obtidos para o pH de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex [®] Ultra SP-L e Pectinex [®] Mash em diferentes concentrações.....	168
Tabela 26 – Resultados obtidos para o °Brix de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex [®] Ultra SP-L e Pectinex [®] Mash em diferentes concentrações.....	170
Tabela 27 – Resultados obtidos para a acidez de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex [®] Ultra SP-L e Pectinex [®] Mash em diferentes concentrações.....	172

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
LNF	Latino Americana
URI	Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – campus Erechim
PME	Pectinameteilesterase
PMGL	Pectina liase
pH	Potencial hidrogenioiônico
PE	Pectinaesterases
PGL	Pectato liase
PG	Poligalaturonases
PU	Poliuretano
CO ₂	Gás carbônico
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
mM	Mili molar
rpm	Rotações por minuto
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco heptahidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
HCl	Ácido clorídrico
NaCl	Cloreto de sódio
ASB	Albumina de soro bovino
IC	Intensidade de cor
U/g	Unidade de atividade enzimática por grama
V _{Max}	Velocidade máxima
K _M	Constante de Michaelis-Menten
ppm	mg.L ⁻¹

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO	33
1.1 OBJETIVOS.....	34
1.1.1 Objetivo geral.....	34
1.1.2 Objetivos específicos.....	34
REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
2.1 ENZIMAS.....	39
2.2 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS.....	40
2.3 PECTINASES.....	41
2.3.1 Enzimas pectinolíticas e sua classificação	42
2.3.1.1 Protopectinases (PPases).....	42
2.3.1.2 Pectinesterases (PE).....	43
2.3.1.3 Despolimerases.....	44
Liases	44
<i>Pectina Liase (PMGL)</i>	44
<i>Pectato Liase (PGL)</i>	44
Hidrolases	45
<i>Poligalacturonases (PG)</i>	45
<i>Pectinametilesterase (PME)</i>	46
2.3.2 Aplicações industriais das Pectinases	48
2.3.2.1 Indústrias de sucos de frutas.....	49
2.3.2.2 Recuperação de óleos essenciais.....	49
2.3.2.3 Indústrias de vinhos.....	49
2.3.2.4 Extração de óleos vegetais.....	50
2.3.2.5 Indústria têxtil.....	50
2.3.2.6 Indústria de papel e celulose.....	51
2.3.2.7 Ração animal.....	51
2.3.2.8 Alimentos funcionais.....	51
2.3.2.9 Melhoramento na extração de amido de mandioca.....	51
2.3.2.10 Fermentação de café e chá.....	52
2.4 IMOBILIZAÇÃO.....	52
2.4.1 Métodos de imobilização de enzimas em diferentes suportes	55
2.4.1.1 Adsorção.....	56
2.4.1.2 Ligação Covalente.....	56

2.4.1.3	Quelação.....	56
2.4.1.4	Encapsulação.....	57
2.4.2	Suportes de imobilização.....	58
2.4.2.1	Alginato de sódio como suporte de imobilização.....	58
2.4.2.2	Gelatina.....	59
2.4.2.3	Poliuretano (PU).....	60
2.5	TRATAMENTO DE ENZIMAS EM FLUIDO PRESSURIZADO.....	62
2.6	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA.....	65
2.7	APLICAÇÃO DE PECTINASES NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS.....	66
2.7.1	Produção e processamento de polpa e suco de frutas.....	68
2.7.2	Obtenção da polpa de frutas.....	68
2.7.3	Suco de frutas.....	70
2.8	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73

CAPÍTULO III

	CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS.....	87
3.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	87
3.1.1	Enzimas.....	87
3.1.2	Reagentes.....	87
3.1.3	Determinações analíticas.....	88
3.1.3.1	Determinação da atividade de pectina liase (PMGL).....	88
3.1.3.2	Determinação da atividade de pectinametilsterase (PME).....	89
3.1.3.3	Determinação do teor de proteínas.....	91
3.1.3.4	Determinação da atividade específica.....	91
3.1.4	Análise estatística.....	91
3.1.5	Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática.....	91
3.1.6	Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{MAX}).....	92
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
3.2.1	Efeito da temperatura e do pH na atividade de PME e PMGL da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L.....	93
3.2.2	Efeito da temperatura e do pH na atividade PME e PMGL da pectinase comercial - Pectinex® Mash.....	96
3.2.3	Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} aparente..	98
3.3	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101

CAPÍTULO IV

IMOBILIZAÇÃO.....	103
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	103
4.1.1 Enzimas.....	103
4.1.2 Reagentes.....	103
4.1.3 Imobilização em diferentes suportes.....	104
4.1.3.1 Imobilização da enzima em suporte de gelatina-alginato.....	104
4.1.3.2 Imobilização enzimática em suporte de poliuretano (PU).....	105
4.1.4 Rendimento de imobilização.....	107
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
4.2.1 Atividade das pectinases comerciais livres e imobilizadas....	107
4.2.2 Rendimento de imobilização.....	108
4.3 CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS.....	110

CAPÍTULO V

TRATAMENTO DE ENZIMAS EM FLUIDO PRESSURIZADO.....	111
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	111
5.1.1 Tratamento com fluido pressurizado.....	111
5.1.1.1 Reagentes.....	112
5.1.2 Aparato experimental para tratamento da enzima em fluido pressurizado.....	112
5.1.2.1 Procedimento experimental.....	114
5.1.3 Planejamento de experimentos.....	114
5.1.4 Reutilização do extrato pectinolítico imobilizado após tratamento com GLP.....	115
5.1.5 Tratamento estatístico.....	115
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
5.2.1 Efeito do tratamento com GLP na atividade das pectinases dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash imobilizados em suporte gelatina-alginato.....	116
5.2.1.1 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte de gelatina-alginato... 116	
5.2.1.2 Efeito do tratamento do fluido pressurizado (GLP) na atividade de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte de gelatina-alginato.....	119

5.2.1.3 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizado em suporte gelatina-alginato.....	122
5.2.1.4 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizados em suporte gelatina-alginato.....	124
5.2.2 Efeito do tratamento com GLP na atividade das pectinases dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash imobilizados em suporte de poliuretano (PU).....	126
5.2.2.1 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP – L imobilizado em suporte de poliuretano (PU).	127
5.2.2.2 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte poliuretano (PU).....	129
5.2.2.3 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático Pectinex® Mash em suporte de poliuretano (PU).....	131
5.2.2.4 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizado em suporte poliuretano (PU).....	133
5.2.3 Avaliação da reutilização das pectinases comerciais (Pectinex® Mash e Ultra SP-L) imobilizadas em suporte de gelatina-alginato após tratamento com GLP.....	135
5.3 CONCLUSÕES.....	138
REFERÊNCIAS.....	141

CAPÍTULO VI

ESTABILIDADE ENZIMÁTICA.....	143
6.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	143
6.1.1 Estabilidade térmica.....	143
6.1.2 Análise dos parâmetros cinéticos.....	144
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	144
6.2.1 Estabilidade enzimática a baixas temperaturas.....	144
6.2.2 Estabilidade enzimática a altas temperaturas.....	147
6.2.3 Parâmetros cinéticos.....	149
6.3 CONCLUSÕES.....	154
REFERÊNCIAS.....	155

CAPÍTULO VII

APLICAÇÃO DE PECTINASES NA CLARIFICAÇÃO SUCOS DE FRUTAS.....

7.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	157
7.1.1 Potencial de aplicação das pectinases em suco de pêssego.....	157
7.1.2 Avaliação das características físico-químicas do suco de pêssego.....	158
7.1.3 Reutilização do extrato pectilonolítico imobilizado e tratado com GLP na clarificação de suco de pêssego.....	159
7.1.5 Tratamento estatístico.....	159
7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	159
7.2.1 Avaliação do potencial de aplicação das pectinases na clarificação de suco de pêssego.....	159
7.2.2 Avaliação da reutilização das pectinases comerciais (Pectinex® Mash e Ultra SP-L) imobilizadas em suporte de gelatina-alginato e após tratamento com GLP na clarificação de suco de pêssego.....	173
7.3 CONCLUSÕES.....	176
REFERÊNCIAS.....	178

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....

APÊNDICES

APÊNDICE I: Tabela 29 - Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para a enzima PME da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L.....	185
APÊNDICE II: Tabela 30 - ANOVA para a atividade enzimática da enzima PME como resposta para o DCCR para o complexo Pectinex® Ultra SP-L.....	186
APÊNDICE III: Figura 30 - Superfície de resposta do planejamento completo fatorial 2 ² em relação à atividade enzimática de PME da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L em função do pH e da temperatura.....	187
APÊNDICE IV: Tabela 31 - Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para o complexo Pectinex® Ultra SP-L a termos de medida de atividade de PMGL.....	188
APÊNDICE V: Tabela 32 - ANOVA para a atividade enzimática para a enzima PMGL como resposta para o DCCR do complexo Pectinex® Ultra SP-L.....	189

APÊNDICE VI: Figura 31 - Superfície de resposta do planejamento completo fatorial 2^2 em relação à atividade enzimática de PMGL da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L em função do pH e da temperatura.....	190
APÊNDICE VII: Tabela 33 - Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para a enzima PME do complexo Pectinex® Mash.....	191
APÊNDICE VIII: Tabela 34 - ANOVA para a atividade enzimática da enzima PME como resposta para o DCCR para o complexo Pectinex® Mash.....	192
APÊNDICE IX: Figura 32 - Superfície de resposta do planejamento completo fatorial 2^2 em relação à atividade enzimática de PME da pectinase comercial Pectinex® Mash em função do pH e da temperatura.....	193
APÊNDICE X: Tabela 35 - Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para a enzima Pectinex® Mash a termos de medida de atividade de PMGL.....	194
APÊNDICE XI: Tabela 36 - ANOVA para a atividade enzimática da enzima PMGL como resposta para o DCCR para o complexo Pectinex® Mash.....	195
APÊNDICE XII: Figura 33 - Superfície de resposta do planejamento completo fatorial 2^2 em relação à atividade enzimática de PMGL da pectinase comercial Pectinex® Mash em função do pH e da temperatura.....	196
APÊNDICE XIII: Tabela 37 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de pressão e temperatura do planejamento fatorial completo 2^3 para atividade de PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L.....	197
APÊNDICE XIV: Tabela 38 - Análise de variância - ANOVA do planejamento fatorial 2^3 para a atividade residual da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L após tratamento com GLP.....	198
APÊNDICE XV: Figura 34 - Estabilidade da enzima PME livre do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.....	199
APÊNDICE XVI: Figura 35 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.....	200

APÊNDICE XVII: Figura 36 - Estabilidade da enzima PME imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra S-L nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.....	201
APÊNDICE XVIII: Figura 37 - Estabilidade da enzima PMGL livre do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.....	202
APÊNDICE XIX: Figura 38 - Estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.....	203
APÊNDICE XX: Figura 39 - Estabilidade da enzima PMGL imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.....	204
APÊNDICE XXI: Figura 40 - Estabilidade da enzima PME livre do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 80°C, -18°C e 4°C.....	205
APÊNDICE XXII: Figura 41 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.....	206
APÊNDICE XXIII: Figura 42 - Estabilidade da enzima PME imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.....	207
APÊNDICE XXIV: Figura 43 - Estabilidade da enzima PMGL livre do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 80°C, -18°C e 4°C.....	208
APÊNDICE XXV: Figura 44 - Estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 80°C, -18°C e 4°C.....	209
APÊNDICE XXVI: Figura 45 - Estabilidade da enzima PMGL imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 80°C, -18°C e 4°C.....	210
APÊNDICE XXVII: Figura 46 - Estabilidade da enzima PME livre do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	211
APÊNDICE XXVIII: Figura 47 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 25°C, 30°C e 40°C.....	212
APÊNDICE XXIX: Figura 48 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 50°C e 60°C.....	213

APÊNDICE XXX: Figura 49 - Estabilidade da enzima PME imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de 25°C, 30°C e 40°C.....	214
APÊNDICE XXXI: Figura 50 - Estabilidade da enzima PME imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de 50°C e 60°C.....	215
APÊNDICE XXXII: Figura 51 - Estabilidade da enzima PMGL livre do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	216
APÊNDICE XXXIII: Figura 52 - Estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	217
APÊNDICE XXXIV: Figura 53 - Estabilidade da enzima PMGL imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	218
APÊNDICE XXXV: Figura 54 - Estabilidade da enzima PME livre do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	219
APÊNDICE XXXVI: Figura 55 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	220
APÊNDICE XXXVII: Figura 56- Estabilidade da enzima PME Imobilizada pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	221
APÊNDICE XXXVIII: Figura 57 - Estabilidade da enzima PMGL livre do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	222
APÊNDICE XXXIX: Figura 58 - Estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	223
APÊNDICE XL: Figura 59 - Estabilidade da enzima PMGL imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.....	224

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é uma alternativa que visa substituir os processos químicos, uma vez que os biocatalisadores envolvem processos com menor impacto ambiental e são mais específicos, sendo uma ferramenta promissora para síntese de compostos de alto valor agregado (HASAN et al., 2006, NYARI, 2013).

A escolha de um biocatalisador imobilizado está relacionada com a possibilidade de aplicação, atividade catalítica, viabilidade de operação contínua do processo, maior facilidade de controle e de separação do produto final, além do aumento de estabilidade ao meio reacional, pH e à temperatura, entre outros (MENDES et al., 2011, NYARI, 2013). Desta forma, o principal interesse em imobilizar enzimas está relacionado com a obtenção de um catalisador com atividade e estabilidade que não seja afetado durante o processo, como pode ocorrer com a enzima livre (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

As enzimas pectinolíticas possuem várias aplicações em escala industrial. Ressalta-se a clarificação enzimática de sucos naturais utilizando como biocatalizador uma pectinase, que surge como um processo com condições mais brandas de temperatura e pH, e também mais favorável ambientalmente.

A estabilidade e a atividade enzimática podem depender da enzima, das características do solvente, do conteúdo de água, da relação enzima/suporte/meio reacional e das variáveis de processos envolvidas, significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema sob investigação (FRANKEN et al., 2010; FADILOGLU e ERKMEN, 2002). Neste contexto, estudos revelam que algumas enzimas aumentam sua atividade e outras diminuem e/ou perdem suas atividades após exposição aos fluidos comprimidos. O uso destes solventes pode ser uma alternativa interessante não somente para conduzir reações enzimáticas, mas também aumentar a atividade dos sistemas enzimáticos ou inativar/reduzir sua atividade (TANIGUCHI et al., 1987; TEDJO et al., 2000; CHEN et al., 1992; ISHIKAWA et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2006a e 2006b; GIEBAUF e GAMSE, 2000; FRICKS et al., 2006).

Neste sentido, a busca por um biocatalisador ideal, sem causar riscos ambientais, reaproveitável e de baixo custo, respondendo às necessidades do mercado e às vantagens da utilização de pectinases

imobilizadas em relação ao potencial de aplicação destas, consolidaram a proposta desta pesquisa, cujos objetivos foram traçados e serão apresentados a seguir.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do uso de fluido pressurizado (gás liquefeito de petróleo (GLP), sobre pectinases comerciais (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash), imobilizadas em diferentes suportes.

1.1.2 Objetivos específicos

- i) Caracterizar os complexos enzimáticos imobilizados em estudo com relação à temperatura e pH de máxima atividade em pectina cítrica e aos parâmetros cinéticos;
- ii) Imobilizar o complexo enzimático pectinolítico comercial em suporte de gelatina-alginato e poliuretano;
- iii) Estudar o efeito das variáveis temperatura, taxa de despressurização, tempo e pressão, na atividade de pectina liase e pectinametilesterase das pectinases comerciais (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash) imobilizadas em diferentes suportes (gelatina-alginato e poliuretano);
- iv) Avaliar a estabilidade das enzimas livre e imobilizadas submetidas ou não ao tratamento em fluido pressurizado em diversas temperaturas;
- v) Avaliar a potencialidade de reutilização dos complexos pectinolíticos comerciais imobilizados e tratadas com fluido pressurizado-GLP;
- vi) Avaliar a potencialidade de aplicação das pectinases comerciais imobilizadas e submetidas ou não ao tratamento com fluido pressurizado (GLP) na clarificação de suco de pêssego.

Para tal, esta tese de doutorado está dividida em capítulos, conforme a descrição resumida apresentada a seguir.

O Capítulo I apresenta uma breve introdução com os objetivos da tese de doutoramento. No Capítulo II, é apresentada uma revisão da literatura acerca das enzimas pectinolíticas, suas características e principais aplicações. O Capítulo III apresenta a caracterização das

enzimas, no qual realizou-se a análise dos efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática. Neste Capítulo, também são apresentados os parâmetros de Michaelis-Menten obtidos. O Capítulo IV é referente à imobilização das enzimas em dois suportes diferentes (poliuretano e gelatina-alginato). A medida da atividade enzimática foi realizada com as enzimas nas formas livre e imobilizada, a fim de verificar o comportamento das pectinases frente aos diferentes tipos de imobilização. O Capítulo V apresenta o desenvolvimento do método empregado para a determinação da atividade enzimática com intuito de avaliar o efeito do tratamento destas em fluido pressurizado através da descrição dos materiais utilizados, dos aparatos experimentais e dos procedimentos adotados no desenvolvimento do estudo.. O Capítulo VI mostra os resultados da reutilização (reciclos), da estabilidade térmica. O Capítulo VII aborda a aplicação das enzimas na clarificação de suco de pêssego e reutilização no processo de clarificação das pectinases imobilizadas e/ou imobilizadas e tratadas com GLP. O Capítulo VIII apresenta as conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

CHEN, J.S.; BALABAN, M.O.; WEI, C.L.; MARSHALL, M.R.; HSU, W.Y. **Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.40: 2345-2349, 1992.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M.G., SOLDI, V.; **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. Química Nova, v. 27, 2004.

FADILUOLU, S.; ERKMEN, O. **Inactivation of lipase by carbon dioxide under atmospheric pressure**. Journal of Food Engineering, v.52: 331-335, 2002.

FRANKEN, L.P.G.; MARCON, N.S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J.V. **Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity**. Food Bioprocess Technology, v.3: 511-520, 2010.

FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P.B.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C.; GIRARDI, J.S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; **Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide**. Journal of Supercritical Fluids, v.38: 347-353, 2006.

GIEBAUF, A.; GAMSE, T.A **simple process for increasing the specific activity of porcine pancreatic lipase by supercritical carbon dioxide treatment**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.9: 57-64, 2000.

ISHIKAWA, H; SHIMODA, M.; YONEKURA, A.; OSAJIMA, Y. **Inactivation of enzymes and decomposition of α -helix structure by supercritical carbon dioxide microbubble method**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.44: 2646-2649, 1996.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A., **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p. 235-251, 2006.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. de; OLIVEIRA, P. C. de, **Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial**, Química Nova, Vol. 34, No. 5, 831-840, Recebido em 14 de junho de 2010, aceito em 15 de dezembro de 10; publicado na web em 25 de março de 2011.

NYARI, N. L. D. **Estudo da imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em poliuretano.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI - Campus Erechim), Erechim, 94 p., 2013.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; DARIVA, C.; CUNHA, A. G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN.; OLIVEIRA, J.V.; FREIRE, D.M.G. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase.** Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic. v.39: 117-121, 2006a.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A.F.; KUNITA, M.H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids.** Journal of Supercritical Fluids, v.38: 127-133, 2006b.

TANIGUCHI, M.; KAMIHIRA, M.; KOBAYASHI, T. **Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity.** Agricultural Biological Chemistry. v.51: 593-596, 1987.

TEDJO, W.; ESHTIAGHI, M.N.; KNORR, D. **Lipase of supercritical carbon dioxide and high pressure on lipoxygenase and peroxidase activity.** Journal of Food Science. v.65, 1284-1287, 2000.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente Capítulo apresentará uma explanação sobre enzimas, em especial pectinases, enzimas de interesse neste trabalho. Foram utilizados dois complexos enzimáticos comerciais (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L) para avaliar o comportamento das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilesterase (PME) frente a imobilização em diferentes suportes, tratamento com fluido pressurizado e sua potencialidade de utilização na clarificação de suco de frutas. A imobilização será abordada no Capítulo III, o tratamento utilizando fluido pressurizado no Capítulo V e a aplicação na clarificação no Capítulo VII.

2.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações no organismo, sem serem, elas próprias, alteradas neste processo. Somente atuam em condições específicas de temperatura, pH e umidade (CHAMPE e HARVEY, 1989; FIREMAN e FIREMAN, 1998; BÜHLER et al., 1998).

Em sistemas vivos, a maioria das reações bioquímicas dá-se em vias metabólicas, que são seqüências de reações em que o produto de uma reação é utilizado como reagente na reação seguinte. Diferentes enzimas catalisam diferentes passos de vias metabólicas, agindo de forma sincronizada de modo a não interromper o fluxo nessas vias. Cada enzima pode sofrer regulação da sua atividade, aumentando-a, diminuindo-a ou mesmo interrompendo-a, de modo a modular o fluxo da via metabólica em que se insere (PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003).

Além de serem muito ativas e versáteis, as enzimas são biocatalisadores altamente requisitados, devido às suas propriedades, executando uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. A facilidade de regular a atividade enzimática é mais um ponto positivo na utilização de enzimas. Para isso basta apenas que se modifique a natureza do meio de reação, altere o pH ou adicione algum efector. Toda enzima ainda catalisa as transformações moleculares sem

ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003).

As enzimas são comumente utilizadas em várias aplicações industriais, e a demanda para aumentar a estabilidade, atividade e especificidade destas crescem rapidamente. O mercado mundial de enzimas apresenta valor comercial de US\$2 bilhões anuais e vem crescendo a cada ano com taxas de 8 a 10%. Deste total, o Brasil participa com 5% do mercado mundial através de importações. A indústria de alimentos é a que mais tem se beneficiado com o uso das enzimas, sendo utilizadas em 15% dos processos industriais. Neste contexto, 60% do total de enzimas industriais fornecidas mundialmente são produzidas na Europa, os restantes 40% nos EUA e Japão (BHAT, 2000).

2.2 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

As substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média das paredes primárias de células de vegetais superiores. Quimicamente são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α (1 \rightarrow 4), parcialmente esterificados por grupos metil e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (UENOJO e PASTORE, 2007).

Segundo Martins (2006), baseando-se nos tipos de modificações da cadeia principal, as substâncias pécticas podem ser classificadas em:

- Protopectina: é o termo usado para descrever as substâncias pécticas insolúveis em água, das quais se originam as substâncias pécticas solúveis.
- Ácido péctico: são os ácidos poligalacturônicos cujos grupos carboxílicos não se apresentam esterificados com os grupos metila.
- Ácido pectínico: são os ácidos poligalacturônicos que contêm quantidades variáveis de grupos metoxílicos. Estes compostos apresentam a propriedade de formar gel na presença de açúcares e cátions divalentes.
- Pectina: é o nome genérico de misturas pécticas que contêm ácido pectínico como maior componente.

As substâncias pécnicas são usadas na indústria de alimentos como agentes geleificantes e como fibras nutricionais. Por outro lado, podem representar um problema nas várias etapas do processamento de frutas e vegetais, visto que seu arraste, após o rompimento da parede celular, pode causar turbidez em sucos ou incrustações em tubulações e reatores industriais (SANTOS, 2007).

As substâncias pécnicas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por micro-organismos como fungos, leveduras e bactérias (SAKAI et al., 1993; GAINVORS et al., 1994).

O grau de esterificação e de polimerização, a proporção de açúcares neutros, o peso molecular, são os principais fatores de heterogeneidade entre as substâncias pécnicas de diferentes origens. Isso torna improvável a existência de pectinas idênticas. A pectólise, ação das enzimas pectinolíticas, é um fenômeno associado com vários processos biológicos da planta, tais como alongamento, crescimento celular e maturação do fruto (COURI, 1993).

2.3 PECTINASES

Embora a pectina apresente outros açúcares em sua composição, o termo enzimas pectinolíticas, ou pectinases, refere-se ao grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico. Devido à presença de várias formas de pectina nas células das plantas, são necessárias pectinases com diferentes formas de ação para sua degradação (GUMMANDI e PANDA, 2003). Estas enzimas podem ser induzidas por substratos pécnicos ou produzidas constitutivamente, dependendo do organismo estudado (MALDONADO, STRASSER, SAAD, 1998).

Diversos organismos são capazes de produzir pectinases, incluindo plantas, bactérias, algumas leveduras, fungos filamentosos e organismos simbiotes de animais (AGUILAR e HUITRON, 1987; LADJAMA et al., 1991; FERNANDES-SALOMÃO et al., 1996; PRADÉ, et al., 1999; SIROTEK et al., 2001; SILVA et al., 2005). Porém, estudos de produção de pectinases são mais abundantes para fungos filamentosos, uma vez que as enzimas comerciais são provenientes destes micro-organismos e o pH ideal para suas atividades aproxima-se do valor de pH de muitos sucos de frutas, na faixa de 3,0 a 5,5. A produção de pectinases, assim como de outras enzimas, é influenciada por fatores como fonte de carbono, pH e temperatura, entre outros.

As pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem usadas na indústria. Sua aplicação comercial foi observada em 1930 para a preparação de vinhos e sucos de frutas. Porém, apenas na década de 1960, a composição química dos tecidos de plantas ficou esclarecida e com esse conhecimento, cientistas começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência. Como resultado, pectinases são hoje as enzimas que mais crescem no setor comercial, sendo produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras (CARVALHO, 2007).

2.3.1 Enzimas pectinolíticas e sua classificação

As pectinases despolimerizam a pectina por hidrólise e transesterificação, bem como por reações de desesterificação, isto é, hidrolisam a cadeia éster entre os grupos carboxila e metil da pectina (DARTORA et al., 2002).

A classificação das enzimas pecticas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, pela preferência de substrato (pectina, ácido pectico ou protopectina), ação por transesterificação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liquidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante) (ZHENG e SHETTY, 2000; KASHYAP et al, 2000; SAKAI et al., 1993; SILVA et al., 2005; ALKORTA et al., 1998).

Existem basicamente três tipos de pectinases: 1) protopectinases que hidrolisam a protopectina insolúvel originando pectina solúvel; 2) pectinesterases que catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxílicos; e 3) despolimerizantes que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações α (1 \rightarrow 4) das cadeias glicosídicas no ácido D-galacturônico (JAYANI et al., 2005).

2.3.1.1 Protopectinases (PPases)

As protopectinases também conhecidas por pectinosinases catalisam a hidrólise da protopectina, originando ácido pectico e pectina, diminuindo a rigidez da parede celular durante o amolecimento e o amadurecimento dos vegetais. Existem dois tipos de PPases. O tipo A faz a clivagem na parte interna da molécula do ácido poligalacturônico da protopectina, enquanto o tipo B nas cadeias de polissacarídeos que podem estar conectados à cadeia de ácido poligalacturônico e constituintes da parede celular (JAYANI et al., 2005).

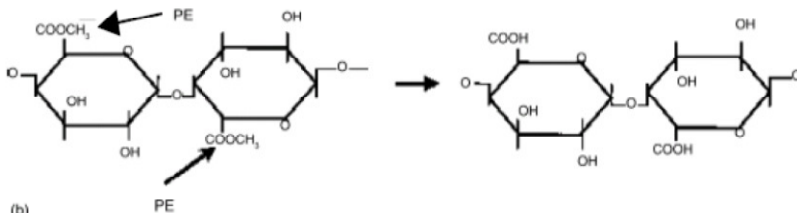
2.3.1.2 Pectinesterases (PE)

As pectinesterases também podem ser denominadas de polimetilgalacturonato esterase. Estas enzimas catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico. A pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase (PG) (ALKORTA et al., 1998; GAVA, 1998).

A desesterificação da pectina ocorre linearmente ao longo da molécula, por mecanismo em cadeia simples, comumente reduzindo a esterificação em 10% (GAVA, 1998). Durante a reação ocorre a quebra da molécula da água e a adição de um hidrogênio a um carbono da ligação e adição do grupo hidroxila a outro carbono, produzindo metano e pectina com baixo grau de metoxilação. A reação cessa antes que todos os grupos carboxilas sejam removidos. Em parte, essa inibição ocorre pelo aumento da concentração do produto formado (pectato) e, também, devido à possível repulsão entre grupos carboxilas carregados negativamente (TRIBESS, 2003).

As pectinesterases são produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras e plantas e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais e podem estar envolvidas em mudanças das substâncias pécticas durante o amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (ALKORTA et al., 1998). São reconhecidas várias isoformas de PE, que variam em termorresistência e em número de acordo com a fonte vegetal. Em suco de laranja existem pelo menos sete isoformas, com pesos moleculares, resistência térmica e atividades diferentes (TRIBESS, 2003). A Figura 1 demonstra o modo de ação da pectinesterase.

Figura 1 - Modo de ação da pectinesterase. A seta indica o local de reação da enzima na substância péctica.



Fonte: JAYANI et al., 2005.

2.3.1.3 Despolimerases

Catalisam a quebra das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) entre os monômeros do ácido D-galacturônico. Essas enzimas atuam em pectinas por mecanismos de hidrólise, catalisando a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, ou por transeliminação (liases) (JAYANI et al., 2005). As despolimerases podem ser subdivididas, dependendo da preferência da enzima pelo substrato em liases e hidrolases.

Liases

São também conhecidas como transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (KASHYAP et al, 2001). Esse grupo é constituído pela pectina liase e pectato liase.

Pectina Liase (PMGL)

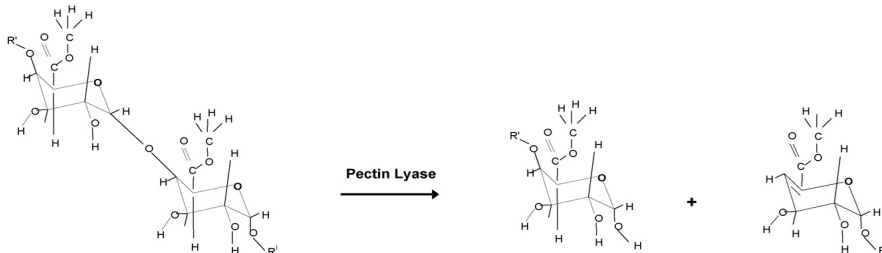
A pectina liase (PL), também chamada de polimetilgalacturonato liase (PMGL) e/ou transeliminase, é uma enzima que atua na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de transeliminação de hidrogênio, onde clivam as ligações glicosídicas no carbono 4 e simultaneamente eliminam hidrogênio do carbono 5 (Figura 2). Estas enzimas são subdivididas em dois tipos, as endopolimetilgalacturonato liases [Endo-PMGL] que catalisam de forma randômica a ruptura das ligações α (1 \rightarrow 4) da pectina e as exopolimetilgalacturonato liases [Exo-PMGL], que catalisam a ruptura das ligações α (1 \rightarrow 4) da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora. Atuam preferencialmente no ácido pectínolico (MARTINS, 2006; JAYANI et al., 2005, YADAV et al., 2009).

Pectato Liase (PGL)

A pectato liase (poligalacturonato liases, PGL) é uma liase que têm preferência por ácido pectico (ácido poligalacturônico com baixos níveis de esterificação) (MARTINS, 2006). A PGL catalisa a separação da ligação glicosídica α – 1,4 do ácido pectico por trans-eliminação e é dividida em endo – PGL, que catalisa a clivagem aleatória da ligação

glicosídica α (1 \rightarrow 4) do ácido pécico e *exo*-PGL (E.C. 4.2.2.9), que catalisa a clivagem sequencial da ligação glicosídica α (1 \rightarrow 4) do ácido pécico na extremidade da cadeia (CORREIA, 2010).

Figura 2 - Modo de ação da pectina liase na substância pécica.



Fonte: YADAV et al., 2009.

Hidrolases

Incluem as poligalacturonases e as polimetilgalacturonases, podem apresentar ação endo - hidrólise randômica ou *exo* - hidrólise sequencial (UENOJO e PASTORE, 2007).

Poligalacturonases (PG)

As poligalacturonases (PG) são enzimas que catalisam a hidrólise da cadeia de ácido poligalacturônico de que é constituída a pectina. Como a poligalacturonase é mais ativa na degradação de pectinas desmetiladas, a ação da pectinametilsterase prepara, ou seja, torna a pectina acessível à degradação realizada por essa enzima, causando sua despolimerização (CARVALHO et al., 2001; ASSIS et al., 2004; LOHANI et al., 2004; JAYANI et al., 2005).

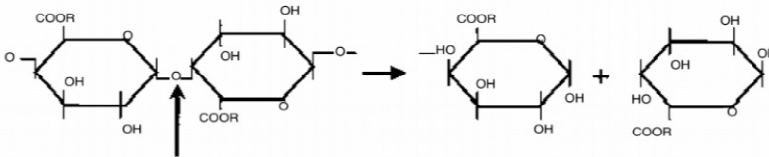
A quebra das ligações glicosídicas existentes nas substâncias pécicas está diretamente ligada ao aumento de pectinas solúveis, à diminuição da rigidez intercelular e a adesividade dos tecidos vegetais (CARVALHO, 2007).

A maioria das poligalacturonases pesquisadas reage eficazmente em pH ácido variando de 3,5 a 5,5. Embora a temperatura ótima citada na maioria dos trabalhos esteja entre 30-50°C, algumas poligalacturonases que catalisam a hidrólise de substâncias pécicas a

temperaturas mais altas também têm sido isoladas (CARVALHO, 2007).

A reação de despolimerização da pectina acontece quando a poligalacturonase catalisa a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4), que se localizam entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia da pectina, com a introdução de água pela ponte de hidrogênio (RESENDE et al., 2004). As poligalacturonases podem proporcionar a clivagem dessa cadeia de diferentes formas (Figura 3). As exo-poligalacturonases [Exo-PG (E.C. 3.2.1.67)] promovem a redução da unidade externa ou terminal da cadeia poligalacturônica, resultando em um ácido galacturônico como produto da reação principal. Enquanto as endo-poligalacturonases [Endo-PG (E.C.3.2.1.15)] podem catalisar o rompimento aleatório dessa ligação (CARVALHO, 2007).

Figura 3 – Modo de ação da poligalacturonase. A seta indica o local de reação da enzima na substância pectínica.



Fonte: SATHYANARAYANA e PANDA, 2003.

As poligalacturonases necessitam de grupos carboxílicos livres para a catálise. A presença de grupos metoxílicos na molécula da pectina pode inibir a atividade dessas enzimas (DINU et al., 2007). Endo-PG proporciona a produção de uma série de oligogalacturonatos e pouca quantidade de mono e digalacturonatos, enquanto que Exo-PG produz relativamente alta concentração de mono e/ou digalacturonatos (WHITAKER, 1990).

Pectinametilsterase (PME)

A pectinametilsterase (PME) também conhecida por polimetilgalacturonase (PMG) catalisa a remoção dos grupos metil, atuando nos finais redutores e no interior das cadeias pectínicas com alto grau de esterificação (reduzindo seu peso), por consequência, sua

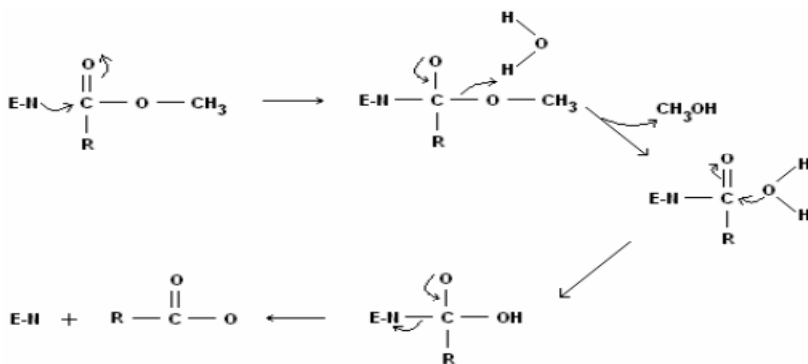
atividade é mais alta quando de 65-75 % da pectina está metilada (COSGROVE, 1997; EVANGELISTA, CHITARRA, CHITARRA, 2000).

A maioria das PME's tem pesos moleculares de 35 a 50 kDa. Estima-se também que os valores de pH e temperatura ótima nos quais essas enzimas são ativas estão entre valores de 4-8 e 40-50°C, respectivamente (ASSIS et al., 2004).

Em sucos, a diminuição no grau de esterificação e o aumento na densidade de cargas geradas na cadeia pectínica causam uma elevação na afinidade pelos íons de cálcio (Ca⁺), sendo então geradas ligações cruzadas intermoleculares mediadas por esse íon. Esta auto-associação das regiões não esterificadas da pectina poderá levar à formação de agregados e por consequência sua precipitação (ROMBOUTS et al, 1982; BAKER e CAMERON, 1999; BOAS et al., 2000). A pectinametilesterase pode também estar envolvida no processo de alongação preliminar de paredes durante o crescimento da célula (ASSIS, LIMA e OLIVEIRA, 2001).

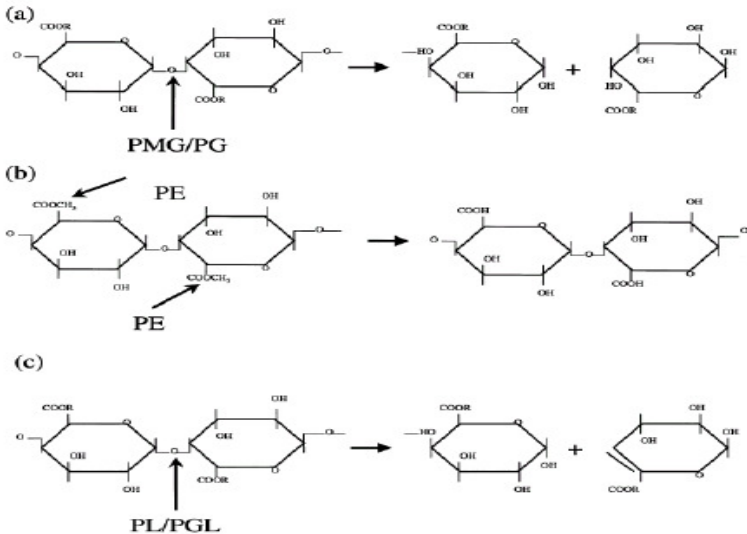
A pectinametilesterase remove grupos metoxil da pectina por um ataque nucleofílico da enzima no éster metílico (localizados nos carbonos 6 do grupo carboxílico), resultando na formação de um intermediário substrato-enzima com o lançamento de um metanol. Estes seguem através da desacetilação, o qual sofre uma hidratação do intermediário para regenerar a enzima e liberar um ácido carboxílico (Figura 4) (WONG, 1995; PIMENTA, CHAGAS e COSTA, 2000; VORAGEM, BELMAN e SCHOLS, 2001).

Figura 4 - Mecanismo de reação da pectinametilesterase sobre a pectina.



Fonte: WONG, 1995.

Figura 5 - Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das substâncias pécicas. (a) Radical H para PG e CH₃ para PMG; (b) PE e (c) Radical H para PGL e CH₃ para PL. As flechas indicam os locais onde as pectinases atuam nas substâncias.



Fonte: GUMMANDI e PANDA, 2003.

2.3.2 Aplicações industriais das Pectinases

As enzimas, de um modo geral, são amplamente utilizadas nos processos industriais, em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico. Entretanto, uma enzima torna-se comercialmente interessante somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial (BRAVO et al., 2000).

As enzimas pectinolíticas consumidas pela indústria brasileira são importadas de alguns laboratórios tais como: Miles, Novo Nordisk, Biocon e Novozymes. O consumo interno é grande e o mercado potencial é muito grande considerando que o Brasil é um dos maiores produtores de suco de laranja do mundo e significativo produtor de vinhos (SANTOS, 2007), como destacado anteriormente, mercado este potencial para enzimas pectinolíticas. Souza (2008) e Uenojo e Pastore (2007), relataram algumas aplicações industriais importantes das

pectinases bem como algumas de suas vantagens as quais são citadas nos itens a seguir.

2.3.2.1 Indústrias de sucos de frutas

As substâncias pécticas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sucos das frutas, e sua presença causa um aumento considerável na viscosidade do suco, dificultando a filtração e a concentração. A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50 % o tempo de filtração.

A combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, são usadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. A hidrólise enzimática das paredes celulares aumenta o rendimento de extração, a polpa resultante tem baixa viscosidade e a quantidade de resíduos da polpa é reduzida. O uso de enzimas de maceração aumenta o rendimento da extração e melhora o processamento, sem aumento de custos. Essas enzimas são utilizadas após o corte da matéria-prima, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração dos componentes da fruta. Após a extração, pectinases são adicionadas para clarificação e diminuição de viscosidade para facilitar a filtração e concentração.

2.3.2.2 Recuperação de óleos essenciais

Após a extração do suco, as partículas de albedo e a emulsão óleo-água são separadas. Esta emulsão é passada em um ciclone e, a seguir, centrifugada para produzir uma emulsão rica em óleo, que é concentrada. A aplicação de pectinases hidrolisa os complexos de pectina-proteína, liberando o óleo, aumentando o rendimento, diminuindo o tempo de processo e melhorando a qualidade do produto final.

2.3.2.3 Indústrias de vinhos

As pectinases, em conjunto com D-glucanases e hemicelulases, têm sido utilizadas na produção de vinho. As vantagens do uso das três

enzimas são: melhor maceração da casca e aumento da extração de pigmentos facilita a clarificação e a filtração do mosto e aumenta a qualidade e a estabilidade do vinho. A adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração do suco, reduz o tempo de clarificação e aumenta o conteúdo de terpenos no vinho. Preparações comerciais de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectinametilesterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho.

2.3.2.4 Extração de óleos vegetais

A degradação da parede celular por enzimas pectinolíticas permite seu uso para extração de óleo vegetal em processo aquoso, pela liquefação dos componentes estruturais das paredes celulares das sementes que contêm óleo. Preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulasas e hemicelulasas começaram a ser utilizadas para extração de óleo de oliva, sendo adicionadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração. O uso de enzimas de maceração aumenta a quantidade de agentes antioxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extra-virgem, reduz a indução ao ranço, aumenta a extração, melhora o fracionamento na centrifugação e produz óleo com baixo teor de umidade.

2.3.2.5 Indústria têxtil

Enzimas pectinolíticas podem ser usadas nas indústrias têxteis para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, no tratamento do resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais. Pectinases alcalinas são utilizadas para maceração das fibras vegetais, como linho, cânhamo e juta, na biopreparação de algodão e no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão. Em algodão cru, a remoção da pectina, cera e agentes de goma com a utilização de pectinases em conjunto com amilases, lipases e hemicelulasas em condições adequadas, substituem o uso da soda cáustica e gera produtos de alta qualidade, para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia.

2.3.2.6 Indústria de papel e celulose

Durante a fabricação de papel, pectinases podem despolimerizar substâncias pécnicas e, subsequentemente, diminuir a demanda catiônica das soluções pécnicas e do filtrado resultantes do branqueamento com peróxido, solucionar problemas de retenção no branqueamento mecânico da celulose e no tratamento dos efluentes dos moinhos de papel.

2.3.2.7 Ração animal

Pectinases são utilizadas em conjunto com outras enzimas para reduzir a viscosidade da ração animal, a fim de aumentar a absorção e a liberação de nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis e dos nutrientes bloqueados pelas fibras.

2.3.2.8 Alimentos funcionais

Pectina e polissacarídeos pécnicos estão emergindo como ingredientes alimentares bioativos. Pectina de “grapefruit”, usado industrialmente como estabilizante e como suplemento de alimentos infantis, melhora a nutrição e o desenvolvimento físico infantil. Esses oligogalacturonídeos e seus produtos de degradação por enzimas pectinolíticas são classificados como “probióticos”, por serem não digeríveis, ou seja, não são hidrolisados na parte superior do trato gastrointestinal, e podem ser usados como promotores de saúde em nutrição humana e animal por estimularem seletivamente o crescimento e/ou a atividade de espécies de bactérias residentes no colo intestinal.

2.3.2.9 Melhoramento na extração de amido de mandioca

Polpa de mandioca, o resíduo sólido produzido após a extração do amido, contém uma proporção significativa de grânulos de amido (68%, base seca) e de fibras (27%, base seca). O alto conteúdo de fibras provavelmente diminui a extração do amido remanescente, mantendo os grânulos juntos e presos em uma rede fibrosa, que pode ser rompida por métodos enzimáticos, baseados na aplicação de uma mistura de pectinases e celulases que destroem a integridade estrutural da matriz responsável pelo aprisionamento dos grânulos, expondo e liberando o amido.

2.3.2.10 Fermentação de café e chá

Pectinases são importantes na fermentação de café e chá, pois aceleram o processo de fermentação, melhorando a qualidade do produto final. Enzimas pécnicas são adicionadas para remover a camada de mucilagem do grão, constituída de três quartos de substancias pécnicas.

Celulases e hemicelulases, presentes em preparações comerciais, são aspergidas nos grãos, acelerando o processo de fermentação. Como o tratamento dos grãos de café em larga escala com enzimas comerciais e custosas e não econômico, são utilizadas enzimas pécnicas microbianas obtidas da fermentação de resíduos da mucilagem.

2.4 IMOBILIZAÇÃO

De um modo geral, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (VILLENEUVE et al., 2000).

Segundo Brígida (2006), enzimas imobilizadas são aquelas que se encontram ligadas covalentemente ou não em um suporte que possa proteger a capacidade catalítica da enzima. O processo de imobilização consiste em circundar o material com atividade biológica em uma matriz polimérica envolvida por uma membrana semipermeável. Esta membrana permite a difusão de nutrientes, oxigênio e protege de perdas internas da célula de ambos, stress mecânico e compostos tóxicos (QI et al., 2006).

O termo enzima imobilizada inclui: (i) a modificação das enzimas de forma a torná-las insolúvel em água; (ii) a utilização de enzimas na forma solúvel em reatores equipados com membranas de ultrafiltração, que permitem o escoamento dos produtos da reação, porém retendo a enzima no interior do reator; e (iii) a restrição da mobilidade da enzima pela ligação à outra molécula que torna o sistema insolúvel no meio reacional (MIRANDA, 2004).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

O aumento da atividade enzimática geralmente ocorre, pois a enzima quando imobilizada fica protegida pelo suporte frente às trocas de pH, temperatura, força iônica, forças de cisalhamento, interface ar - líquido entre outras variações do meio solvente em que se encontra (WISEMAN, 1991).

A tecnologia de imobilização une os conhecimentos da química, bioquímica e biologia celular com aqueles da engenharia, buscando sempre ampliar às aplicações das enzimas na conversão de matérias-primas, normalmente de baixo custo, em produtos de maior valor agregado. Dessa forma, a imobilização de enzimas é realizada não só com o propósito de atender aplicações puramente científicas, onde são utilizadas como modelos para estudar a relação entre a atividade catalítica e a estrutura proteica, mas principalmente visando o uso comercial em processos contínuos (MIRANDA, 2004).

Segundo Assis et al., (2004), as enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens em relação às enzimas solúveis. Entre elas, pode-se citar a capacidade de reutilização da enzima, maior facilidade de separação do produto final, diminuindo as etapas posteriores de purificação do mesmo. A imobilização enzimática permite a operação contínua, facilita o controle da reação, reduz o volume desta e possibilita uma alta concentração catalítica no reator. A reação pode ser interrompida no momento desejado pela simples remoção da enzima, em processos de batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência, em reatores contínuos. O processo de imobilização ainda permite a modificação favorável das propriedades catalíticas de algumas enzimas, as quais passam a apresentar maior estabilidade ao pH e a temperatura.

A escolha de um processo de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais do processo, tais como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para a fixação da

enzima. Assim, o método escolhido deve atender a duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a controle e down-streaming process (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Industrialmente, as pectinases apresentam ampla utilização nas indústrias de alimentos e bebidas (RODRÍGUEZ e SERRAT, 2008), assim como podem ser utilizadas em áreas diversas, como a indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, detergentes e no tratamento de efluentes (KASHYAP et al., 2001).

Para a maioria dos usos industriais, as poligalacturonases imobilizadas produzidas por fungos provam ser úteis pela atividade pectinolítica e ótimo de ação em faixa de pH baixo, servindo para grande parte das aplicações em processos envolvendo frutas e vegetais (DE MELO et al., 2008).

Delcheva et al., (2007) imobilizaram pectinase de *A. niger* em membrana copolimérica de poliacrilonitrilo ativada ou não com glutaraldeído, e encontraram pH ótimo de 5 e 5,5 para a membrana não ativada e ativada com glutaraldeído, respectivamente. Para a enzima imobilizada em ambas as membranas a temperatura ótima ficou em 60 °C.

Reham et al. (2013) utilizaram alginato de cálcio como suporte para a imobilização de pectinase de *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 e encontraram que a imobilização incrementa o tempo ótimo de reação para a degradação de pectina de 5 a 10 min. e a temperatura de 45 a 55 °C, se comparada com a enzima livre, no entanto reportaram pH ótimo de 7 tanto para a enzima livre quanto imobilizada.

Shukla et al., (2010) estudaram a imobilização covalente de poligalacturonase de *A. niger* em nylon-6 ativado com glutaraldeído e obtiveram eficiência de imobilização de 40 % e determinaram que o imobilizado pode ser reutilizado por 4 ciclos mantendo 50 % da sua atividade inicial. Rozie et al., (1988) realizaram a imobilização de Endo-poligalacturonase comercial (Rapidase®) em alginato de cálcio e determinaram rendimento de imobilização de aproximadamente 75%. Pifferi e Spagna (1987) obtiveram 16,2 % de rendimento de imobilização quando imobilizaram endo-poligalacturonase sobre γ -alumina.

Serrat e Valverde (2005) imobilizaram covalentemente Endo-poligalacturonase de *Kluveromyces marxianus* CECT 11769 em alginato de sódio ativado com glutaraldeído obtendo 26,4% de rendimento da imobilização e uma atividade enzimática imobilizada de 195 U/g. Rao et

al. (2000) determinaram que a Endo-poligalacturonase de *A. ustus* quando imobilizada covalentemente em sílica gel modificada retém 28 % da sua atividade original e pode ser reutilizada por 10 ciclos de reação com cerca de 90% de retenção da sua atividade original.

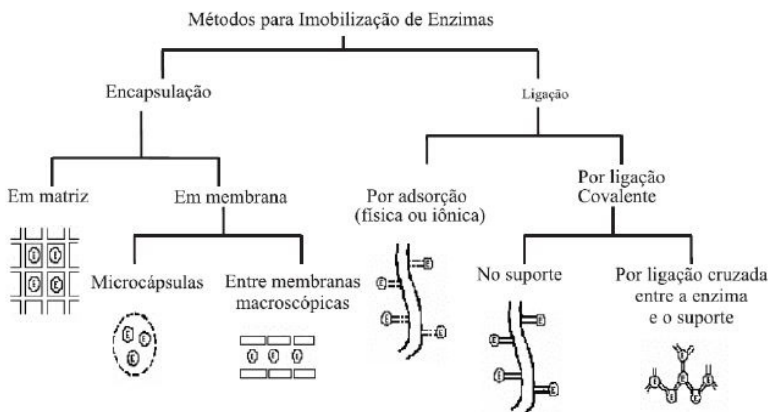
Esawy et al., (2013) encapsularam pectinases parcialmente purificadas de *A. niger* NRC1ami em esponja de polivinil álcool (PVA) e obtiveram atividade específica de 270 U/mg e 66 % de rendimento de imobilização.

Lei e Bi (2007) obtiveram 73% de retenção da atividade enzimática no imobilizado de pectinase em copolímeros de poliestireno-b- ácido acrílico (PS-b-PAA).

2.4.1 Métodos de imobilização de enzimas em diferentes suportes

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada. Os principais métodos de imobilização são: adsorção, ligação covalente, quelação e encapsulação (KENNEDY, 1988). A Figura 6 mostra os diferentes métodos de imobilização de enzimas.

Figura 6 - Métodos de imobilização de enzimas em diferentes suportes.



Fonte: DALLA-VECCHIA et al., 2004.

2.4.1.1 Adsorção

É o método mais simples e utilizado para imobilização de enzimas. A enzima é imobilizada sobre um suporte sólido por ligações fracas, tais como interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas.

A escolha do suporte depende de suas propriedades que são importantes para aplicações industriais como: resistência mecânica e estabilidade física, caráter hidrofóbico e custo. Suportes como pérolas de vidro poroso, Celite e biopolímeros são muito utilizados nestes processos (VINELLEUVE et al., 2000).

2.4.1.2 Ligação Covalente

Neste método, a enzima é covalentemente ligada a um material insolúvel, em água, pela reação entre grupos funcionais da proteína e grupos reativos do material ativado. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. Neste caso, são envolvidos os resíduos de aminoácidos não essenciais à catálise enzimática e grupos reativos da superfície do suporte. Entre os grupos funcionais de resíduos de aminoácidos que podem participar da reação encontram-se: grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico; grupos amino da lisina e da hidroxilisina; hidroxila da serina e outros (DALLA-VECHIA et al., 2004; TAYLOR, 1991; KENNEDY et al., 1988).

2.4.1.3 Quelação

Esta técnica envolve o uso de compostos de metais de transição que compõe como uns dos meios ativadores da superfície do suporte, permitindo a união direta da enzima, sem pré-derivação do suporte ativado, formando assim os quelantes. Os suportes usados são: vidro, quitina, celite, gelatina e celulose. Uma extensão para este processo é a derivatização do suporte ativado com o ácido 5-aminosalicílico para aumentar a força de ligação da enzima ao sistema. Também é possível formar o hidróxido ou óxido hídrico na presença de metais de transição. Enzimas imobilizadas ativas têm sido preparadas utilizando-se a técnica da ativação da superfície do suporte com metais de transição, formando ao final, um quelato entre a enzima e a superfície ativa do suporte.

2.4.1.4 Encapsulação

Este método está fundamentado na diferença de tamanho entre a molécula do catalisador e do soluto, e aqui duas aproximações têm sido adotadas: (a) a formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a numa estrutura tridimensional, ou (b) o biocatalisador é retido em uma membrana porosa. Nestes casos a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. Consequentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzimas imobilizadas. Este método pode compreender a encapsulação em gel, fibras e a micro encapsulação.

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, micro-organismos, aditivos alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica. Alguns polímeros gelificam por geleificação iônica, geleificação térmica ou por combinação desses dois mecanismos. A preparação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molar, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Mediante essa técnica, o material de recheio é extrusado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada (ROCHA e GROSSO, 2006).

As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima, no interior de um volume relativamente pequeno, e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: (a) a restrição de que os biocatalisadores somente podem ser aplicados com substratos de baixo peso molecular; (b) a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; (c) a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação; e, (d) os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substrato no interior da matriz porosa.

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos, para cada aplicação de uma enzima imobilizada, é necessário se escolher o procedimento mais simples e mais barato, que resulte numa enzima imobilizada com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

2.4.2 Suportes de imobilização

As características das matrizes ou suportes são de grande importância na determinação da eficiência do sistema de imobilização. Ao selecionar um suporte para uma enzima, deve-se levar em conta fatores como pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, conjugação de cofatores e o processo de separação do substrato do produto (FLORES, 2011). As propriedades ideais de um suporte incluem a resistência física à compressão, biocompatibilidade, resistência ao ataque microbiano e baixo custo (FAJARDO-OCHOA et al., 2011).

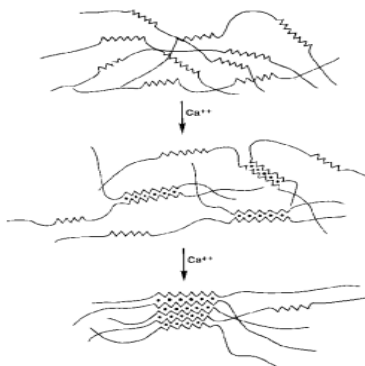
2.4.2.1 Alginato de sódio como suporte de imobilização

As esferas de alginato cálcico representam um dos suportes mais comumente utilizados para a imobilização de enzimas e proteínas, assim como também para o controle da liberação de fármacos (ALMEIDA e ALMEIDA, 2004). Os alginatos são heteropolissacarídeos lineares, extraídos a partir de algas marrons pertencentes à classe Phaeophyceae.

As propriedades físicas dos alginatos são determinadas pela composição e a extensão das sequências dos ácidos e pela massa molecular; desta forma, alginatos com maior porcentagem de blocos G formam géis mais rígidos e quebradiços, que podem sofrer sinerese. Já os géis de alginato com maior porcentagens de blocos M são mais elásticos e dificilmente sofrem sinerese (IWAKI, 2010).

Segundo Fundueanu et al. (1999), as propriedades de geleificação do alginato, derivam da ligação cooperativa de cátions bivalentes localizados entre blocos homopoliméricos de resíduos de guluronato (blocos G), os quais se alinham para formar cavidades eletronegativas que permitem que íons Ca fiquem localizados dentro delas, assemelhando-se a ovos dentro de uma caixa de ovos. Por esta razão, o modelo proposto para explicar as propriedades geleificantes dos alginatos ao reagir com os sais cálcicos é chamado “modelo de caixa de ovo” ou egg-box model. Na Figura 7, se ilustra a melhor a formação do chamando “modelo de caixa de ovo”.

Figura 7 - Modelo “caixa de ovo” para a formação do gel de alginato com íons cálcio.



Fonte: FUNDUEANU et al., 1999.

2.4.2.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína composta de material hidrocolóide, rica em aminoácidos e pode absorver até 10 vezes o seu peso em água (DATTA et al., 2013). Obtém-se a partir da hidrólise controlada ácida ou alcalina do colágeno do tecido conectivo, principalmente da pele e dos ossos dos animais, uma vez que for eliminado todo o material contaminante (BADUI, 1999).

O processo alcalino é amplamente utilizado para o pré-tratamento do couro bovino e tratamento ácido para a pele suína. A gelatina obtida pelo método ácido é denominada de Tipo A e pelo método básico é do Tipo B (KEMPKA, 2012). Sua vida de prateleira tem atraído a atenção para imobilização de enzimas. O uso de gelatina como agente imobilizante é barato, biocompatível e sua estrutura facilita múltiplas combinações de interações moleculares (DATTA et al., 2013).

A resistência do gel da gelatina é determinada utilizando um teste chamado de Bloom (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). O Bloom é uma medida de dureza, consistência, firmeza e compressibilidade de um gel a uma determinada temperatura, avaliada através da carga em gramas requeridas para produzir uma depressão no gel em condições normais; as gelatinas comerciais oscilam de 50 a 300 g (Bloom) (KEMPKA, 2012).

O aumento do índice de Bloom leva a uma notável melhoria das propriedades mecânicas e a uma redução significativa da capacidade de

absorção de água (LAI, 2009). O uso de gelatina como agente imobilizante é barato, biocompatível e sua estrutura facilita múltiplas combinações de interações moleculares.

Shen et al. (2011) desenvolveram uma matriz híbrida de alginato-gelatina-fosfato de cálcio para a imobilização de β -galactosidase, baseada na interação que de forma natural acontece entre as moléculas de colágeno e o fosfato de cálcio, principal mineral dos ossos de vertebrados, dentes de mamíferos e escamas de peixe.

Zhang et al. (2009) preparam cápsulas híbridas de alginato-quitosano- fosfato de cálcio, para a imobilização de transglucosidase utilizada durante a conversão de maltose em isomalto-olissacarídeos. Já Zhang et al., (2008) encapsularam álcool desidrogenase em microcápsulas híbridas biométicas de alginato-gelatina-carbonato de cálcio.

2.4.2.3 Poliuretano (PU)

O sucesso de biomateriais a partir de polímeros é a relativa facilidade/baixo custo em que eles podem ser sintetizados com ampla faixa de propriedades como: alta resistência mecânica, baixo atrito, dureza, elasticidade. A grande variedade de reações envolvidas na ciência dos polímeros torna altamente desejável descobrir e desenvolver novas estratégias de síntese e gerar novos biomateriais poliméricos a partir dessas estratégias, buscando assim novas formas de aplicações destas estruturas (VILMAR, 2013).

A criação de poliuretano é atribuída ao químico industrial alemão Otto Bayer (1902-1982), o qual descobriu a reação de poliadição de isocianato e polióis. O produto foi inicialmente desenvolvido como um substituto da borracha no início da Segunda Guerra Mundial (www.americaindustry.com).

O poliuretano (PU) pode ser definido como um polímero resultante da reação de um isocianato e um composto hidroxilado em que ambos pode ser di ou polifuncionais (DELPECH, 1999; YEGANEH, 2005; KLOSS, 2007; LINGAPPA, 2011).

Os isocianatos podem ser aromáticos, alifáticos, ciclo-alifáticos ou policíclicos.

Podem ser representados pela fórmula geral $R(-N=C=O)_n$, onde o radical aromático R é o principal e n é a funcionalidade, que normalmente é igual a dois (diisocianato) ou superior (poliisocianato) (KLOSS, 2007). Já os polióis, com compostos de hidroxilas terminais na

molécula, podendo ser entre si 2 (diois) e 3 (trióis). Podem ainda ser poliéteres ou possuir estrutura hidrocarbônica (WOODS, 1995; ZAWADZKI, 1996, VILMAR, 2013).

A natureza química, bem como a funcionalidade dos reagentes deve ser selecionada de acordo com as propriedades finais desejadas. Esta flexibilidade permite obter uma infinita variedade de compostos com diferentes propriedades físicas, químicas e morfológicas, de acordo com necessidades específicas de uma determinada aplicação, fazendo com que os poliuretanos ocupem posição importante no mercado mundial de polímeros sintéticos de alto desempenho (WOOLEY e PETERSEN, 1994; CANEVAROLO e SEBASTIÃO, 2002; AKCELRUD, 2007; CANAUD, 2007; KLOSS, 2007; SANTOS, 2001; ALBIQUIM, 2013).

Os poliuretanos (PUs) são obtidos a partir de uma reação química quase instantânea de poliadição de um poliisocianato (di ou polifuncional) com um polioliol, podendo ainda ocorrer a adição de outros reagentes (com dois ou mais grupos de hidrogênio reativos) como agente de cura ou extensores de cadeia, contendo dois ou mais grupos reativos, catalisadores, agentes de expansão; surfactantes; cargas, agentes antienvelhecimento, corantes e pigmentos, retardantes de chama, desmoldantes, etc. (MANO, 1999; CALLISTER, 2000; CANAUD, 2007; VIEIRA, 2009, VILMAR, 2013).

A formação da espuma de PU ocorre em duas fases, a primeira fase é de dispersão dos reagentes onde o primeiro passo no processo de formação de espuma consiste em compatibilizar vários ingredientes, alguns dos quais imiscíveis. Em seguida ocorre a segunda fase, a de nucleação, onde as bolhas de ar são introduzidas durante a etapa de mistura dos reagentes (CANAUD, 2007; VILMAR, 2013).

Na ausência de qualquer surfactante, o volume de ar introduzido é muito pequeno. As bolhas são poucas e grandes e ocorre coalescência sem a influência estabilizante do surfactante. A tensão superficial do surfactante aumenta o volume de núcleos de ar misturado aos reagentes e diminui a tendência do gás difundir das bolhas menores para as maiores. Isto resulta em espuma com células maiores e mais uniformes (ZAREVÚCKA, 1996). Após, com o crescimento das bolhas, vários mecanismos conduzem ao crescimento da célula (VILMAR, 2013), tais como:

- difusão do gás recém-formado para as bolhas existentes;
- reação entre água e isocianato produz gás carbônico;

- simultaneamente, o calor de reação vaporiza o agente de expansão auxiliar. A solução se torna supersaturada com gás, o gás dissolvido começa a sair da solução;
- expansão do gás nas bolhas menores para as bolhas maiores.

A estabilização ocorre com a coalescência das células, que ocorre quando a camada líquida que separa as bolhas, ocorrendo rompimento, devido à instabilidade. Depois de formadas as células na espuma em crescimento devem ser estabilizadas até que as estruturas atinjam resistência através da polimerização.

O Poliuretano (PU), é um polímero que compreende uma cadeia de unidades orgânicas unidas por duas ligações iônicas. São amplamente usadas em espumas rígidas, flexíveis, elastômeros duráveis, adesivos de alto desempenho, selantes, fibras, vedações, gavetas, preservativos, carpetes, peças de plástico rígido e tintas (CATAL, 2010; VILMAR, 2013).

O uso de catalisador enzimático em fluido supercrítico empregam meios orgânicos, na tentativa de avaliar seus efeitos na polimerização, buscando o desenvolvimento de um novo processo tecnológico com viabilidade técnica e econômica (SANTOS, 2011).

A capacidade de remoção de sulfatos de águas residuais por meio de bactérias sulfato-redutoras imobilizadas em espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno de baixa densidade e cerâmicas baseadas em alumínio, foram avaliados. Os resultados indicaram o favorecimento das condições anaeróbicas necessárias ao desenvolvimento desses micro-organismos, bem como o aumento da resistência desses resíduos contendo altas concentrações de sulfato (SILVA et al., 2006).

A caracterização das células de micro-organismos em partículas de espuma de poliuretano está diretamente relacionada a de retenção da biomassa dentro da matriz: sendo aderida ao suporte, micro grânulos e mecanicamente retidos nos poros da espuma, bem como células dispersas aderidas a partículas, permitindo a otimização dos fluxos de substratos e produtos entre as espécies imobilizadas na matriz (AZEVEDO, 2005).

2.5 TRATAMENTO DE ENZIMAS EM FLUIDO PRESSURIZADO

A aplicação de enzimas em fluidos pressurizados, apesar de apresentar boas perspectivas, ainda não tem sido extensivamente estudada. Reações que representam especial interesse são as reações

enzimáticas em condições supercríticas, abrindo a possibilidade da utilização dos fluidos supercríticos em uma nova área, a biotecnologia (OLIVEIRA, 1999).

Os fluidos supercríticos começaram então a ser examinados como meio potencial para a catálise enzimática. O uso de solventes não aquosos para reações enzimáticas são atrativos por várias razões. Uma enzima em um solvente não aquoso pode possuir interações solvente/enzima similares àquelas de seu meio nativo e, então, mostrar atividade maior quando comparada à água pura. Os substratos podem, também, ser mais solúveis em um solvente não aquoso, fazendo com que as taxas de reação sejam maiores neste tipo de solvente (OLIVEIRA, 1999).

A aplicação de solventes em condições supercríticas é baseada na observação experimental da característica que muitos gases apresentam, de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (MC HUGH e KRUKONIS, 1994). Nestas condições, passa-se diretamente do estado gasoso ao estado supercrítico (HOYER, 1985). A concepção de estado supercrítico faz referência a um estado da matéria em que o composto se comporta como fluido, pois apresenta propriedades intermediárias entre a de um gás e de um líquido e também se refere ao fato de uma substância se encontrar em uma condição de temperatura e pressão acima dos valores críticos. No ponto crítico, as fases gasosa e líquida tornam-se idênticas, isto é, só uma fase existe (ALMEIDA FILHO, 2003).

A combinação das propriedades das fases líquida e vapor, característica do estado supercrítico ocorre de uma forma extremamente vantajosa para utilização dos fluidos supercríticos (FSC) como solventes. O FSC possui densidade próxima à do líquido, o que fortalece as suas propriedades de solvente. Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades singulares fazerem dos FSC meios bastante interessantes para reações químicas e enzimáticas (OLIVEIRA, 1999). A Tabela 1 apresenta as propriedades críticas de vários solventes que são comumente utilizados em reações enzimáticas.

A catálise enzimática em fluidos pressurizados apresenta interesse particular para as indústrias farmacêuticas e de alimentos, principalmente devido à facilidade de recuperação dos produtos, livres de solventes, ao final do processo.

Tabela 1 – Propriedades críticas de vários solventes.

Solvente	Peso Molecular g/mol	Temperatura crítica (K)	Pressão crítica (MPa)	Densidade (kg/L)
CO ₂	44,01	304,1	7,38	469
Água	18,02	647,3	22,12	348
Metano	16,04	10,4	4,6	162
Etano	30,07	305,3	4,87	203
Propano	44,09	369,8	4,25	217
Metanol	32,04	512,6	8,09	272
Etanol	46,07	513,9	6,14	276
Acetona	58,08	508,1	4,7	278

Fonte: Wen et al., 2009.

É importante salientar que em geral o solvente pode afetar fortemente a atividade da enzima através de sua interação com o suporte, no caso de enzimas imobilizadas, ou mesmo com radicais da própria enzima. Neste contexto, as enzimas podem apresentar diferentes comportamentos dependendo do solvente utilizado, mesmo quando submetidas às mesmas condições experimentais (FEIHRMANN, 2005).

As interações proteína-meio pressurizado que podem afetar a atividade enzimática incluem a partição do substrato, produto e água entre a enzima e o solvente, e interações diretas entre o fluido e a enzima, as quais podem inibir ou inativar a enzima por quebra das ligações hidrogênio, iônica e hidrofóbica. A partição do substrato entre o sítio ativo e o solvente depende da hidrofobicidade do solvente e da enzima. Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (KNEZ e HABULIN, 2001).

Enzimas são inativas na completa ausência de água, mas a quantidade de água necessária para uma enzima ser cataliticamente ativa é surpreendentemente baixa (ZAKS e KLIBANOV, 1985). Em sistemas não aquosos, o teor de água necessário para manter uma enzima na forma cataliticamente ativa é geralmente equivalente à uma

monocamada por molécula de enzima. Estas moléculas essenciais de água são ligadas por interações não-covalentes que mantêm a estrutura nativa da proteína. Se as moléculas de água em volta da enzima são perturbadas, a enzima geralmente perde sua atividade.

O meio não aquoso pode retirar a água associada à molécula da enzima e esta tendência depende do tipo de solvente (ZAKS e KLIBANOV, 1985). Solventes mais hidrofílicos apresentam uma tendência maior em retirar a água essencial para a molécula da enzima.

A atividade enzimática é sensível ao pH, e em soluções aquosas a dependência da atividade com o pH reflete a ionização de vários resíduos de aminoácidos que têm um papel importante na catálise. Contudo, em meio não aquoso, a falta de uma fase aquosa definida torna difícil a definição do pH, e medidas diretas de pH não são factíveis (DORDICK, 1989). Em meio não aquoso, enzimas mudam sua atividade se o pH do meio micro aquoso em volta dela for alterado.

Para a ativação da enzima é necessária a presença de pelo menos uma pequena monocamada de água. Em reações enzimáticas sob condições supercríticas a água divide-se entre a enzima e a mistura reacional. Em um sistema essencialmente não aquoso a água divide-se preferencialmente entre o solvente com o aumento da hidrofobicidade (FEIHRMANN, 2005).

O uso de fluidos pressurizados como solventes para reações químicas pode ser uma rota promissora no sentido de eliminar traços de solvente dos produtos reacionais. Adicionalmente, processos industriais em condições próximas ao ponto crítico podem ser vantajosos em termos de: consumo de energia, facilidade de recuperação do produto e minimização da formação de produtos secundários (KNEZ e HABULIN, 1998).

2.6 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A estabilidade e a atividade enzimática podem depender da espécie de enzima, das características do solvente, do conteúdo de água da enzima/suporte/meio reacional e das variáveis de processo envolvidas, significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema sob investigação (FRANKEN et al., 2010; FADIGLU e ERKMEN et al., 2002).

Como o tratamento térmico é difundido na indústria alimentícia e/ou químicas, o conhecimento da estabilidade térmica das enzimas é essencial, a fim de otimizar as condições de processamento (GUIAVARCH et al., 2003; GUMMANDI e PANDA, 2003; REXOVA-BENKOVA e MARKOVIC, 1976; VAN DEN BROECK et al., 1999), bem como em condições diferentes pHs do meio reacional.

2.7 APLICAÇÃO DE PECTINASES NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS

Nas últimas décadas, a utilização de enzimas na indústria vem aumentando rapidamente porém, ainda existe um grande campo para sua expansão. A aplicação de enzimas na polpa, no processamento de bagas, uvas, maçãs e peras, é uma prática muito comum hoje em muitos países. A despectinização de sucos após a prensagem é necessária quando se quer obter um suco cristalino e prevenir a gelatinização durante a concentração ou conservação de sucos concentrados. A adição de outros complexos de enzimas, tais como as celulases, pode também resultar na melhoria dos rendimentos de suco e na melhor extração da cor (NOVO NORDISK, 1992). No Brasil, a utilização de enzimas no processamento de sucos de frutas já é comum em escala industrial, principalmente no caso de obtenção de sucos de maçã, uva e na produção de vinhos e sidras (NOVO NORDISK, 1992).

Todos os tipos de frutas e bagas de significado industrial e nutricional contém quantidades variáveis de um polissacarídeo natural, a pectina, que atua como um tipo de cola que une as paredes celulares dos vegetais. Na fruta verde, a pectina se encontra em sua forma insolúvel, às vezes chamada de protopectina, que é responsável pela firmeza da fruta verde. Quando a fruta amadurece, ocorre uma hidrólise parcial em uma forma mais solúvel, o que amolece a estrutura da fruta. Devido à solubilidade parcial nesta fase, parte da pectina passa para o suco durante a prensagem, resultando em um aumento da viscosidade e dificuldade na obtenção de otimização nos rendimentos da produção dos sucos, podendo provocar entupimento de filtros e redução da velocidade de filtração. O suco extraído é pobre com respeito à cor e aos componentes aromáticos. Além disso, a pectina torna a concentração de sucos extremamente difícil, dificultando a retirada de água do suco (NOVO NORDISK, 1992; BRASIL et al., 1996).

A aplicação de enzimas pectinolíticas visa basicamente, reduzir a viscosidade do suco, que inicialmente aumenta por ação da protopectina solubilizada, devolvendo assim a viscosidade inicial. As pectinases visam ainda destruir a estrutura gelatinosa na capa intermediária dos frutos, por quebra da pectina não dissolvida. Assim, o suco é liberado mais facilmente da fruta macerada, e conseqüentemente o rendimento da extração aumenta reduzindo o tempo de processo. As pectinases permitem ainda liberar da estrutura das células, por maceração, as substâncias que influenciam na qualidade (cor, aroma, etc.) sem alterar a consistência da fruta para a extração (NOVO NORDISK, 1992; BRASIL et al., 1996).

Comercialmente já se tem utilizado pectinases na obtenção de sucos clarificados, coma função de hidrolisar a cadeia da pectina até a eliminação total desta, para se obter um produto límpido e também reduzir a viscosidade (do CANTO, 1995). A ação das pectinases na clarificação do suco não se restringe apenas à redução da viscosidade. A pectinametilesterase (PME) leva a desmetoxilação parcial da pectina liberando alguns grupos de ácido galaturônico carregados negativamente. Estes grupos podem se combinar com cátions com forte capacidade de formar complexos, principalmente cálcio, e conseqüentemente formando flocos com fácil tendência à sedimentação e podendo ainda facilitar a etapa de filtração. Os ácidos liberados podem ainda se combinar com cátions com fraca capacidade complexante, levando à formação de flocos hidratados e relativamente estáveis, que podem formar uma névoa de pectina com proteínas, que posteriormente poderão precipitar com o tratamento térmico. A poligalacturonase rompe cadeias longas de pectina e reduz a viscosidade. A quebra destas cadeias muda a carga dos complexos proteína-pectina, levando à agregação destes em grandes partículas que sedimentam facilmente, melhorando a filtração. (VARNAM e SUTHERLAND, 1994).

Vários trabalhos tem estudado a aplicação de enzimas na extração de suco e na redução da viscosidade de diversos frutos. No caso de suco clarificado de limão, pode-se empregar um complexo contendo pectinases e celulases para atuar tanto na hidrólise da pectina, quanto na membrana externa das células contendo o suco da fruta. Na extração de suco de maçã, o uso de complexos enzimáticos, contendo celulases e pectinases é fundamental para hidrolisar a pectina que ocorre em grande quantidade nessa fruta, mesmo nas maçãs mais maduras (do CANTO, 1995).

2.7.1 Produção e processamento de polpa e suco de frutas

A evolução da industrialização de frutas no Brasil e no mundo aponta para o caminho da agregação de valor. Os alimentos são processados por várias razões: para preservar e estender o prazo de validade, aumentar a digestibilidade, a biodisponibilidade de alguns nutrientes, melhorar a palatabilidade e a textura, preparar alimentos prontos para o consumo, eliminar micro organismos, inativar toxinas, remover partes não comestíveis, inibir fatores antinutricionais e criar novos tipos de alimentos (SHILS, 2002).

A fim de atender a nichos de mercados diferenciados, o segmento das frutas processadas entrou na era da diversificação, sendo incorporadas na rotina das pessoas em forma de sucos, polpas, conservas, e em outros produtos. (PEREIRA, 2005).

O processamento de frutas para obtenção de polpas, sucos, doces, geleias, frutas desidratadas ou secas é um atividade agroindustrial importante, uma vez que agrega-se valor econômico à fruta, evitando desperdícios e minimizando perdas que podem ocorrer durante a comercialização do produto *in natura*. A ampliação deste mercado depende atualmente do aumento do consumo e da qualidade do produto final. Neste caso, a qualidade engloba os aspectos físicos, químicos, físico-químicos, microbiológicos, nutricionais e sensoriais. Paralelamente cresce a demanda por produtos transformados, de fácil consumo, como frutos pré-processados que mantenham as características do produto *in natura*. Os sucos de frutas podem ser comercializados em suas diversas formas, como sucos integrais, reconstituídos, clarificados ou não, néctares, sucos compostos ou misturas concentradas e congeladas (EMBRAPA/SEBRAE, 1997).

2.7.2 Obtenção da polpa de frutas

Polpa pode ser definida como um produto obtido pelo esmagamento da parte carnosa comestível da fruta por processos tecnológicos adequados. As frutas destinadas à fabricação devem ser sãs, maduras, não apresentar nenhum tipo de sujidade na casca ou terem sofrido ataques de insetos ou parasitas. As polpas não devem conter resíduos de cascas ou sementes e devem apresentar cor, aroma e sabor característicos (EMBRAPA/SEBRAE, 1997; MATTA et al., 2005).

Em um processo industrial as frutas são descarregadas, pesadas e enviadas diretamente para a linha de produção. As frutas são lavadas em água clorada (em torno de 8 a 12 ppm de cloro livre) com intuito de serem retiradas a terra e demais sujeiras aderidas ao produto reduzindo os problemas relacionados com a possível contaminação microbiana. A lavagem pode ser feita por imersão, para que ocorra a retirada de sólidos por decantação. Seguida de aspersão de água clorada e escovamento com cerdas de nylon e enxague final (EMBRAPA/SEBRAE, 1997; DOWNES, 1995).

A seguir, as frutas passam por um processo de seleção, onde todas as que são impróprias e as partes defeituosas são descartadas. Os frutos devem estar maduros, de modo que seja obtido o máximo de rendimento em termos de teor de sólidos solúveis e de aroma. Esta etapa é muito importante, pois a presença de frutas estragadas ou mesmo deterioradas pode comprometer a qualidade do produto final. Por outro lado, frutas não totalmente maduras podem conferir características de sabor desagradáveis ao suco final (EMBRAPA/SEBRAE, 1997; DOWNES, 1995).

Dependendo do tipo de fruta, esta poderá ser despulpada sem a eliminação do caroço, usando equipamento adequado. É o caso da manga e do pêssego, que podem ser despulpados diretamente, usando despulpador inclinado com braços da escova. O caroço é eliminado limpo, sem restos de polpa e sem sofrer nenhum dano pelo equipamento (ITAL, 1991).

Para a obtenção da polpa é necessário que seja realizado o despulpamento. No despulpamento há a separação das cascas, fibras, sementes e outras partes não comestíveis. Esta etapa pode ser realizada em despulpadeira vertical ou horizontal, onde ocorre a passagem da fruta por uma malha de aço inoxidável com diferentes tamanhos de furos para o seu refinamento. A polpa é recolhida na parte anterior do equipamento em recipientes limpos de aço inoxidável e, transportada ou bombeada para a etapa seguinte (ITAL, 1991).

Após a extração da polpa, esta poderá ser envasada a quente, ou com a utilização de conservantes, ou ainda congelada. A operação de congelamento deve ser realizada no menor espaço de tempo possível afim de manter as características originais das frutas. Quanto mais rápido esta etapa for realizada, melhor será a qualidade do produto final. No caso da polpa de pêssego, quando o objetivo é congelar, resfria-se a polpa em trocadores de calor de superfície raspada, com água até 30°C e com amônia até 0°C, antes do envasamento para em seguida proceder o

congelamento em câmaras frigoríficas a temperatura de -25°C . É importante ressaltar que a polpa deve ser mantida congelada até o momento do seu consumo. A temperatura recomendada para seu armazenamento, em câmaras frigoríficas varia de -18°C a -25°C . Congeladores domésticos também podem ser utilizados. Como estes equipamentos domésticos atingem uma faixa de temperatura entre -8°C e -10°C , os produtos terão tempo de vida de prateleira menor (EMBRAPA/SEBRAE, 19997; JACKIX, 1988).

2.7.3 Suco de frutas

O suco de frutas é um líquido límpido ou turvo extraído das frutas, através de processo mecânico, não fermentado, de cor, sabor e aroma característicos da fruta do qual ele foi extraído (ASHURST, 1998). A obtenção do suco ocorre a partir de frutas frescas, maduras e lavadas através de um processo industrial tecnologicamente adequado. Não podem apresentar-se diluídos nem conter odor ou sabor estranhos, e/ou algum indício de fermentação. Podem ser estabilizados através de algum tratamento físico ou químico autorizado ou conter algum tipo de aditivo, que garanta a conservação e características atrativas ao consumidor. Os sucos podem ser concentrados mediante a retirada de 50% de sua água de constituição, através de processos tecnológicos adequados. Este suco concentrado, antes de ser consumido, deve ser diluído em água até apresentar as mesmas características do suco originalmente utilizado (EMBRAPA/SEBRAE, 1997).

A maior parte dos sucos de frutas contém entre 75 a 90% de água, de 9 a 25% de açúcares, de 0,1 a 5% de ácidos orgânicos, de 0,1 a 0,2% de fibra dietética e de 0,2 a 0,6% de proteína. Outros componentes estão presentes em traços tais como minerais, vitaminas, constituintes de aroma, pigmentos, lipídios, nucleotídeos, amido, pectina e micro organismos (SOUTHGATE et al., 1995).

Para obtenção do suco, inicialmente se faz a extração da polpa. Após a obtenção da polpa, o processamento de suco de frutas basicamente é realizado através de etapas de inativação enzimática, prensagem, refino ou clarificação, dasaeração, pasteurização, formulação, envase e armazenamento (VARNAM E SUTHERLAND, 1994).

A inativação pelo calor consiste em submeter o produto, imediatamente após o despolpamento, a um tratamento térmico que depende de cada fruta, com o objetivo de inibir ou minimizar as

transformações enzimáticas e reduzir a carga microbiana, ambas indesejáveis e que podem deteriorar o produto. A inativação térmica, dentre outras vantagens, confere ao suco a estabilidade da cor e da consistência, parâmetros importantes para a qualidade do produto (EMBRAPA/SEBRAE, 1997).

Dependendo do tipo de produto final que se deseja, o suco requer uma etapa de clarificação. A clarificação convencional envolve a utilização de coadjuvantes como albumina, gelatina, caseína, quitosana ou bentonita, que tem por objetivo melhorar o processo de clarificação e filtração. A utilização de preparados enzimáticos específicos atuam sobre as fibras e pectinas tem sido cada vez mais difundida, pois o tratamento enzimático hidrolisa a pectina e celulose, reduzindo a viscosidade e turbidez do suco. Além disso, a hidrólise das pectinas libera oligômeros solúveis e ácidos galacturônicos carregados negativamente, que podem combinar-se bem com cátions, formando complexos e conseqüentemente flocos, facilitando a sedimentação e filtração (VARNAM e SUTHERLAND, 1994).

O oxigênio incorporado ao suco nas etapas anteriores causa oxidações, destruindo algumas vitaminas e prejudicando a cor e o sabor do suco. O desaerador normalmente é colocado em linha com o pasteurizador, para que o suco só atinja a temperatura de pasteurização após a eliminação do oxigênio.

Após as etapas de obtenção do suco, este é enviado ao tanque de formulação onde são adicionados os conservantes, antioxidantes e estabilizantes. Após a formulação final, o produto é envasado sob condições higiênicas em embalagens apropriadas. O suco envasado pasteurizado deverá ser armazenado sob refrigeração. A adição de conservantes e acidulantes pode, em alguns casos, permitir que o suco seja armazenado em temperatura ambiente (EMBRAPA/SEBRAE, 1997).

2.8 CONCLUSÕES

Na revisão da literatura apresentada no decorrer deste capítulo, apresentou-se uma explanação sobre as principais aplicações de pectinases.

Para aumentar a viabilidade técnica e econômica do uso destas enzimas em diferentes processos é necessária a busca de alternativas para aumentar a estabilidade e a atividade enzimática. O uso de fluidos

pressurizados em substituição a solventes orgânicos tem sido objeto de intensas pesquisas na área de enzimas, pois em alguns casos, o uso de solventes pressurizados leva a um aumento na atividade enzimática. Neste contexto, como contribuição para estas pesquisas o presente trabalho investigou a influência de fluido pressurizado (gás liquefeito de petróleo – GLP) sobre a atividade enzimática de pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) dos complexos pectinolíticos comerciais (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash), após tratamento das enzimas imobilizadas em suporte de gelatina-alginato de sódio e imobilizadas em suporte de poliuretano (PU), a estabilidade enzimática de pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) do complexo pectinolítico comercial (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash) em diferentes temperaturas, sua aplicação na clarificação de suco de frutas bem como a possibilidade de reutilização, contribuindo para ampliar o campo de aplicação dos complexos enzimáticos pectinolíticos, pois há relatos que o tratamento com fluidos pressurizados aumenta a atividade enzimática e a estabilidade das enzimas tratadas.

REFERÊNCIAS

- ANFINSEN, C. B. **Principles that govern the folding of protein chains**. Science. v.181, p. 223-230. (Nobel Lecture), 1973.
- AGUILAR, G. e HUITRON, C. **Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition**. Enzyme and Microbial Technology. 9:690-696, 1987.
- AKCELRUD, L., **Fundamentos da Ciência de Polímeros**. Ed. Manole, Barueri, São Paulo, 2007.
- ALBIQUIM. Associação Brasileira de Química, 2013. Disponível em <http://ebiquim.org.br/poliuretanos/quimicamente.htm>. Acesso em 16 de agosto de 2014.
- ALKORTA I, GARBISU C, LLAMA J.M., SERRA, J.L. **Industrial applications of pectic enzymes: a review**. Process Biochemistry. 1998; v.33: 21-28, 1998.
- ALMEIDA, P.; ALMEIDA, A. **Cross-linked alginate–gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol**, Journal of Controlled Release, v. 97, p. 431– 439, 2004.
- ALMEIDA FILHO, C. **Estudo experimental e teórico de coeficientes de difusão binários envolvendo componentes de óleos essenciais em dióxido de carbono supercrítico**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- ASHURST, P. R. **The chemistry and technology of soft drinks and fruit juices**. Sheffield Academic Press & CRC Press, USA, 258p. 1998.
- ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. **Activity of pectinamethylesterase, pectina content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development**. Food Chemistry 74, 133–137, 2001.
- ASSIS, S. A.; FERREIRA B. S.; FERNANDES, P.; GUAGLIANONI, D.G., CABRAL J.M.S., OLIVEIRA, O.M.M.F. **Gelatin-immobilized pectinamethylesterase for production of low methoxyl pectina**. Food Chemistry 86 (3), 333-337, 2004.
- ASSIS, S.; FERNANDES, P., FERREIRA, B., CABRAL, J., FARIA OLIVEIRA, O. **Screening of supports for the immobilization of**

pectinmetylesterase from acerola (*Malpighita glabra* L.). Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 79. P. 277-280, 2004.

AZEVEDO, J. G. W., **Estudo das condições de imobilização de *Streptomyces olindensis* ICD20 em alginato de cálcio, visando a produção de retamicina,** p 109, São Paulo, SP, 2005.

BADUI, S. **Química de los alimentos.** Cuarta edición. México: Editorial Pearson educación, 1999.

BAKER, R.A.; CAMERON, R.G. **Clouds of citrus juices and drinks.** Food technology. 53, (1), 64-69, 1999.

BHAT, M.K.; **Celulases and related enzymes in biotechnology.** Biotechnology Advances, v.18: 355-383, 2000.

BRASIL, I. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W. **Estudo do Rendimento de Suco de Goiaba Extraído por Tratamento Enzimático.** In: Ciência e Tecnologia de Alimentos. V. 16 n. 1, p. 57-61. 1996.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L.; **Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*.** Ciência Agrotecnologia. v.24: 137-152, 2000.

BRÍGIDA, A.I.S., **Estudo da imobilização de lípase tipo B de *Cândida antártica* utilizando fibra da casca de coco verde como suporte.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BOAS, E.V.B.; CHITARRA A.B.; MALUF, W.R.; CHITARRA, M.I.F. **Modificações texturais de tomates Heterozigotos no Loco Alcobaça.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35 (7), 1447, 2000.

BÜHLER, M.; LIMPER, J.; MÜLLER, A. et al. **Las enzimas en la nutrición animal.** 1.ed. Bonn: AWT, p.47, 1998.

CALLISTER, F. W. D., **Ciência e Engenharia dos Materiais – Uma introdução LTC – Livros Técnicos e Científicos S A,** Rio de Janeiro, 2000.

CANAUD, C., **Tecnologia do Poliuretano,** Dossiê técnico. Rede de tecnologia do Rio de Janeiro. REDETEC, serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT, disponível em <http://www.respostatecnica.org.br>. acessado em 26 de julho de 2014.

Sede tecnológica do Rio de Janeiro, junho de 2007.

CANEVAROLO, Jr.; SEBASTIÃO, V., **Ciência de Polímeros – Um texto básico para Tecnólogos e Engenheiros**. Artliber Editora. São Paulo, 2002.

CARVALHO, H.A.; CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA A.B.; CARVALHO, H.S. **Efeito da Atmosfera Modificada sobre Componentes da Parede Celular da Goiaba**. *Ciência e Agrotecnologia*, 25 (3), 605-615, 2001.

CARVALHO, S. **Pectinases produzidas pelo Agente “G088”: Extração e purificação**. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Lavras Minas Gerais - Brasil, 2007.

CATAL, B., **Poliuretane Technology**. *Enzyme* 11, 567-577. John Wiley & Sons, New York, 2010.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Enzimas in: Bioquímica ilustrada**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, p.53-66, 1989.

CORREIA, A. A. DA Silva; **Maceração enzimática da Polpa de Noni (*Morinda citrifolia L.*)**. Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos. Fortaleza, 2010.

COSGROVE, D.J. **Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants**, *Annu Ver Cell Dev. Biol.* 13, 171-201, 1997.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus Níger* mutante**. Tese (Doutorado em Ciências). Pós-graduação em Tecnologia de Processos Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 98f, 1993.

CSANÁDI, Z.; SISAK, C. **Immobilization of Pectinex Ultra SP-L pectinase and its application to production of fructooligosaccharides**. *Acta Alimentaria*, v. 35, n. 2, p. 205–212, 2006.

DALLA-VECCHIA, R., NACSIMENTO, M.G., SOLDI, V.; **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. *Química Nova*, v.27, 2004.

DARTORA, A. B.; BERTOLIN, T. E.; BILIBIO, D.; SILVEIRA, M. M. E COSTA, J. **Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endo polygalacturonase by solid state fermentation.** Zeitschrift für Naturforschung, 57, 666-670, 2002.

DATTA, S.; CHRISTENA, L.; RAJARAM, Y. **Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials,** 3 Biotech, v.3, p 1-9, 2013.

DELICHEVA, G.; PISHTIYSKI, I.; DOVRED, G.; KRUSTEVA, S **Immobilization of *Aspergillus niger* Pectinase on Polyacrylonitrile Copolymer Membrane,** Trends in Applied Sciences Research, v. 2, n.5, p 419–425, 2007.

DE MELO, S.; DE MACEDO, G.; DA SILVA, F.; DE SOUZA R.; PINTO G. **Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase,** Química Nova, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, 2008.

DELPECH, M. C. COUTINHO, F. M. B., **Poliuretanos como Materiais de Revestimento de Superfície.** Instituto de Macromoléculas. Professora Eloísa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro. CP 68525, Polímeros: Ciência e Tecnologia. Rio de Janeiro, janeiro-março de 1999.

DINU, D.; NECHIFOR, M.T.; STOIAN, G.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. **Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16.** Journal of Biotechnology. v.131: 128-137, 2007.

do CANTO, W. L. **Produção, Usos e Mercado das Enzimas (Estudos econômicos – Alimentos Processados).** Campinas: ITAL, 1985.

DORDICK, J.S. **Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents.** Enzyme Microbiology and Technology, v. 11, pp. 194-211, 1989.

DOWNES, J.W. **Equipos para la extracción y elaboración de zumo de frutas delicadas,** In: Ashurst, P. R Ed. Producción y envasado de zumos y bebidas de frutas sin gás, Ed. Acribia, Espana. p. 191-213, 1995.

EMBRAPA/SEBRAE. Programa de capacitação tecnológica. Curso de Processamento de frutas, CTAA – EMBRAPA, Rio de Janeiro, 135 p., 1997

ESAWY, M.; GAMAL, A.; KAMEL, Z.; ISMAIL, A.; ABDEL-FATTAH, A. **Evaluation of free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase applicable in industrial processes**, Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 1463– 1469, 2013.

EVANGELISTA, R.M.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. **Influência da aplicação pré-Colheita de cálcio na textura e na atividade das enzimas Poligalacturonase, Pectinametilesterase e galactosidase de mangas ‘Tommy Atkins’ armazenadas sob refrigeração**. Ciência e Agrotecnologia. v.24 (Edição Especial),174-181, dez., 2000.

FADILOGLU, S. ERKMEN, O. **Inactivation of lipase by carbon dioxide under atmospheric pressure**. J Food Eng. V. 52, 331.335, 2002.

FAJARDO-OCHOA, R.; OSUNA-CASTRO, J.; VELÁZQUEZ-MENDOZA, C.; ESCALANTE-MINAKATA, P.; IBARRA-JUNQUERA, V. **Inmovilización de células y enzimas**, Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, v. 3, n. 6, p. 42-56, 2011.

FEIHRMANN, A. C. **Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizadas em fluidos pressurizados**. Dissertação – Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Rio Grande do Sul, 78p., 2005.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M., AMORIM, A.C.R., CHAVES-ALVES, V.M., COELHO, J.L.C., SILVA, D.O., ARAUJO, E.F. **Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum***. Brazilian Society for Microbiology. v.27, p.15-18, 1996.

FIREMAN, F.A.T.; FIREMAN, A.K.B.A.T. **Enzimas na alimentação de suínos**. Ciência Rural, v.28, n.1, p.173-178, 1998.

FLORES, G. **Efecto de un proceso de inmovilización por gelación iónica sobre a actividad proteolítica de mexicana**. Tesis (Maestría en Ciencia en Bioprosos) – Unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología- Instituto Politécnico Nacional, Mexico D.F, 2011.

FRANKEN, L.P.G.; MARCON, N.S., TREICHEL, H., OLIVEIRA D., FREIRE D.M.G., DARIVA, C., DESTAIN, J. OLIVEIRA, J.V. **Effect of treatment with Compressed Propoane on Lipases Hydrolytic Activity.** Food and Bioprocess Tech, v. 3, p. 511-520, 2010.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. **Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods,** Biomaterials, v. 20, p.1427-1435, 1999.

GAINVORS, A., FRÉZIER, V., LEMARESQUIER, H., LEQUART, C., AIGLE, M., BELARBI, A.; **Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain.** Yeast, v. 10: n. 10: 1311-1319, 1994.

GAVA A. J.; **Princípios de tecnologia de alimentos;** São Paulo: Nobel, 1 ed.104, 1998.

GÓMEZ-GUILLÉN, C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, E.; MONTERO, P. **Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review.** Food Hydrocolloids, p. 1-15, 2011.

GUIAVARC'H, Y., SILA, D., DUVETTER, T., VAN LOEY, A., & HENDRICKX, M. **Influence of sugars and polyols on the thermal stability of purified tomato and cucumber pectinmethylesterases: A basis for TTI development.** Enzyme Microbial Technology. v.33: 544–555, 2003.

GUMMANDI, S.N., PANDA, T.; **Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review.** Process Biochemistry, v.38: 987-996, 2003.

HOYER, G.G. **Extraction with supercritical fluids: why, how and so what.** Chemtech, July, 1985.

ITAL – INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Industrialização de frutas. Manual técnico,** n. 8 Campinas, 206 p. 1991.

JACKIX, M. H. **Doces, geleias e frutas em calda (Teórcio e prático).** Ed. Da UNICAMP: São Paulo. Icone, 172 p. 1988.

JAENICKE, R. **Stability and folding of domain proteins.** Prog. Biophys. Mol. Biol.v.71. p.155-241, 1999.

JAYANI R.S., SAXENA S., GUPTA R.; **Microbial pectinolytic enzymes: a review**. Process Biochemistry, v.40: n.9: 2931-2944, 2005.

IWAKI, Y. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de alginato de sódio**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 2010.

KASHYAP, D.R.; VOBRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI., **Applications of pectinases in the commercial sector: a review**. Bioresource Technology. v.77, p. 215-227, 2001.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R.; **Production purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp.** World Journal of Microbiology and Biotechnology. v.16: 277-282, 2000.

KASHYAP, D.R.; VOBRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI., **Applications of pectinases in the commercial sector: a review**. Bioresource Technology.v.77, p. 215-227, 2001.

KEMPKA, A. **Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase utilizando gelatina de diferentes *blooms* adicionada de plastificantes hidrofílicos**. Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. 2012.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; MELO, E. H. M.. “**Review: The immobilization of enzymes and cells**”. *Chimicaoggi- Maggio*. 21-29, 1988.

KLOSS, J. R., **Síntese e Caracterização de Poliuretanos Biodegradáveis a base de póli (εCapralactona)Diol**. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências) - Programa de Pós-graduação em Química. Curitiba, 2007.

KNEZ, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V.; **Enzyme catalysed reactions in dense gases**. Journal of Supercritical Fluids, v.14: 17-29, 1998.

LADJAMA, A., CHARDON-LORIAUX, I., FOGLIETTI, M.J. **On the pectolytic activity of two *Streptomyces* strains**. FEMS Microbiology Lett. 79:279-284, 1991.

LAI, J. **The Role of Bloom Index of Gelatin on the Interaction with Retinal Pigment Epithelial Cells**, International Journal of Molecular Sciences. v. 10, p. 3442-3456, 2009.

LEI, Z.; BI, S. **Preparation and properties of immobilized pectinase onto the amphiphilic PS-*b*-PAA diblock copolymers**, Journal of Biotechnology, v.128, n.1, p. 112-119, 2007.

LINGAPPA, K. PROMOD, T. **Imobilização de *Aspergillus niger* em espuma de poliuretano para produção de ácido cítrico de Alfarroba Pod Extrato**. American Journal of Food Technology, 2011.

LOHANI, S.; TRIVEDI, P.K.; NATH, P. **Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA**. Postharvest Biology and Technology 31, 119-126, 2004.

MALDONADO, M.C., STRASSET, de SAAD, A.M.; **Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Apergillus niger* in subemerges and solid state system**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. v.20: 34-38, 1998.

MANO, E. B., MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2. ed.revista e ampliada. São Paulo. Edgard Blucher, 191 p, 1999.

MARCON, N. S., **Avaliação da atividade de pectinases em fluídos pressurizados**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Erechim. 2012.

MARTINS, E. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 108f., 2006.

MATTA, V. M.; FREIRE JÚNIOR M.; CABRAL, L. M. C.; FURTADO, A. A. L. **Polpa de fruta congelada**. Brasília, DF. Embrapa informação tecnológica. 35 p. (Coleção Agroindústria Familiar), 2005.

MC HUGH, M., KRUKONIS, V. **Supercritical fluid extraction**, Stonenham, Butterworth-Heinenamm,1994.

MIRANDA, M.. **Aprimoramento do Procedimento de Imobilização da Lipase Microbiana em Óxido de Nióbio para Modificação de Óleos Vegetais**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química de Lorena, Lorena, São Paulo, Brasil, 2004.

NOVO NORDISK – **Ação das Enzimas**. Apostila, 49 p. 1992.

OLIVEIRA, D. **Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO₂ supercrítico**. Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

PATEL, R.N.; **Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p.804-826, 2002.

PEREIRA, B. **Processamento agrega valor: Frutas e derivados** - Publicação Trimestral do IBRAF. São Paulo, n. 1, ed. 3, p. 19-26, 2005.

PIFFERI, P.; SPAGNA, G. **The immobilization of endopolygalacturonase on γ -alumina**, *Journal of Molecular Catalysis*, v. 42, p. 137 – 149, 1987.

PIMENTA, C.J.; CHAGAS, S.J.R.; COSTA, L. **Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica L.*) colhido em quatro estágios de maturação**. *Ciência Agrotecnica*, Lavras, 24 (4), 1079-1083, 2000.

PIZARRO, A. V. L., PARK, E. Y. **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth**. *Process Biochemistry*. 38:1077-1082, 2003.

PRADE, R.A., ZHAN, D.F., AYOUBI, P., MORT, A.J. **Pectins, pectinases and plant-microbe interactions**. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. 16:361-391, 1999.

QI W-T., MA, J., YU, W-T., XIE, Y-B., WANG W., MA., X.; **Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsuls**. *Enzyme Microbiology Technology*. v.38: 697-704, 2006.

RAO, N.; KEMBHAVI, A.; PANT, A. **Immobilization of endopolygalacturonase from *Aspergillus ustus* on silica gel**, *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 1557–1559, 2000.

REHAM, H.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S.; MOLINARO, A. ANSARI, A. **Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support**. *Food Chemistry*, v. 139, p. 1081–1086, 2013.

RESENDE, J.M.; CHITARRA, M.I.F.; MALUF, W.R.; CHITARRA, A.B.; SAGGIN JÚNIOR, O.J. **Atividade de enzimas pectinametilsterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular.** Horticultura Brasileira, 22 (2), 206-212, 2004.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O. **Pectic enzymes: Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry.** v.33: 323–385, 1976.

ROCHA, W.S., GROSSO, C.R.F.; **Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas da alginato de cálcio e acetofitalato de celulose.** Sitientibus, Feira de Santana. v.35: 125-148, 2006.

RODRÍGUEZ, O.; SERRAT, M. **Poligalacturonasas de levaduras: Un producto biotecnológico de grandes potencialidades,** Tecnología Química, v. 28, n. 1, p. 80-90, 2008.

ROMBOUTS, F.M; VERSTEEG, C. KARMAN, A.H.; PILNIK,W. **Pectinesterases in component parts of citrus fruits related to problems of cloud loss and gelation in citrus products.**In Use of Enzymes in food technology. Proceedings Of International Symposium; Dupuy, P., Ed. Versailles, France; p.483-487, 1982.

ROZIE, H.; SOMERS, W.; BONTE, A.; VISSER, J.; VAN'T RIET, K.; ROMBOUTS, M. **Adsorption characteristics of endo-polygalacturonase on alginate beads.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 10, n.4, p. 346-58, 1988.

SARABOJI, K.; GROMINHA, M. M.; PONUSWANY, M. N.; **International Journal of Biological Macromolecules .v. 35. p. 211.** 2005.

SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J., VANDAMME, E.J. **Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications.** Advances in Applied Microbiology. v.39: 213-294, 1993.

SANTOS, R. D., **Produção Enzimática de Poli (εCaprolactona) em Dióxido de Carbono Supercrítica.** Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florinópolis/SC, 2011.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** Tese (Doutor em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2007.

SATHYNARAYANA, N. G.; PANDA, T. **Purification and biochemical properties of microbial pectinases** – a review. *Process Biochemistry*, 38, 987-996, 2003.

SERRAT, M.; VALVERDE, T. **Inmovilización covalente de una endopoligalacturonasa de levadura sobre alginato de calcio**, *Revista Cubana de Química*, v. 17, n. 1, p. 226–227, 2005.

SHILS, M.; E.; OLSON, J.; A.; MOSHE, A.; S.; ROSS, c. **Processamento de alimentos: Balanço nutricional de segurança e qualidade.** In: **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** São Paulo: Editora Manole. p. 1949-1950, 2002.

SILVA, A.; HIRASHAWA, J. S.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M., **Evaluation of support materials for immobilization of surfasse-reducinc bactéria and methanogenic archea.** *Anaerobe*. London, v. 12, n. 2 p 93-98, 2006.

SILVA, E.G., BORGES, M.F., MEDINA, C., PICCOLI, R.H., SCHWAN, R.F. **Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits.** *FEMS Yeast Research Journal*. 5:859-865, 2005.

SIROTEK, K., MAROUNEK, M., RADA, V., BENDA, V. **Isolation and characterization of rabbit caecal pectinolytic bacteria.** *Folia Microbiologica*. 46:79-82, 2001.

SOUTHGATE, D. A. T.; JOHNSON, L.T.; FENWICK, G.R. **Valor nutritivo y salubridad de los zumos de frutas elaboradas.** In: Ashurst, P. R. Ed. *Producción y envasado de zumos y bebidas de frutas sin gás.* Ed. Acribia, Espana, p. 321-348, 1995.

SOUZA R. L.A., **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato**, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Campina Grande, 2008.

TAYLOR, R. F.; **Protein Immobilization, Fundamentals and Applications**, Cambridge, Massachusetts. pp. 143-145. 1991.

TRIBESS, T. B. **Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

UENOJO M.; PASTORE G.M.; **Pectinases: aplicação industriais e perspectivas.** Química Nova. v.30: n.2: 388-394. 2007.

VAN DEN BROECK, I., LUDI KHUYZE, L. R., VAN LOEY, A. M., WEEMAES, C. A., & HENDRICKX, M. E. **Thermal and combined pressure-temperature inactivation of orange pectinesterase: Influence of pH and additives.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.47: 2950-2958, 1999.

VARNAM, A. H. e SUTHERLAND, J. P. **Bebidas: Tecnologia, Química y Microbiología.** Ed. Acribia S.A., Espana, 487p. 1994.

VIEIRA, C.D., **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes produtos de ativação.** Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 4, 8, 25. 2009.

VILLENEUVE, P., JEAN M MUDERHWA, J.M., GRAILLE, J., HAAS, M.J.; **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v.9: 113-148, 2000.

VILMAR, W.D., **Química Tecnológica dos poliuretanos.** Rio de Janeiro, 2013. Disponível em <http://www.poliuretanos.com.br>. Acesso em 30 de julho de 2014.

VORAGEM, F.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H. **Chemistry and enzymology of pectins.** In: McCleary, V.; Prosky, L., Edtors, 2001. Advanced dietary fibre technology, Blackwell Science, London, p.379-398, 2001.

WEN, D-S., JIANG, H., ZHANG, K. **Supercritical fluids technology for clean biofuel production.** Progress in Natural Science. v.19: 273-284, 2009.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas,** Zaragoza: Acribia, 1991.

WOODLEY, P.; PETERSEN, S. B., **Lipases: their structure biochemistry and application.** Cambridge University, Cambridge, 1994.

- WHITAKER, J. R. **Microbial Enzyme and Biotechnology**. 2. ed., New York: Elsevier, 363 p., 1990.
- WONG, D.W.S. Food enzymes Structure and Mechanism. Ed. Chapman & Hall, New York, 1995.
- WOODS, G., **Flexible polyurethane foams**, London Applied Science Publishers, 352p. 1995.
- YADAV S, YADAV P.K., YADAV D., YADAV K.D.S., **Pectin lyase: A review**. Process Biochemistry, 44, 1–10, 2009.
- YEGANEH, H.; LAKOURAJ, M.M; JAMSHD, I.S., **Synthesis and properties of biodegradable elastomeric epoxy modified polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol)**, European Polymer Journal, v. 41, p 2370-2379., 2005.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. **Enzyme catalyzed processes in organic solvents**. Proceedings of National Academy Science v. 82, pp. 3192, 1985.
- ZAREVÚCKA, M.; ZALSKA, M.; REJZEK, M.; STREINZ, L.; WIMMER, Z.; MACKOVA, M.; DEMNEROVA, K., **Lipase-mediated hydrolysis and esterification**, 1996.
- ZAWADZKI, S.F., **Síntese e Caracterização de Redes Poliméricas Independentes de Poliuretano e Poli(metacrilato de metila)**. Tese de Doutorado (Doutor em Química Orgânica). Instituto de Macromoléculas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.
- ZHANG, L.; JIANG, Y.; SHI, J.; SUN, X.; LI, J.; JIANG, Z. **Biomimetic polymer–inorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation**, Reactive and Functional Polymers, v. 68, p. 1507–1515, 2008.
- ZHANG, L.; JIANG, Y.; JIANG, Z.; SUN, X.; SHI, J.; CHENG, W.; SUN, Q. **Immobilized transglucosidase in biomimetic polymer–inorganic hybrid capsules for efficient conversion of maltose to isomaltooligosaccharides**, Biochemical Engineering Journal, v. 46, p. 186–192, 2009.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. **Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes**. Process Biochemistry, v. 35, p. 825–830, 2000.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

Objetivos

Caracterizar os complexos enzimáticos imobilizados em estudo com relação à temperatura e pH de máxima atividade em pectina cítrica e aos parâmetros cinéticos

Para a caracterização das enzimas, realizou-se a análise dos efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática das enzimas pectinametilesterase (PME) e pectina liase (PMGL).

A utilização de enzimas implica na necessidade de controle de variáveis de processo, tais como pH e temperatura ótimas para a sua atuação. Caso não haja um controle das condições operacionais do processo enzimático, a eficiência do processo pode ser prejudicada, levando a perdas de produtividade e economia. Alguns autores afirmam que sem o uso de enzimas, não é possível viabilizar a produção de sumos de alguns frutos e vegetais (HELBIG e LAPERCHE, 2001).

A taxa da reação em diferentes concentrações de substrato (pectina cítrica) foi utilizada para obter os parâmetros de Michaelis-Menten, a velocidade máxima (V_{Max}) de reação e a constante de afinidade (K_M).

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Enzimas

Para a condução do estudo, foram utilizadas duas pectinases comerciais, na forma livre, que foram gentilmente cedidas pela empresa LNF Latino Americana Ltda. Os nomes comerciais são Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash. Ambas enzimas produzidas por fermentação submersa pelos fungos filamentosos *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus niger*.

3.1.2 Reagentes

Os reagentes empregados foram:

- Solução de cloreto de cálcio 75 mmol ($CaCl_2$), (Synth®);

- Solução tampão de oxalato de sódio (Merck®);
 - Alginato de sódio (Dinâmica®);
 - Solução tampão de acetato de sódio 100 mM, (Cromoline®);
- pH 4,5;
- Solução de pectina 1,0% em tampão Tris-HCl 0,05 M (Vetec®); pH 4,5;
 - Solução de cloreto de cálcio 0,01M (CaCl₂), (Synth®);
 - Solução de sulfato de zinco hepta hidratado a 9% (ZnSO₄·7H₂O), (Sigma Aldrich®);
 - Solução de hidróxido de sódio 0,5M (NaOH), (Dinâmica®);
 - Solução de hidróxido de sódio 0,05M (NaOH), (Dinâmica®);
 - Solução de ácido tiobarbitúrico 0,04M (C₄H₄N₂O₂S), (Merck®);
 - Solução de ácido clorídrico 0,1M (HCl), (Dinâmica®);
 - Solução de cloreto de sódio 0,2M (NaCl), (Synth®);

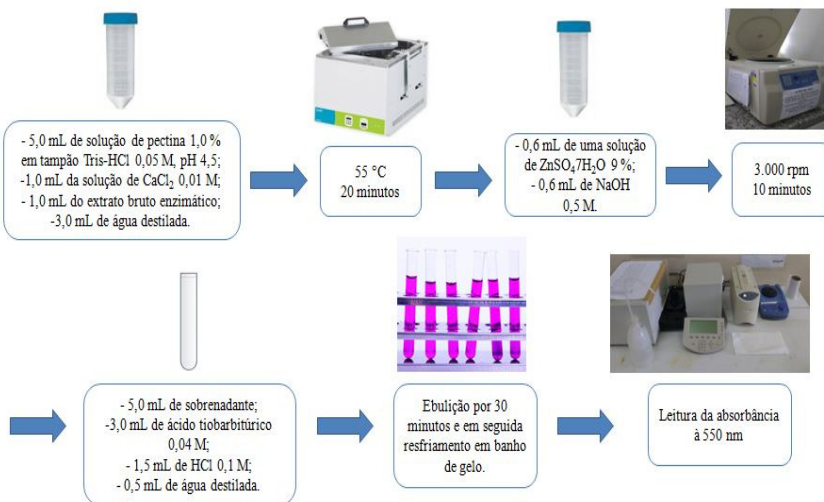
3.1.3 Determinações analíticas

3.1.3.1 Determinação da atividade de pectina liase (PMGL)

A atividade da pectina liase foi determinada segundo método de Ayers *et al.* (1966), descrito por Pitt (1988), com algumas modificações, onde determinou-se os produtos insaturados finais da degradação da pectina e o ácido tiobarbitúrico.

A mistura de reação constituiu-se de 5,0 mL da solução de pectina 1,0 % em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 4,5; 1,0 mL da solução de CaCl₂ 0,01 M; 1,0 mL do extrato bruto enzimático e 3,0 mL de água destilada. Após a incubação por 20 min a 55 °C, foi adicionado 0,6 mL de uma solução de ZnSO₄·7H₂O 9 % em seguida 0,6 mL de NaOH 0,5 M. As proteínas precipitadas do substrato não consumido foram removidas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi adicionado à mistura de 3,0 mL do ácido tiobarbitúrico 0,04 M; 1,5 mL de HCl 0,1 M e 0,5 mL de água destilada. A mistura foi aquecida em banho-maria por 30 min, resfriada em banho de gelo e medida a absorbância à 550 nm. A avaliação da atividade enzimática da enzima PMGL, pode ser visualizada resumidamente na Figura 8

Figura 8 - Esquema da determinação da atividade da enzima Pectina Liase (PMGL).



Fonte: O autor.

Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,01 na absorbância a 550 nm, nas condições do ensaio (Pitt, 1988). Como pode ser visto na Equação 1.

$$Atividade (U/mL) = \frac{\Delta abs}{0,01} \quad (1)$$

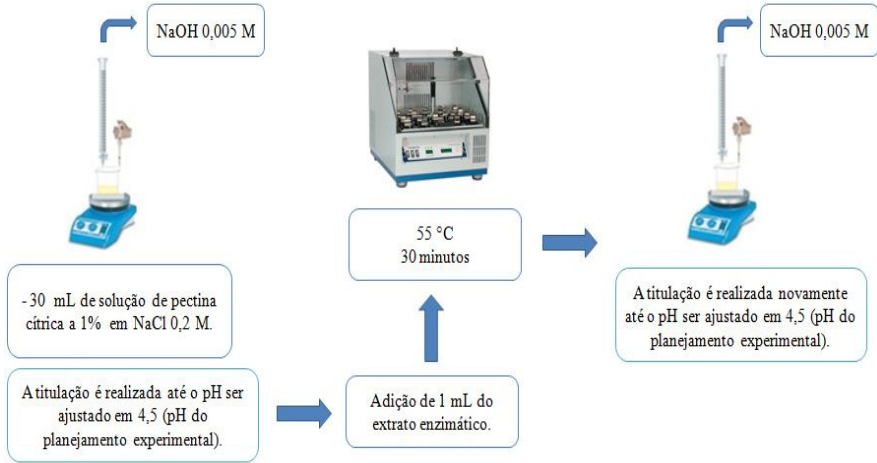
3.1.3.2 Determinação da atividade de pectinametilsterase (PME)

A atividade de pectinametilsterase (PME) foi determinada segundo Hultin et al. (1966) com modificações (temperatura controlada a 55°C ± 2).

O procedimento é melhor ilustrado na Figura 7, onde inicialmente foi adicionado 30 mL de solução de pectina cítrica a 1% em NaCl 0,2 M em um erlenmeyer, ajustado o pH em 4,5 (pH do planejamento experimental) e, a seguir adicionado um mililitro do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu em um shaker com temperatura de 55 °C ± 2 durante 30 minutos. Após a reação, o pH da

solução foi mantido em torno de 4,5, por 10 min, com NaOH 0,005 M. Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de $1 \mu\text{mol}$ de NaOH $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$, nas condições do ensaio.

Figura 9 - Esquema da determinação da atividade da enzima Pectinametilsterase (PME).



Fonte: O autor.

A Equação 2 permite calcular a atividade de pectinametilsterase (PME), como pode ser visto abaixo.

$$\textit{Atividade (U/mL)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M \times 10^3}{t \times e} \quad (2)$$

Onde:

V = Volume de NaOH gasto em mL;

M = Molaridade do NaOH (0,005 M);

t = Tempo de reação (30 min);

e = Massa de imobilizado em gramas, ou volume de extrato enzimático ou sobrenadante em mL utilizada para realização da medida de atividade.

3.1.3.3 Determinação do teor de proteínas

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford et al., (1976), usando albumina de soro bovino (ASB) como padrão (Sigma A3294).

3.1.3.4 Determinação da atividade específica

A atividade específica foi obtida através da razão entre o valor da atividade enzimática e do teor de proteínas. A atividade específica é entendida como sendo a atividade por unidade de peso da proteína.

3.1.4 Análise estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguido de comparação das médias pelo teste de Tukey, com o software *Statistica* versão 8.0, com nível de confiança de 95%.

3.1.5 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

Para estudo dos efeitos da temperatura e pH na atividade enzimática utilizou-se a técnica de planejamento experimental que é uma ferramenta estatística que permite determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar possíveis interações entre variáveis de um processo. Além disso, essa ferramenta também permite otimizar o sistema em estudo, com objetivo de maximizar ou minimizar uma resposta. A principal vantagem da utilização desta ferramenta é a redução do número de experimentos e a consequente redução de custos (YUN e BAI, 2008; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Devido ao fato da enzima possuir vários grupos ionizáveis, mudanças no pH afetarão o sítio catalítico e a conformação da enzima. Em geral, enzimas são ativadas numa faixa limitada de pH e para cada enzima existe um ótimo ou uma faixa ótima de atuação (MAUGERI, 2002).

Realizou-se um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR), com um total de 11 experimentos (4 ensaios fatoriais, 4 ensaios dos pontos axiais e 3 ensaios repetidos na condição central). As faixas de pH e temperatura estão descritas na Tabela 2.

Os resultados foram analisados usando software *Statistica* versão 8.0. As respostas ou variável dependentes foram a atividade de pectina liase (Planejamento 1) e pectinametil esterase (Planejamento 2), assim foram determinados os valores ótimos de pH e temperatura para os dois complexos enzimáticos analisados (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L).

Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados nos planejamentos 1 e 2 para os dois complexos enzimáticos em estudo (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L).

Variáveis Independentes	Níveis				
	(-)1,41	(-)1	0*	(+)1	(+)1,41
pH	3	3,4	4,5	5,5	6
Temperatura (°C)	30	37	55	73	80

3.1.6 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{MAX}) aparente

Os parâmetros cinéticos das catálises enzimáticas têm sido determinados tradicionalmente pelo uso da velocidade inicial (V_0), quando diferentes concentrações de um substrato são usadas (TORRES et al., 2004). A partir dos valores de velocidade inicial da reação (V_0) e da concentração do substrato (2,0 a 50 g/L), os coeficientes cinéticos, velocidade máxima (V_M) e a constante de Michaelis-Menten (K_M), foram calculados.

Para determinar K_M e V_M aparente utilizou-se o método de Lineweaver-Burk, que consiste em uma linearização (Equação 3) da equação de Henri-Michaelis-Menten (Equação 4). A atividade enzimática foi determinada conforme o item 3.1.3, o pH e temperatura utilizados foram determinados pela análise estatística descrita no item 3.1.4.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot [S]} \quad (3)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade de PME e PMGL da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L

A tabela 3 apresenta a matriz do DCCR (valores reais e codificáveis) e resposta em termos de atividade de Pectinametilesterase (PME), Pectina liase (PMGL), proteína e atividade específica de PME e PMGL da pectinase comercial Ultra SP-L. De acordo com o resultado a maior atividade enzimática (50,70 U/g) foi obtida no ensaio 6 para a enzima PME., quando a medida de atividade enzimática foi realizada a uma temperatura de 55 °C e a titulação da atividade enzimática foi realizado até pH 6. A enzima PMGL apresentou maior ganho de atividade no ensaio 9 com 20,14 U/mL, quando a medida de atividade enzimática foi realizada a uma temperatura de 55 °C e com tampão em pH 4,5.

Tabela 3 – Matriz do DCCR (valores reais) com a resposta em termos de atividade enzimática de PME, PMGL, proteína e atividade específica de PME e PMGL, em função do pH e temperatura, da pectinase comercial Pectinex Ultra SP-L.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	PME (U/mL)	Pectinex Ultra SP-L			Atividade Específica PMGL (U/mg)	
				Proteína (mg/mL)	Atividade Específica de PME (U/mg)	PMGL (U/mL)		
1	-1 (3,4)	-1 (37)	25,00	0,018	1250	8,00	0,019	421
2	1 (5,5)	-1 (37)	50,50	0,019	2525	18,60	0,018	1033
3	-1 (3,4)	1 (73)	0	0,017	0	17,72	0,017	1042
4	1 (5,5)	1 (73)	1,30	0,018	65	19,54	0,018	1085
5	-1,41 (3,0)	0 (55)	0,77	0,018	38	16,81	0,019	884
6	1,41 (6,0)	0 (55)	50,70	0,019	2535	20,05	0,018	1113
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	16,70	0,017	835	4,33	0,018	240
8	0 (4,5)	1,41 (80)	0	0,018	0	15,12	0,017	889
9	0 (4,5)	0 (55)	43,20	0,019	2160	20,14	0,018	1118
10	0 (4,5)	0 (55)	44,10	0,018	2205	17,72	0,019	932
11	0 (4,5)	0 (55)	44,90	0,019	2245	0,018	0,018	1053

Os resultados apresentados referentes à atividade da PME foram tratados estatisticamente para avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta. A análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes estão apresentados na tabela 29 (Apêndice I) Os termos significativos no modelo codificado (equação 5) foram selecionados pelo valor de p. considerando nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 30 Apêndice II), foi empregada para validação do modelo matemático codificado usado para a predição da atividade de PME do complexo enzimático Pectinex Ultra SP-L, dentro das faixas de pH e temperaturas estudados. O Valor de F reflete a razão entre a soma quadrática média devido à regressão e a soma quadrática média devido ao erro e indica a significância do modelo.

$$AtvPME(ultra) = 44,05 + 12,19 * pH + 12,25 * T - 17,38 * T^2 \quad (5)$$

O modelo codificado otimizado para atividade enzimática, apresentado na Equação 5 foi validado pela análise de variância (ANOVA). (Tabela 30 Apêndice II), O coeficiente de determinação obtido (0,94) e o F calculado (7,52) 1,5 vezes maior que o F tabelado permitiram validar o modelo, com 95% de confiança. O modelo codificado foi utilizado para gerar a superfície de resposta (Figura 30 Apêndice III) para atividade enzimática de PME (Pectinex Ultra SP-L) em função do pH e temperatura. Observa-se que a faixa de temperatura na qual a atividade foi maior variou entre 50 e 60 °C e a faixa de pH variou entre 4,5 e 6,0.

Visando a utilização industrial da enzima optou-se pelas condições do ponto central (pH 4,5 e temperatura 55°C), que estão dentro da faixa ótima de atuação da enzima, para determinar a atividade enzimática de PME para Pectinex Ultra SP-L nos próximos experimentos.

Os resultados apresentados referentes à atividade de polimetilgalacturonase liase, foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente de cada resposta. Na tabela 31 apêndice IV, encontra-se a análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes. Os termos significativos no modelo codificado (equação 6) foram selecionados no valor de p. considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 32 apêndice V), foi empregada para a validação do modelo matemático codificado usado para a predição da atividade de polimetilgalacturonase liase, para a Pectrinex Ultra SP –L dentro das faixas de pH e temperatura estudados. O Valor de F reflete a razão entre a soma quadrática média devido à regressão e a soma quadrática média devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo.

O modelo codificado otimizado para atividade enzimática apresentado na equação 6 foi validado pela análise de variância (ANOVA). (Tabela 32 apêndice V), O coeficiente de determinação obtido (0,96) e o F calculado (13,3) 3 vezes maior que o F tabelado) permitiram a validação do modelo com 95% de confiança. O modelo codificado foi utilizado para gerar a superfície de resposta (fig. 31 apêndice VI) para atividade enzimática em função do pH e temperatura. Observa-se que a faixa de temperatura na qual a atividade foi maior variou entre 50 e 60 °C e a faixa de pH variou entre 4,5 e 6,0. Definindo as condições do ponto central (pH 4,5 e temperatura 5,5 °C) para ser utilizada para determinação de atividade enzimática de polimetilgalacturonase liase para Pectinex Ultra SP L nos próximos experimentos situação similar à enzima PME descrita anteriormente.

$$Atv\ PMGL\ (ultr) = 18,94 + 2,12 * pH + 3,24 * T - 4,15 * T^2 \quad (6)$$

3.2.2 Efeito da temperatura e do pH na atividade PME e PMGL da pectinase comercial - Pectinex® Mash

A Tabela 4 apresenta a matriz experimental em termos de atividade de PME, PMGL, proteína e atividade específica da pectinase comercial Pectinex Mash. A maior atividade para a Enzima PME foi de 42 U//mL, ensaio 6 quando a medida de atividade enzimática foi realizada a uma temperatura de 55 °C e a titulação da atividade enzimática foi realizado até pH 6. A enzima PMGL apresentou maior ganho de atividade no ensaio 9 com 58,08 U/mL, quando a medida de atividade enzimática foi realizada a uma temperatura de 55 °C e com tampão em pH 4,5.

Tabela 4 – Matriz do DCCR (valores reais) com a resposta em termos de atividade enzimática de PME, PMGL, proteína e atividade específica de PME e PMGL, em função do pH e temperatura, da pectinase comercial Pectinex Mash.

Pectinex Mash								
Ensaio	pH	Temperatura (°C)	PME (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica de PME (U/mg)	PMGL (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica PMGL (U/mg)
1	-1 (3,4)	-1 (37)	15,2	0,017	760	15,26	0,018	847
2	1 (5,5)	-1 (37)	32,4	0,018	1620	2956	0,019	1555
3	-1 (3,4)	1 (73)	5,3	0,019	265	28,13	0,018	1562
4	1 (5,5)	1 (73)	4,1	0,018	205	30,37	0,019	1624
5	-1,41 (3,0)	0 (55)	10,9	0,019	545	28,57	0,018	1587
6	1,41 (6,0)	0 (55)	42	0,019	2100	39,67	0,019	2087
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	41	0,017	2050	10,81	0,018	600
8	0 (4,5)	1,41 (80)	2,8	0,016	140	25,34	0,017	1490
9	0 (4,5)	0 (55)	39,7	0,019	1985	58,08	0,018	3226
10	0 (4,5)	0 (55)	34,4	0,018	1720	46,18	0,019	1961
11	0 (4,5)	0 (55)	39,1	0,018	1955	43,22	0,018	2401

A análise dos efeitos lineares quadráticos (Tabela 33 apêndice VII) onde pode-se verificar que com um nível de 95% de confiança o pH apresentou influência positiva e a temperatura influenciou negativamente sobre a atividade de PME da pectinase comercial Pectinex Mash. A partir dos coeficientes de regressão obteve-se o modelo matemático empírico apresentado na equação 7.

$$AtvPME(mash) = 37,77 + 7,05 * pH - 11,54 * T - 10,46 * T^2 \quad (7)$$

A análise de variância dos fatores estudados encontra-se na tabela 34 apêndice VIII. O modelo foi validado, podendo assim gerar a superfície de resposta (fig. 32 Apêndice IX), onde podemos visualizar uma faixa ótima de pH e temperatura para a atividade enzimática. Pelos mesmos motivos apresentados para a enzima Pectinex Ultra SP-L os próximos experimentos foram realizados em pH 4,5 e em temperatura de 55 °C.

A temperatura e pH ótimos para os dois preparados enzimáticos estão de acordo com resultados apresentado por Gonzalez (2009) para diferentes pectinases. Este autores encontraram valores de pH entre 4,0-4,5 e temperatura de 45 °C ao determinar as condições ótimas da atividade da PME presente em preparações industriais (Pectinex 100L Plus, Panzym Univers e Panzym Clears). Dinu et al., (2007) purificaram cinco enzimas pectinolíticas produzidas a partir de *Aspergillus niger*

MIUG16 e também encontrou valores semelhantes, temperatura ótima de 40°C e pH 4,4.

Para PME extraída de goiaba, Leite et al., (2006) encontraram pH ótimo 8,5 e uma faixa de temperatura ótima entre 75-85°C. Vivar-Vera et al., (2005) realizou um estudo com pectinase de *Crataegus pubescens*, sendo que esta não apresentou atividade de PME em pH 3 ocorrendo um aumento na atividade a partir do pH 4, tendo pH ótimo 7,5, e temperatura máxima foi medida em 55°C. Essa diferença de pHs pode ser explicada por Benen et al., (2003) que relata que a PME presente em plantas e bactérias tem pH ótimo que varia entre 6 e 8. Já nas produzidas por alguns fungos, como no caso das pectinases comerciais (Pectinex Mash e Ultra SP-L), o pH ótimo da PME encontra-se entre 4 e 6.

Com relação à atividade enzimática da PMGL, a avaliação estatística dos dados demonstrou que a temperatura influenciou significativamente (tabela 35 apêndice X). O modelo codificado obtido (equação 8) pelo tratamento dos dados foi validado (tabela 36 apêndice XI), podendo assim obter-se uma superfície de resposta (fig. 33 Apêndice XII) na qual percebe-se uma faixa ótima de pH (4,0 a 5,0) e temperatura (50 a 60 °C) para atividade enzimática. A partir destes resultados, também foi determinado que os próximos experimentos para medida de atividade de PMGL seriam realizados com tampão TRIS-HCL pH 4,5 e em temperatura de 55 °C.

$$Atv\ PMGL\ (mash) = 46,17 - 14,14 * T^2 \quad (8)$$

3.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} aparente

Após a análise dos efeitos e determinado qual seria o melhor pH e temperatura para realização dos experimentos, determinou-se o parâmetros cinéticos das duas enzimas.

Uma faixa de 2,0 a 50,0 g.L⁻¹ de concentração de pectina cítrica foi utilizada para ver qual o efeito causado na atividade enzimática de PME e PMGL para os dois complexos enzimáticos analisados (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L), podendo assim obter-se os valores de K_M e V_{Max} . Utilizou-se os valores de atividade específica de cada enzima para o cálculo. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de K_M e V_{Max} aparente obtidos para as enzimas PME e PMGL dos complexos Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L estudados.

Pectinases comerciais	K_M (mg.mL ⁻¹)		V_{Max} (U.mL ⁻¹)	
	PMGL	PME	PMGL	PME
Pectinex® Mash	0,23	1,55	64,10	500,00
Pectinex® Ultra SP-L	0,50	2,27	19,38	666,67

De acordo com a Tabela 5, a enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash mostrou o menor valor para o K_M , o que indica uma maior afinidade da enzima para com o substrato, bem como, maior velocidade máxima (V_{Max}), em comparação com o complexo Pectinex® Ultra SP-L.

O valor de K_M indica a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor o K_M , maior a afinidade da enzima pelo substrato; logo, a velocidade da reação também será maior (TORRES et al., 2004).

Observa-se um aumento no valor do K_M para a enzima PME, para os dois complexos em estudo, podendo este ter ocorrido devido às restrições difusionais, ou seja, limitações de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. A medida da atividade da enzima foi realizada mediante a técnica de titulação, onde foi possível observar a rapidez da reação, como indicam os valores de V_{Max} .

Quando a enzima está imobilizada, as limitações na difusão são afetadas principalmente pelo tamanho das esferas, forma, tamanho dos poros e a carga enzimática da imobilização, assim como também pelas mudanças estruturais na enzima, com as moléculas podendo ter assumido uma conformação inativa (BUGA et al., 2010, YANG et al., 2010; YIGITOGU e TEMOÇIN, 2010, BUSTAMANTE-VARGAS, 2013).

Leite et al., (2006) encontraram valores de 0,23 e 0,32 mg mL⁻¹ para K_M e os valores de 0,244 e 0,053 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ para V_{Max} para a PME extraída de goiaba. Arbaisah et al., (1997) avaliaram duas pectinametilesterases e encontraram valores de K_M de 0,52 mg mL⁻¹ e de 0,0843 mg mL⁻¹ e velocidades máximas de 154 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ e 726 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente.

3.3 CONCLUSÕES

Através dos experimentos realizados nesta etapa do trabalho, os valores de pH e temperatura foram fixados para os próximos ensaios experimentais. Optou-se pelas condições do ponto central (pH 4,5 e temperatura 55°C), que estão dentro da faixa ótima de atuação da enzima, para as enzimas dos dois complexos enzimáticos estudados (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash).

Os parâmetros de Michaelis-Menten, a velocidade máxima (V_{Max}) de reação e a constante de afinidade (K_M) foram obtidos utilizando diferentes concentrações de substrato (pectina cítrica), variando de 2,0 a 50,0 g.L⁻¹. A enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash mostrou maior afinidade com o substrato.

REFERÊNCIAS

- ARBAISAH, S.M.; ASBI, B.A.;JUNAINAH, A.H.; JAMILAH, B. Purification and properties of pectinesterase from soursop (*Anona muricata*) pulp. **Food Chemistry**. v.59: 33-40, 1997.
- AYERS, W. A.; PAPAIVIZAS, G. C.; DIEM, A. F. **Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani***. *Phytopatol.*, 56, 1006-1011, 1966.
- BENEN, J. A. E.; VAN ALEBEEK, G. J. W. M; VORAGEN, A. G. J. **Handbook of food enzymology**. New York: Basel, 2003.
- BRADFORD, M.M. **A Rapid and Sensitive method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. *Analytical Biochemistry*. V. 72, p.248-254, 1976.
- BUGA, M.; IBRAHIM, S.; NOK, A. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6), **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 52, p. 8934-8943, 2010.
- BUSTAMANTE-VARGAS, C. E. **Estudo da imobilização do extrato enzimático pectinolítico de *Aspergillus niger* atcc 9642 em matriz polimérica- inorgânica**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI - Erechim, Erechim, 2013.
- DINU, D.; NECHIFOR, M.T.; STOIAN, G.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. **Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16**. *Journal of Biotechnology*. v.131: 128-137, 2007.
- GONZALEZ, S.L.; **Determinação da atividade de Pectinametilsterase em pectinases industriais e a atividade residual exógena no suco de manga**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 2009.
- HELBIG, J., LAPERCHE, S.; **Production of colour-intensive na colour stable juice**. *Fruit Processing*, v.2: 324-347, 2001.

HULTIN, H. O.; SUN, B.; BULGER, J. **Pectin methyl esterase of the banana. Purification and properties.** Journal of Food Science, Chicago, 31 (3), 320-327, 1966.

LEITE, K., TADIOTTI, A.C., BALDOCHI, D., OLIVEIRA, O.M.M.F.O. **Partial purification, heat stability and kinetic characterization of the pectinmethylesterase from *Brasílian guava, Paluma cultivars*.** Food Chemistry. 2006: v.94: 565-572.

MAUGERI F.; **Apostila de Engenharia Bioquímica.** FEA-UNICAMP, 2002.

PITT, M., **Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*.** In: Methods in Enzymology. 161, 350-354, 1988.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos.** 1ª ed., Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

TORRES, M.C.L; SOARES, N. F. F MAIA, J.F. **Parâmetros cinéticos da glutathione s-transferase e sua ativação por extratos de vegetais.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. v.24: n.2: 243-248. , 2004.

VIVAR-VERA, M.A.; SALZANO-MONTOYA, J. A.; CALVA-CALVA, E.; RAMOS-RAMIREZ, G. **Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit.** Swiss Society of Food and Technology. V. 40. p. 278-284, 2005.

YANG, J.; MA, X.; ZHANG, Z.; CHEN, B.; LI, S.; WANG, G. Lipase immobilized by modification-coupled and adsorption-cross-linking methods: A comparative study, **Biotechnology Advances**, v. 28, p.644–650, 2010.

YIGITOGLU, M.; TEMOÇIN, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, p. 130–135, 2010.

YUN W., BAI F.; **Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* Y1.** Journal of Biotechnology, doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.0701924, 2008.

CAPÍTULO IV

IMOBILIZAÇÃO

Objetivos

Imobilizar o complexo enzimático pectinolítico comercial em suporte de gelatina-alginato e poliuretano;

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Enzimas

Para a condução do estudo, foram utilizadas duas pectinases comerciais, na forma livre, que foram gentilmente cedidas pela empresa LNF Latino Americana Ltda. Os nomes comerciais são Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash. Ambas enzimas produzidas por fermentação submersa pelos fungos filamentosos *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus niger*.

A medida da atividade enzimática para as enzimas seguem a metodologia descrita nos itens 3.1.3.1 para a PMGL e 3.1.3.2 para a PME (Capítulo III).

4.1.2 Reagentes

Os reagentes empregados para o estudo da imobilização foram:

- Alginato de sódio (Cinética Reagentes-Soluções®);
- Gelatina alimentícia de origem bovina com um *Bloom* ≤ 260 g (Gelita®);
- Tampão oxalato de sódio (Merck®) pH 5,5;
- Cloreto de cálcio 75 mM (Vetec®);
- Pectina cítrica (Vetec®);
- Tampão acetato de sódio (Vetec®); pH 4,5;
- Isocianato (Empresa Flexível poliuretanos);
- Poliol (Empresa Flexível poliuretanos);

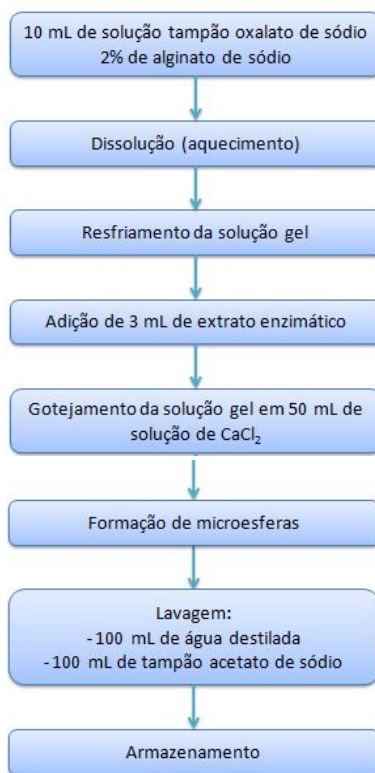
Os reagentes utilizados para a medida de atividade enzimática foram listados no item 3.1.2.

4.1.3 Imobilização em diferentes suportes

4.1.3.1 Imobilização da enzima em suporte de gelatina-alginato

Na imobilização foram empregadas gelatina e solução de CaCl_2 , segundo método proposto por Shen (2011) e Vargas (2013) com modificações. Para o preparo da solução gel, adicionou-se 10 mL de solução tampão oxalato de sódio e 2 % de alginato de sódio, que foram aquecidos ($\sim 60^\circ\text{C}$) até a dissolução. Após o resfriamento da solução gel, acrescentou-se 3 mL de extrato enzimático (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L). O gel formado foi gotejado em 50 mL de solução de CaCl_2 75 mmol/L previamente preparado com 1 % de gelatina. Em seguida, as microesferas foram lavadas com 100 mL de água destilada e 100 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 4,5) e então, armazenadas a 4°C em recipiente de plástico com tampa, sendo este recipiente plástico com a enzima colocado dentro de um vidro com sílica gel. O procedimento da imobilização poderá ser visualizado no Fluxograma apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma de imobilização das pectinases em suporte gelatina-alginato.



Fonte: O autor.

4.1.3.2 Imobilização enzimática em suporte de poliuretano (PU)

A reação de polimerização do poliuretano foi realizada variando a razão molar dos monômeros poliál-isocianato (5:3,v/v), com base no trabalho realizado por Silva et al., (2013).

A reação de polimerização foi conduzida com uma seringa graduada pela qual os monômeros foram misturados e, posteriormente, homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro, durante 30 s. Após esta etapa ocorreu o estágio de polimerização (5 minutos) do poliuretano, expansão da espuma e completa solidificação.

O procedimento experimental para imobilização da enzima em

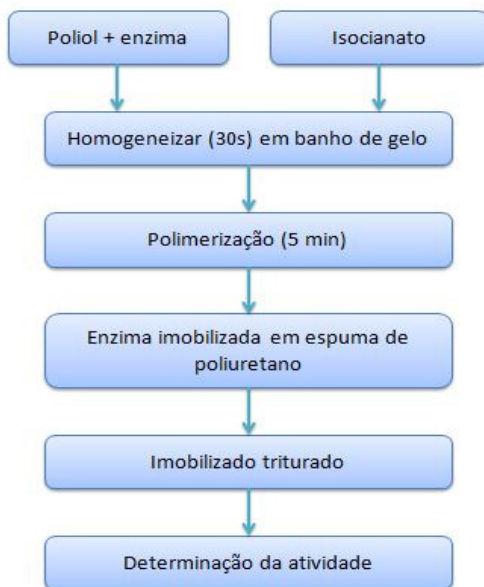
PU foi realizado empregando a concentração dos monômeros selecionada (poliol-isocianato, 5:3 v/v) adicionado 1 mL do complexo pectinolítico comercial (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L) com posterior estudo da imobilização e conseqüente formação de polímero.

Para imobilização, a pectinase foi homogeneizada no monômero poliol e após, ao isocianato, sendo o recipiente mantenedor da mistura envolto em banho de gelo, buscando evitar o aumento excessivo da temperatura devido à reação exotérmica gerada pela mistura dos monômeros, de acordo com o esquema apresentado na Figura 15.

Após a etapa de polimerização, o poliuretano contendo a enzima (imobilizado) foi mantido durante 24 h em dessecador para equalização do teor de umidade.

Decorrida a polimerização, a estrutura formada com a enzima inclusa foi triturada, homogeneizada, tratada em fluidos pressurizado e submetida à medida das atividades enzimáticas de pectina liase e pectinametilsterase

Figura 11 – Apresentação esquemática do procedimento de imobilização da pectinase em suporte de poliuretano (PU).



4.1.4 Rendimento de imobilização

Para determinar o rendimento da imobilização (RI) foram quantificadas as atividades dos complexos enzimáticos Ultra SP-L e Mash (PME e PMGL) no extrato pectinolítico livre e imobilizado em suporte de alginato-gelatina bem como no sobrenadante, seguidos de procedimentos especificados nos itens 3.1.3.1 para a PMGL e 3.1.3.2 para a PME. O cálculo do rendimento foi realizado de acordo com a equação 9.

$$RI(\%) = \frac{(U_L - U_S)}{U_I} \cdot 100 \quad (9)$$

Onde:

RI = Rendimento (%);

U_L = Atividade da enzima livre oferecida (U/mL);

U_S = Atividade enzimática do sobrenadante (U/mL);

U_I = Atividade enzimática do imobilizado (U/g).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Atividade das pectinases comerciais livres e imobilizadas

A Tabela 6 apresenta os resultados comparativos das atividades enzimáticas de pectinameteliesterase e pectina liase dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash, livre e imobilizadas em suporte de gelatina-alginato e poliuretano.

Tabela 6 – Comparação das atividades enzimáticas de PMGL e PME dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash livre e imobilizado em suporte de gelatina-alginato e poliuretano.

Pectinases comerciais	Pectinex® Mash		Pectinex® Ultra SP-L	
	PMGL	PME	PMGL	PME
Atividade da enzima livre (U/mL)	654,45	20,75	428,25	44,2
Atividade da enzima imobilizada em suporte gelatina-alginato (U/mL)	15,25	34,49	10,8	14,68
Atividade da enzima imobilizada em suporte de poliuretano (U/mL)	16,32	21,42	15,76	1,6

A enzima PMGL dos dois complexos estudados mostrou um superior valor de atividade livre, quando comparado ao valor da enzima PME. Porém, quando as enzimas foram imobilizadas, a PME do complexo Pectinex® Mash mostrou um ganho de atividade nos dois suportes testados. A principal vantagem dos dois tipos de suportes utilizados é a fácil recuperação do meio reacional, o que permite a sua utilização em diferentes ciclos.

A enzima PME do complexo Pectinex® Ultra SP-L perdeu a sua atividade quando imobilizada em PU, provavelmente devido ao aumento de temperatura durante a reação entre o polioli e o isocianato para a formação da espuma e imobilização da enzima.

4.2.2 Rendimento de imobilização

O rendimento é um parâmetro para determinar a eficiência do processo de imobilização, sendo mais eficiente na medida que se consiga encapsular a maior quantidade de enzima possível. Após o encapsulamento do extrato enzimático pectinolítico, realizou-se a determinação do rendimento de imobilização. A Tabela 7 apresenta os resultados de rendimento obtidos nas matrizes de estudo.

Tabela 7 - Resultados referente ao rendimento de imobilização em gelatina-alginato para os complexos enzimáticos Pectinex® Ultra SP-L e Mash (enzimas PMGL e PME).

Parâmetros experimentais	PMGL		PME	
	Ultra SP-L	Mash	Ultra SP-L	Mash
Volume de extrato enzimático (mL)	3,0	3,0	3,0	3,0
Atividade do extrato (U/mL)	16,6	17,5	31,6	34,1
Atividade total oferecida (U)	49,8	52,3	95,0	102,5
Massa de imobilizado (g)	10,67	10,26	10,67	10,26
Atividade do imobilizado (U/g)	13,1	13,2	23,0	18,17
Atividade total no imobilizado (U)	139,8	135,5	246,0	186,5
Volume de sobrenadante (mL)	47,0	47,0	47,0	47,0
Atividade do sobrenadante (U/mL)	0,1	0,2	0,07	0,08
Atividade total/sobrenadante (U)	4,7	9,4	3,4	3,9
Atividade teórica total no imobilizado (U) *	45,1	42,9	91,6	98,5
Rendimento de imobilização (%) **	309,9	316,0	268,5	189,2

* Diferença entre a atividade total oferecida (49,8 U) e a atividade total no sobrenadante (4,7 U);

** Comparativo entre a atividade Total Teórica no imobilizado (45,1 U) e a Atividade Total no Imobilizado obtida Experimentalmente (139,8 U)

Obs. 1: Para a enzima PMGL, os ensaios em branco, ou seja, conduzidos com o suporte e o sobrenadante oriundos de uma simulação de imobilização sem o extrato enzimático, não apresentaram atividade.

Obs. 2: Para a enzima PME, o suporte e o sobrenadante oriundos de uma simulação experimental de imobilização sem o extrato enzimático apresentaram atividades de 0,49 U/g e 0,14 U/mL, respectivamente.

Pode-se observar que o maior rendimento de imobilização foi de 316,0% obtido pela enzima PMGL do complexo enzimático pectinolítico Pectinex® Mash, seguido de 309,9% da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L, 268,5% da enzima PME, do complexo enzimático pectinolítico Pectinex® Ultra SP-L e 189,2 da enzima PME do complexo enzimático pectinolítico Pectinex® Mash.

Assis et al., (2004) realizaram um *screening* de suportes reticulados com glutaraldeído (2,5%) para imobilização do extrato parcialmente purificado de pectinametilesterase de acerola (*Malíghia glabra L.*) e obtiveram os maiores rendimentos de imobilização em sepharose de 81,7%, seguido do gel de gelatina 78,0% após 48 horas de processo.

Shukla et al., (2010) imobilizaram PG de *Aspregillus Níger* em nylon 6 ativado com glutaraldeído e obtiveram 40% de rendimento imobilizado.

Vargas et al., (2015) imobilizaram extrato pectinolítico em polímero inorgânico de alginato-gelatina-cálcio e obtiveram 72,7% de rendimento imobilizado em pH de 5,5.

Silva et al., (2008) imobilizaram amilase de malte de milho por oclusão usando alginato de sódio e obtiveram 100% de rendimento.

4.3 CONCLUSÕES

As enzimas em estudo mostraram diferentes comportamentos quando imobilizadas em diferentes suportes. De modo geral, os suportes empregados (gelatina-alginato e poliuretano) atenderam as expectativas do estudo proposto. Porém, a enzima PME do complexo Pectinex® Ultra SP-L teve a sua atividade reduzida durante a imobilização em poliuretano.

A enzima PMGL do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash apresentou o maior rendimento de imobilização (316,0%), seguida

da enzima PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L (309,9%) em gelatina-alginato.

REFERÊNCIAS

ASSIS, S.; FERNANDES, P., FERREIRA, B., CABRAL, J., FARIA OLIVEIRA, O. **Screening of supports for the immobilization of pectinmetylsterase from acerola (*Malpighita glabra L.*)**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 79. P. 277-280, 2004.

SHEN, Q.; YANGA, R.; HUA, X.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. **Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization**. Process Biochemistry, v. 46, p. 1565–1571, 2011.

SHUKLA, S.; SAXENA, S.; THAKUR, J.; GUPTA, R. **Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto glutaraldehyde activated nylon-6 and its application in apple juice clarification**, Acta Alimentaria, v. 39, n. 3, p. 277–292, 2010.

SILVA, R. L. de F. O. B.; SOUZA, J. C.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. **Imobilização de enzimas de milho maltado em gel**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, v.28, p. 642-648. 2008.

SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. O.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. **Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam**. Food and Bioproducts Processing, v. 91, p. 54-59, 2013.

VARGAS, C. E. B. **Estudo da Imobilização do Extrato Enzimático Pectinolítico de *Aspergillus niger* ATCC 9642 em Matriz Polimérica - Inorgânica**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Erechim, Erechim. 2013.

VARGAS, C. E. B., MIGNONI, M., OLIVEIRA, D., VENQUIARUTO, L. D., VALDUGA, E., TONIAZZO, G., DALLAGO, R. M. **Synthesis of a hybrid polymeric-inorganic biomimetic support incorporating in situ pectinase from *Aspergillus Níger* ATCC 9642**. Byoprocess Biosyst Eng. Published on line: 19 Abril 2015.

CAPÍTULO V

TRATAMENTO DE ENZIMAS EM FLUIDO PRESSURIZADO

Objetivos

Estudar o efeito das variáveis temperatura, taxa de depressurização, tempo e pressão, na atividade de pectina liase e pectinametilesterase das pectinases comerciais (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash) imobilizadas em diferentes suportes (gelatina-alginato e poliuretano)

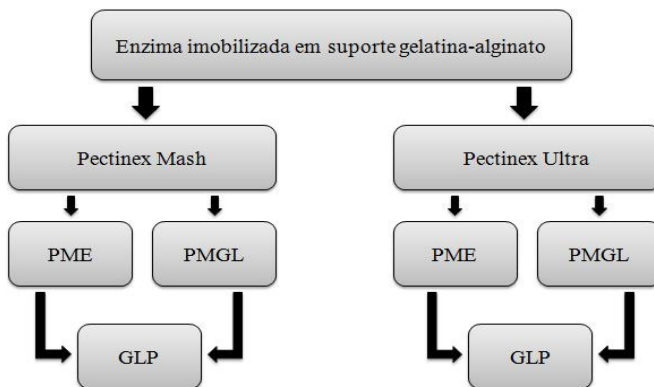
Avaliar a potencialidade de reutilização dos complexos pectinolíticos comerciais imobilizados e tratados com fluido pressurizado-GLP

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Tratamento com fluido pressurizado

O tratamento com fluido pressurizado realizado para as enzimas comerciais (Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L) imobilizadas em suporte gelatina-alginato, como descrito no item 4.1.3.1, utilizando o gás liquefeito de petróleo - GLP pode ser visualizado na Figura 10.

Figura 12 - Diagrama do tratamento enzimático com fluido pressurizado (GLP).



Fonte: O autor.

5.1.1.1 Reagentes

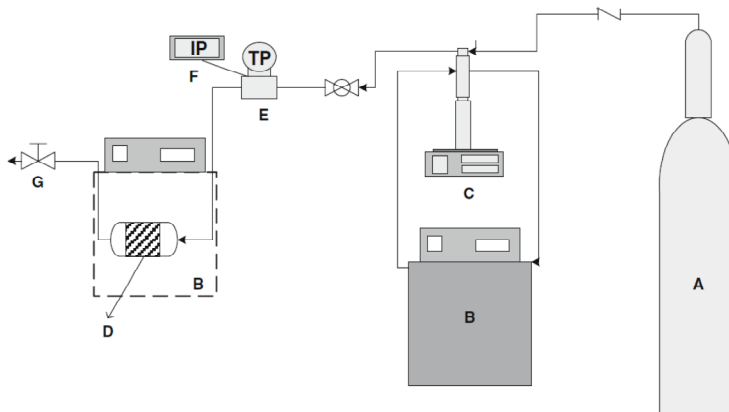
O gás liquefeito de petróleo foi fornecido pela Petrobras e é constituído por uma mistura de propano (50,3 %), n-butano (28,4 %), isobutano (13,7 %), etano (4,8 %) e outros componentes secundários (metano, pentano, isopentano, entre outros).

5.1.2 Aparato experimental para tratamento da enzima em fluido pressurizado

O equipamento consiste basicamente de um reservatório de solvente, dois banhos termostáticos, uma bomba de seringa (ISCO 260 D), uma reator de aço inoxidável com um volume interno de 3 mL, um transdutor de pressão absoluta (Smar, LD301) equipado com um programador portátil (Smar, HT201) com uma precisão de $\pm 0,4$ bar. O diagrama esquemático do equipamento é apresentado na Figura 13. O equipamento foi construído para conduzir os experimentos até 350 bar e 80°C (FRICKS et al., 2006; FRANKEN et al., 2010). Todas as linhas de montagem experimental empregaram tubulações de aço inoxidável com diâmetro externo 1/16" (HIP). Uma "check valve" (HIP 15-41AF1-T316SS) foi colocada entre a bomba e o reservatório de solvente para evitar o refluxo de solvente pressurizado.

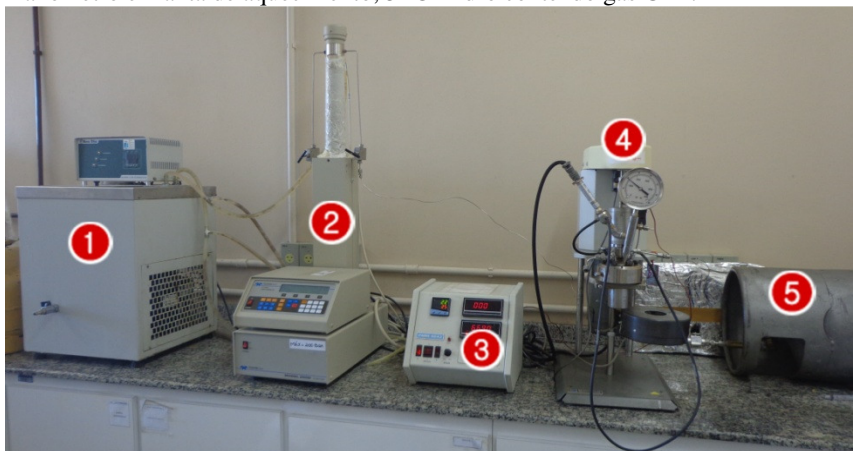
Duas outras válvulas micrométricas (HIP 15-11AF2 316SS) completaram o aparato experimental, uma localizada após a bomba de seringa, na entrada da célula de alta pressão, para permitir o carregamento de solvente e a outra logo após a célula para realizar a descarga do solvente. A célula de alta pressão encontrava-se acoplada a um aquecedor revestido de uma manta térmica. Um diagrama esquemático da unidade é mostrado na Figura 13 e uma vista geral da unidade e detalhes do reator (célula de aço inoxidável) utilizado nos experimentos podem ser verificados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 13 – Diagrama esquemático do aparato utilizado no tratamento das enzimas com o fluido pressurizado. A - reservatório de solvente; B - banho termostático; C - bomba de seringa; D - reator/célula de aço; E – Indicador de pressão; F - Transdutor de pressão; G - válvula micrométrica.



Fonte: O autor.

Figura 14 – Aparato utilizado no tratamento das enzimas com o fluido pressurizado. 1- Banho Termostático; 2- Bomba de seringa; 3- Transdutor de pressão, temperatura e agitação; 4- Reator/célula de aço equipada com manômetro e manta de aquecimento; 5- Cilindro contendo gás GLP.



Fonte: O autor.

Figura 15 – Detalhes da célula montada e acoplada ao equipamento de alta pressão (a) e em (b) da célula de aço inoxidável com capacidade para 36 g de imobilizado pectinolítico.



Fonte: O autor.

5.1.2.1 Procedimento experimental

O banho termostático foi ajustado para 37 °C para todos os experimentos. Quando a temperatura encontrava-se estável, a enzima imobilizada (em média 36 g) foi acondicionada na célula e esta era acoplada ao sistema. Após este procedimento, o sistema era alimentado e pressurizado com GLP até a pressão estabelecida pelo planejamento experimental por um tempo determinado. Depois de decorrido o tempo estipulado, o sistema era despressurizado a uma taxa também estabelecida no item 5.1.3.

A atividade enzimática era determinada antes (atividade inicial) e após (atividade final) ao tratamento com fluido pressurizado, utilizando ~0,5 g do extrato pectinolítico imobilizado. A atividade residual foi determinada de acordo com o exposto na Equação 10.

$$\text{Atividade residual}(\%) = \frac{\text{Atividade após pressurização}}{\text{Atividade antes da pressurização}} \cdot 100 \quad (10)$$

5.1.3 Planejamento de experimentos

Com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis do processo (pressão, taxa de despressurização e tempo de exposição) sobre a

atividade enzimática, um planejamento composto central 2^3 foi realizado. A Tabela 8 apresenta o intervalo de estudo das variáveis independentes para as pectinases comerciais (Pectinex® MASH e Pectinex® Ultra SP-L) imobilizadas a serem tratadas com GLP.

Tabela 8 – Variáveis e níveis experimentais avaliados nos planejamentos para GLP pressurizado.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0*	1
Pressão (bar)	30	110	190
Tempo (h)	1	3,5	6
R (bar.min ⁻¹)	20	60	100

*Triplicata do ponto central.

5.1.4 Reutilização do extrato pectinolítico imobilizado após tratamento com GLP

As esferas do extrato pectinolítico imobilizado (~0,5 g) foram usadas sucessivamente em diferentes ciclos de medida de atividade (procedimentos especificados nos itens 3.1.3.1 para a PMGL e 3.1.3.2 para a PME). A cada ciclo de reuso, aproximadamente 0,5 g do imobilizado utilizado anteriormente permanecia em contato por 5 min em 20 mL de solução de acetato de sódio (100 mM, pH 4,5). Posteriormente, foi realizada a secagem a vácuo das esferas utilizando funil de buchner e kitassato. A atividade das pectinases (PMGL e PME) inicial foi considerada 100% e avaliou-se a atividade residual (%) após cada ciclo de reuso, conforme a Equação 11.

$$RA = \frac{\text{Atividade de PMGL no ciclo } n}{\text{Atividade de PMGL inicial}} \cdot 100 \quad (11)$$

5.1.5 Tratamento estatístico

Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguido de comparação das médias pelo teste de

Tukey, com o software *Statistica* versão 8.0, com nível de confiança de 95 %.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa são demonstrados e discutidos os resultados obtidos para atividade enzimática das pectinametilesterase e pectina liase dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash. As mesmas foram imobilizadas e submetidas aos tratamentos com fluido pressurizado (GLP).

5.2.1 Efeito do tratamento com GLP na atividade das pectinases dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash imobilizados em suporte gelatina-alginato

Os complexos enzimáticos comerciais (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash) imobilizados em suporte gelatina-alginato foram submetidos ao tratamento em fluido pressurizado (GLP). A atividade enzimática e a atividade residual foram determinadas logo após o tratamento com GLP pressurizado.

5.2.1.1 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte de gelatina-alginato

A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2³ (valores reais e codificados) e respostas em atividade residual (%) da enzima pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em gelatina-alginato, após o tratamento com GLP. Verifica-se que houve aumento de atividade enzimática da pectinametilesterase em quase todos os experimentos tratados com fluido pressurizado (GLP).

De acordo com a Tabela 9, verifica-se que a maior a atividade residual de 119% foi obtida nos ensaios 9, 10 e 11 (Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹) 119 % e a menor atividade residual ocorreu no experimento 3 (Pressão = 30 bar; Tempo = 6 h; R = 20 bar.min⁻¹). O tratamento estatístico dos resultados da tabela 9 permitiram somente avaliar os efeitos estimados das variáveis conforme demonstrado no gráfico de pareto (Figura 16) pois, o F calculado foi menor que o F tabelado não permitindo validar o modelo e construir

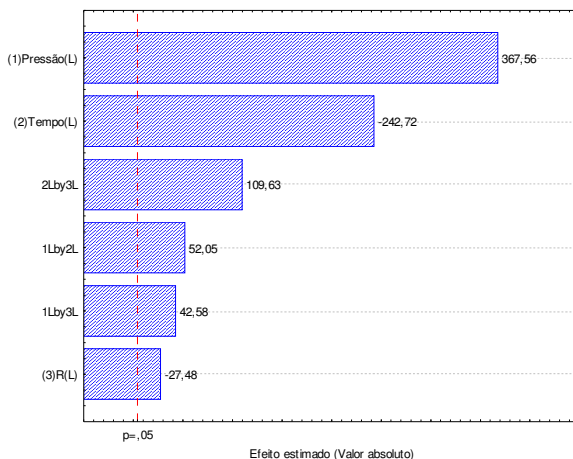
superfície de resposta e/ou curva de contorno. Verifica-se que a pressão e as interações das variáveis estudadas exerceram efeitos significativos ($p < 0,05$) positivos. No entanto, o tempo e a taxa de depressurização influenciaram negativamente na atividade da enzima PME da Pectinex Ultra SP-L

Tabela 9 – Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado GLP e resposta em atividade residual de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte gelatina-alginato.

Complexo enzimático comercial - Pectinex® Ultra SP-L				
Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min⁻¹)	Atividade Residual de PME (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	103,88
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	98,70
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	93,12
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	94,82
5	190 (1)	1 (-1)	20(-1)	109,94
6	190 (1)	1 (-1)	100 (1)	108,31
7	190 (1)	6 (1)	20 (-1)	103,20
8	190 (1)	6 (1)	100 (1)	105,58
9	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	119,34
10	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	119,41
11	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	119,37

Atividade Enzimática Imobilizada Inicial = 14,68 U/g

Figura 16 – Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2^3 para a atividade residual de PME do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte gelatina-alginato.



Alguns trabalhos apresentados na literatura relatam que o uso de solventes com baixa constante dielétrica, tais como o propano, poderiam manter ou aumentar a atividade e estabilidade enzimática (KNEZ e HABULIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; FRICKS et al., 2006). Possivelmente, isto esteja associado ao incremento da atividade de PME nos ensaios 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 (Tabela 9), já que o GLP utilizado apresenta em sua composição 50,3 % de propano.

Na literatura não foi encontrado estudos que realizaram tratamentos com fluidos pressurizados de pectinases, mas relatado com outras enzimas (lipases, inulinases). Oliveira et al., (2006) submeteram as lipases IM, Novozym 435 e de *Yarrowia lipolytica* ao processamento com propano (30-250 bar) e butano (10-250 bar). Para o processamento com propano as lipases Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica* apresentaram perda menos pronunciada na atividade, enquanto que a Novozym 435 apresentou um ganho de atividade em todas as condições experimentais investigadas. O processamento com butano apresentou os mesmos resultados apontados no processamento com propano. O butano, por apresentar uma baixa constante dielétrica, preserva a conformação enzimática sob altas pressões, diminuindo os possíveis efeitos da desnaturação que levam à diminuição da atividade enzimática.

Silva (2011) comprovou que a fração de butano (28 %) encontrada no GLP possui uma maior influência na atividade específica da enzima e também obteve melhores resultados nas enzimas inulinases, quando estas foram expostas por menor tempo (1 h) ao GLP do que quando exposta em gases puros.

5.2.1.2 Efeito do tratamento do fluido pressurizado (GLP) na atividade de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte de gelatina-alginato

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) e respostas em atividade residual da PMGL (%) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado, após o tratamento com GLP. Verifica-se que houve aumento de atividade enzimática de PMGL nos ensaios 1, 2, 3 e 4, sendo que a maior atividade residual foi de 114 % (Ensaio 2). Porém nos demais ensaios houve um decréscimo da atividade após o tratamento com GLP.

A Tabela 37 apêndice XIII, apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de pressão e temperatura (2), para a atividade residual de pectina liase. As variáveis independentes pressão, tempo e a interação tempo e taxa de despressurização mostraram uma influência significativa ($p < 0,05$) negativa sobre a atividade residual da enzima pectina liase. No entanto, as variáveis taxa de despressurização, interação pressão e tempo e interação pressão e taxa de despressurização apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) positiva sobre a atividade residual de pectina liase. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 42, apêndice XIV).

Tabela 10 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte gelatina-alginato.

Complexo enzimático comercial – Pectinex® Ultra SP-L				
Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min⁻¹)	Atividade Residual de PMGL (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	110,23
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	114,32
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	106,07
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	106,58
5	190 (1)	1 (-1)	20(-1)	89,97
6	190 (1)	1 (-1)	100 (1)	96,53
7	190 (1)	6 (1)	20 (-1)	93,02
8	190 (1)	6 (1)	100 (1)	94,04
9	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	96,36
10	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	96,40
11	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	96,30

Atividade Enzimática Imobilizada Inicial = 10,8 U/g

A Equação 12 apresenta o modelo codificado, que descreve a atividade residual de pectina liase em função das variáveis analisadas (pressão, tempo e taxa de despressurização), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,95 e o F calculado de 1,13 vezes maior que o valor tabelado (6,16), os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 17. O coeficiente de correlação quantifica a qualidade do ajustamento, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, variando de 0 a 100 % (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

$$AR = 99.98 - 7.95.X1 - 1.42.X2 + 1.52.X3 + 1.56.X1.X2 + 0.373.X1.X3 - 1.14.X2.X3 \quad (12)$$

Onde:

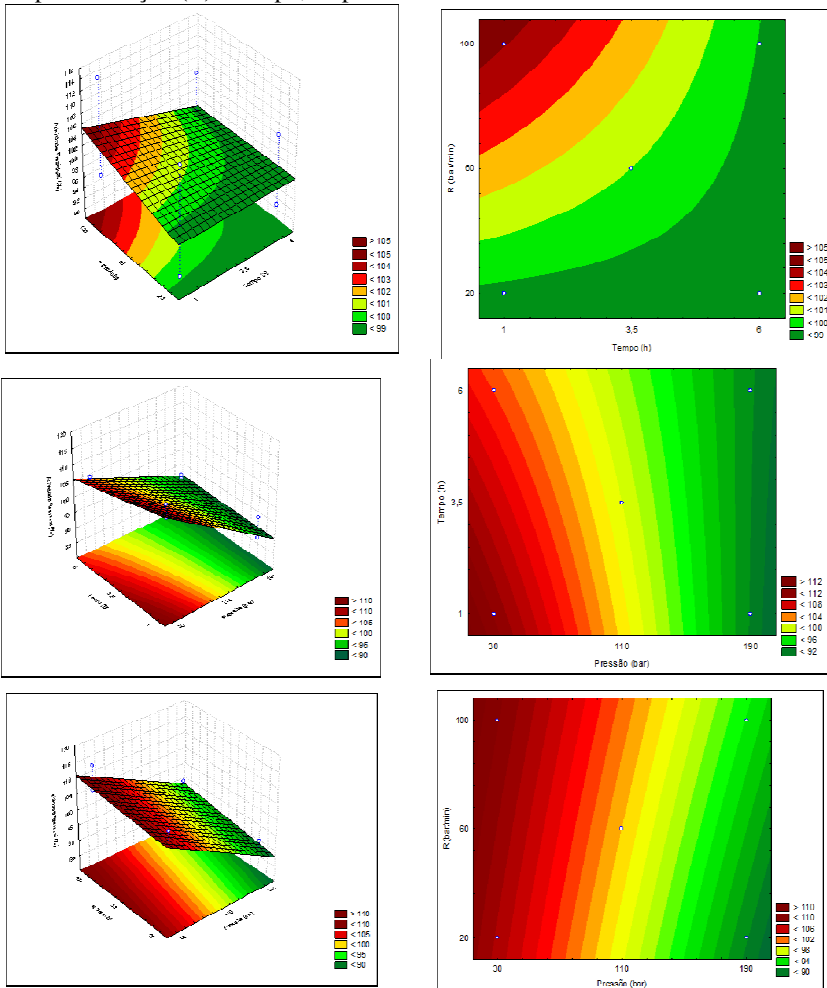
AR = Atividade Residual de pectina liase – PMGL (%);

X_1 = Pressão (bar);

X_2 = Tempo (h);

X_3 = Taxa de Despressurização (bar.min⁻¹).

Figura 17 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade residual de pectina liase (Pectinex Ultra SP-L) submetida ao tratamento com GLP pressurizado: (a) tempo e pressão; (b) taxa de despressurização e pressão; (c) despressurização (R) e tempo, respectivamente.



A Figura 17 mostra que a máxima atividade residual de PMGL, encontra-se na região próxima a maior taxa de despressurização ($\sim 100 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$) e nas faixas de menor pressão ($\sim 30 \text{ bar}$) e tempo ($\sim 1\text{h}$). Conforme relatado anteriormente, a taxa de despressurização apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) positivo. No entanto, o tempo e a pressão isoladamente apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) negativo, demonstrando que maiores atividades residuais são obtidas quando o tempo de exposição da enzima e à pressão do sistema forem menores e a uma despressurização rápida do sistema.

De acordo com Knez e Habulin (2001), a despressurização é um dos fatores que mais afeta a atividade das enzimas. O fluido pressurizado entra em contato com a estrutura terciária da enzima de um modo lento. Quando o sistema é despressurizado rapidamente há uma expansão rápida do fluido, isso ocasiona uma diferença de pressão entre o ambiente onde se encontra a enzima e a sua pressão interna, gerando um desdobramento na estrutura da enzima, podendo levar a um aumento da sua atividade e a seletividade.

A redução da atividade enzimática de PMGL (Pectinex® Ultra SP-L) imobilizada, nos ensaios 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 (Tabela 10) pode ser devido a desnaturação de proteína induzida por pressão. Alguns autores (JACKSON e ELLER, 2006) relatam que a desnaturação pela ação da pressão poderá ser um processo reversível, diferente da desnaturação causada por temperatura.

5.2.1.3 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizado em suporte gelatina-alginato

A Tabela 11 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash. Verifica-se que houve aumento de atividade enzimática da pectinametilsterase (Pectinex® Mash) em praticamente todos os experimentos, exceto ao do ensaio 3, tratados com fluido pressurizado (GLP).

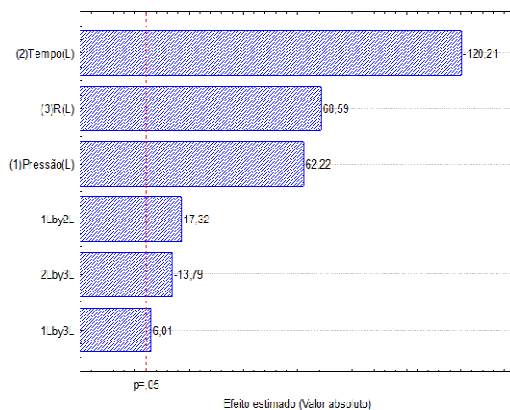
Tabela 11 – Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizada em suporte gelatina-alginato.

Complexo enzimático comercial – Pectinex® Mash				
Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min⁻¹)	Atividade Residual de PME (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	106,58
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	103,33
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	98,63
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	104,55
5	190 (1)	1 (-1)	20(-1)	104,46
6	190 (1)	1 (-1)	100 (1)	102,87
7	190 (1)	6 (1)	20 (-1)	100,84
8	190 (1)	6 (1)	100 (1)	109,10
9	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	109,51
10	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	111,30
11	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	110,03

Atividade Enzimática Imobilizada Inicial = 34,49 U/g

De acordo com a Tabela 11, verifica-se que a maior a atividade residual de PME foi de 111 % obtida no ensaio 10 (Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹). Estes resultados podem ser melhor visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 18), onde verifica-se que a pressão, taxa de despressurização e as interações com a pressão exerceram efeitos significativos ($p < 0,05$) positivos. No entanto, o tempo e a interação do tempo com a taxa de despressurização influenciaram negativamente na atividade da enzima PME da Pectinex® Mash

Figura 18 – Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para a atividade enzimática de pectinametilesterase (PME) do complexo Pectinex® Mash.



5.2.1.4 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizados em suporte gelatina-alginato

A Tabela 12 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash. Verifica-se que em todos os ensaios realizados obteve-se incremento na atividade relativa residual.

Tabela 12 – Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizada em suporte gelatina-alginato.

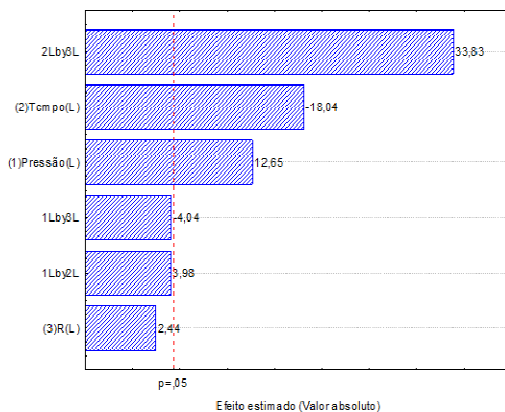
Complexo enzimático comercial – Pectinex® Mash				
Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min⁻¹)	Atividade Residual de PMGL (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	122,16
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	117,96
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	103,40
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	114,22
5	190 (1)	1 (-1)	20(-1)	138,42
6	190 (1)	1 (-1)	100 (1)	110,55
7	190 (1)	6 (1)	20 (-1)	104,19
8	190 (1)	6 (1)	100 (1)	130,42
9	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	121,37
10	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	120,59
11	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	119,93

Atividade Enzimática Imobilizada Inicial = 15,25 U/g

De acordo com a Tabela 12 verifica-se que a máxima atividade residual foi de 138,42 % (Ensaio 5), com pressão de 190 bar; tempo de exposição de 1 hora e taxa de despressurização de 20 bar.min⁻¹, demonstrando um incremento de 38 % em relação a atividade de pectina liase inicial. Esses resultados podem ser melhor visualizados pelos efeitos estimados apresentados no gráfico de Pareto (Figura 19), onde verifica-se que a pressão e a interação entre o tempo e a taxa de despressurização exerceram efeitos significativos ($p < 0,5$) positivos

sobre a atividade de pectina liase, embora que o tempo isolado tenha exercido efeito significativo ($p < 0,5$) negativo, indicando que maiores atividades residuais são obtidas quando a pressão é aumentada e o tempo diminuído.

Figura 19 – Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2^3 para a atividade enzimática de pectina liase (PMGL) do complexo Pectinex® Mash.



Marcon (2012) ao tratar a enzima comercial (Pectinex® Mash) imobilizado em suporte de alginato de sódio e carvão ativado com GLP pressurizado, obteve um aumento de 17,24 % sobre a atividade inicial de pectinametilsterase, na condição em que estava exposta à maior pressão (270 bar) durante o menor tempo (1 h) submetida a uma taxa de despressurização rápida (100 bar/min).

5.2.2 Efeito do tratamento com GLP na atividade das pectinases dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash imobilizados em suporte de poliuretano (PU)

Os complexos enzimáticos comerciais (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash) imobilizados em suporte de poliuretano (PU) foram submetidos ao tratamento em fluido pressurizado (GLP). A atividade enzimática e a atividade residual foram determinadas logo após o tratamento com GLP pressurizado.

5.2.2.1 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP – L imobilizado em suporte de poliuretano (PU)

A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) e respostas em atividade residual (%) da enzima pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em poliuretano, após o tratamento com GLP. Verifica-se que houve aumento de atividade enzimática da pectinametilsterase (Pectinex® Ultra SP-L) em quase todos os experimentos tratados com fluido pressurizado (GLP).

De acordo com a Tabela 13, verifica-se que a maior a atividade residual foi obtida nos ensaios 6 e 7 (Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; e 6 h, R= 100 bar.min⁻¹) de 156,25 % e a menor atividade residual (81,25 %) ocorreu no experimento 3 (Pressão = 30 bar; Tempo = 6 h; R = 20 bar.min⁻¹).

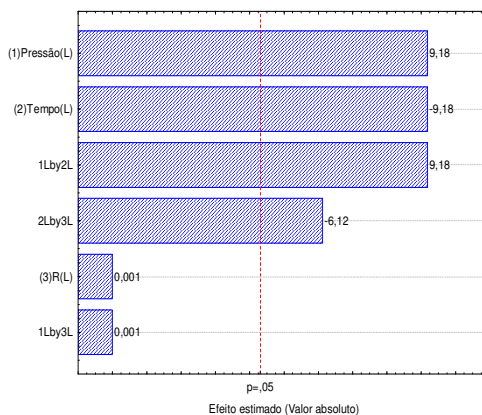
Os resultados da Tabela 13 podem ser melhor visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 20), onde verifica-se que a pressão e a interação do tempo e a taxa de despressurização exerceram efeitos significativos ($p < 0,05$) positivos. No entanto, o tempo e a interação tempo com a taxa de despressurização influenciaram negativamente na atividade da enzima PME da Pectinex® Ultra SP-L.

Tabela 13 – Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado GLP e resposta em atividade residual de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L immobilizada em suporte de poliuretano.

Complexo enzimático comercial - Pectinex® Ultra SP-L				
Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min⁻¹)	Atividade Residual de PME (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	150,00
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	100,00
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	81,25
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	131,25
5	190 (1)	1 (-1)	20(-1)	93,75
6	190 (1)	1 (-1)	100 (1)	156,25
7	190 (1)	6 (1)	20 (-1)	156,25
8	190 (1)	6 (1)	100 (1)	93,75
9	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	131,25
10	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	128,75
11	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	128,75

Atividade Enzimática Imobilizada Inicial = 1,6 U/g

Figura 20 – Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2^3 para a atividade enzimática de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L.



5.2.2.2 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte poliuretano (PU)

A Tabela 14 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) e respostas em atividade residual (%) da enzima pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em poliuretano, após o tratamento com GLP. Verifica-se que não houve aumento de atividade enzimática da pectinametilesterase (Pectinex® Ultra SP-L) em todos os experimentos tratados com fluido pressurizado (GLP).

De acordo com a Tabela 14, verifica-se que não houve aumento da atividade enzimática. Estes resultados podem ser melhor visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 21), onde verifica-se que a interação das variáveis tempo e taxa de despressurização exerceram efeito significativo ($p < 0,05$) negativo na atividade da enzima PME da Pectinex® Ultra SP-L.

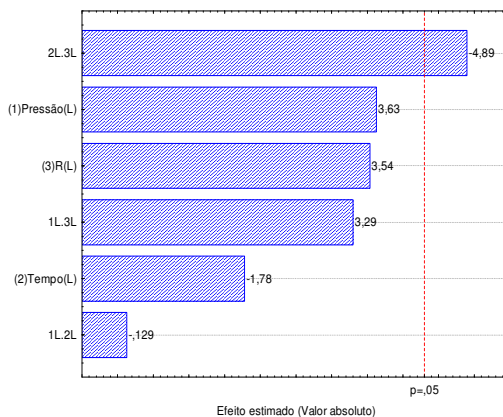
Tabela 14 – Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de poliuretano.

Complexo enzimático comercial - Pectinex® Ultra SP-L				
Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min⁻¹)	Atividade Residual de PMGL (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	39,18
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	52,63
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	48,83
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	36,33
5	190 (1)	1 (-1)	20(-1)	43,20
6	190 (1)	1 (-1)	100 (1)	63,73
7	190 (1)	6 (1)	20 (-1)	46,12
8	190 (1)	6 (1)	100 (1)	53,13
9	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	54,59
10	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	55,60
11	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	50,24

Atividade Enzimática Imobilizada Inicial = 15,76 U/g

A redução da atividade enzimática de PMGL (Pectinex® Ultra SP-L) imobilizada em poliuretano pode ser devido à dificuldade encontrada pelo gás GLP para transpor o suporte de imobilização, devido a mudanças conformacionais da enzima, conforme relatado por Nakamura et al., (1996 -1997), para outras enzimas.

Figura 21 – Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2^3 para a atividade enzimática de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L.



5.2.2.3 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático Pectinex® Mash em suporte de poliuretano (PU)

A Tabela 15 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) e respostas em atividade residual (%) da enzima pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizado, após o tratamento com GLP. Verifica-se que houve aumento de atividade enzimática da pectinametilsterase (Pectinex® Mash) nos experimentos 6, 9, 10 e 11 tratados com fluido pressurizado (GLP).

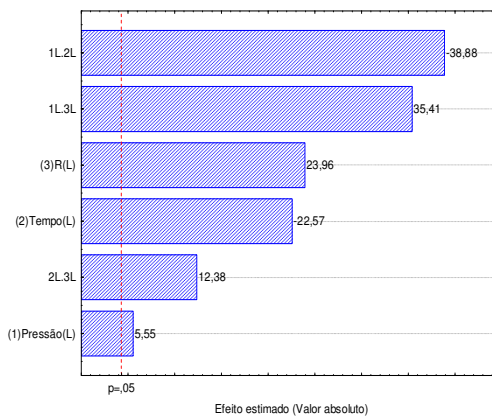
De acordo com a Tabela 15, verifica-se que a maior a atividade residual de PME foi de 103 % obtida no ensaio 11 (Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹). Estes resultados podem ser melhor visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 22), onde verifica-se que a pressão, taxa de despressurização e a interações da taxa de despressurização com a pressão e tempo exerceram efeitos significativos ($p<0,05$) positivos. No entanto, o tempo e a interação da pressão com o tempo influenciaram negativamente na atividade da enzima PME da Pectinex® Mash.

Tabela 15 - Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado - GLP e resposta em atividade residual de pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizada em suporte de poliuretano.

Complexo enzimático comercial – Pectinex® Mash				
Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min⁻¹)	Atividade Residual de PME (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	91,69
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	89,72
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	95,33
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	92,67
5	190 (1)	1 (-1)	20(-1)	96,35
6	190 (1)	1 (-1)	100 (1)	102,98
7	190 (1)	6 (1)	20 (-1)	78,61
8	190 (1)	6 (1)	100 (1)	95,93
9	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	103,03
10	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	102,84
11	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	103,40

Atividade Enzimática Imobilizada Inicial = 21,42 U/g

Figura 22 – Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2^3 para a atividade enzimática de pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash.



5.2.2.4 Avaliação do efeito do tratamento com GLP na atividade de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizado em suporte poliuretano (PU)

A Tabela 16 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) e respostas em atividade residual (%) da enzima pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizado, após o tratamento com GLP. Verifica-se que não houve aumento de atividade enzimática da pectina liase (Pectinex® Mash) em todos os experimentos tratados com fluido pressurizado (GLP).

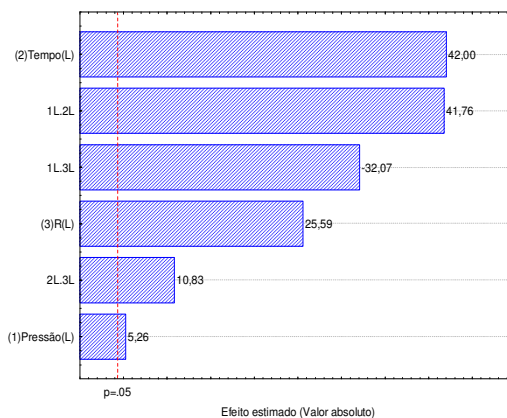
Tabela 16 – Matriz do Planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) do tratamento com fluido pressurizado GLP e resposta em atividade residual de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizada em suporte de poliuretano.

Complexo enzimático comercial - Pectinex® Mash				
Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min⁻¹)	Atividade Residual de PMGL (%)
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	36,71
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	73,34
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	27,54
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	82,90
5	190 (1)	1 (-1)	20(-1)	32,46
6	190 (1)	1 (-1)	100 (1)	19,37
7	190 (1)	6 (1)	20 (-1)	91,35
8	190 (1)	6 (1)	100 (1)	94,10
9	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	84,47
10	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	85,60
11	110 (0)	3,5 (0)	60 (0)	83,34

Atividade Enzimática Imobilizada Inicial = 16,32 U/g

Os resultados da Tabela 16 podem ser melhor visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 23), onde verifica-se que todas as variáveis influenciaram na atividade de PMGL (Pectinex® Mash), porém a interação da pressão e da taxa de despressurização influenciaram ($p < 0,05$) negativamente sobre a atividade da PMGL.

Figura 23 – Gráfico de pareto (efeitos estimados) das variáveis do Planejamento fatorial 2^3 para a atividade enzimática de pectina liase (PMGL) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash.



Conforme, discutido anteriormente, possivelmente a redução da atividade enzimática de PMGL (Pectinex® Mash) imobilizada em poliuretano pode ser devido á dificuldade encontrada pelo gás GLP para transpor o suporte de imobilização, devido a mudanças conformacionais da enzima.

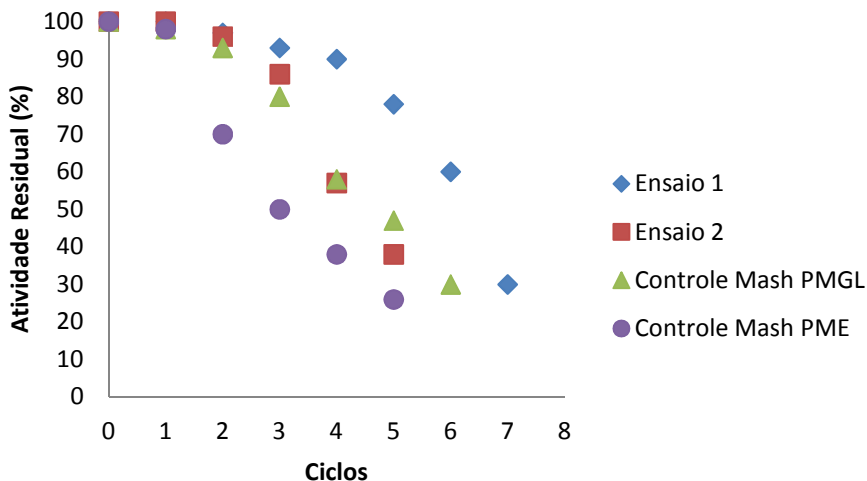
De acordo com os resultados mostrados, a imobilização em gelatina-alginato demonstrou maior eficiência, sendo este suporte escolhido para as próximas etapas do trabalho que consiste na estabilidade térmica e clarificação de suco de frutas (Capítulos VI e VII, respectivamente).

5.2.3 Avaliação da reutilização das pectinases comerciais (Pectinex® Mash e Ultra SP-L) imobilizadas em suporte de gelatina-alginato após tratamento com GLP

As Figuras 24 e 25 mostram os perfis de atividade relativa (%), em relação aos ciclos de reutilização, obtidos para enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME). A Figura 24 mostra os resultados obtidos para o complexo Pectinex® Mash e a Figura 25 é referente aos resultados obtidos para o complexo Pectinex® Ultra SP-L. Em ambos os casos as enzimas foram imobilizadas em suporte de gelatina-alginato utilizando os ensaios onde obteve-se os melhores resultados de atividade após o tratamento com fluido pressurizado

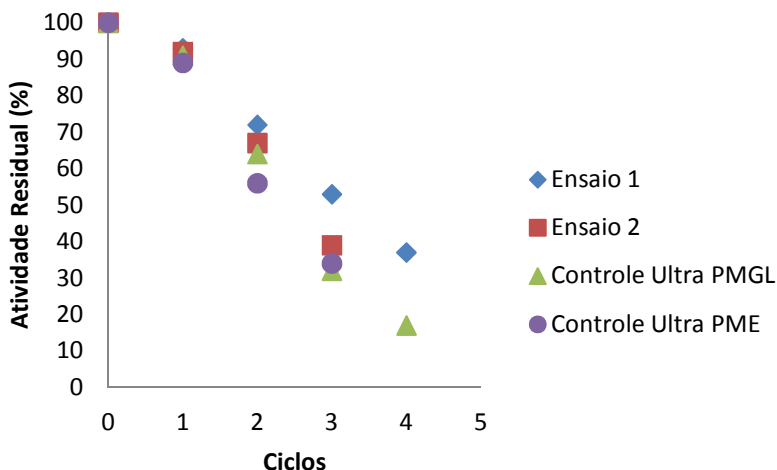
(GLP). Utilizou-se a enzima apenas imobilizada sem outro tipo de tratamento como controle para verificar a eficácia do tratamento empregado.

Figura 24 – Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização (Ensaio 1 PMGL: 190 bar, tempo de 1 h e 20 bar/min; Ensaio 2 PME: 110 bar, tempo de 3,5 h e 60 bar/min).



De acordo com a Figura 24 a enzima pectina liase (PMGL) (Ensaio 1) mostrou o melhor resultado, mantendo a sua atividade por até 6 ciclos de utilização quando a atividade relativa atingiu 60%, enquanto o controle manteve a atividade por 5 ciclos e atingiu 47% de atividade relativa. A enzima pectinametilesterase (PME) (Ensaio 2) manteve a sua atividade por 5 ciclos, onde apresentou 57% de atividade relativa e o seu controle manteve-se por 3 ciclos com 50% de atividade.

Figura 25 – Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilsterase (PME) do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização (Ensaio 1 PMGL: 30 bar, tempo de 1 h e 100 bar/min; Ensaio 2 PME: 110 bar, tempo de 3,5 h e 60 bar/min).



Conforme a Figura 25, a enzima pectina liase (PMGL) (Ensaio 1) mostrou o melhor resultado, assim como observado na Figura 25. A enzima manteve a sua atividade por 3 ciclos de utilização e atingiu 53% de atividade relativa, enquanto que o controle obteve 2 ciclos atingindo 64%. A enzima pectinametilsterase (PME) (Ensaio 2) manteve a sua atividade por 2 ciclos apresentando 67% de atividade relativa e o seu controle 56% igualmente em 2 ciclos de utilização.

Um dos maiores interesses ao imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador que possa ser reutilizado no processo catalítico. Ao longo dos reciclos, é comum obter diminuição da atividade enzimática. Esta queda deve ser quantificada para determinar o número máximo de vezes que a enzima imobilizada pode ser utilizada, sem afetar significativamente a produtividade do processo (KEMPKA, 2012).

A perda de atividade relativa pode ser explicada pela inativação da enzima em virtude da desnaturação proteica (KEPMKA, 2012). Geralmente enzimas encapsuladas em alginato de cálcio, têm diminuição da sua atividade após seu uso em diferentes ciclos catalíticos, devido à liberação da enzima do suporte como resultado da

lavagem das esferas no final de cada ciclo, além de mudanças conformacionais e ao dano mecânico das esferas depois de ser utilizadas repetidas vezes (REHMAN et al., 2013; WON et al., 2005).

Valores de atividade residual nos reusos de pectinases também se têm reportado, porém em outros suportes de imobilização. Csanádi e Sisak (2006), ao avaliarem o reuso da enzima Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em resina de Amberlite IRA900 Cl, determinaram, que pode ser usada por 12 ciclos consecutivos para a produção de frutooligossacarídeos. Li et al., (2007) estudaram a imobilização de pectinase comercial em suporte ativado de ágar-gel e encontraram que a enzima imobilizada manteve 81 % de atividade residual após 10º ciclo de reação.

5.3 CONCLUSÕES

As enzimas apresentaram diferentes comportamentos utilizando-se o mesmo solvente pressurizado mesmo quando submetidas às mesmas condições experimentais. A consecução do presente trabalho permite, de maneira geral, concluir que:

- A enzima Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte alginato-gelatina tratada com GLP:

- Obteve-se um acréscimo de 19 % para a atividade de pectinametilsterase (PME), quando tratada com GLP na pressão de 110 bar, tempo de exposição de 3,5 h e taxa de depressurização de 60;

- Atividade de pectina liase (PMGL) houve um decréscimo nos ensaios 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e um acréscimo nos ensaios 1, 2, 3 e 4. O ensaio 2 apresentou maior acréscimo, 14%, quando tratado com GLP na pressão de 30 bar, tempo de exposição de 1 h e taxa de depressurização de 100. As variáveis independentes pressão, tempo e a interação tempo e taxa de depressurização mostraram uma influência significativa ($p < 0,05$) negativa sobre a atividade residual da enzima pectina liase.

- A enzima Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de poliuretano (PU) tratada com GLP:

- Obteve-se um acréscimo de atividade de pectinametilsterase (PME) de 56% quando submetida a uma

pressão de 190 bar por uma hora e despressurizada a uma taxa de 100 bar/min;

- Para a enzima pectina liase (PMGL) verifica-se que não houve aumento da atividade enzimática após tratamento com GLP.

- A enzima Pectinex® Mash imobilizada em suporte alginato-gelatina tratada com GLP:

- A atividade de pectinase liase (PMGL) incrementou em 38 % quando submetidas a pressão de 190 bar por 1 h e despressurizada a uma taxa de 20 bar/min, respectivamente;

- Para a atividade de pectinametilsterase (PME) houve um aumento de 11 %, na pressão de 110 bar por 3,5 h e despressurizada a uma taxa de 60 bar/min.

- A enzima Pectinex® Mash imobilizadas em suporte Poliuretano:

- Houve um incremento de 3 % na atividade de pectinametilsterase (PME) quando submetida a uma pressão de 110 bar por 3,5 hs e despressurizada a uma taxa de 60 bar/min, tratada com GLP;

- Para a enzima pectina liase (PMGL) não houve aumento da atividade enzimática.

- Reuso

- Quanto ao reuso das pectinases comerciais imobilizadas em suporte gelatina-alginato e tratadas com gás GLP, a enzima pectina liase (PMGL) do complexo Pectinex® Mash mostrou o melhor resultado, mantendo a sua atividade por até 6 ciclos de utilização quando a atividade relativa atingiu 60%, enquanto o controle manteve a atividade por 5 ciclos e atingiu 47% de atividade relativa. A enzima pectinametilsterase (PME) manteve a sua atividade por 5 ciclos, onde apresentou 57% de atividade relativa e o seu controle manteve-se por 3 ciclos com 50% de atividade.

- Para o complexo Pectinex® Ultra SP-L, a enzima pectina liase (PMGL) mostrou o melhor resultado, assim como observado para o complexo Pectinex® Mash. A enzima manteve a sua atividade por 3 ciclos de utilização e atingiu 53% de atividade relativa, enquanto que o controle obteve 2 ciclos

atingindo 64%. A enzima pectinametilesterase (PME) manteve a sua atividade por 2 ciclos apresentando 67% de atividade relativa e o seu controle 56% igualmente em 2 ciclos de utilização.

REFERÊNCIAS

- FRANKEN, L.P.G.; MARCON, N.S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J.V. **Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity.** Food Bioprocess Technology, v.3: 511-520, 2010.
- FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P.B.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C.; GIRARDI, J.S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; **Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide.** J. supercritical Fluids. v.38: 347-353, 2006.
- JACKSON, M.A., ELLER, F.J.; **Isolation of long-chain aliphatic alcohols from beeswax using lipase-catalyzed methanolysis in supercritical carbon dioxide.** J. Supercritical Fluids. v.37: 173-177, 2006.
- KEMPKA, A. **Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase utilizando gelatina de diferentes *blooms* adicionada de plastificantes hidrofílicos.** Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2012.
- KNEZ, Z.; HABULIN, M. **Compressed gases as alternative enzymatic reaction solvents: a short review.** Journal of Supercritical Fluids, v.23, pp. 29-42, 2001.
- LI, T.; LI, S.; WANG, N.; TAIN, L. **Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support,** Food Chemistry, v. p. 109 703–708, 2007.
- NAKAMURA, T., OGATA, Y., HAMADA, S., OHTA, K.; **Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers by *Aspergillus Niger* and *Saccharomyces cerevisiae*.**J. Ferm. Bioeng. v.81: 564-566, 1996.
- NAKAMURA, T., SHITARA, A., MATSUDA, S., MATSUO, T., SUIKO, M., OHTA, K.; **Production, Purification and Properties of an Endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose.** J. Ferm. Bioeng. v.84: 313-318, 1997.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; DARIVA, C.; CUNHA, A. G.; BELIVAQUA, J.V.; DESTAIN.; OLIVEIRA, J.V.; FREIRE, D.M.G. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase.** Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic. v.39: 117-121, 2006.

REHAM, H.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S.; MOLINARO, A. ANSARI, A. **Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support.** Food Chemistry, v. 139, p. 1081–1086, 2013.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos.** 1ª ed., Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SILVA, M.F. **Avaliação da atividade da enzima inulinase em fluidos pressurizados e aplicação na síntese de fruto-oligossacarídeos.** Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões URI - Erechim, Erechim, 2011.

WON, K.; SANGBUM, K.; KWANG-JE, K; HONG, P.; SANG-JI, M. **Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel bead,** Process Biochemistry, v. 40, p. 2149-2154, 2005.

CAPÍTULO VI

ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

Objetivos

Avaliar a estabilidade das enzimas livre e imobilizadas submetidas ou não ao tratamento em fluido pressurizado em diversas temperaturas.

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Estabilidade térmica

A estabilidade enzimática foi avaliada para a enzima livre, enzima imobilizada e enzima imobilizada tratada com GLP pressurizado.

A estabilidade após tratamento com fluidos pressurizados foi avaliada no ponto em que a enzima teve maior ganho de atividade. Como as quatro pectinases dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L (PME e PMGL) e Pectinex Mash® (PME e PMGL) obtiveram os melhores resultados em condições experimentais diferentes, avaliamos a melhor condição de cada experimento, utilizando-se para a enzima PME do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L a pressão de 110 bar, por 3,5 horas e taxa de depressurização de 60 bar.min⁻¹ para a enzima PMGL, a pressão de 30 bar, por 1 hora e taxa de depressurização de 100 bar.min⁻¹. Para a enzima PME do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash, a pressão de 110 bar, por 3,5 horas e taxa de depressurização de 60 bar.min⁻¹ e para a enzima PMGL, a pressão de 190 bar, por 1 hora e taxa de depressurização de 20 bar.min⁻¹.

A fim de determinar a estabilidade térmica das pectinases comerciais imobilizadas e tratadas com fluido pressurizado – GLP estas serão submetidas a altas (25, 30, 40, 50 e 60°C) e baixas (4, -18 e -80°C) temperaturas. As amostras foram coletadas periodicamente (em intervalos de 24 - 72 h, dependendo da temperatura) para avaliação das atividades enzimáticas. A estabilidade térmica é expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática (PMGL e PME).

6.1.2 Análise dos parâmetros cinéticos

A desativação térmica das pectinases é geralmente descrita pela cinética de primeira ordem, descrita pela Equação 13 (Aghajanzadeh et al., 2016).

$$\text{Log} \left(\frac{A}{A_0} \right) = -k_d \cdot t \quad (13)$$

Sendo:

A = Atividade enzimática residual;

A₀ = Atividade enzimática inicial;

k_d = Constante de inativação enzimática térmica ou constante de velocidade de reação (dias⁻¹);

t = Tempo (dias).

O tempo requerido para reduzir a atividade das pectinases em 90%, é chamado de tempo de redução decimal (D-valor), o qual é inversamente relacionada com a constante de velocidade de reação (Equação 14) (Aghajanzadeh et al., 2016).

$$D = \frac{2,303}{k_d} \quad (14)$$

A Energia de Inativação Térmica (E_d) foi determinada através das constantes de inativação térmica (k_d). Após a determinação das constantes de inativação, a energia de inativação (E_d) foi estimada plotando-se um gráfico ln (k_d) versus 1/T (Temperatura) conforme a equação linearizada de Arrhenius.

O Tempo de meia-vida (t_{1/2}) foi calculado através da razão do valor angular do gráfico de ln (k_d) versus 1/T (Temperatura) pelo valor de k_d.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Estabilidade enzimática a baixas temperaturas

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade enzimática das enzimas PME e PMGL dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Mash em função do tempo e temperaturas de 4, -18°C e 80°C são apresentados nas Figuras 34 a 45

(Apêndices XV a XXVI) nas 3 formas estudadas (livre, imobilizada e imobilizada com tratamento utilizando GLP).

A Figura 34 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em baixas temperaturas livre. A enzima manteve a atividade superior a 50% por um período de 30 dias.

A Figura 35 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em baixas temperaturas, imobilizada em suporte de gelatina-alginato. A enzima foi monitorada durante 100 dias, período que manteve atividade superior a 60% para as temperaturas de -80°C e -18°C já para temperatura de 4°C houve decréscimo de atividade em 60 dias de estocagem.

A Figura 36 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em baixas temperaturas, imobilizada e pressurizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. A enzima foi monitorada durante 100 dias, houve acréscimo da atividade durante aproximadamente 50 dias de estocagem para todas as temperaturas. Nos demais dias a estabilidade foi mantida acima de 60%.

A Figura 37 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em baixas temperaturas livre. Houve decréscimo de atividade maior que 50% a partir 40 dias de estocagem para temperatura de 4°C e para as demais temperaturas isto ocorreu após 60 dias de estocagem.

A Figura 38 mostra a estabilidade enzimática da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em baixas temperaturas imobilizada em suporte de gelatina-alginato. Houve decréscimo da atividade maior que 50% em todas as temperaturas a partir de 20 dias dia de estocagem.

A Figura 39 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em baixas temperaturas imobilizada e pressurizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. Houve decréscimo de atividade maior que 50% em todas as temperaturas após 20 dias de estocagem.

A Figura 40 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash em baixas temperaturas livre. A enzima manteve sua atividade em torno de 100%, embora que ocorreu oscilações durante o tempo de monitoramento para as temperaturas de -80°C e -18°C. Já para temperatura de 4°C houve decréscimo da atividade acima de 50% após dias de armazenamento.

A Figura 41 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash em baixas temperaturas, imobilizada em

suporte de gelatina-alginato. A enzima foi monitorada durante 100 dias, embora tenha havido algumas oscilações manteve atividade em torno de 100% para todas temperaturas.

A Figura 42 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP –L em baixas temperaturas, imobilizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. A enzima foi monitorada durante 100 dias período no qual sua estabilidade manteve-se em 100% durante o tempo de estocagem.

A Figura 43 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash em baixas temperaturas livre. A atividade enzimática manteve-se estável durante 100 dias de monitoramento para as temperaturas de -80°C e -18°C. Para a temperatura de 40°C houve decréscimo da atividade enzimática acima de 50% a partir de 70 dias de armazenamento.

A Figura 44 mostra a estabilidade enzimática da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizada. Houve incremento da atividade enzimática até 70 dias de monitoramento para as temperatura de -80°C e -18°C. Para a temperatura de 4°C houve decréscimo de atividade acima de 50% após 60 dias de armazenamento.

A Figura 45 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash em baixas temperaturas imobilizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. Houve incremento de atividade nas temperaturas de -80°C e -18°C até 50 dias de monitoramento. A partir de 80 dias dia até o final do monitoramento a atividade permaneceu em torno de 100%. Para a temperatura de 4°C, houve decréscimo de atividade acima de 50% após 90 dias de monitoramento.

A proteína nativa é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de van der Waals. Com o aumento da temperatura, essas interações são rompidas e a proteína se desdobra (ANFENSEN, 1973). Segundo Jaenicke (1999), algumas proteínas recuperam sua conformação ativa após o resfriamento, porém, para a maioria, a desnaturação é irreversível. O que pode explicar a longa estabilidade das enzimas armazenadas a baixas temperaturas, principalmente a Pectinex® Mash, que deve recuperar a sua conformação ativa.

6.2.2 Estabilidade enzimática a altas temperaturas

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade enzimática das enzimas PME e PMGL dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Mash em função do tempo e temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C são apresentados nas Figuras 46 a 59 (Apêndices XXVII a XL) nas 3 formas estudadas (livre, imobilizada e imobilizada com tratamento utilizando GLP).

A Figura 46 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em altas temperaturas livre. Houve decréscimo da atividade enzimática maior que 50% a partir do vigésimo quinto dia de armazenamento.

A Figura 47 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em altas temperaturas (25°C, 30°C e 40°C) imobilizada em suporte de gelatina-alginato. Houve decréscimo da atividade enzimática maior que 50% depois de 20 dias de armazenamento.

A Figura 48 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em altas temperaturas (50°C e 60°C) imobilizada em suporte de gelatina-alginato. Houve decréscimo da atividade enzimática maior que 50% após 10 horas de estocagem.

A Figura 49 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em altas temperaturas (25°C, 30°C e 40°C) imobilizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. A atividade enzimática manteve-se estável em 50% para temperatura de 25°C depois de 50 dias de armazenamento. Para as temperaturas de 30°C e 40°C a perda de atividade acima de 50% ocorreu após 10 dias de armazenamento.

A Figura 50 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em altas temperaturas (50°C e 60°C) imobilizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. Houve decréscimo da atividade enzimática acima 50% após 10 horas de estocagem para ambas as temperaturas.

A Figura 51 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em altas temperaturas livre. Houve decréscimo da atividade enzimática abaixo 50% após 25 dias de estocagem para ambas as temperaturas.

A Figura 52 mostra a estabilidade enzimática da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em altas temperaturas imobilizada em suporte de gelatina-alginato. Houve decréscimo da

atividade enzimática abaixo de 50% nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C e 60°C após 15 dias de estocagem. A atividade enzimática na de temperatura de 25°C permaneceu em 50% até 20 dias de estocagem.

A Figura 53 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L em altas temperaturas imobilizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. Houve decréscimo da atividade enzimática acima de 50% em todas as temperaturas após 20 dias de estocagem.

A Figura 54 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash em altas temperaturas livre. Houve decréscimo da atividade enzimática maior que 50% depois de 40 dias de armazenamento.

A Figura 55 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash em altas temperaturas imobilizada em suporte de gelatina-alginato. A atividade enzimática para as temperaturas de 25°C e 30°C mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento. Para a temperatura de 40°C ocorreu perda de atividade maior que 50% após 40 dias de armazenamento, enquanto que para as temperaturas de 50°C e 60°C a perda de atividade enzimática ocorreu apenas em 5 dias de armazenamento.

A Figura 56 mostra a estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash em altas temperaturas imobilizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. Embora tenha havido oscilação da atividade enzimática para as temperaturas de 25°C e 30°C sua atividade estável foi mantida acima de 60% durante o período de armazenamento. Para a temperatura de 40°C ocorreu perda de atividade maior que 50% após 70 dias de armazenamento, enquanto que para as temperaturas de 50°C e 60°C a perda de atividade enzimática ocorreu apenas em 10 dias de armazenamento.

A Figura 57 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash em altas temperaturas livre. Houve um decréscimo da atividade enzimática maior que 50% depois de 30 dias de armazenamento.

A Figura 58 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash em altas temperaturas imobilizada em suporte de gelatina-alginato. A atividade enzimática para a temperatura de 30°C permaneceu acima de 50% até 60 dias de estocagem. Nas temperaturas de 25°C e 40°C houve decréscimo da atividade enzimática maior que 50% após 30 dias de estocagem. Nas temperaturas de 50°C e

60°C houve decréscimo da atividade acima de 50% após 10 dias de estocagem.

A Figura 59 mostra a estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash em altas temperaturas imobilizada em suporte de gelatina-alginato e pressurizada com GLP. A atividade enzimática para a temperatura de 25°C e permaneceu acima de 50% até 40 dias de estocagem. Nas temperaturas de 30°C, 40°C 50°C e 60°C houve decréscimo da atividade enzimática maior que 50% após 10 dias de estocagem.

Glinka e Liao (2011) realizaram um estudo de estabilidade térmica durante 5 e 10 minutos para enzima produzida por *Fusarium asiaticum*, nas temperaturas entre 25°C e 55°C sendo que a enzima permaneceu estável. Na temperatura de 65°C após 10 minutos a enzima foi inativada.

Dirix et al., (2005) relataram que, após o tratamento por 15 minutos a 50°C, 57% da atividade inicial é mantida, enquanto que apenas 3% da atividade permaneceu após 15 minutos a 55°C.

Vivar-Vera et al., (2007) avaliou a estabilidade enzimática de *Crataeys pubescens* encontrando resultados semelhantes para temperatura de 60°C onde a enzima perdeu mais de 50% da atividade residual relativa em 25 minutos.

6.2.3 Parâmetros cinéticos

A Tabela 17 apresenta os valores cinéticos encontrados para a enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash.

Pode-se observar que a energia de desativação/desnaturação enzimática da enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash mostrou um acréscimo quando comparada com a E_d da enzima livre. O resultado mais expressivo foi atribuído para a enzima imobilizada e tratada.

Os melhores resultados foram obtidos em baixas temperaturas (-80, -18 e 4 °C). O maior valor de D encontrado foi de 1212,11 (dias) para a enzima livre, seguido de 742,90 (dias) para a enzima imobilizada. Vale ressaltar que a enzima imobilizada pode ser utilizada em vários ciclos de utilização, sendo mais eficiente que a enzima em sua forma livre.

Tabela 17 - Parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash.

PMGL - Pectinex® Mash Livre				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (½) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0019	231,84	1212,11	3,66
-18	0,0032	137,65	719,68	
4	0,0078	56,47	295,25	
25	0,0282	15,62	81,67	
30	0,0260	16,94	88,57	
40	0,0260	16,94	88,57	
50	0,0384	11,47	59,97	
60	0,0384	11,47	59,97	

PMGL - Pectinex® Mash Imobilizada				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (½) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0031	169,45	742,90	4,37
-18	0,0057	92,16	404,03	
4	0,0050	105,06	460,6	
25	0,0232	22,64	99,26	
30	0,0097	54,15	237,42	
40	0,0332	15,82	69,36	
50	0,0964	5,44	23,89	
60	0,1131	4,64	20,36	

PMGL - Pectinex® Mash Imobilizada e Tratada				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (½) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0136	40,13	169,34	4,54
-18	0,0035	155,94	658,00	
4	0,0117	46,64	196,84	
25	0,0145	37,64	158,82	
30	0,0925	5,90	24,89	
40	0,1130	4,83	20,38	
50	0,1130	4,83	20,38	
60	0,0635	8,59	36,26	

A Tabela 18 mostra os valores dos parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PME do complexo Pectinex® Mash. É possível observar que a enzima PME do complexo Pectinex® Mash mostrou valores mais elevados para a energia de desativação (E_d),

quando comparado com a enzima PMGL do mesmo complexo enzimático.

Tabela 18 - Parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PME do complexo Pectinex® Mash.

PME - Pectinex® Mash Livre				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (½) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0009	807,56	2558,89	6,04
-18	0,0016	454,25	1439,37	
4	0,0025	290,72	921,20	
25	0,0029	250,62	794,14	
30	0,0407	17,86	56,58	
40	0,0203	35,81	113,44	
50	-	-	-	
60	-	-	-	
PME - Pectinex® Mash Imobilizada				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (½) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0028	362,07	822,5	9,18
-18	0,0006	1689,67	3838,33	
4	0,0022	460,82	1046,82	
25	0,0020	506,9	1151,50	
30	0,0028	362,07	822,5	
40	0,0192	52,81	119,94	
50	-	-	-	
60	-	-	-	
PME - Pectinex® Mash Imobilizada e Tratada				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (½) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0026	490,92	885,77	10,62
-18	0,0014	911,72	1645,00	
4	0,0017	750,83	1654,71	
25	0,0032	398,88	719,68	
30	0,0062	205,87	371,45	
40	0,0075	170,19	307,06	
50	-	-	-	
60	-	-	-	

Para esta enzima, as temperaturas de 50 e 60 °C provocaram uma desnaturação proteica muito rápida, sendo avaliada a sua estabilidade em minutos, como apresentado nos apêndices.

A Tabela 19 mostra os valores dos parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L.

Tabela 19 - Parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L.

PMGL - Pectinex® Ultra SP-L Livre				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (1/2) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0114	27,08	202,01	2,57
-18	0,0127	24,31	181,34	
4	0,0210	14,70	109,67	
25	0,0585	5,27	39,37	
30	0,0585	5,27	39,37	
40	0,0496	6,22	46,43	
50	0,0842	3,67	27,35	
60	0,0830	3,71	27,74	
PMGL - Pectinex® Ultra SP-L Imobilizada				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (1/2) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0428	3,31	53,81	1,18
-18	0,0785	1,81	29,33	
4	0,0625	2,26	36,85	
25	0,0404	3,51	57,00	
30	0,0625	2,26	36,84	
40	0,0785	1,80	29,34	
50	0,0990	1,43	23,26	
60	0,1280	1,10	17,99	
PMGL - Pectinex® Ultra SP-L Imobilizada e Tratada				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (1/2) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0436	5,27	52,82	1,91
-18	0,0575	3,99	40,05	
4	0,0785	2,92	29,34	
25	0,0425	5,40	54,19	
30	0,0447	5,14	51,52	
40	0,0458	5,01	50,28	
50	0,0442	5,19	52,10	
60	0,1047	2,19	21,99	

De acordo com a Tabela 19, pode-se observar que a enzima PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L apresentou o menor valor para a constante de desativação (E_d) e os menores valores de t ($1/2$). Apesar de possuir uma certa fragilidade, a enzima possui potencial de aplicação para clarificação de sucos.

A Tabela 20 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PME do complexo Pectinex® Ultra SP-L. Para as temperaturas de 50 e 60 °C, a enzima apresentou atividade apenas em sua forma livre. Contudo, o tempo de meia-vida (t $1/2$) foi de aproximadamente 1 dia. Quando a mesma enzima foi armazenada em baixas temperaturas (-80 °C), mostrou valores de tempo de meia-vida de 267,94 dias para a sua forma imobilizada e tratada, e de apenas 2,82 dias para a forma livre.

Aghajanzadeh et al. (2016), encontraram um valor-D de 152,5 min a 60 °C, para PME utilizada em tratamento térmico de suco de laranja azedo.

Tabela 20 - Parâmetros cinéticos encontrados para a enzima PME do complexo Pectinex® Ultra SP-L.

PME - Pectinex® Ultra SP-L Livre				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t ($1/2$) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0419	2,82	54,96	0,98
-18	0,0244	4,84	94,38	
4	0,0385	3,07	59,82	
25	0,0585	2,02	39,37	
30	0,0585	2,02	39,37	
40	0,0496	2,38	46,43	
50	0,0842	1,40	27,35	
60	0,0830	1,42	27,74	
PME - Pectinex® Ultra SP-L Imobilizada				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t ($1/2$) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0048	129,62	479,79	5,17
-18	0,0058	107,28	397,07	
4	0,0256	24,30	89,96	
25	0,0333	18,68	69,16	
30	0,0407	15,29	56,58	
40	0,1102	5,65	20,89	
50	-	-	-	
60	-	-	-	

PME - Pectinex® Ultra SP-L Imobilizada e Tratada				
Temperatura (°C)	K_d (dias⁻¹)	t (½) (dias)	Valor D (dias)	Ed (KJ/mol)
-80	0,0030	267,94	767,67	6,68
-18	0,0031	259,29	742,90	
4	0,0060	133,97	383,83	
25	0,0113	71,13	203,81	
30	0,0822	9,78	28,02	
40	0,1027	7,82	22,42	
50	-	-	-	
60	-	-	-	

6.3 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados podemos concluir que a atividade enzimática varia de forma significativa dependendo da enzima, forma como ela foi avaliada e da temperatura de armazenamento.

De modo geral, as enzimas do complexo Pectinex® Mash mostraram-se estáveis em todas as temperaturas estudadas, enquanto que as enzimas do complexo Pectinex® Ultra SP-L não mostraram resposta em algumas temperaturas altas. Este comportamento pode ser devido a rápida desnaturação da proteína que estrutura a enzima.

Observou-se um aumento da estabilidade para as enzimas tratadas com fluido pressurizado (GLP), mostrando influencia do gás sobre a estabilidade e atividade enzimática.

É possível observar que a enzima PME do complexo Pectinex® Mash mostrou valores mais elevados para a energia de desativação (E_d), seguido da enzima PMGL do mesmo complexo.

REFERÊNCIAS

AGHAJANZADEH, S.; ZIAIFAR, A. M.; KASHANINEJAD, M.; MAGHSOUDLOU, Y.; ESMAILZADEH, E. **Thermal inactivation kinetic of pectin methylesterase and cloud stability in sour orange juice.** Journal of Food Engineering, v. 185, p 72-77, 2016.

DIRIX, C.; DUVETTER, T.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX M.; HEREMANS, K. **The insitu observation of the temperature and pressure stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase with Fourier transform IR spectroscopy reveals an unusual pressure stability of B-helices.** Biochem. J. V. 392. P 565-571, 2005.

GLINKA, E.M.; LIAO, Y.C. **Purification and partial characterization of pectin methylesterase produced by *Fusarium asiaticum*.** Fungal Biol. v. 115. P. 1112-1121, 2011.

VIVAR-VERA, M.A.; SALZANO-MONTOYA, J. A.; CALVA-CALVA, E.; RAMOS-RAMIREZ, G. **Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit.** Swiss Society of Food and Technology. V. 40. p. 278-284, 2005.

CAPÍTULO VII

APLICAÇÃO DE PECTINASES NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS

Objetivos

Avaliar a potencialidade de aplicação das pectinases comerciais imobilizadas e submetidas ou não ao tratamento com fluido pressurizado (GLP) na clarificação de suco de pêsego.

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1 Potencial de aplicação das pectinases em suco de pêsego

Para avaliar a potencialidade das pectinases comerciais Pectinex® Ultra SP-L e Mash na clarificação de sucos de frutas, foi utilizado polpa natural de pêsego (Mais Fruta®) obtida no comércio local. A diluição da polpa foi realizada na proporção de 100g de polpa em 200 mL de água.

No tratamento de clarificação de suco empregaram-se enzimas imobilizadas e/ou enzimas imobilizadas e tratadas com fluido pressurizado (GLP), primeiramente nas concentrações de 0,01%, 0,005%, 0,0025%. (v/v) à temperatura de 50°C (temperatura ótima de reação destas enzimas) durante 60 minutos, sob agitação constante de 100 rpm. Alcançado o tempo de tratamento realizou-se o processo de inativação da enzima em banho-maria com temperatura de 95 °C durante 5 min. sendo resfriadas a seguir em banho de gelo, a fim de interromper a reação. Após, o tratamento enzimático as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e filtradas em papel filtro (Whatman n°1) para as determinações analíticas (SIN et al., 2006). Para o controle de reação (reação em branco), o extrato enzimático foi substituído por água destilada.

Posteriormente, mais duas concentrações foram testadas (0,00125% e 0,000625%) para os índices de clarificação e turbidez, a fim de comprovar a eficácia de cada enzima nas baixas concentrações das mesmas.

7.1.2 Avaliação das características físico-químicas do suco de pêssego

No suco com tratamento e sem tratamento enzimático (controle) foram avaliadas as seguintes características físico-químicas: pH. Acidez, sólidos totais, e sólidos solúveis totais (°Brix), em refratômetro Abbe conforme metodologias descritas por IAL (2005); viscosidade em viscosímetro “Falling Ball” (VALLE e VASCONCELLOS, 1997).

A clarificação do suco de pêssego foi determinada com base na intensidade de cor (IC), as leituras das absorvâncias foram realizadas nos comprimentos de onda 440 nm e 520 nm, com percurso óptico de 1 mm, contra água, em espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU640), sendo a primeira correspondente à cor amarela, resultante da oxidação dos polifenóis, e a segunda à cor vermelha resultante dos pigmentos antocianínicos da fruta (TANNER e BRUNNER, 1985). A intensidade de cor (IC) foi expressa com base na soma das absorvâncias das 440 nm e 520 nm de acordo com a Equação 15.

$$IC = A_{440} + A_{520} \quad (15)$$

A clarificação foi expressa em % de clarificação, calculada com base na intensidade de cor do suco controle e do suco tratado, de acordo com a Equação 16.

$$\text{Clarificação (\%)} = \frac{IC \text{ do suco controle} - IC \text{ do suco tratado} \times 100}{IC \text{ do suco controle}} \quad (16)$$

A redução da turbidez no suco foi calculada com base na absorvância, medida no comprimento de onda de 540 nm, com percurso óptico de 1 mm, contra água, em espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU640) conforme metodologia descrita por Chatterjee et al. (2004). A redução da turbidez foi expressa em % de redução de turbidez, calculada com base na absorvância (Abs) do suco controle e do suco tratado, de acordo com a Equação 17.

$$\text{Redução Turbidez(\%)} = \frac{Abs \text{ do suco controle} - Abs \text{ do suco tratado} \times 100}{Abs \text{ do suco controle}} \quad (17)$$

7.1.3 Reutilização do extrato pectilonolítico imobilizado e tratado com GLP na clarificação de suco de pêsego

Para avaliar o número de ciclos foi utilizado o índice de clarificação e a turbidez conforme descrito no item 7.4.1 e a metodologia utilizada foi descrita no item 7.4.2.

7.1.5 Tratamento estatístico

Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguido de comparação das médias pelo teste de Tukey, com o software *Statistica* versão 8.0, com nível de confiança de 95%.

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.2.1 Avaliação do potencial de aplicação das pectinases na clarificação de suco de pêsego

Os resultados obtidos para clarificação, redução de turbidez, sólidos totais, pH, Brix, acidez e viscosidade para as diferentes concentrações das enzimas dos complexos enzimáticos comerciais Pectinex[®] Ultra SP-L e Pectinex[®] Mash são apresentados nas tabelas 21 a 27.

Tabela 21 – Resultados obtidos para clarificação de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash em diferentes concentrações.

Clarificação (%)						
Concentração	Ultra SP-L Imobilizada	Ultra SP-L PME ¹	Ultra SP-L PMGL ²	Mash Imobilizada	Mash PME ³	Mash PMGL ⁴
0,01%	86,3 ^{aA} ± 1,15	88,3 ^{aA} ± 0,57	88,0 ^{aA} ± 0,00	86,3 ^{aB} ± 1,15	86,6 ^{aB} ± 0,57	89,3 ^{aA} ± 0,57
0,005%	82,6 ^{bA} ± 1,52	86,6 ^{bA} ± 0,57	86 ^{bA} ± 0,57	82,6 ^{bA} ± 1,52	84,3 ^{bA} ± 1,52	83,3 ^{bA} ± 2,51
0,0025%	76,3 ^{cA} ± 0,57	80,0 ^{bA} ± 1,00	78,3 ^{bA} ± 1,15	76,3 ^{cB} ± 0,57	79,6 ^{bA} ± 1,15	77,3 ^{cB} ± 1,00
0,00125%	37,3 ^{dB} ± 0,57	48,0 ^{aA} ± 1,00	50 ^{cA} ± 1,00	37,3 ^{dB} ± 0,57	47,0 ^{cA} ± 0,00	48,3 ^{dA} ± 1,15
0,000625%	5,6 ^{cC} ± 0,57	7,6 ^{dB} ± 0,57	11,6 ^{dA} ± 0,57	5,6 ^{cB} ± 0,57	9,3 ^{dA} ± 0,57	10,3 ^{eA} ± 0,57

(1) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (2) Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹. (3) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (4) Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.

NOTA: médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras minúsculas entre colunas e maiúsculas entre linhas.

Conforme a Tabela 21, na concentração de 0,00125% pode-se observar que a enzima imobilizada diferiu significativamente das outras enzimas analisadas (tratadas com gás GLP). O mesmo aconteceu com a concentração de 0,000625%, o que indica que o gás GLP influenciou positivamente na clarificação, pois nessa concentração a enzima PME clarificou 26% a mais o suco em relação ao padrão (apenas imobilizada), e a enzima PMGL clarificou 52,6% a mais. Desse modo, é possível inferir que a enzima PMGL do complexo comercial Pectinex® Ultra SP-L mostrou melhores resultados. Em concentrações mais elevadas (em 0,01%; 0,005% e 0,0025%) esse efeito é mascarado pela quantidade excessiva de enzima no suco.

Resultados semelhantes foram obtidos para o complexo Pectinex® Mash, na concentração de enzima de 0,0025%, a enzima PME mostrou diferença em relação as enzimas PMGL e padrão (imobilizada). Na concentração de 0,00125%, a enzima PME clarificou 20,6% a mais em relação a enzima apenas imobilizada. Novamente a enzima PMGL mostrou-se mais eficaz, clarificando 22,8% a mais em relação ao padrão na concentração de 0,00125% e 45,6% a mais na concentração de 0,000625%.

Tabela 22 – Resultados obtidos para redução da turbidez de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L Pectinex® Mash em diferentes concentrações.

Concentração	Redução da turbidez (%)					
	Ultra SP-L Imobilizada	Ultra SP-L PME ¹	Ultra SP-L PMGL ²	Mash Imobilizada	Mash PME ³	Mash PMGL ⁴
0,01%	94,3 ^{3aA} ± 0,57	92,3 ^{3aA} ± 1,57	94,0 ^{3aA} ± 0,00	94,3 ^{3aA} ± 1,52	93,0 ^{3aA} ± 1,00	94,6 ^{3aA} ± 0,57
0,005%	92,0 ^{3aA} ± 1,00	91,0 ^{aA} ± 1,00	92 ^{3aA} ± 0,57	88 ^{3aA} ± 1,00	91,3 ^{3aA} ± 1,52	90,0 ^{3aA} ± 1,00
0,0025%	84,0 ^{3bB} ± 1,00	86,6 ^{3bA} ± 0,57	86,3 ^{3aA} ± 1,00	83,3 ^{3bB} ± 1,15	89,3 ^{3bA} ± 0,57	87,3 ^{3aA} ± 0,57
0,00125%	39,6 ^{3bB} ± 0,57	47,6 ^{3aA} ± 0,57	47,0 ^{3aA} ± 1,0	39,0 ^{3cC} ± 1,00	50,3 ^{3aA} ± 0,57	48,0 ^{3bB} ± 1,00
0,000625%	7,33 ^{3cC} ± 0,57	5,6 ^{3bB} ± 0,57	9,3 ^{3aA} ± 0,57	7,3 ^{3bB} ± 0,57	8,3 ^{3bB} ± 0,57	10,3 ^{3aA} ± 0,57

(1) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (2) Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹. (3) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (4) Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.

NOTA: médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras minúsculas entre colunas e maiúsculas entre linhas.

A Tabela 22 mostra os resultados obtidos para os complexos enzimático Pectinex[®] Ultra SP-L e Mash[®] para a redução da turbidez. A enzima imobilizada e as enzimas imobilizadas e tratadas com gás GLP mostraram diferentes resultados. A enzima que apresentou melhor performance foi a PMGL, principalmente na concentração de 0,000625%, sendo 39,8% mais eficaz que a enzima PME na mesma concentração.

Segundo Lee et al. (2006), há uma relação direta entre redução da turbidez com o aumento da clarificação. Vámos-Vigyázó (1981), Clemente e Pastore (1988) empregando enzima comercial Pectinex, demonstraram que a mesma apresentava atividade de celulases, melhorando o desempenho no processo de clarificação de suco de pêssego.

As enzimas do complexo Pectinex[®] Mash mostraram diferentes comportamentos em relação a concentração de enzima no suco. A enzima PME mostrou melhores resultados até a concentração de 0,00125% em relação as demais, decaindo o seu percentual de redução de turbidez na concentração de 0,000625%, onde a enzima PMGL foi mais eficaz.

Para os índices de clarificação e redução da turbidez, as concentrações de 0,00125% e 0,000625% foram testadas a fim de comprovar a eficácia das enzimas em baixas concentrações.

Tabela 23 – Resultados obtidos para sólidos solúveis totais de suco de péssago utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash em diferentes concentrações.

Concentração	Sólidos Solúveis Totais (%)					
	Ultra SP-L Imobilizada	Ultra SP-L PME ¹	Ultra SP-L PMGL ²	Mash Imobilizada	Mash PME ³	Mash PMGL ⁴
0,01%	2,8 ^{ba} ± 0,35	2,8b ^a ± 0,57	2,6 ^{ba} ± 0,23	3,1 ^{ba} ± 0,63	3,0b ^a ± 0,10	2,8b ^a ± 0,15
0,005%	3,0 ^{ba} ± 0,43	2,8 ^{ba} ± 0,57	2,6 ^{ba} ± 0,23	2,7 ^{bb} ± 0,57	2,9 ^{ba} ± 0,57	2,9 ^{bab} ± 0,10
0,0025%	3,0 ^{ba} ± 0,57	2,7 ^{bb} ± 0,15	2,5 ^{ba} ± 1,15	2,5 ^{ba} ± 0,20	2,4 ^{ca} ± 0,17	2,7 ^{bba} ± 0,40
Padrão	8,9 ^{aa} ± 0,04	8,9 ^{aa} ± 0,04	8,9 ^{aa} ± 0,04	8,9 ^{aa} ± 0,04	8,9 ^{aa} ± 0,04	8,9 ^{aa} ± 0,04

(1) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (2) Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹. (3) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (4) Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.

NOTA: médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras minúsculas entre colunas e maiúsculas entre linhas.

A Tabela 23 mostra os resultados para os sólidos solúveis totais, onde as enzimas dos diferentes complexos estudados não mostraram diferenças significativas nas diferentes concentrações de enzimas testadas. Em ambos os casos, houve uma diferença de aproximadamente 72% em relação ao padrão, o que indica que as enzimas foram eficazes na diminuição dos sólidos solúveis totais.

Tabela 24 – Resultados obtidos para viscosidade de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash em diferentes concentrações.

Concentração	Viscosidade (%)					
	Ultra SP-L Imobilizada	Ultra SP-L PME ¹	Ultra SP-L PMGL ²	Mash Imobilizada	Mash PME ³	Mash PMGL ⁴
0,01%	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00
0,005%	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00
0,0025%	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00	2,3 ^{BA} ± 0,00
Padrão	3,0 ^{BA} ± 0,01	3,0 ^{BA} ± 0,01	3,0 ^{BA} ± 0,01	3,0 ^{BA} ± 0,01	3,0 ^{BA} ± 0,01	3,0 ^{BA} ± 0,01

(1) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (2) Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹. (3) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (4) Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.

NOTA: médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras minúsculas entre colunas e maiúsculas entre linhas.

A Tabela 24 mostra os valores de viscosidade, onde as enzimas dos diferentes complexos estudados não mostraram diferenças significativas nas diferentes concentrações de enzimas testadas. Em ambos os casos, houve uma diferença de aproximadamente 23,3% em relação ao padrão, o que indica que as enzimas foram eficazes na diminuição da viscosidade.

As pectinas quando em solução aquosa, podem tornar o meio mais viscoso, mesmo quando em baixas concentrações, dependendo do seu grau de metoxilação (LOFGREN e HERMANSSON, 2007). O tratamento enzimático de degradação da pectina ocasionaria redução na capacidade de retenção de água, portanto, mais água livre é liberada para o sistema, reduzindo a viscosidade dos sucos (SANDRI, et. al.; 2011).

Santin et al.; (2008) avaliou a viscosidade de suco de pêssego com pectinase comercial Pectines APFL – 3 (Novozymes), nas condições de 45°C, durante 30 minutos e na concentração de enzima de 200 ppm, obtendo a redução da viscosidade de 29,7%. O resultado é considerado razoável tendo em vista que a enzima comercial Pectinex já contém certa quantidade de celulases, sendo provavelmente suficiente para melhorar a extração de suco e retenção de polpa, e a adição de mais celulase não afetaria o desempenho do processo (CLEMENTE e PASTORE, 1988; VÁMOS –VIGÁZÓ, 1981).

Tabela 25 – Resultados obtidos para o pH de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash em diferentes concentrações.

pH						
Concentração	Ultra SP-L Imobilizada	Ultra SP-L PME ¹	Ultra SP-L PMGL ²	Mash Imobilizada	Mash PME ³	Mash PMGL ⁴
0,01%	3,8 ^{aA} ± 0,00	3,8 ^{aA} ± 1,00	3,7 ^{aA} ± 0,57	3,8 ^{aA} ± 0,57	3,7 ^{aAB} ± 1,00	3,7 ^{aAB} ± 0,57
0,005%	3,6 ^{bA} ± 0,57	3,5 ^{cAB} ± 1,00	3,5 ^{BB} ± 0,1,	3,6 ^{bCB} ± 0,57	3,7 ^{aA} ± 0,57	3,7 ^{aAB} ± 1,00
0,0025%	3,6 ^{bA} ± 0,57	3,7 ^{bA} ± 1,00	3,7 ^{aA} ± 1,00	3,7 ^{abB} ± 0,57	3,7 ^{aA} ± 1,00	3,5 ^{aA} ± 1,00
Padrão	3,5 ^{bA} ± 0,46	3,5 ^{cA} ± 0,46	3,5 ^{bA} ± 0,46	3,5 ^{cA} ± 0,46	3,5 ^{bA} ± 0,46	3,5 ^{bA} ± 0,46

(1) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (2) Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹. (3) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (4) Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.

NOTA: médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras minúsculas entre colunas e maiúsculas entre linhas.

De acordo com a Tabelas 25, o valor de pH não diferiu significativamente entre os tratamentos testados. Pode-se observar que o processo de clarificação enzimática não alterou os valores de pH do suco de pêssigo.

A Tabela 26 apresenta os valores de °Brix do suco de pêssigo nos diferentes tratamentos utilizando as enzimas dos complexos Pectinex[®] Ultra SP-L e Pectinex[®] Mash. Os tratamentos não apresentaram diferença significativa.

Tabela 26 – Resultados obtidos para o °Brix de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash em diferentes concentrações.

°Brix						
Concentração	Ultra SP-L Imobilizada	Ultra SP-L PME ¹	Ultra SP-L PMGL ²	Mash Imobilizada	Mash PME ³	Mash PMGL ⁴
0,01%	2,9 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,57	2,9 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,57
0,005%	2,9 ^{abA} ± 0,57	2,9 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,0	2,9 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,00	2,9 ^{abA} ± 0,57
0,0025%	3,0 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,00	2,9 ^{abA} ± 0,57	3,0 ^{abA} ± 0,00	2,9 ^{abA} ± 0,57
Padrão	3,0 ^{abA} ± 0,01	3,0 ^{abA} ± 0,01	3,0 ^{abA} ± 0,01	3,0 ^{abA} ± 0,01	3,0 ^{abA} ± 0,01	3,0 ^{abA} ± 0,01

(1) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (2) Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹.(3) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (4) Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.

NOTA: médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras minúsculas entre colunas e maiúsculas entre linhas.

A Tabela 27 apresenta os valores de acidez do suco de pêssego nos diferentes tratamentos realizados utilizando os complexos comerciais estudados. Os tratamentos não apresentaram diferença significativa.

Tabela 27 – Resultados obtidos para a acidez de suco de pêssego utilizando as enzimas do complexo enzimático comercial Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash em diferentes concentrações.

Acidez						
Concentração	Ultra SP-L Imobilizada	Ultra SP-L PME ¹	Ultra SP-L PMGL ²	Mash Imobilizada	Mash PME ³	Mash PMGL ⁴
0,01%	2,1 ^{abA} ± 0,57	2,2 ^{aA} ± 0,57	2,2 ^{aA} ± 0,57	2,3 ^{aA} ± 0,00	2,3 ^{aA} ± 1,00	2,3 ^{aA} ± 0,00
0,005%	2,1 ^{abA} ± 0,57	2,2 ^{aA} ± 0,57	2,2 ^{aA} ± 0,57	2,0 ^{bA} ± 0,57	2,0 ^{bA} ± 0,57	2,0 ^{abA} ± 0,57
0,0025%	2,0 ^{bA} ± 0,57	2,0 ^{bA} ± 0,57	2,0 ^{bA} ± 0,57	2,0 ^{cA} ± 0,57	2,1 ^{bA} ± 0,00	2,1 ^{bA} ± 0,00
Padrão	2,2 ^{aA} ± 0,58	2,1 ^{aA} ± 0,58	2,1 ^{aA} ± 0,58	2,2 ^{cA} ± 0,58	2,2 ^{aA} ± 0,58	2,2 ^{bA} ± 0,58

(1) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (2) Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹. (3) Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; (4) Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.

NOTA: médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), sendo comparadas letras minúsculas entre colunas e maiúsculas entre linhas.

De acordo com as Tabelas 24 a 27, observa-se que as enzimas Pectinex® Mash e Pectinex® Ultra SP-L imobilizada e/ou imobilizada e tratada com gás GLP nas concentrações de 0,01% 0,005 0,0025% não influenciaram os valores de viscosidade, pH, °Brix e acidez, sendo os valores estão próximos aos obtidos com o suco *in natura*. Resultados semelhantes encontrados também para pH e °Brix em suco de umbu (USHIKUBO et al., 2007), tamarindo (WATANABE, 2007) e abacaxi (BARROS et al., 2003).

7.2.2 Avaliação da reutilização das pectinases comerciais (Pectinex® Mash e Ultra SP-L) imobilizadas em suporte de gelatina-alginato e após tratamento com GLP na clarificação de suco de pêssego

Os resultados dos perfis de atividade relativa (%) em relação aos ciclos de reutilização na clarificação e redução da turbidez de suco de pêssego, obtidos para as enzimas PMGL e PME das pectinases comerciais Pectinex® Mash e Ultra SP-L imobilizadas em suporte de gelatina-alginato, imobilizadas e tratadas com fluido pressurizado nas seguintes condições: Mash PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min.⁻¹; Mash PMGL Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min.⁻¹. Ultra SP - L PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min.⁻¹; Ultra SP - L PMGL Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min.⁻¹; são apresentados nas Figuras 28, 29, 30 e 31, respectivamente.

De acordo com as Figuras 26 e 27, observa-se que as enzimas Pectinex® Mash (PME e PMGL) imobilizadas e tratadas com gás GLP apresentaram atividade relativa até o 7º ciclo de utilização tanto para clarificação quanto para redução de turbidez, quando a atividade relativa atingiu 40%. No entanto, para a enzima imobilizada a atividade relativa se manteve até o 5º ciclo de utilização.

Figura 26 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial (Pectinex® Mash) imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização na clarificação de suco de pêsego nas condições de ensaio Mash PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; Mash PMGL Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.

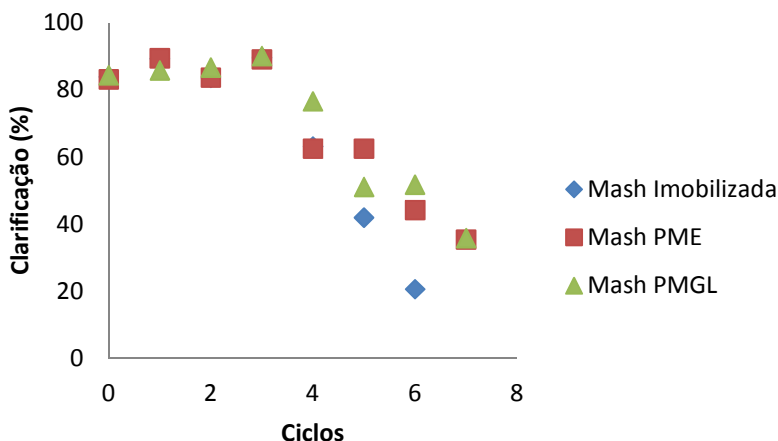
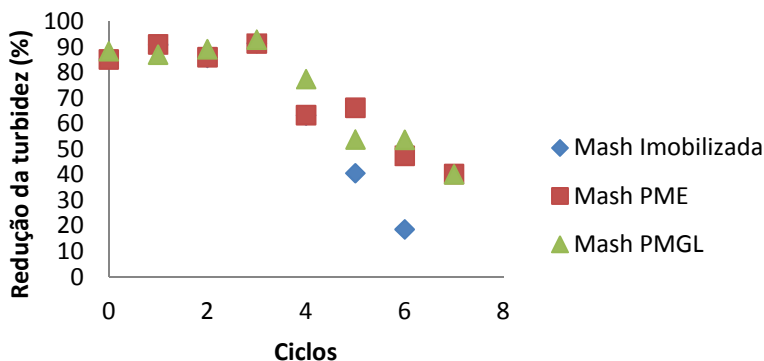


Figura 27 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial (Pectinex® Mash) imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização redução de turbidez de suco de pêsego nas condições de ensaio Mash PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; Mash PMGL Pressão = 190 bar; Tempo = 1 h; R= 20 bar.min⁻¹.



A maioria das bebidas de frutas processadas industrialmente são clarificadas durante a produção, a fim de evitar a turbidez indesejável e sedimentos no produto final. A turvação imediata de sucos de frutas recém processados é geralmente considerada como resultado de partículas suspensas de pectina decorrentes da parede celular das plantas e de outros materiais como celulose, hemicelulose, lignina e amido, além de proteínas e taninos (ABDULLAH et al., 2007; PINELO et al., 2010; KEMPKA et al., 2013).

Segundo Uenojo e Pastore (2007), a adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade proporcionando uma maior separação entre as fases sólidas e líquidas e aumentando o rendimento dos sucos ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50% o tempo de filtração assim possibilitando a oferta de um produto nobre.

De acordo com as Figuras 28 e 29, observa-se que as enzimas Pectinex® Ultra SP-L (PME e PMGL) imobilizadas e tratadas com gás GLP apresentaram atividade relativa até o 3º ciclo de utilização tanto para clarificação quanto para redução de turbidez, quando a atividade relativa atingiu 40%. Para a enzima imobilizada, a atividade relativa se manteve até o 2º ciclo de utilização.

Figura 28 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial (Pectinex® Ultra SP-L) imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização na clarificação de suco de pêsego nas condições de ensaio Ultra PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; Ultra SP -L PMGL Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹.

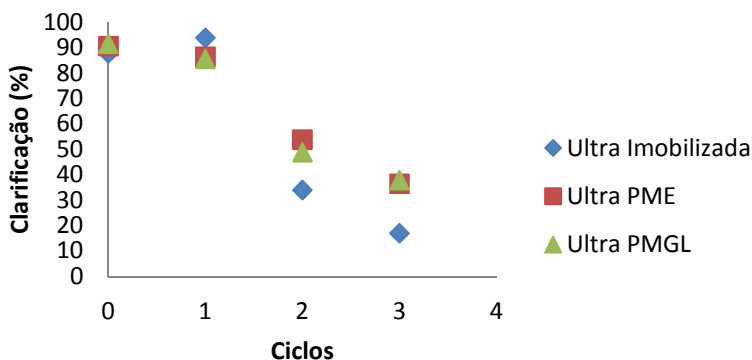
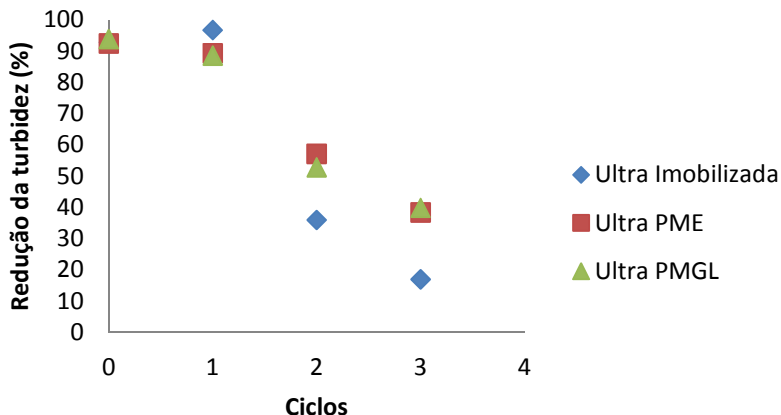


Figura 29 - Atividade relativa (%) das enzimas pectina liase (PMGL) e pectinametilesterase (PME) do complexo enzimático comercial (Pectinex® Ultra SP-L) imobilizado em suporte de gelatina-alginato após o tratamento com GLP e nos respectivos ciclos de reutilização redução de turbidez de suco de pêsego nas condições de ensaio Ultra SP -L PME Pressão = 110 bar; Tempo = 3,5 h; R= 60 bar.min⁻¹; Ultra SP -LPMGL Pressão = 30 bar; Tempo = 1 h; R= 100 bar.min⁻¹.



7.3 CONCLUSÕES

O gás GLP influenciou positivamente na clarificação de suco de pêsego, pois na concentração de 0,00125%, a enzima PME clarificou 26% a mais o suco em relação ao padrão (apenas imobilizada), e a enzima PMGL clarificou 52,6% a mais. Desse modo, é possível inferir que a enzima PMGL do complexo comercial Pectinex® Ultra SP-L mostrou melhores resultados. Em concentrações mais elevadas (em 0,01%; 0,005% e 0,0025%) esse efeito é mascarado pela quantidade excessiva de enzima no suco. Resultados semelhantes foram obtidos para o complexo Pectinex® Mash.

Para a redução da turbidez, a enzima imobilizada e as enzimas imobilizadas e tratadas com gás GLP mostraram diferentes resultados. A enzima que apresentou melhor performance foi a PMGL do complexo Pectinex® Mash, principalmente na concentração de 0,000625%, sendo 39,8% mais eficaz que a enzima PME na mesma concentração.

Para os sólidos solúveis totais, as enzimas dos diferentes complexos estudados não mostraram diferenças significativas nas

diferentes concentrações testadas. O mesmo aconteceu para os resultados de viscosidade, pH, °Brix e acidez, mostrando que as enzimas em estudo possuem potencial de clarificação e redução dos sólidos solúveis totais sem interferir nas qualidades sensoriais e organolépticas do suco de pêssego.

As enzimas (PME e PMGL) do complexo Pectinex® Mash imobilizadas e tratadas com gás GLP apresentaram atividade relativa até o 7º ciclo de utilização tanto para clarificação quanto para redução de turbidez, quando a atividade relativa atingiu 40%. Este resultado mostra o potencial de aplicação de enzimas imobilizadas e tratadas com gás GLP.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, A.G. L.; SULAIMAN, N.M.; AROUA, M.K.; MEGAT MOHD NOOR, M.J. **Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme.** Journal of Food Engineering, v. 81, p. 65–71, 2007.

BARROS, S. T. D.; ANDRADE, C. M. G.; MENDES, E. S.; PERES, L. **Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration.** Journal of Membrane Science. Amsterdam. v. 215. p. 213-224. 2003.

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B.P.; GUHA, A.K. **Clarification of fruit juice with chitosan.** Process Biochemistry, v.39, p.2229–2232, 2004.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G.M. **Peroxidase and Polyphenoloxidase the Importance for Food Technology.** Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 32. p. 167-171. 1988.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ª Ed., São Paulo, v1, 2005.

KEMPKA, A. P.; PRESTES, R. C.; ALVIERO, T. **Clarificação de suco de maçã de dois cultivares utilizando tratamento enzimático e colágeno hidrolisado.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.15, n.2, p.137-146, 2013.

LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID, N.S.A.; BAHARIN, B.S. **Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice response surface methodology (RSM).** Journal of Food Engineering. V. 73. P. 55-63. 2006.

LOFGREN, C. & HERMANSSON, A.M. Synergistic **rheological behavior of mixed HM/LM pectin gels.** Food Hydrocolloids, v. 21. p. 480-486. 2007.

PINELO, M.; ZEUNER, B.; MEYER, A. S. **Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity.** Food and Bioproducts Processing, v. 88, p. 259–265, 2010.

- SANDRI, I G.; FONTANA, R. C.; BARFKNECHET, D.M.; SILVEIRA, M.M. **Clarification of fruit juices by fungal pectinases**, *LWT Science and Technology*, v. 44, p.2217-2222, 2011
- SANTIN, M. M.; VALDUGA, E.; TREICHEL, E.; CABRAL, L.; LUCCIO, M. DI. **Evaluation of enzymatic treatment of peach juice using reponse surface methodology**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 88. p. 507-512. 2008.
- SIN, H.N.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; RAHMAM, R. **Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology**, *Journal of Food Engineering*, v. 6, p. 313-319, 2006.
- TANNER, H.; BRUNNER, H.R. **Getranke anlytic – untersuchungsmethode fur dia Labor- und Betriebspraxis**. Wadesnwill: Verlang Helles, 1985.
- UENOJO M.; PASTORE G.M.; **Pectinases: aplicação industriais e perspectivas**. *Química Nova*. v.30: n.2: 388-394, 2007.
- USHIKUBO, F. Y.; WATANABE, A. P.; VIOTTO, L. A. A **Microfiltration of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.)**. *Juice Journal of Membrane Science*. Amsterdam. v. 288, p. 61-66, 2007.
- VALLE, ANY B.F.; VASCONCELLOS, ANA M. **Cursos práticos em bioquímica. Departamento de bioquímica – Instituto de química**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.
- VÁMOS – VIGYÁZÓ, L. **Polyphenolperoxidase and peroxidase in fruits and vegetables**. *Central Food Research Institute*. v. 15. p. 49-127. 1981.
- WATANABE, A.P. **Microfiltração de suco de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) por membrana polimérica: efeito do tratamento enzimático, da velocidade tangencial e pressão transmembrana**. 95 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Engenharia de Alimentos de Campinas, Campinas, 2007.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

As enzimas apresentaram diferentes comportamentos utilizando-se o mesmo solvente pressurizado mesmo quando submetidas às mesmas condições experimentais. A consecução do presente trabalho permite, de maneira geral, concluir que:

- Os valores de pH e temperatura ótima de atuação da enzima, para as enzimas dos dois complexos enzimáticos estudados (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash) foram de 4,5 e 55°C, respectivamente.
- Os parâmetros de Michaelis-Menten, a velocidade máxima (V_{Max}) de reação e a constante de afinidade (K_M) foram obtidos. A enzima PMGL do complexo Pectinex® Mash mostrou maior afinidade com o substrato, e a enzima PME do complexo Pectinex® Ultra SP-L mostrou o maior valor de V_{Max} .
- A enzima PMGL do complexo enzimático comercial Pectinex® Mash apresentou o maior rendimento de imobilização (316,0%), seguida da enzima PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L (309,9%) em gelatina-alginato.
- A enzima PME do complexo Pectinex® Ultra SP-L teve a sua atividade reduzida durante a imobilização em poliuretano. Este comportamento pode estar relacionado com o aumento da temperatura na formação da espuma.
- A enzima Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte alginato-gelatina tratada com GLP mostrou um acréscimo de 19 % para a atividade de pectinametilsterase (PME).
- A enzima Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de poliuretano (PU) tratada com GLP mostrou um acréscimo de atividade de pectinametilsterase (PME) de 56%.
- A enzima pectinase liase (PMGL) do complexo Pectinex® Mash imobilizada em suporte alginato- gelatina tratada com GLP incrementou em 38 % a sua atividade.

- A enzima Pectinex® Mash imobilizadas em suporte Poliuretano houve um incremento de 3 % na atividade de pectinametilsterase (PME) e não houve aumento da atividade enzimática para a pectina liase (PMGL). Por esta razão, não foi utilizado este suporte para os trabalhos posteriores.
- Quanto ao reuso das pectinases comerciais imobilizadas em suporte gelatina-alginato e tratadas com gás GLP, a enzima pectina liase (PMGL) do complexo Pectinex® Mash mostrou o melhor resultado, mantendo a sua atividade por até 6 ciclos de utilização quando a atividade relativa atingiu 60%, enquanto o controle manteve a atividade por 5 ciclos e atingiu 47% de atividade relativa. A enzima pectinametilsterase (PME) manteve a sua atividade por 5 ciclos, onde apresentou 57% de atividade relativa e o seu controle manteve-se por 3 ciclos com 50% de atividade.
- Para o reuso do complexo Pectinex® Ultra SP-L, a enzima pectina liase (PMGL) mostrou o melhor resultado, assim como observado para o complexo Pectinex® Mash. A enzima manteve a sua atividade por 3 ciclos de utilização e atingiu 53% de atividade relativa, enquanto que o controle obteve 2 ciclos atingindo 64%. A enzima pectinametilsterase (PME) manteve a sua atividade por 2 ciclos apresentando 67% de atividade relativa e o seu controle 56% igualmente em 2 ciclos de utilização.
- De modo geral para a estabilidade térmica, as enzimas do complexo Pectinex® Mash mostraram-se estáveis em todas as temperaturas estudadas, enquanto que as enzimas do complexo Pectinex® Ultra SP-L não mostraram resposta em algumas temperaturas altas. O uso do gás GLP mostrou efeito positivo na estabilidade enzimática.
- Observou-se um aumento da estabilidade para as enzimas tratadas com fluido pressurizado (GLP), mostrando influencia do gás sobre a estabilidade e atividade enzimática.
- É possível observar que a enzima PME do complexo Pectinex® Mash mostrou valores mais elevados para a energia de desativação (E_d), seguido da enzima PMGL do mesmo complexo.

- O gás GLP influenciou positivamente na clarificação de suco de pêssego, pois na concentração de enzima de 0,00125%, a enzima PME clarificou 26% a mais o suco em relação ao padrão (apenas imobilizada), e a enzima PMGL clarificou 52,6% a mais. Desse modo, é possível inferir que a enzima PMGL do complexo comercial Pectinex® Ultra SP-L mostrou melhores resultados.
- A enzima que apresentou melhor performance foi a PMGL do complexo Pectinex® Mash, principalmente na concentração de 0,000625%, sendo 39,8% mais eficaz que a enzima PME na mesma concentração.
- Para os sólidos solúveis totais, as enzimas dos diferentes complexos estudados não mostraram diferenças significativas nas diferentes concentrações testadas. O mesmo aconteceu para os resultados de viscosidade, pH, °Brix e acidez, mostrando que as enzimas em estudo possuem potencial de clarificação e redução dos sólidos solúveis totais sem interferir nas qualidades sensoriais e organolépticas do suco de pêssego.
- As enzimas (PME e PMGL) do complexo Pectinex® Mash imobilizadas e tratadas com gás GLP apresentaram atividade relativa até o 7º ciclo de utilização tanto para clarificação quanto para redução de turbidez, quando a atividade relativa atingiu 40%.

Ao final do presente trabalho foi possível verificar que a literatura ainda apresenta uma grande lacuna em relação a utilização de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) pressurizado na avaliação da atividade enzimática. O estudo do tratamento das pectinases utilizando propano e/ou butano como fluido supercrítico contribuiria para avaliação do comportamento destas enzimas.

Tendo em vista que o suporte de poliuretano pode afetar a atividade enzimática em função da sua alta temperatura de reação para a formação da espuma, sugerimos a utilização da enzima comercial na forma liofilizada. Resultados prévios do grupo de pesquisa da URI mostraram-se promissores para as enzimas testadas.

A utilização de diferentes suportes de imobilização, bem como o estudo da clarificação de vinhos e outros sucos utilizando pectinases imobilizadas em gelatina-alginato, contribuiriam na complementação do presente estudo.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Tabela 29 – Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para a enzima PME da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L.

	Efeito	Erro Padrão	p
Média	44,06	7,14	8.10^{-4}
pH Linear (pH)*	24,37	7,57	0,02
pH Quadrática (pH ²)	-17,26	9,03	0,11
Temperatura Linear (T)*	-24,50	7,57	0,02
Temperatura Quadrática (T ²)*	- 34,75	9,03	0,01
pH x Temperatura (pH x T)	-12,10	10,69	0,40

* Efeitos significativos ($p < 0,05$)

APÊNDICE II

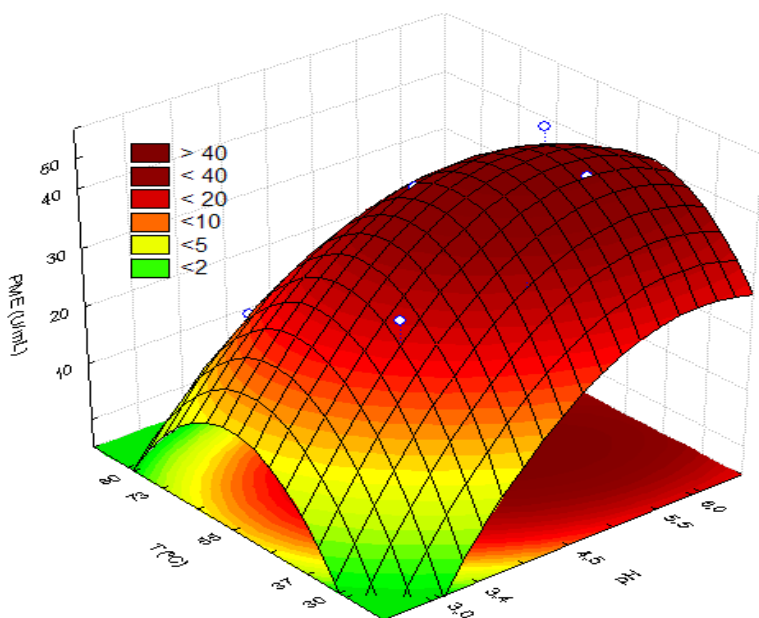
Tabela 30 – ANOVA para a atividade enzimática da enzima PME como resposta para o DCCR para o complexo Pectinex® Ultra SP-L.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	4298,39	5	859,68	7,52
Resíduo	571,65	5	114,3	
Falta de ajuste	570,20	3		
Erro Puro	1,477	2		
Total	4870,04	10		

Coefficiente de correlação: $R=0,94, F_{0,95; 5; 5} = 5,05$

APÊNDICE III

Figura 30 - Superfície de resposta do planejamento completo fatorial 2^2 em relação à atividade enzimática de PME da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L em função do pH e da temperatura.



APÊNDICE IV

Tabela 31 - Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para o complexo Pectinex® Ultra SP-L a termos de medida de atividade de PMGL.

	Efeito	Erro Padrão	P
Média	18,93	1,17	0,000016
pH Linear (pH)	4,26	1,44	0,031263
pH Quadrática (pH ²)	0,45	1,71	0,801049
Temperatura Linear (T)	6,49	1,43	0,006289
Temperatura Quadrática (T ²)	- 8,30	1,71	0,004690
pH x Temperatura (pH x T)	-4,39	2,03	0,082622

APÊNDICE V

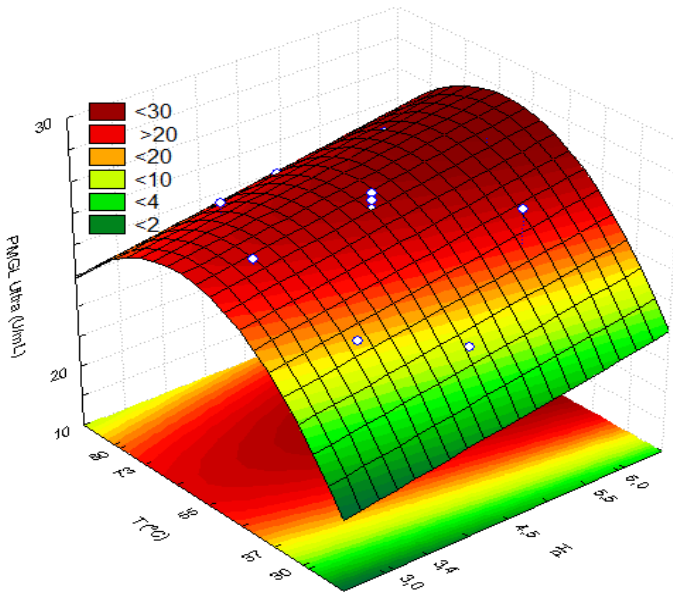
Tabela 32 - ANOVA para a atividade enzimática para a enzima PMGL como resposta para o DCCR do complexo Pectinex® Ultra SP-L.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	228,98	3	76,32	13,3
Resíduo	40,11	7	5,73	
Falta de ajuste	37,18	5		
Erro puro	2,92	2		
Total	269,09	10		

Coefficiente de correlação: $R=0,96$, $F_{0,95; 3;7} = 4,34$

APÊNDICE VI

Figura 31 - Superfície de resposta do planejamento completo fatorial 2^2 em relação à atividade enzimática de PMGL da pectinase comercial Pectinex® Ultra SP-L em função do pH e da temperatura.



APÊNICE VII

Tabela 33 – Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para a enzima PME do complexo Pectinex® Mash.

	Efeito	Erro Padrão	P
Média	37,77	4,76	5.10^{-3}
pH Linear (pH)*	15,00	4,76	0,05
pH Quadrática (pH ²)	-16,34	6,97	0,06
Temperatura Linear (T)*	-23,08	5,84	0,01
Temperatura Quadrática (T ²)*	- 20,92	6,97	0,03
pH x Temperatura (pH x T)	-9,2	8,24	0,31

APÊNDICE VIII

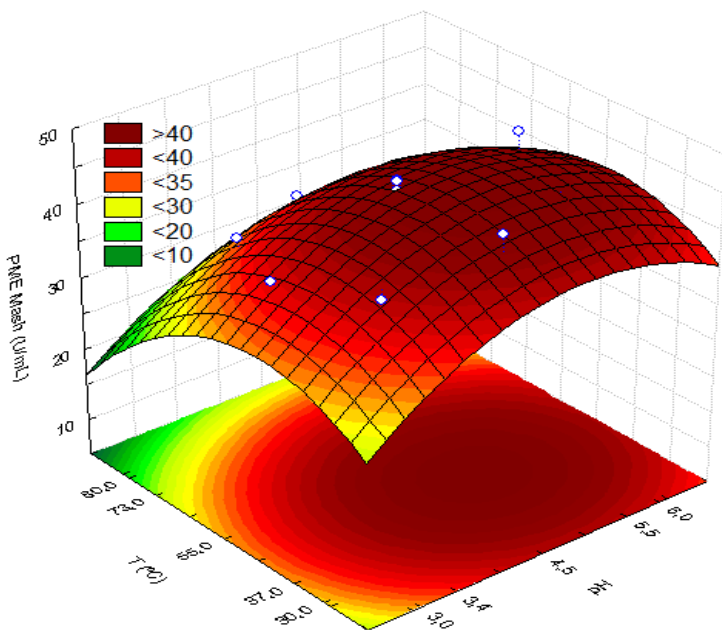
Tabela 34 – ANOVA para a atividade enzimática da enzima PME como resposta para o DCCR para o complexo Pectinex® Mash.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	228,517	4	571	8,07
Resíduo	424,4	6	70,74	
Falta de ajuste	407,62	4		
Erro Puro	16,84	2		
Total	2709,64	10		

Coefficiente de correlação: $R=0,93, F_{0,95; 4;6} = 4,53$

APÊNDICE IX

Figura 32 - Superfície de resposta do planejamento completo fatorial 2^2 em relação à atividade enzimática de PME da pectinase comercial Pectinex® Mash em função do pH e da temperatura.



APÊNDICE X

Tabela 35 – Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para a enzima Pectinex® Mash a termos de medida de atividade de PMGL.

	Efeito	Erro Padrão	P
Média	46,19	3,96	0,000081
pH Linear (pH)	8,20	4,86	0,152342
pH Quadrática (pH ²)	-12,15	5,80	0,090211
Temperatura Linear (T)	8,69	4,86	0,133577
Temperatura Quadrática (T ²)	- 28,29	5,80	0,004551
pH x Temperatura (pH x T)	-5,78	6,86	0,437908

APÊNDICE XI

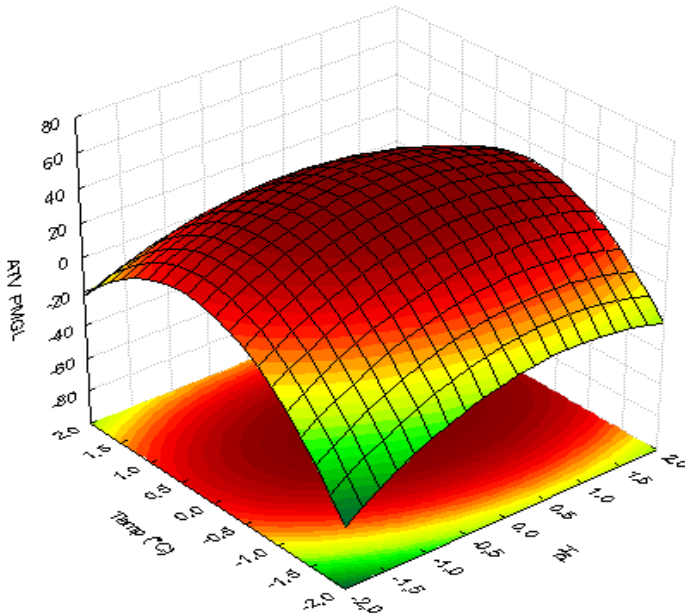
Tabela 36 - ANOVA para a atividade enzimática da enzima PMGL como resposta para o DCCR para o complexo Pectinex® Mash.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	1104,44	1	1104,44	12,9
Resíduo	767,8	9		
Falta de ajuste	644,11	7	85,3	
Erro puro	123,70	2		
Total	1872,28	10		

Coefficiente de correlação: $R=0,77$, $F_{0,95; 1; 9} = 5,11$

APÊNDICE XII

Figura 33- Superfície de resposta do planejamento completo fatorial 2^2 em relação à atividade enzimática de PMGL da pectinase comercial Pectinex® Mash em função do pH e da temperatura.



APÊNDICE XIII

Tabela 37 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de pressão e temperatura do planejamento fatorial completo 2^3 para atividade de PMGL do complexo Pectinex® Ultra SP-L.

	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	P
Média	99,98	0,014	0
(1)Pressão (L)*	-7,95	0,016	0,000004
(2)Tempo (L)*	-1,41	0,016	0,000141
(3)R (L)*	1,52	0,016	0,000122
1L.2L*	1,56	0,016	0,000116
1L.3L*	0,37	0,016	0,002024
2L.3L*	-1,14	0,016	0,000217

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

APÊNDICE XIV

Tabela 38 - Análise de variância – ANOVA do planejamento fatorial 2^3 para a atividade residual da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L após tratamento com GLP.

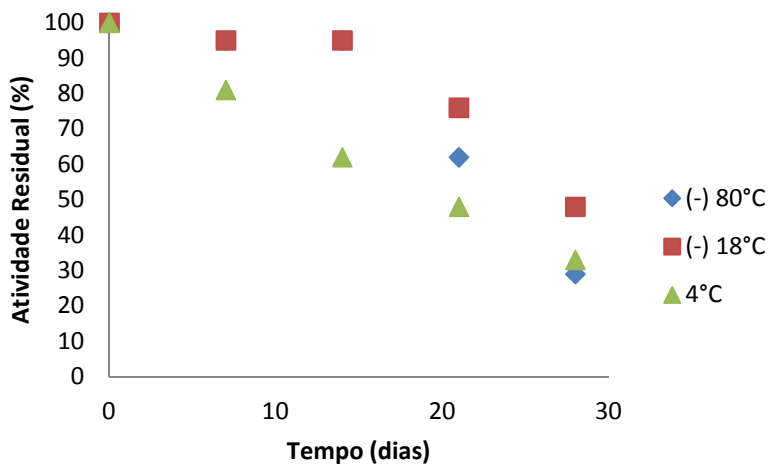
Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	571,97	6	95,33	6,95
Resíduo	54,81	4	13,70	
Falta de Ajuste	54,81	2		
Erro Puro	0,0045	2		
Total	626,80	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação $R=0,95$

$F_{\text{tab},95\%}=6,16$

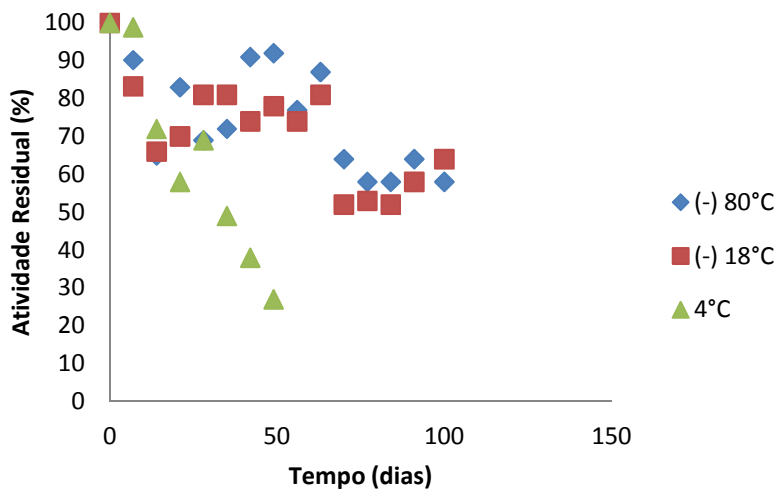
APÊNDICE XV

Figura 34 - Estabilidade da enzima PME livre do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.



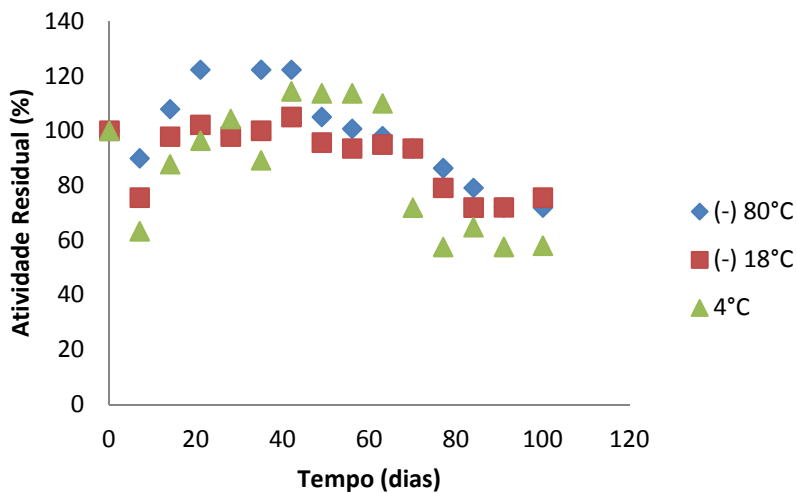
APÊNDICE XVI

Figura 35 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de -80°C , -18°C e 4°C .



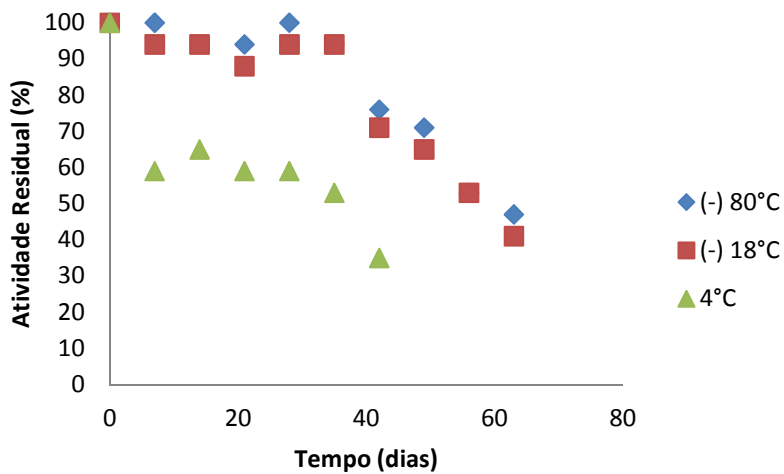
APÊNDICE XVII

Figura 36 - Estabilidade da enzima PME imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.



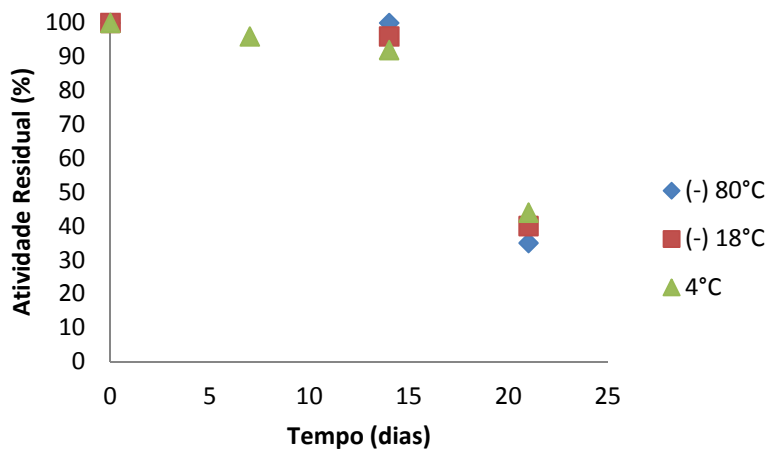
APÊNDICE XVIII

Figura 37 - Estabilidade da enzima PMGL livre do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.



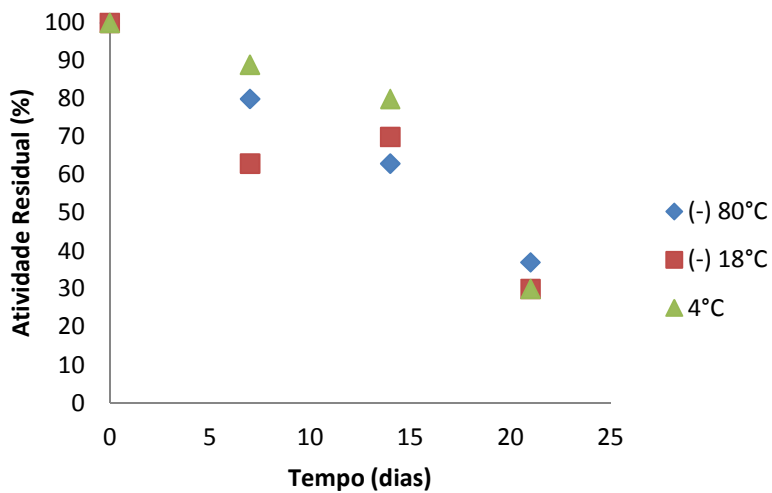
APÊNDICE XIX

Figura 38 - Estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP –L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.



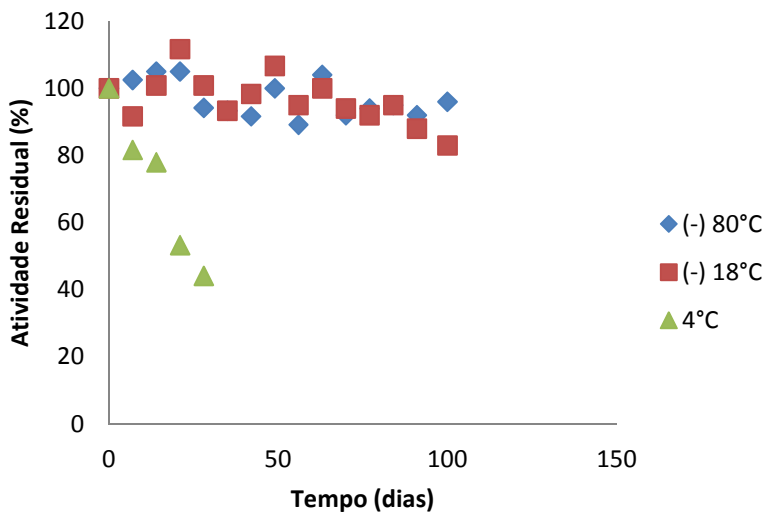
APÊNDICE XX

Figura 39 - Estabilidade da enzima PMGL imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP –L nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.



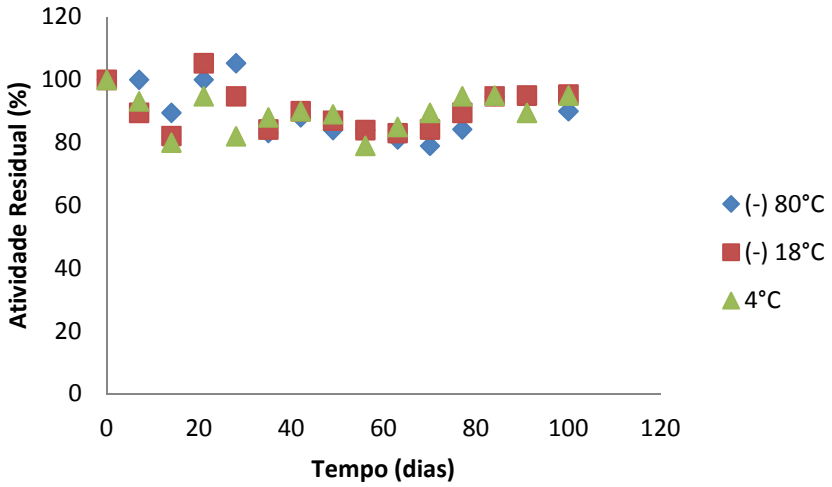
APÊNDICE XXI

Figura 40 - Estabilidade da enzima PME livre do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 80°C, -18°C e 4°C.



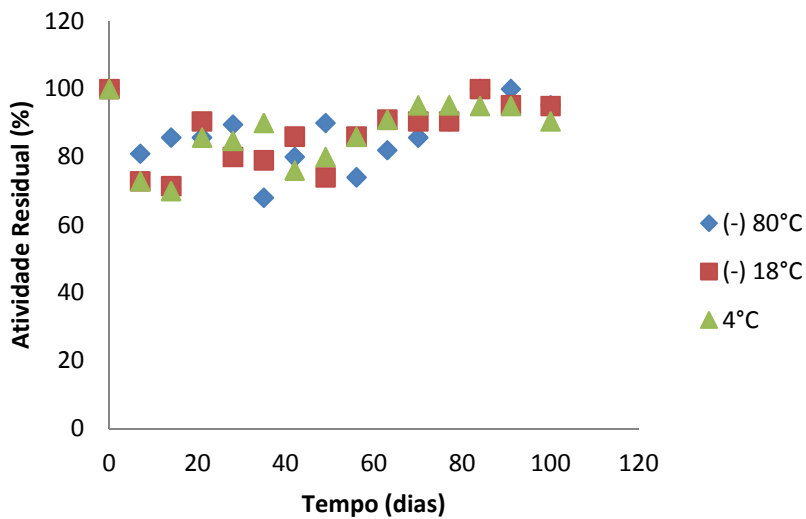
APÊNDICE XXII

Figura 41 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de -80°C , -18°C e 4°C .



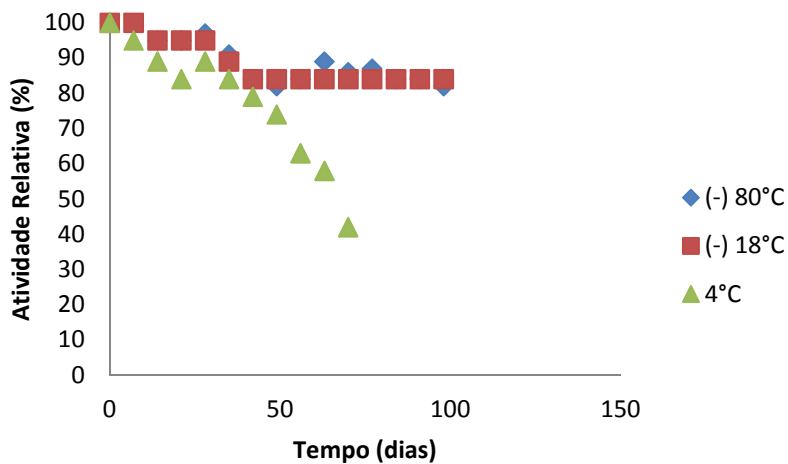
APÊNDICE XXIII

Figura 42 - Estabilidade da enzima PME immobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de -80°C, -18°C e 4°C.



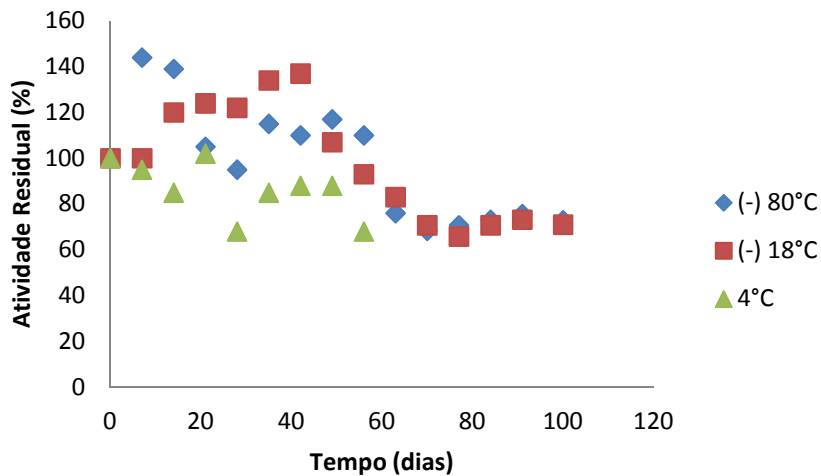
APÊNDICE XXIV

Figura 43 - Estabilidade da enzima PMGL livre do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperatura de 80°C, -18°C e 4°C.



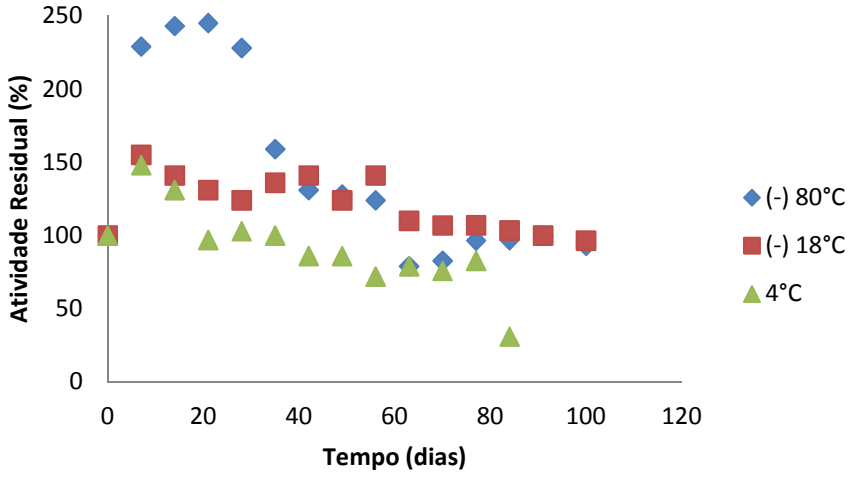
APÊNDICE XXV

Figura 44 - Estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash immobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 80°C, -18°C e 4°C.



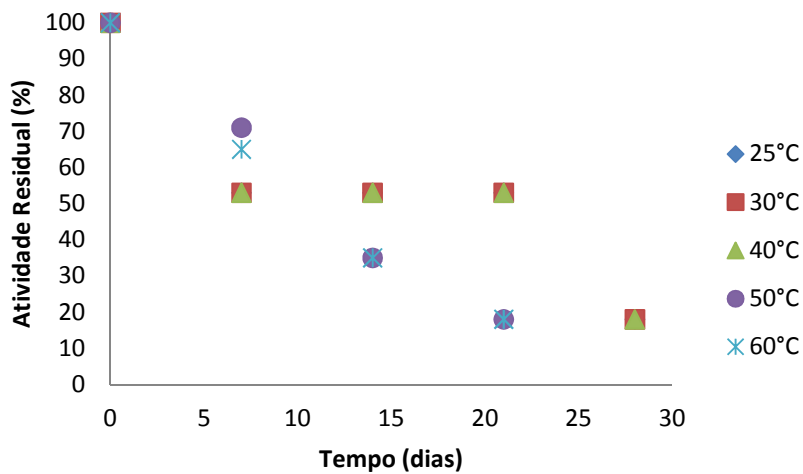
APÊNDICE XXVI

Figura 45 - Estabilidade da enzima PMGL imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 80°C, -18°C e 4°C.



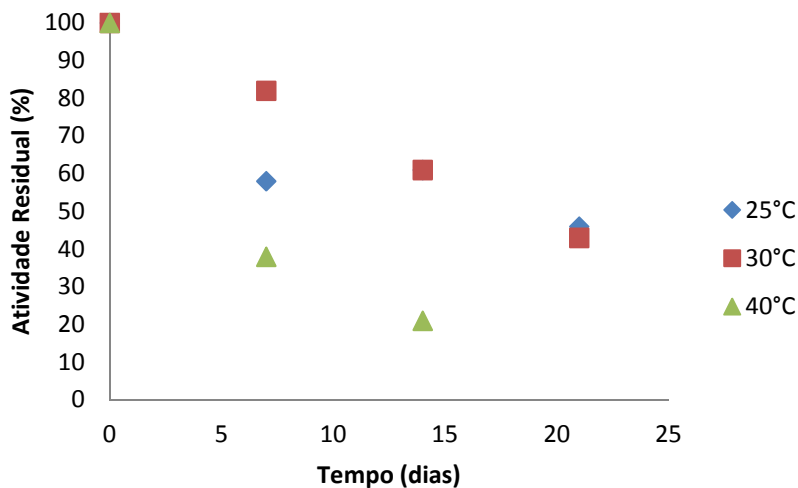
APÊNDICE XXVII

Figura 46 - Estabilidade da enzima PME livre do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



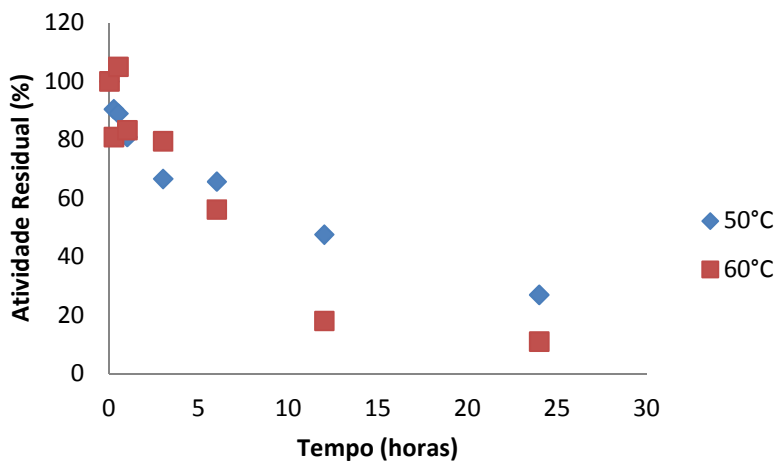
APÊNDICE XXVIII

Figura 47 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 25°C, 30°C e 40°C.



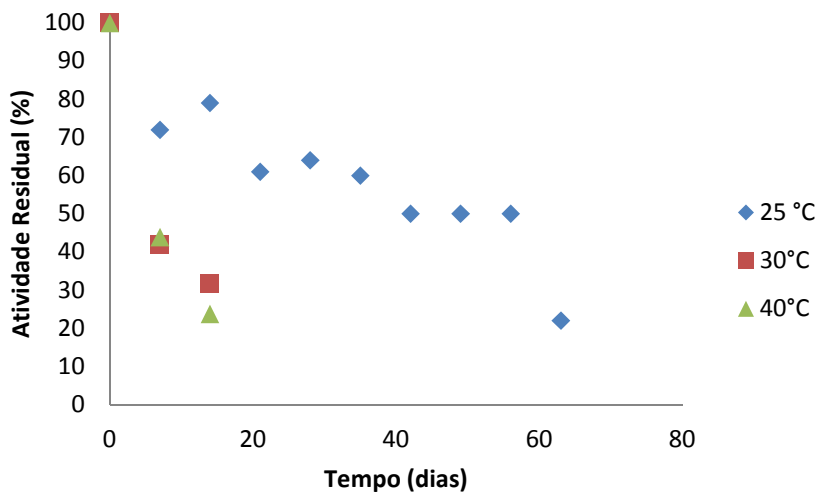
APÊNDICE XXIX

Figura 48 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 50°C e 60°C.



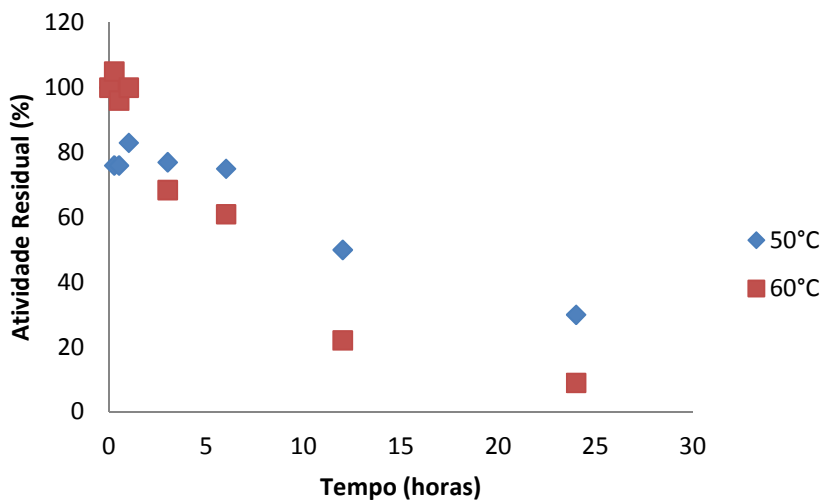
APÊNDICE XXX

Figura 49 - Estabilidade da enzima PME immobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP –L nas temperaturas de 25°C, 30°C e 40°C.



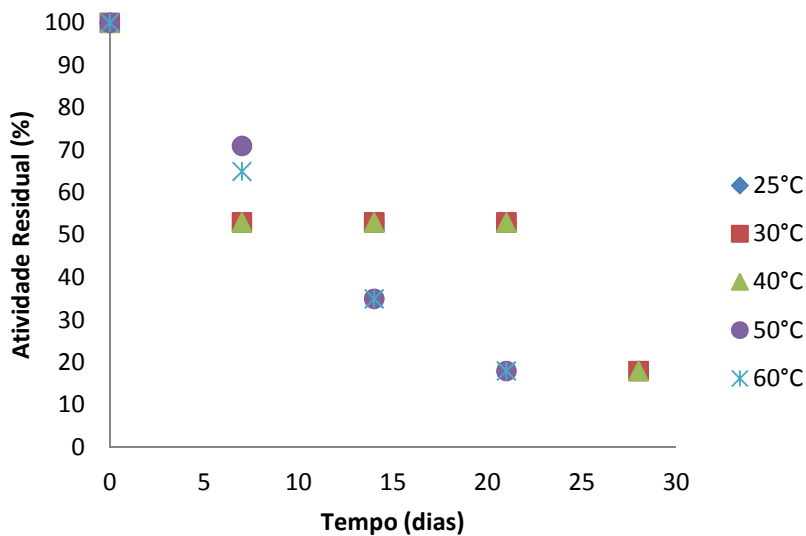
APÊNDICE XXXI

Figura 50 - Estabilidade da enzima PME imobilizada pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP –L nas temperaturas de 50°C e 60°C.



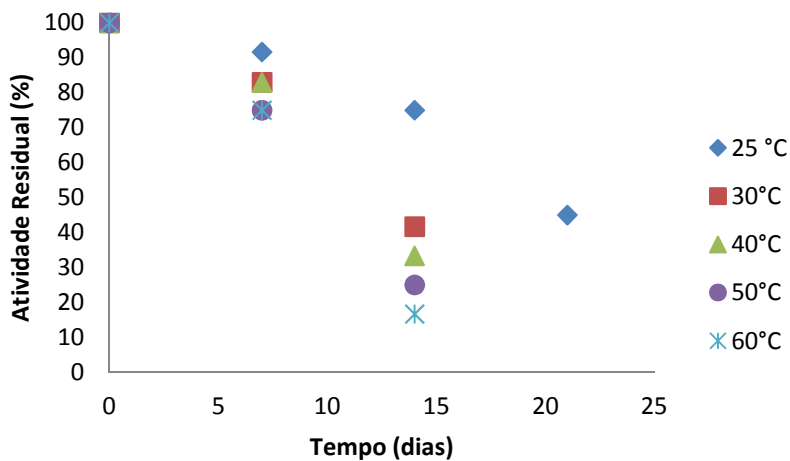
APÊNDICE XXXII

Figura 51 - Estabilidade da enzima PMGL livre do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



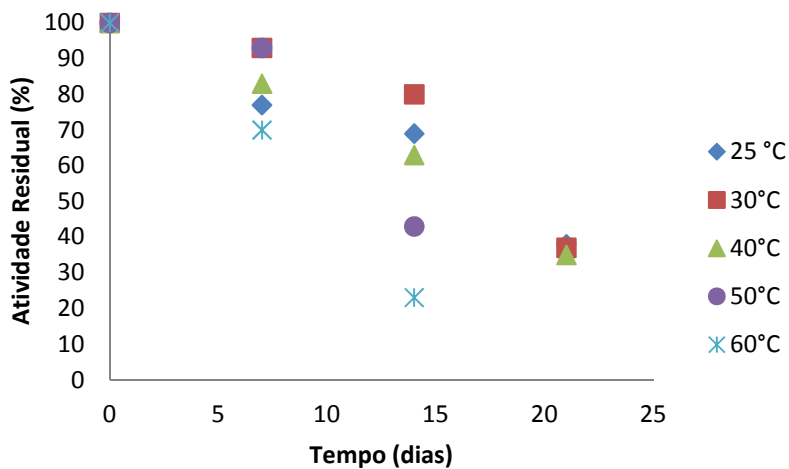
APÊNDICE XXXIII

Figura 52 - Estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



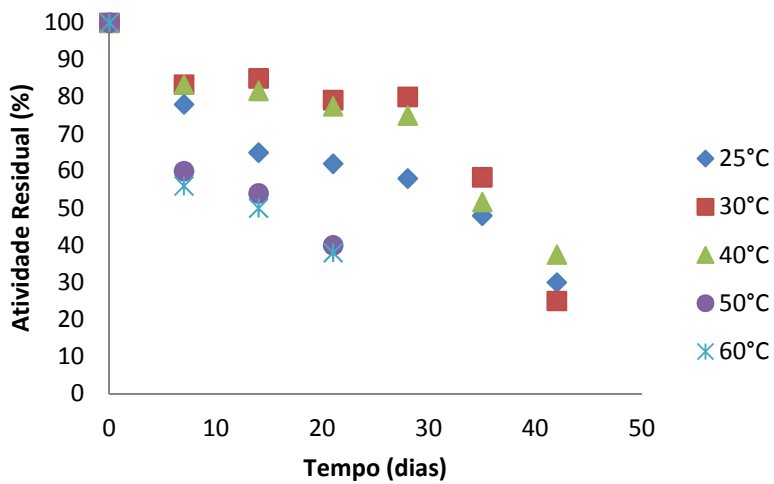
APÊNDICE XXXIV

Figura 53 - Estabilidade da enzima PMGL imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Ultra SP -L nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



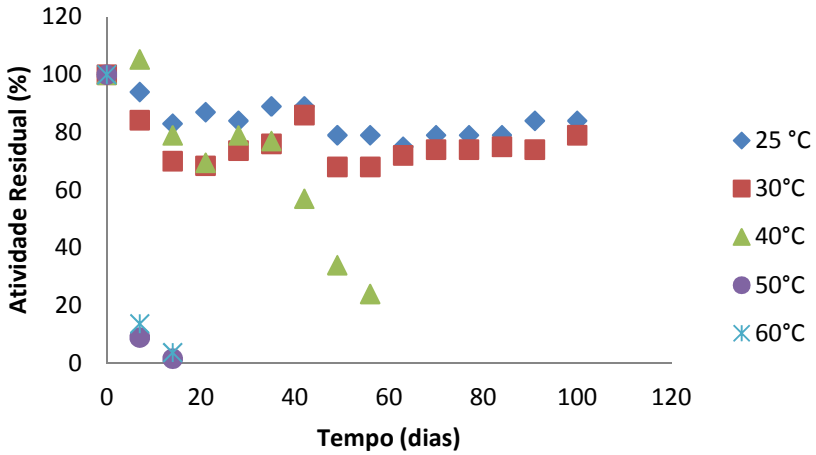
APÊNDICE XXXV

Figura 54 - Estabilidade da enzima PME livre do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



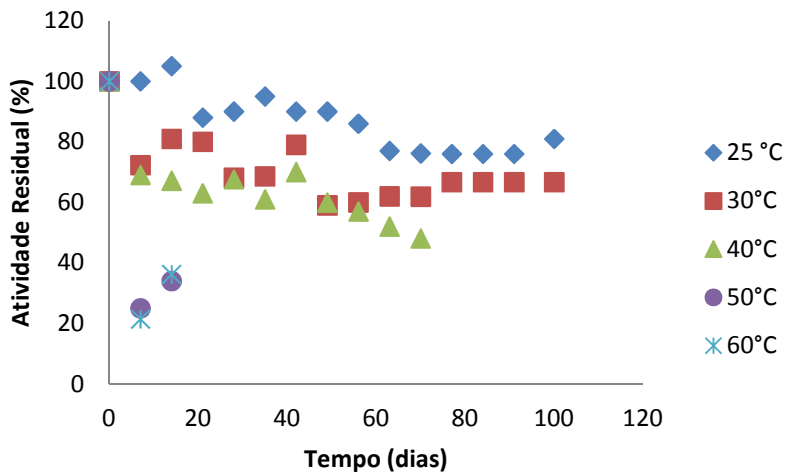
APÊNDICE XXXVI

Figura 55 - Estabilidade da enzima PME do complexo enzimático Pectinex® Mash imobilizada em suporte de gelatina-alginato nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



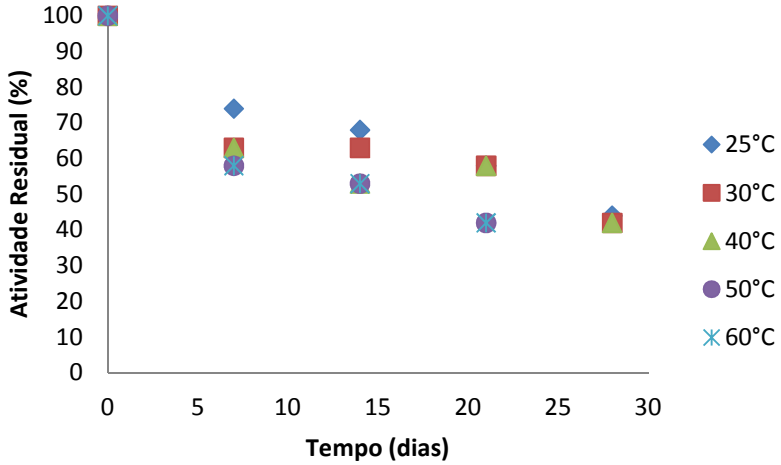
APÊNDICE XXXVII

Figura 56 - Estabilidade da enzima PME mobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



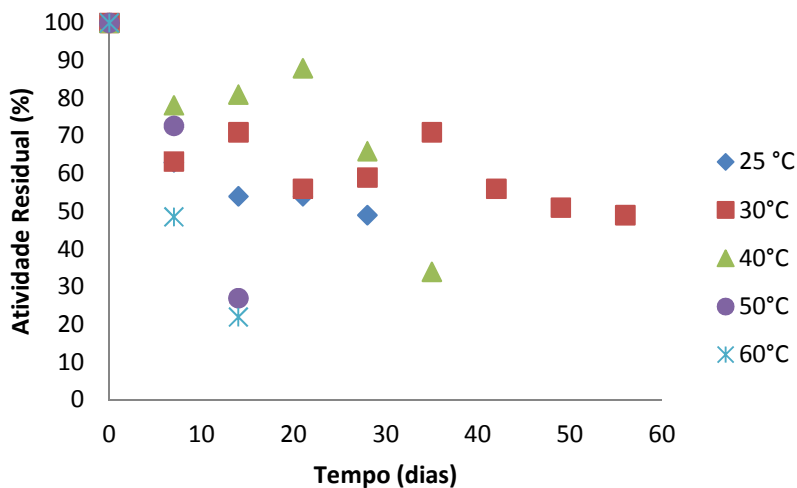
APÊNDICE XXXVIII

Figura 57 - Estabilidade da enzima PMGL livre do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



APÊNDICE XXXIX

Figura 58 - Estabilidade da enzima PMGL do complexo enzimático Pectinex® Mash immobilizada em suporte de gelatina-alginate nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.



APÊNDICE XL

Figura 59 - Estabilidade da enzima PMGL imobilizada e pressurizada do complexo enzimático Pectinex® Mash nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.

