

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PECTINASES EM FLUIDOS
PRESSURIZADOS**

NAIANE SABEDOT MARCON

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL
MARÇO DE 2012

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PECTINASES EM FLUIDOS PRESSURIZADOS

Naiane Sabedot Marcon

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Helen Treichel, D. Sc
(Orientadora)

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.
(Orientador)

Gean Delise Leal Pasquali Vargas, D.Sc.
(UFFS)

Clarissa Dalla Rosa, D.Sc.
(URI)

Erechim, março de 2012

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por me mostrar que as coisas nem sempre acontecem da forma que se espera, mas sim como tem que acontecer, que é preciso ter fé e lutar para a realização de tudo, porque nada se concretiza sozinho.

Aos meus Orientadores Helen Treichel e Marco Di Luccio, pela confiança e dedicação, que mesmo com a distância se fizeram presentes nos momentos em que foi preciso.

A LNF Latino Americana pelo fornecimento das enzimas, possibilitando o desenvolvimento da dissertação.

À Marcella Fernandes da Silva pela amizade, apoio, orientação e colaboração para o desenvolvimento desta dissertação e pelo conhecimento repassado.

Ao professor Iloir, pela amizade e contribuição na realização dos experimentos.

À Di e ao Vini, pela ajuda e dedicação no começo deste trabalho.

À amiga Rosi pela companhia desde a graduação, sempre ajudando e incentivando com bastante entusiasmo.

A todos do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, em especial: Mar, Sandy, Graci, Simone, Caudia, Zuleica, Jé, Ceni, Tássio, Rosi, Ju e ao Tress, pelos momentos de descontração e amizade.

A toda turma do Mestrado em Engenharia de Alimentos 2010 pela companhia, incentivo e ajuda durante estes dois anos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pelas palavras de apoio e preocupação demonstrada.

A minha família por ter me incentivado em mais esta conquista, porque sem o apoio deles teria sido bem mais difícil.

A URI-Campus de Erechim, por intermédio da Coordenação do Programa de Pós – Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização do Mestrado.

A todos, que de alguma forma, perto ou distantes, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PECTINASES EM FLUIDOS PRESSURIZADOS

Naiane Sabedot Marcon

Março/2012

Orientadores: Helen Treichel

Marco Di Luccio

As pectinases são enzimas amplamente utilizadas em diversos segmentos industriais, como indústria de alimentos, tecidos, papel, antifúngicos entre outras. Para aumentar a viabilidade técnica e econômica do uso destas enzimas em diferentes processos é necessário 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, o presente trabalho tem como objetivo investigar a influência de diferentes fluidos pressurizados (gás liquefeito de petróleo - GLP e CO₂) sobre a atividade enzimática de duas pectinases. Os estudos foram realizados com duas enzimas comerciais imobilizadas com carvão ativado e alginato de sódio, a Pectinex MASH e Pectinex Ultra SP-L para atividade de pectinesterase. Ao ser tratada com GLP pressurizado, a enzima Pectinex MASH teve um aumento de 713 U/mg sobre a atividade inicial, na condição em que estava exposta à maior pressão (270 bar) durante o menor tempo (1 hora) submetida a uma taxa de despressurização rápida (100 bar/min), nas mesmas condições, a enzima Pectinex Ultra também obteve o melhor resultado 161 U/mg. Quando as enzimas foram submetidas ao CO₂ pressurizado, ambas tiveram perda de atividade de mais que 50%, mostrando que a natureza do solvente pressurizado exerce um papel relevante sobre a atividade destas enzimas.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PECTINASES EM FLUIDOS PRESSURIZADOS

Naiane Sabedot Marcon

Março/2012

Orientadores: Helen Treichel

Marco Di Luccio

The pectin enzymes are largely used in many industrial segments, like the food industry, cloth, paper, and antifungal, amongst others. In order to increase the technical and economical availability in the usage of such enzymes, it is needed a search for alternatives to increase the stability and the enzymatic activity. The use of pressurized fluids as a substitute for organic solvents has been constantly studied in numerous researches on enzymes, because in some cases, the enzymatic activity increases due to the use of pressurized fluids. In this context, the present assignment's goal is to investigate the influence of different pressurized fluids (Liquefied Petroleum Gas – LPG e CO₂) over enzymatic activities of two pectin enzymes. The studies were executed with two commercial enzymes immobilized with activated coal and sodium alginate, the Pectinex MASH and Pectinex Ultra SP-L to perform the pectinesterase. After being treated with pressurized LPG, the Pectinex MASH enzyme had an increase amount of 713 U/mg from the initial activity, under the exposition of the higher pressure (270 bar) and the minimum time (1 hour) submitted to a quick depressurization (100 bar/min), under the same conditions, the Pectinex Ultra enzyme achieved the best results too – 161 U/mg. Being treated with CO₂ led the enzymes to a loss rate of 50% in their activities, revealing that the nature of the pressurized solvents has great influence on the activities of these enzymes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	ENZIMAS	4
3.2	PECTINASES	5
3.2.1	PROTOPECTINASES.....	6
3.2.2	DESMETOXILANTES	6
3.2.3	DESPOLIMERIZANTE	7
3.2.4	APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS PECTINASES	9
3.3	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.....	14
3.4	IMOBILIZAÇÃO.....	15
3.4.1	ENCAPSULAMENTO.....	16
3.5	TRATAMENTO DE ENZIMAS EM FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	17
3.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	MATERIAIS	22
4.1.1	ENZIMAS	22
4.1.2	REAGENTES.....	22
4.2	MÉTODOS.....	22
4.2.1	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.	22
4.2.2	IMOBILIZAÇÃO COM ALGINATO DE SÓDIO E CARVÃO ATIVADO.....	24
4.2.3	TRATAMENTO COM FLUIDO PRESSURIZADO.....	25
4.2.4	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA TÉRMICA.	28
4.2.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	29
4.2.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	EFEITO DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	31
5.1.1	EFEITO DA TEMPERATURA E pH PARA ENZIMA PECTINEX ULTRA SP-L	31
5.1.2	EFEITO DA TEMPERATURA E pH PARA ENZIMA PECTINEX MASH	34

5.2	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS K_M E $V_{MÁX}$	37
5.3	IMOBILIZAÇÃO E TRATAMENTO A ALTA PRESSÃO	38
5.3.1	IMOBILIZAÇÃO.....	38
5.3.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO CO_2 NAS DUAS ENZIMAS.....	38
5.3.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO GLP NAS DUAS ENZIMAS	41
5.4	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	48
5.4.1	ESTABILIDADE A BAIXAS TEMPERATURAS.....	48
5.4.2	ESTABILIDADE A ALTAS TEMPERATURAS.	50
6	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	56
6.1	CONCLUSÕES	56
6.2	SUGESTÕES	56
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – PROPRIEDADES CRÍTICAS DE VÁRIOS SOLVENTES.....	18
TABELA 2- VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NOS PLANEJAMENTOS 1 E 2.....	23
TABELA 3 – VARIÁVEIS E NÍVEIS EXPERIMENTAIS AVALIADOS NOS PLANEJAMENTOS PARA GLP.	28
TABELA 4 – VARIÁVEIS E NÍVEIS EXPERIMENTAIS AVALIADOS NOS PLANEJAMENTOS PARA CO ₂	28
TABELA 5 -MATRIZ DO DCCR (VALORES REAIS) COM A RESPOSTA EM TERMOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA ENZIMA PECTINESTERASE (PME) EM FUNÇÃO DE pH E TEMPERATURA PARA A ENZIMA COMERCIAL PECTINEX ULTRA SP-L	32
TABELA 6 – ANÁLISE DOS EFEITOS PARA OS TERMOS LINEARES, QUADRÁTICOS E DE INTERAÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA A ENZIMA PECTINEX ULTRA SP-L.....	32
TABELA 7 – ANOVA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PME COMO RESPOSTA PARA O DCCR PARA A ENZIMA PECTINEX ULTRA SP-L.....	33
TABELA 8 - MATRIZ DO DCCR (VALORES REAIS) COM A RESPOSTA EM TERMOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA ENZIMA POLIMETILGALACTURONASE (PME) EM FUNÇÃO DE pH E TEMPERATURA PARA A ENZIMA COMERCIAL PECTINEX MASH.	35
TABELA 9 – ANÁLISE DOS EFEITOS PARA OS TERMOS LINEARES, QUADRÁTICOS E DE INTERAÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA A ENZIMA PECTINEX MASH.	35
TABELA 10 – ANOVA PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PME COMO RESPOSTA PARA O DCCR PARA A ENZIMA PECTINEX MASH.....	36
TABELA 11 – COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA	38
TABELA 12- ATIVIDADE RELATIVA RESIDUAL, PROTEÍNA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA, PARA PECTINASE PECTINEX ULTRA SP-L APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO.	39
TABELA 13 - ATIVIDADE RELATIVA RESIDUAL, PROTEÍNA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA, PARA PECTINASE PECTINEX MASH APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO.	39
TABELA 14 – ATIVIDADE RELATIVA RESIDUAL, PROTEÍNA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA, PARA PECTINEX ULTRA SP-L APÓS TRATAMENTO COM FLUIDO PRESSURIZADO (GLP). ...	41
TABELA 15 – ANÁLISE DOS EFEITOS PARA TERMOS LINEARES E DE INTERAÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA ATIVIDADE DA PECTINASE PECTINEX ULTRA SP-L EM TERMOS DE	

PRESSÃO, TAXA DE DESPRESSURIZAÇÃO E TEMPO, COM GLP UTILIZADO COMO FLUIDO PRESSURIZADO. TABELA 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA PECTINEX ULTRA SP-L EM GLP PRESSURIZADO TABELA 17 - ATIVIDADE RELATIVA RESIDUAL, PROTEÍNA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA, PARA PECTINEX MASH APÓS TRATAMENTO COM FLUIDO PRESSURIZADO (GLP)..... TABELA 18 - ANÁLISE DOS EFEITOS PARA TERMOS LINEARES E DE INTERAÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA ATIVIDADE DA PECTINASE PECTINEX MASH EM TERMOS DE PRESSÃO, TAXA DE DESPRESSURIZAÇÃO E TEMPO, COM GLP UTILIZADO COMO FLUIDO PRESSURIZADO. TABELA 19- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA PECTINEX MASH EM GLP PRESSURIZADO TABELA 20 - CONSTANTES DE INATIVAÇÃO TÉRMICA (K_D) DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA E SEUS RESPECTIVOS TEMPOS DE MEIA-VIDA ($T_{1/2}$).	42 42 44 45 45 55
--	---

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – AÇÃO DA PECTINESTERASE SOBRE A MOLÉCULA DE PECTINA.	7
FIGURA 2- AÇÃO DAS EXO-POLIGALACTURONASES TIPO 1 SOBRE ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO. 8	
FIGURA 3 – AÇÃO DE EXO-PECTINA LIASE SOBRE PECTINA.....	8
FIGURA 4 – 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 – CÉLULA DE AÇO; E – TRANSDUTOR DE PRESSÃO; F – INDICADOR DE PRESSÃO; G – VÁLVULA MICROMÉTRICA.....	26
FIGURA 5 – DETALHES DA CÉLULA DE AÇO INOXIDÁVEL COM VOLUME INTERNO DE 0,5 G (A) E DA CÉLULA ANTES E DEPOIS DE SER ACOPLADA AO EQUIPAMENTO DE ALTA PRESSÃO (B). 26	
FIGURA 6 – VISTA DA UNIDADE EXPERIMENTAL UTILIZADA NO TRATAMENTO ENZIMÁTICO (A) E DA CÉLULA JÁ ACOPLADA A UNIDADE EXPERIMENTAL E MERGULHADO NO BANHO TERMOSTÁTICO (B).....	27
FIGURA 7 -A) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA; B) CURVA DE CONTORNO PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PME ENZIMA PECTINEX ULTRA SP-L.....	34
FIGURA 8 - A) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA; B) CURVA DE CONTORNO PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PME ENZIMA PECTINEX MASH.....	36
FIGURA 9-SUPERFÍCIES DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO PARA ENZIMA PECTINEX ULTRA SP-L SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM GLP PRESSURIZADO: (A) TAXA DE DESPRESSURIZAÇÃO (R) E TEMPO; (B) TAXA DE DESPRESSURIZAÇÃO E PRESSÃO; (C) TEMPO E PRESSÃO.....	43
FIGURA 10-SUPERFÍCIES DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO PARA ENZIMA PECTINEX ULTRA SP-L SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM GLP PRESSURIZADO: (A) TAXA DE DESPRESSURIZAÇÃO (R) E TEMPO; (B) TAXA DE DESPRESSURIZAÇÃO E PRESSÃO; (C) TEMPO E PRESSÃO.....	46
FIGURA 11 - ESTABILIDADE DA PECTINEX MASH, (♦) 4°C LIVRE; (■) 4°C IMOBILIZADA; (▲) 4°C PRESSURIZADA; (X) -18°C LIVRE; (Ж) -18°C IMOBILIZADA; (•) -18°C PRESSURIZADA; (-) -80°C IMOBILIZADA; (+) -80 °C LIVRE; (—) -80°C PRESSURIZADA.	49
FIGURA 12 - ESTABILIDADE DA PECTINEX ULTRA SP-L, (♦) 4°C LIVRE; (■) 4°C IMOBILIZADA; (▲) 4°C PRESSURIZADA; (X) -18°C LIVRE; (Ж) -18°C IMOBILIZADA; (•) -18°C PRESSURIZADA; (-) -80°C IMOBILIZADA; (+) -80 °C LIVRE; (—) -80°C PRESSURIZADA; .	49

FIGURA 13 – ESTABILIDADE ENZIMÁTICA NA TEMPERATURA 30°C: A) PECTINEX MASH B)	
PECTINEX ULTRA SP-L. (♦) LIVRE; (■) IMOBILIZADA; (▲) PRESSURIZADA.	50
FIGURA 14 - ESTABILIDADE ENZIMÁTICA NA TEMPERATURA 40°C: A) PECTINEX MASH B)	
PECTINEX ULTRA SP-L. (♦) LIVRE; (■) IMOBILIZADA; (▲) PRESSURIZADA.	51
FIGURA 15 - ESTABILIDADE ENZIMÁTICA NA TEMPERATURA 50°C: A) PECTINEX MASH B)	
PECTINEX ULTRA SP-L. (♦) LIVRE; (■) IMOBILIZADA; (▲) PRESSURIZADA.	52
FIGURA 16 - ESTABILIDADE ENZIMÁTICA NA TEMPERATURA 60°C: A) PECTINEX MASH B)	
PECTINEX ULTRA SP-L. (♦) LIVRE; (■) IMOBILIZADA; (▲) PRESSURIZADA.	53

1 INTRODUÇÃO

As indústrias de bebidas têm investido na obtenção de sucos límpidos e sem opacidade, visto que a aparência visual do líquido influencia a decisão do consumidor no momento de optar por determinado produto (TRIBESS, 2003). A ação coloidal da pectina dificulta o processo de fabricação dos sucos, pois a turvação dificilmente pode ser removida apenas por filtração, devido à grande quantidade de partículas em suspensão. Quando tratados previamente por enzimas pécticas, amilases e celulasas os sucos de frutos são facilmente extraídos, clarificados e filtrados (BARROS *et al.*, 2004; FILHO *et al.*, 1991).

O uso de enzimas tem se revelado muito promissor em termos de rendimento em sumo, proporcionando uma melhor utilização de matéria-prima, aumentando a eficiência nas operações unitárias do processo produtivo, no consumo energético e, em termos ambientais, reduzindo os desperdícios produzidos (SUN *et al.*, 2006 VORA *et al.*, 1999; ZADERNOWSKI *et al.*, 2003). Deve-se salientar que 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; LAPERCHE, 2001).

A crescente ênfase no uso de biocatalisadores devido às suas propriedades favoráveis, tais como condições amenas e ambientalmente compatíveis de reação e sua alta especificidade, têm resultado num aumento do uso de enzimas imobilizadas, pois a interação entre suporte e a enzima podem alterar favoravelmente as suas propriedades físicas e químicas (BASRI *et al.*, 1996). A biocatálise é a área que apresenta maior crescimento no mercado industrial de moléculas biologicamente ativas. Estima-se que até o ano de 2025 cerca de 50% dos processos químicos podem ser substituídos por processos biotecnológicos isolados, ou mesmo pela integração entre catálise enzimática e reações químicas (ANTUNES, 2005).

O uso de fluidos pressurizados como solventes para reações químicas e bioquímicas pode ser uma rota promissora, no sentido de eliminar traços de solvente dos produtos reacionais. Adicionalmente, processos industriais em condições próximas ao ponto crítico do solvente podem ser vantajosos em termos do consumo de energia, facilidade de recuperação

do produto e minimização da formação de produtos secundários. O dióxido de carbono supercrítico possui características especiais tais como baixa toxicidade e temperatura de trabalho, podendo ainda aumentar as taxas de reação limitadas difusionalmente (KNEZ E HABULIN, 1998).

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 & ERKMEN, 2002).

Estudos revelam que algumas enzimas aumentam sua atividade e outras diminuem e/ou perdem suas atividades após exposição aos fluidos pressurizados. 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).

Visando a realização de reações enzimáticas a altas pressões, de fundamental importância é a avaliação do comportamento das enzimas nestes fluidos, uma vez que a perda de atividade pode levar à baixas taxas de reação e formação de produtos secundários (KASCHE *et al.*, 1988)

2 OBJETIVO

Com base na literatura relacionada ao potencial de aplicação de enzimas em reações de interesse, surgiu a relevância na investigação do comportamento da atividade da pectinametilesterase em fluidos pressurizados. Este trabalho teve como objetivo geral a avaliação dos efeitos do uso de fluidos pressurizados (gás liquefeito de petróleo (GLP) e dióxido de carbono (CO_2)), sobre duas enzimas comerciais, Pectinex ULTRA SP-L e Pectinex MASH.

Especificamente, os objetivos podem ser assim delineados:

- Estudo da caracterização parcial das enzimas, em termos de temperatura e pH ótimos e de estabilidade e determinação das constantes cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), sobre o substrato pectina cítrica;
- Estudo do efeito das variáveis do processo, empregando a técnica de planejamento de experimentos, visando a otimização das condições de tratamento da enzima fluido pressurizado (GLP e CO_2), em termos de atividade residual relativa para as enzimas imobilizadas;
- Avaliação da estabilidade das enzimas livre e imobilizadas submetidas ou não ao tratamento em fluido pressurizado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresentará uma explanação sobre enzimas, em especial pectinases enzima de interesse neste trabalho, uma breve revisão sobre imobilização enzimática e um relato sobre o comportamento da atividade das enzimas quando expostas a fluidos pressurizados.

3.1 ENZIMAS

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. Além disso, este setor está em crescente expansão faturando aproximadamente R\$ 1 trilhão em 2005, o que representa um crescimento de 9,2% em relação a 2004. Desse total, a indústria de sucos naturais teve uma produção de 111 milhões de litros entre janeiro e março de 2007 representando um crescimento de 12,6% em relação ao mesmo período de 2006. Neste contexto, 60% do total de enzimas industriais fornecidas mundialmente são produzidas na Europa, os restantes 40% nos EUA e Japão. (BHAT, 2000, AQUINO, 2007).

As enzimas mais produzidas mundialmente são as hidrolases, com as carbohidrolases formando o segundo grande grupo, aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas correspondem às enzimas pectinases. Estas foram usadas na indústria de ração nos anos 30. Durante as duas décadas seguintes, o uso de celulasas, hemicelulasas e pectinases cresceu consideravelmente, especialmente nas indústrias têxtil, de ração, uva e vinho assim como produção de polpa e papel, desde então, cerca de 25% do mercado mundial de enzimas correspondem às enzimas pectinases (BHAT, 2000, AQUINO, 2007).

A crescente procura por enzimas para aplicações industriais (DAVOLI *et al.*, 2004; KRISHNA, 2002, SCHIMID *et al.*, 2002, SHIN *et al.*, 2004) está relacionada com a

seletividade pelo substrato, ou seja, a capacidade de discriminar substratos distintos mas estruturalmente semelhantes (KLIBANOV, 2001).

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente atrativas, pois aumentam a taxa de reação química sem sofrer transformação. Além de serem ativas e versáteis, elas catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores convencionais. Outra vantagem na utilização de enzimas é a facilidade em se regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar o pH ou adicionar suplementos. Geralmente, possuem alta especificidade como consequência de sua conformação tridimensional (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO & PARK, 2003; HERNALTEENS & MAUGERI, 2010).

3.2 PECTINASES

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).

As substâncias pécticas 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). 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 (UEDA *et al.*, 1982).

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 & PANDA, 2003). Estas enzimas podem ser induzidas por substratos pécticos ou produzidas

constitutivamente, dependendo do organismo estudado (MALDONADO & STRASSER de SAAD, 1998)

Sua classificação é baseada de acordo com o substrato preferencial, mecanismo de ação e sítios de clivagem, (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001). As substâncias pécnicas são classificadas em (JAYANI *et al.*, 2005; KASHYAP *et al.*, 2000):

3.2.1 Protopectinases

As protopectinases (PPases), também conhecidas por pectinosinases catalisam a hidrólise da protopectina, originando ácido pécico e pectina, diminuindo a rigidez da parede celular durante o amolecimento e o amadurecimento. Solubilizam protopectina formando a pectina solúvel altamente polimerizada. São principalmente de dois tipos: protopectinase tipo A que reage com o sítio interno, faz a clivagem na parte interna da molécula do ácido poligalacturônico da protopectina e protopectinase tipo B que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes das paredes celulares (JAYANI *et al.*, 2005).

3.2.2 Desmetoxilantes

Pectina esterase, polimetilgalacturonato esterase ou PMGE (EC 3.1.1.11) catalisa a desesterificação da pectina (Figura -1). 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). Apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50°C (ASSIS *et al.*, 2004).

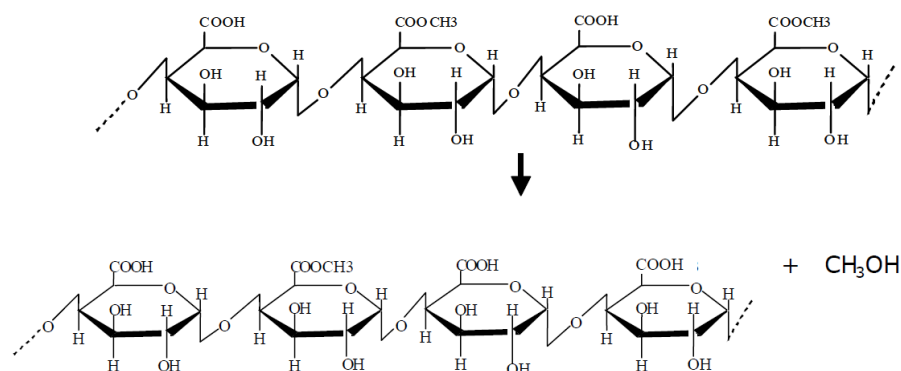


Figura 1 – Ação da pectinesterase sobre a molécula de pectina.

Como pode se observar na Figura 1 a enzima pectinesterase atua sobre pectina altamente metoxilada, liberando metanol (SANTI, 2005).

3.2.3 Despolimerizante

São subdivididas em hidrolases e liases:

Hidrolases: incluem as polimetilgalacturonases (PMG) e as poligalacturonases (PG).

Polimetilgalacturonases (PMG): catalisam a clivagem hidrolítica da ligação glicosídica α -1,4 da pectina. Estas são subdivididas em endo-PMG (EC 3.2.1.15), que causa a clivagem randômica da ligação glicosídica α -1,4 da pectina, preferencialmente na pectina altamente esterificada e exo-PMG (EC 3.2.1.15), que causa clivagem sequencial não redutora da cadeia da pectina.

Poligalacturonase (PG): (EC 3.2.1.15) hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico. É a maior enzima com função hidrolítica, podendo ser classificada de acordo com sua ação endo ou exo do ácido pectico. As endo-PG (EC 3.2.1.15) catalisam a hidrólise aleatória da ligação glicosídica α -1,4 do ácido pectico. As exo-PG são subdivididas em exo-PG-1 (EC 3.2.1.67) que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora (Figura-2), liberando ácidos galacturônicos livres e exo-PG (EC 3.2.1.82), que hidrolisa as ligações alternadas do ácido digalacturônico livre. Possuem pH ótimo de atividade na região levemente ácida e temperatura ótima entre 30 e 50 °C.

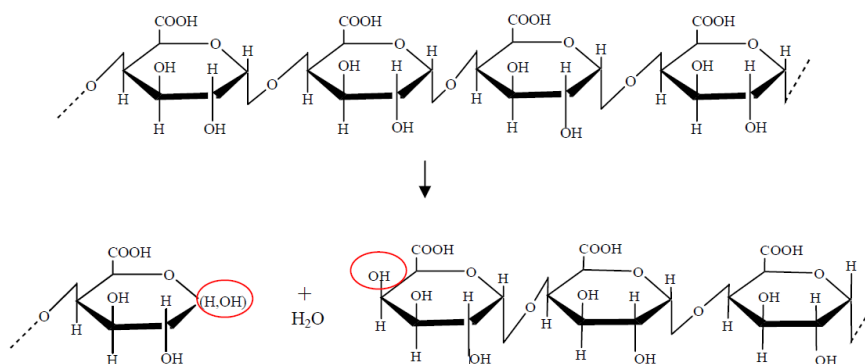


Figura 2- Ação das exo-poligalacturonases tipo 1 sobre ácido poligalacturônico.

Na Figura - 2 é apresentado mecanismo de ação da exo-poligalacturonases tipo 1 onde ocorre a liberação de um monômero de ácido galacturônico por hidrólise da molécula de pectina não esterificada (SANTI, 2005).

Liases incluem polimetilgalacturato liase (PMGL) e a poligalacturonato liase (PGL).

Polimetilgalacturonato Liase (PMGL, EC 4,2,2,10): catalisa a quebra da pectina por clivagem trans-eliminativa. São classificadas em endo-PMGL, que catalisa a clivagem aleatória da ligação glicosídica α -1,4 da pectina e exo-PMGL, que catalisa a quebra sequencial da pectina por transeliminação na extremidade da cadeia. Atuam preferencialmente na pectina (MARTINS, 2006; JAYANI *et al.*, 2005, YADAV *et al.*, 2009). A Figura 3 representa a forma de ação da exo-PMGL.

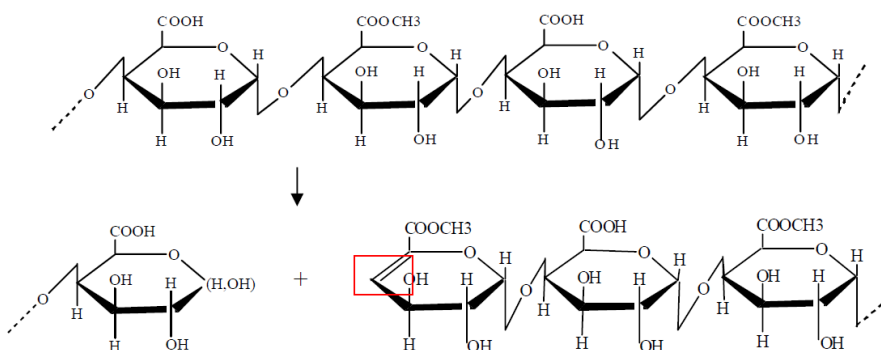


Figura 3 – Ação de exo-pectina liase sobre pectina.

Através de Figura -3 nota-se a dupla ligação gerada pela ação da enzima exo-pectina liase sobre a pectina (SANTI, 2005).

Poligalacturonato liase (PGL): catalisa a clivagem da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico por transeliminção. São divididas em endo-PGL (EC 4.2.2.2) que catalisam a clivagem aleatória da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico e exo-PGL (EC 4.2.2.9) que catalisa a clivagem sequencial da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico na extremidade da cadeia (CORREIA, 2010).

3.2.4 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).

Pectinases de origem microbiana apresentam grande interesse comercial por sua vasta aplicação na indústria de alimentos, principalmente no processamento de frutas e vegetais (BLANCO *et al.*, 1999).

3.2.4.1 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 (ALKORTA, *et al.*, 1998, FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, *et al.*, 2004). A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular (De GREGORIO, *et al.*, 2002, SARIOGLU, *et al.*, 2001), 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 (JAYANI, *et al.*; 2005, FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, *et al.*, 2004, SOUZA, *et al.*, 2003).

Durante meados da década de 30, quando as indústrias de frutas começaram a produzir sucos, o rendimento era baixo e muitas dificuldades foram encontradas para filtrar o suco e se

atingir uma clarificação estável. A partir de então, pesquisas utilizando pectinases, celulases e hemicelulases de microrganismos, juntamente com o conhecimento dos componentes vegetais das frutas, diminuiram essas dificuldades (BHAT, 2000 , JAYANI, *et al.*, 2005).

A combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, é usada na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais (KAUR, *et al.*, 2004, SOUZA, *et al.*, 2003). A adição de α -amilase e amiloglicosidase, ativas a pH ácido, é usada no processamento de frutas contendo amido, especialmente maçã, para prevenir turvação (BHAT, 2000 , SAKAI, *et al.*, 1993, LANG e DÖRNENBURG, 2000, TAJCHAKAVIT,*et al.*, 2001) .

O tratamento enzimático conduz a uma extensa degradação da lamela média e da pectina das paredes celulares por ação de poligalacturonase, pectina metil esterase e pectina liase. O efeito sinérgico da combinação de pectinases e celulases é um processo crucial no tratamento enzimático da polpa para uma quase completa liquefação das frutas e dos vegetais(SORENSEN, *et al.*, 2004, DEMIR, *et al.*, 2001). A hidrólise enzimática das paredes celulares aumenta o rendimento de extração, diminui o conteúdo de açúcares, de matéria seca solúvel, de ácidos galacturônicos e a acidez titulável. A polpa resultante tem baixa viscosidade e a quantidade de resíduos da polpa é reduzida (DEMIR, *et al.*, 2001).

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 (BHAT, 2000).

Em sucos clarificados, como de maçã, as pectinases são utilizadas na separação de partículas sedimentáveis, na filtração ou centrifugação. As vantagens do uso de pectinases em sucos incluem: utilização em diversos tipos de produtos, isto é, sucos clarificados, não clarificados, concentrados, polpas, purês etc.; redução do tempo total para extração do suco em relação aos processos clássicos, auxiliam na produção de sucos e concentrados estáveis com redução de resíduos da polpa; custos de produção reduzidos e possibilidade de processamento de diferentes frutas (KASHYAP, *et al.*, 2001) . Em sucos não clarificados, como o de laranja, é feita a desnaturação da pectina esterase com o aquecimento do suco, para prevenir a perda da turbidez desejada, ou congela-se o suco concentrado para manter a enzima

em estado inativo (KASHYAP, *et al.*, 2001). O tratamento térmico brando pode resultar em produtos de alta qualidade, com melhor qualidade de aroma e maior conteúdo vitamínico (SORENSEN, *et al.*; 2004). Durante o processo de extração do suco, as enzimas podem ser adicionadas no final da extração da polpa lavada para diminuir a viscosidade ou após a extração final, para aumentar a liberação de açúcares e sólidos solúveis, melhorando o rendimento e diminuindo a viscosidade.

O tratamento enzimático melhora a estabilidade da turvação, pois a degradação da pectina é limitada (KASHYAP *et al.*, 2001) .

3.2.4.2 Recuperação de óleos essenciais

Os óleos essenciais estão localizados especialmente nas células do albedo de frutas cítricas e contêm hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos), compostos oxigenados (aldeídos, ésteres, álcoois, cetonas e fenóis) e resíduos não voláteis (ceras, flavonóides e ácidos graxos) (KASHYAP, *et al.*, 2001). 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 (KASHIAP, *et al.*, 2001). 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 (JAYANI,*et al.*, 2005, KASHYAP, *et al.*, 2001).

3.2.4.3 Indústrias de vinhos

Pectinases, em conjunto com β -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 (BHAT, 2000 , , TAKAYANAGI, *et al.*, 2001).

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 pectina metil esterase são referidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho (BHAT, 2000) .

Enzimas pectinolíticas adicionadas durante a maceração das uvas para produção de vinho tinto resultam no melhoramento das características visuais (cor e turbidez), quando comparadas com vinhos não tratados, apresentando características cromáticas consideradas melhores que os vinhos controle (JAYANI, *et al.*, 2005) .

3.2.4.4 Extração de óleos vegetais

Óleos de canola, coco, semente de girassol, palma e oliva são tradicionalmente produzidos por extração com solventes orgânicos, mais comumente o hexano. 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 (KASHYAP, *et al.*, 2001) .

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 (BHAT, 2000, KASHYAP, *et al.*, 2001). O uso de enzimas de maceração aumenta a quantidade de agentes anti-oxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extravirgem, reduz a indução ao ranço, aumenta a extração, melhora o fracionamento na centrifugação e produz óleo com baixo teor de umidade (BHAT, 2000).

3.2.4.5 Alimentos funcionais

Pectina e polissacarídeos pécticos 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 (LANG e DÖRNENBURG, H., 2000).

3.2.4.6 *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 celulasas que destroem a integridade estrutural da matriz responsável pelo aprisionamento dos grânulos, expondo e liberando o amido (SRIROTH, *et al.*, 2000).

3.2.4.7 *Fermentação de café e chá*

Pectinases são importantes na fermentação de café e chá, pois aceleram o processo de fermentação (KASHYAP, *et al.*, 2001, SILVA, *et al.*, 2000) , melhorando a qualidade do produto final (SHARMA e SATYANARAYAMA , 2006) .

Enzimas pécticas são adicionadas para remover a camada de mucilagem do grão, constituída de três quartos de substâncias pécticas.

Celulasas e hemicelulasas, 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 é custoso e não econômico, são utilizadas enzimas pécticas microbianas obtidas da fermentação de resíduos da mucilagem (JAYANI, *et al.*, no prelo, KASHYAP, *et al.*, 2001) .

3.2.4.8 *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 (KASHIAP, *et al.*, 2001; MINUSSI, *et al.*, 1997; PICCOLI-VALLE, *et al.*, 2001) , no tratamento do resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais (KAUR, *et al.*, 2004).

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 (SHARMA e SATYANARAYAMA , 2006). A degomagem de fibras de rami com pectina liase produz fibras com qualidade superior àquelas produzidas por complexos enzimáticos comerciais ou utilizando processo químico com soda alcalina, além de reduzir a

poluição ambiental provocada pela liberação da soda cáustica (KASHIAP, *et al.*; 2001, PICCOLI-VALLE, *et al.*; 2001).

Em algodão cru, a remoção da pectina, cera e agentes de goma com a utilização de pectinases em conjunto com amilases, lipases e hemicelulases em condições adequadas, substitui o uso da soda cáustica e gera produtos de alta qualidade, para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia (SAWADA e UEDA, 2001).

3.2.4.9 Indústria de papel e celulose

Durante a fabricação de papel, pectinases podem despolimerizar substâncias pécicas e, subseqüentemente, diminuir a demanda catiônica das soluções pécicas e do filtrado resultantes do branqueamento com peróxido (JAYANI, *et al.*, 2005), solucionar problemas de retenção no branqueamento mecânico da celulose e no tratamento dos efluentes dos moinhos de papel (SHARMA e SATYANARAYAMA, 2006).

3.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

A atividade das enzimas é função direta da sua estrutura terciária ou quaternária. Nessas condições, todo tratamento que modifique a conformação da enzima (aquecimento, modificação do pH, pressão), dificultando ou impedindo a fixação do substrato na enzima ou ainda modificando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da enzima e, portanto, o seu funcionamento. Existe uma zona de temperatura, às vezes estreita, para a qual atividade enzimática é máxima. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é determinada em condições de operação bem definidas. De fato, a variação da atividade enzimática resulta de dois efeitos antagônicos: de um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima; de outro, a desnaturação da proteína enzimática. Esta desnaturação vai modificar a estrutura terciária e a quaternária da proteína globular e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade (SCRIBAN, 1985).

A caracterização bioquímica das enzimas ganha destaque por fornecer dados para compreender a atuação e as alterações ocorridas, além de fornecerem dados que devem ser considerados no momento da aplicação da enzima em um processo. Temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e pH, os efeitos da utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na obtenção da enzima, e outros parâmetros são decisivos na hora do dimensionamento de um processo enzimático (RIGO, 2009; MALDONADO, 2006).

A estabilidade térmica é a capacidade que a enzima solúvel ou imobilizada possui de manter seu potencial catalítico quando submetida a uma dada temperatura por um dado tempo (ARROYO *et al.*, 1999).

3.4 IMOBILIZAÇÃO

As enzimas estão sujeitas à inativação quando estocadas ou durante o seu uso por acometimento de fatores químicos, físicos ou biológicos. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da intervenção com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois este poderia provocar inativação, impossibilitando a catálise da reação. Para isso, a técnica de imobilização é utilizada para fornecer uma maior 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 semipemeável. 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 principal objetivo da imobilização enzimática 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 capacidade catalítica superior, embora a imobilização possa inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima

em alguns casos. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo (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).

Em geral, os métodos mais utilizados para imobilização de enzimas são adsorção e oclusão da proteína no interior do polímero (POWELL, 1990). O processo de oclusão consiste no aprisionamento de uma enzima em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável, de tal forma que se permita a penetração do substrato e difusão dos produtos e impeça a liberação da proteína, conservando integralmente sua estrutura (RODRIGUEZ *et al.*, 2006). No processo de adsorção, a fixação da proteína é puramente física, ou seja a proteína adere à superfície de um suporte inerte, por meio de ligações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas e forças de Van der Waals. A metodologia de adsorção de enzimas é um processo simples e de fácil execução, porém cabe ressaltar que, sua maior desvantagem é que durante o processo de lavagem a enzima pode desorver do suporte (KEMENY & CHALLACOMBE, 1988).

A imobilização de enzimas realizada em suportes sólidos faz com que as moléculas da enzima aumentem sua catálise e ainda facilite o reuso por mais tempo devido a sua fácil separação com o meio da reação (LEE *et al.*, 2009).

3.4.1 ENCAPSULAMENTO

A imobilização de um biocatalisador via inclusão, ou microencapsulação, consiste em confinar a enzima proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Neste sistema cria-se uma célula artificial que fica delimitada por uma membrana porosa. As enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, por serem moléculas grandes, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos conseguem se difundir. As vantagens da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando a desnaturação enzimática (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004).

Chang (1964) foi pioneiro na aplicação de encapsulamento como técnica de imobilização de enzimas, a partir de então se tem imobilizado por encapsulamento um grande número de enzimas, usando distintos materiais e métodos de preparação das microcápsulas (WISEMAN, 1991).

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 gelificação iônica, gelificação 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 & GROSSO, 2006).

O uso de agentes gelificantes naturais, como gelatina, agarose e k-carragenas são bastante utilizados na imobilização (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004). Mais comumente tem-se utilizado para a encapsulação a união de dois ou mais polímeros (HERTZBERG *et al*, 1992). O alginato é o polímero mais utilizado em imobilizações e microencapsulamentos (LIANG *et al*, 2000).

Li *et al*. (2007) imobilizaram pectinases utilizando alginato como suporte e glutaraldeído como agente reticulante para facilitar a imobilização da enzima e para evitar a dessorção da mesma, combinação esta que rendeu uma atividade residual considerável de 66 %.

3.5 TRATAMENTO DE ENZIMAS EM FLUIDOS PRESSURIZADOS.

Visando à realização de reações enzimáticas a altas pressões é de fundamental importância a avaliação do comportamento das enzimas nestes fluidos, uma vez que a perda de atividade pode levar a baixas taxas de reação e formação de produtos secundários (KASCHE *et al*., 1998). De fato a estabilidade e atividade enzimática pode depender da enzima, das características do solvente, do conteúdo da 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 (MESIANO *et al.*, 2001).

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 fazem dos FSC meios bastantes interessante para reações químicas e enzimáticas (OLIVEIRA,1999). A Tabela1 apresenta as propriedades críticas de vários solventes que são comumente utilizados em reações enzimáticas.

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)

Devido à criação de um ambiente de reação homogêneo e o fluido supercrítico possui inúmeras vantagens incluindo um aumento na mistura do meio reacional, transferência de calor e massa, diminuição nos tempos das reações, bem como por se tratar de um método simples e fácil para produção contínua. Porém, algumas limitações são relatadas, como ambiente severo para a reação e o efeito do gás sobre o material (BERMEJO e COCERO, 2006; MARRONE *et al.*, 2004; HODES *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2009).

As propriedades do fluido supercrítico variam com a densidade, que é uma função forte da temperatura e da pressão na região supercrítica. Isto torna os fluidos supercríticos atrativos como meios de reações químicas dando um maior controle das taxas de reação, equilíbrio, seletividade e atividade catalítica através da manipulação da temperatura e da pressão. Os estudos revelaram que técnicas e conceitos aplicados rotineiramente no estudo de reações em soluções podem ser aplicados para reações em condições supercríticas (SAVAGE *et al.*, 1995).

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). Solventes mais hidrofílicos apresentam uma tendência maior em retirar a água essencial da proteína. Este princípio pode também ser aplicado a sistemas envolvendo fluidos supercríticos. (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2000 e 2001).

A atividade enzimática depende do tipo de fluido pressurizado provavelmente como resultado de diferentes interações proteína-solvente. As interações proteína meio pressurizado que podem afetar a atividade enzimática incluem a participação 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 participação 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).

Pode-se inferir que dependendo da magnitude da pressão aplicada, a extensão das mudanças na estrutura em proteínas globulares pode ser diferente de uma enzima para outra.

Neste sentido, pode também não ocorrer mudanças significativas na estrutura da enzima mesmo a altas pressões (KUHN *et al.*, 2010).

A maioria das enzimas possui atividade bastante específica, capazes de catalisar só uma determinada reação e de fazê-la só em um tipo de meio ou substrato. Algumas enzimas são mais versáteis. Entretanto, todas as enzimas operam dentro de um limite estreito de temperatura e pH (COX, 1987). Grande parte das enzimas apresenta sua atividade ótima em uma faixa de 30 a 40°C, sendo que acima de 45°C pode ocorrer desnaturação (FENNEMA, 1993). Enquanto algumas enzimas perdem sua atividade catalítica a baixas temperaturas, outras suportam, ao menos durante um curto período de tempo um intenso tratamento térmico (BELITZ e GROSCH, 1997).

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. 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, como etapa anterior à utilização de enzimas como catalisadores de reações em FSC, de fundamental importância é a avaliação de seu comportamento nestes solventes alternativos aos orgânicos convencionais (OLIVEIRA *et al.*, 2006 a,b; PRIMO, *et al.* 2007). As enzimas podem apresentar diferentes comportamentos dependendo do solvente utilizado, mesmo quando submetidas às mesmas condições experimentais (FEIHRMANN, 2005).

A atividade da lipase *Yarrowia Lipolytica* (Yll) foi avaliada em CO₂, butano e propano pressurizado com variáveis de taxa de pressurização de 10 a 280 bar, temperatura de 35 a 75 °C, tempo de 1 a 6 horas e diferentes taxas de despressurização. Ocorreu perda significativa da atividade enzimática da lipase em CO₂. Em butano e propano não ocorreram perdas significativas de atividade (OLIVEIRA *et al.*, 2006 a).

Segundo Oliveira *et al.*(2006 b) a enzima Novozym 435 apresentou ganho de atividade em butano e propano pressurizado enquanto a enzima Lipozyme IM obteve perda de atividade. O CO₂ é o solvente que provocou a maior perda de atividade enzimática, diferente de n-butano e propano que se mostraram solventes apropriados para a utilização em reações enzimáticas em fluidos pressurizados.

O uso de fluidos comprimidos 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).

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na revisão da literatura apresentada no decorrer deste capítulo, realizou-se uma explanação sobre aplicação de pectinases, bem como a utilização de fluidos pressurizados em enzimas, e uma breve revisão sobre imobilização enzimática.

Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura a respeito de Pectinametilesterase imobilizada tratada a alta pressão com objetivo de manter ou aumentar atividade enzimática ou a sua estabilidade. Neste sentido, a contribuição do presente estudo diz respeito à imobilização de duas enzimas comerciais e posterior avaliação do comportamento da atividade e características destas enzimas quando submetidas a fluidos pressurizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentada a descrição dos materiais utilizados, dos aparatos experimentais e dos procedimentos adotados no desenvolvimento do estudo. Além disso, é apresentada a metodologia empregada para a determinação da atividade enzimática para avaliar o efeito do processamento destas com fluidos pressurizados

4.1 MATERIAIS

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® MASH e Pectinex® Ultra SP-L. Ambas são enzimas produzidas por fermentação submersa do micro-organismos *Aspergillus aculeatus* e também *Aspergillus niger*.

4.1.2 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). O CO₂ utilizado foi de procedência da White Martins S.A. (com 99,5% pureza, fase líquida)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização enzimática.

Para a caracterização parcial da enzima, realizou-se a análise do efeito do pH e temperatura na atividade enzimática, e determinou-se a taxa da reação em diferentes concentrações de substrato (pectina cítrica), as concentrações utilizadas foram baseadas em

concentrações utilizadas no laboratório para outras enzimas, obtendo-se os parâmetros de Michaelis-Menten, a velocidade máxima (V_M) de reação e a constante de afinidade (K_M) para o substrato.

4.2.1.1 Efeito de temperatura e do pH na atividade enzimática.

Para estudo do efeito da temperatura e pH na atividade enzimática utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos 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; BURKET *et al*, 2005; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

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® 7.0 Statsoft Inc. Assim foram determinados os valores ótimos de pH e temperatura para as duas enzimas avaliadas.

Tabela 2- Variáveis e níveis estudados nos planejamentos 1 e 2

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

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

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 (2,5 a 40 g.L⁻¹), os coeficientes cinéticos, velocidade máxima (V_M) e a constante de Michaelis-Menten (K_M), foram calculados. Para determinar K_M e V_M utilizou-se o método de Lineweaver-Burk, que consiste em uma linearização (Equação 1) da equação de Henri-Michaelis-Menten (Equação 2).

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Equação 1

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Equação 2

4.2.2 Imobilização com alginato de sódio e carvão ativado

A imobilização foi realizada por adsorção em carvão ativado seguida de encapsulamento em gel. O encapsulamento foi baseado na gelificação de alginato de sódio, utilizando glutaraldeído para enrijecimento do gel, carvão ativado como suporte sólido orgânico, sacarose, água e extrato enzimático das duas pectinases que foram submetidas posteriormente ao tratamento com fluidos pressurizados. A utilização da combinação alginato de sódio e glutaraldeído como suporte e agente reticulante foi baseada em estudo de Li *et al.* (2007).

A imobilização seguiu o método descrito por Risso *et al.* (2009). As concentrações de alginato, glutaraldeído e carvão ativado foram determinadas por Richeti *et al.* (2012). O processamento de imobilização está descrito a seguir.

Para o preparo da solução de gel adicionou-se 10g de água destilada a 0,26 g de alginato de sódio que foi aquecido (sem ferver) até a dissolução total do alginato. Enquanto ainda estava quente adicionou-se 6,5g de sacarose. Após o resfriamento da solução de gel acrescentou-se 3 mL de extrato enzimático, 0,65g de glutaraldeído e 0,39 g de carvão ativado.

Para a imobilização em forma de esferas, o gel contendo o extrato enzimático foi gotejado em uma solução de tampão acetato 0,1 M a pH 4,5 (o pH foi determinado durante a caracterização enzimática), cloreto de sódio 0,2 M (1:1), com 3,5% de glutaraldeído que estava mantida em banho de gelo, permanecendo sob agitação constante durante o gotejamento.

As enzimas imobilizadas foram deixadas em descanso a 6°C por 24 horas para fixação da enzima ao suporte. A seguir, foram lavadas com água destilada e tampão acetato. Com o intuito de manter a estrutura enzimática após o processo de imobilização elas foram armazenadas em uma solução de cloreto de cálcio 0,05 M e tampão acetato 0,1 M.

4.2.3 Tratamento com fluido pressurizado

O tratamento com fluidos pressurizados foi realizado para as duas enzimas comerciais, utilizando as condições de operação baseadas em dois planejamentos experimentais para cada enzima, um utilizando CO₂ como gás pressurizado e outro GLP.

4.2.3.1 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 260D), um 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 4. 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 submersa em banho de água e apoiada por um dispositivo simples, enquanto que as válvulas micrométricas ficavam localizadas fora do

banho. Uma vista geral da unidade e do reator utilizados nos experimentos pode ser verificada nas Figuras 4 e 5:

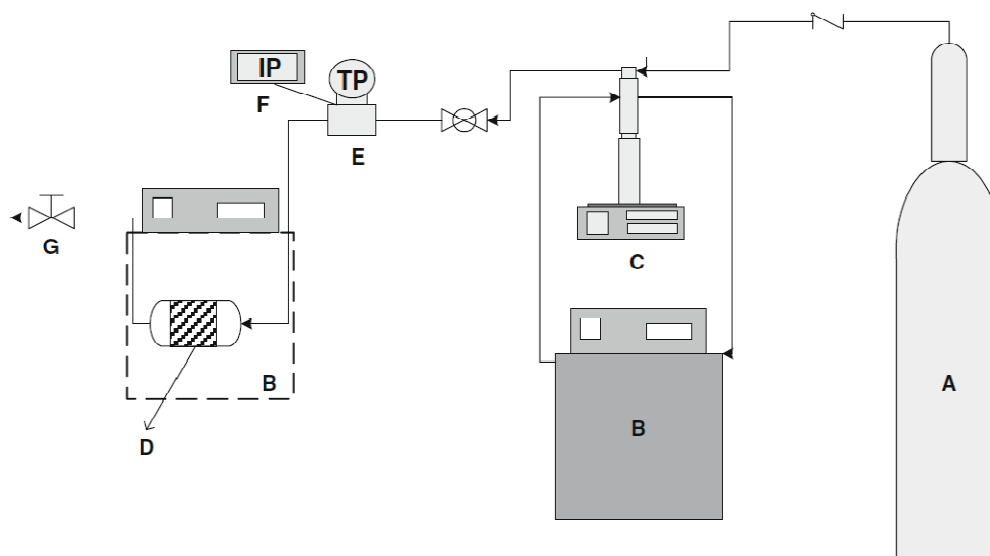


Figura 4 – Diagrama esquemático do aparato utilizado no tratamento das enzimas com o fluido pressurizado. A – reservatório de solvente; B – banho termostático; C bomba de seringa; D – célula de aço; E – transdutor de pressão; F – indicador de pressão; G – válvula micrométrica.

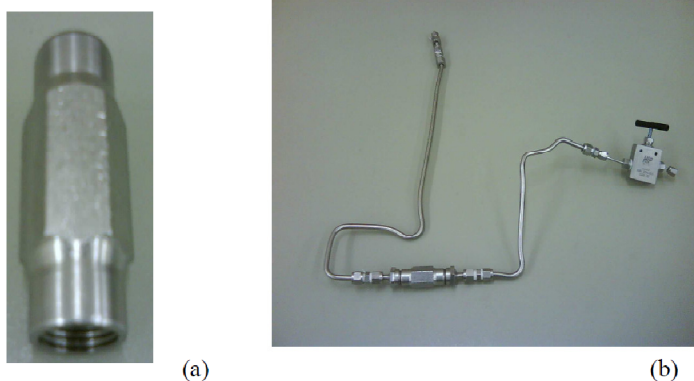


Figura 5 – Detalhes da célula de aço inoxidável com volume interno de 0,5 g (a) e da célula antes e depois de ser acoplada ao equipamento de alta pressão (b).



Figura 6 – Vista da unidade experimental utilizada no tratamento enzimático (a) e da célula já acoplada a unidade experimental e mergulhada no banho termostático (b).

4.2.3.2 Procedimento experimental

O banho termostático onde a célula foi acoplada foi ajustado a 37°C para todos os experimentos, a temperatura foi determinada com bases nos resultados obtidos nos experimentos de efeito de temperatura e pH na atividade enzimática. Quando a temperatura encontrava-se estável, a enzima imobilizada (em média 0,5g) era acondicionada na célula e esta era acoplada ao sistema. Após este procedimento, o sistema era alimentado e pressurizado com GLP ou CO₂ (a temperatura do banho para liquefazer o GLP e o CO₂ era de 5°C) até a pressão estabelecida no planejamento experimental por um tempo determinado. Depois de decorrido o tempo estipulado, o sistema era despressurizado a uma taxa também estabelecida no item 4.2.3.3.

A atividade enzimática era determinada antes (atividade inicial) e após (atividade final) ao tratamento com fluido pressurizado. A atividade residual foi determinada de acordo com o exposto na Equação 3.

$$Aividade\ residual(\%) = \frac{Atividade\ após\ pressurização}{Atividade\ antes\ da\ pressurização} \times 100$$

Equação 3

4.2.3.3 Planejamento de experimentos

Com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis do processo (pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização (R)) sobre a atividade enzimática, um planejamento composto central 2³ foi realizado. A Tabela 3 apresenta o intervalo de estudo da variáveis para enzima tratada com GLP e a Tabela 4 para a enzima tratada com CO₂.

Tabela 3 – Variáveis e níveis experimentais avaliados nos planejamentos para GLP.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Pressão (bar)	30	150	270
Tempo (horas)	1	3,5	6
R (bar/min)	20	60	100

Tabela 4 – Variáveis e níveis experimentais avaliados nos planejamentos para CO₂.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Pressão (bar)	75	175	275
Tempo (horas)	1	3,5	6
R (kg/m ³ min)	10	105	200

4.2.4 Estabilidade Enzimática Térmica.

Como o tratamento térmico é difundido na indústria alimentícia, o conhecimento da estabilidade térmica das enzimas é essencial, a fim de otimizar as condições de processamento (GUIAVARCH *et al.*, 2003; GUMMADI & PANDA, 2003; REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976; VAN DEN BROECK *et al.*, 1999).

Avaliou-se a estabilidade da PME em diversas temperaturas (-80; -18; 4; 30; 40; 50 e 60°C), para as duas enzimas na formas livre, imobilizada e imobilizada tratada com fluido pressurizado. Nas temperaturas baixas, a estabilidade foi avaliada por 100 dias, nas demais temperaturas a estabilidade foi avaliada até a enzima perder 50% da atividade. Para a avaliação da estabilidade enzimática na forma livre utilizou-se uma diluição de 1:100.

4.2.4.1 Determinação da Constante de Inativação Enzimática e do Tempo de Meia Vida

A partir dos resultados obtidos na estabilidade enzimática, foram calculados a constante de inativação térmica (K_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima para cada temperatura. A Equação 4 foi utilizada para determinar o tempo de meia vida.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k_d}$$

Equação 4

4.2.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade de pectinametilesterase (PME) foi determinada segundo método titulométrico descrito por Hultin *et al.* (1966) com modificações. A temperatura e o pH foram determinados conforme o ensaio a ser realizado, onde 30 mL de pectina cítrica foram titulados com NaOH 0,005 M até o valor de pH determinado no ensaio, sendo que a solução foi mantida a temperatura previamente estabelecida. Em seguida, um mililitro do extrato enzimático foi adicionado e, após o tempo de reação de 30 min, titulou-se novamente ao pH estipulado no ensaio. Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de 1 μmol de NaOH min^{-1} mL^{-1} , nas condições do ensaio. Atividade enzimática pode ser determinada segundo a Equação 5.

$$Atividade(U/g) = \frac{V \times N \times 10^3}{t \times m}$$

Equação 5

onde:

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio (mol/L)

V = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra

m = massa de enzima utilizada na reação (g)

t = tempo de reação (min);

1U = 1 μmol de NaOH min⁻¹g⁻¹.

4.2.6 Determinação do teor de proteína.

Para determinação do teor de proteína foi utilizado o aparelho Qubit Fluorimeter (Kit Quant-iT Protein Assay), seguindo o método descrito pelo fabricante. A curva de calibração foi obtida pela análise de padrões de albumina de soro bovino (BSA) em três concentrações (0, 200, 400 ng/μL) utilizando para cada, 190 μL da solução tampão, mais 10 μL de cada padrão, deixando-se reagir por 15 min antes da leitura. Para quantificar a proteína das amostras utilizou-se 10 μL de amostra no lugar do padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo tem por objetivo apresentar e discutir os resultados obtidos no decorrer deste trabalho. Primeiramente foi feita uma caracterização enzimática parcial das pectinases comerciais, Pectinex Ultra SP-L e Pectinex MASH, pelo estudo do efeito da temperatura e pH na atividade enzimática, determinando-se os parâmetros cinéticos K_M e V_M . Então realizou-se a imobilização das enzimas, que após foram submetidas ao tratamento com fluidos pressurizados (GLP e CO₂). Para finalizar foi avaliada a estabilidade enzimática para as enzimas na forma livre, imobilizada e imobilizada tratadas com fluidos pressurizados e determinados a constante de inativação enzimática e o tempo de meia vida.

5.1 EFEITO DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

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).

Para determinar o efeito que a temperatura e o pH causam na atividade enzimática foi realizado um planejamento de experimentos com um delineamento composto central rotacional 2², totalizando 11 experimentos.

5.1.1 Efeito da temperatura e pH para enzima Pectinex Ultra SP-L

A Tabela 5 apresenta a matriz experimental em termos de atividade de PME, para efeito de pH e temperatura, proteína e atividade específica para a enzima Pectinex Ultra SP-L. De acordo com estes resultado a maior atividade enzimática (50,70 U.mL⁻¹) foi obtida no ensaio 6, quando a medida de atividade enzimática foi realizada a uma temperatura de 55 °C e a titulação da atividade enzimática foi realizada até pH 6.

Os resultados apresentados referentes à atividade da pectinaesterase, foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta.

A Tabela 6 apresenta a análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes. Os termos significativos no modelo codificado (equação) foram selecionados pelo valor de p, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 5 -Matriz do DCCR (valores reais) com a resposta em termos de atividade enzimática para enzima pectinesterase (PME) em função de pH e temperatura para a enzima comercial Pectinex Ultra SP-L

Pectinex Ultra SP-L PME					
Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atv. Exp (U.mL ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Atividade Específica (U/mg)
1	-1 (3,4)	-1 (37)	25,00	0,018	1250
2	1 (5,5)	-1 (37)	50,50	0,19	2525
3	-1 (3,4)	1 (73)	0	0,017	0
4	1 (5,5)	1 (73)	1,30	0,018	65
5	-1,41 (3,0)	0 (55)	0,77	0,018	38
6	1,41 (6,0)	0 (55)	50,70	0,019	2535
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	16,70	0,017	835
8	0 (4,5)	1,41 (80)	0	0,018	0
9	0 (4,5)	0 (55)	43,20	0,019	2160
10	0 (4,5)	0 (55)	44,10	0,018	2205
11	0 (4,5)	0 (55)	44,90	0,019	2245

Tabela 6 – Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para a enzima 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

A Tabela 7 apresenta a análise da variância (ANOVA) e foi empregada para a validação do modelo matemático codificado usado para a predição da atividade de PME, para Pectinex 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 do modelo.

Tabela 7 – ANOVA para a atividade enzimática PME como resposta para o DCCR para a enzima 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	
Total	4870,04	10		

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

$$Atv\ PME(ultra) = 44,05 + 12,19 * pH - 8,63 * pH^2 + 12,25 * T - 17,38 * T^2 - 6,05 * pH * T$$

Equação 6

O modelo codificado otimizado para atividade enzimática, apresentado na Equação 6, foi validado pela análise de variância (ANOVA). O coeficiente de determinação obtido (0,96) e o F calculado (7,52) 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 7- a) e a curva de contorno (Figura 7 - b) 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.

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.

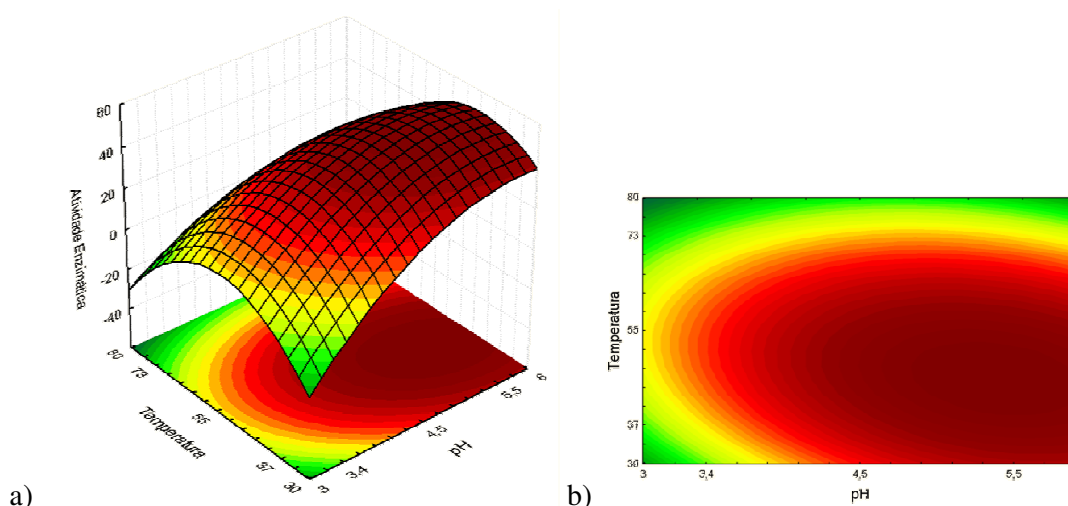


Figura 7 -a) Superfície de resposta; b) Curva de contorno para Atividade Enzimática PME enzima Pectinex Ultra SP-L.

5.1.2 Efeito da temperatura e pH para enzima Pectinex Mash

Na Tabela 8 apresenta a matriz experimental em termos de atividade de PME, proteína e atividade específica para enzima Pectinex Mash. A maior atividade (42 U.mL^{-1}) foi obtida no ensaio 6, nas mesmas condições da enzima Pectinex Ultra SP-L.

Realizou-se o tratamento estatístico dos dados da Tabela 8, obtendo-se os efeitos apresentados na Tabela 9. Visualizando a tabela verifica-se com um nível de 95% de significância que o pH apresentou influência positiva e a temperatura influenciou negativamente a atividade enzimática para PME (Enzima Pectinex Mash). A partir dos coeficientes de regressão obteve-se o modelo matemático empírico apresentado na Equação 7.

A análise de variância (ANOVA) dos fatores estudados foi realizada e está expressa na Tabela 10. O modelo foi validado, podendo assim gerar a superfície de resposta e a curva de contorno (Fig 8 a-b), onde podem ser visualizadas uma faixa ótima de pH e temperatura para atividade enzimática. Pelos mesmos motivos apresentados para enzima Pectinex Ultra SP-L os próximos experimentos foram realizados em pH 4,5 e em temperatura 55 °C.

Tabela 8 - Matriz do DCCR (valores reais) com a resposta em termos de atividade enzimática para enzima polimetilgalacturonase (PME) em função de pH e temperatura para a enzima comercial Pectinex Mash.

Pectinex Mash PME					
Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atv. Experital (UmL ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Atividade Específica (U/mg)
1	-1 (3,4)	-1 (37)	15,2	0,017	760
2	1 (5,5)	-1 (37)	32,4	0,018	1620
3	-1 (3,4)	1 (73)	5,3	0,019	265
4	1 (5,5)	1 (73)	4,1	0,018	205
5	-1,41 (3,0)	0 (55)	10,9	0,019	545
6	1,41 (6,0)	0 (55)	42	0,019	2100
7	0 (4,5)	-1,41 (30)	41	0,017	2050
8	0 (4,5)	1,41 (80)	2,8	0,016	140
9	0 (4,5)	0 (55)	39,7	0,019	1985
10	0 (4,5)	0 (55)	34,4	0,018	1720
11	0 (4,5)	0 (55)	39,1	0,018	1955

Tabela 9 – Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para a enzima Pectinex Mash.

	Efeito	Erro Padrão	p
Média	37,77	4,76	5.10^{-3}
pH Linear (pH)	15,0074	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

$$Atv\ PME(mash) = 37,77 + 7,05 * pH - 8,17 * pH^2 - 11,54 * T - 10,46 * T^2 - 4,6 * pH * T$$

Equação 7

Tabela 10 – ANOVA para a atividade enzimática PME como resposta para o DCCR para a enzima Pectinex Mash

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	2625,00	5	525	31,01
Resíduo	84,64	5	16,93	
Total	2709,64	10		

Coefficiente de correlação: $R=0,93$, $F_{0,95;5;5} = 5,05$

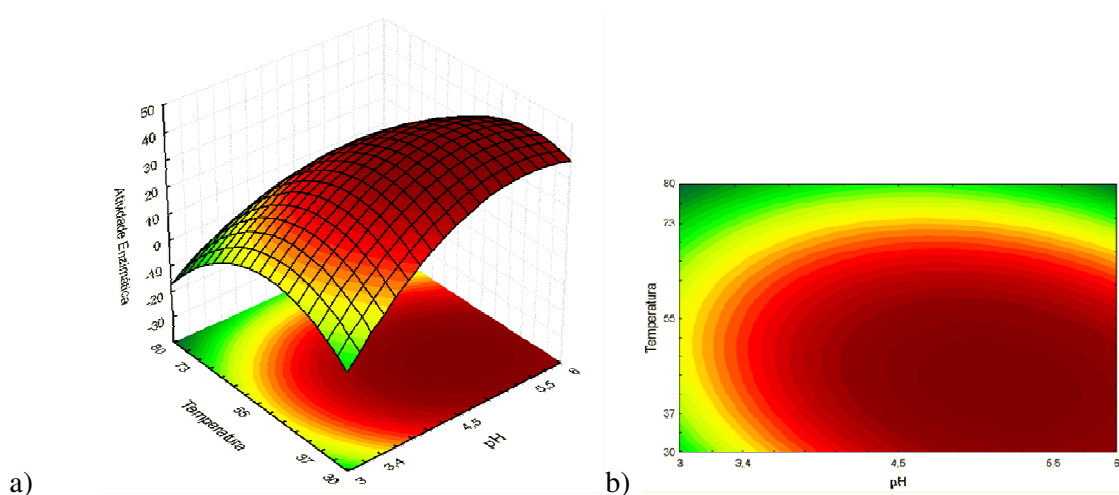


Figura 8 - a) Superfície de resposta; b) Curva de contorno para Atividade Enzimática PME enzima Pectinex Mash

Os resultados de temperatura e pH ótimos para os dois preparados enzimáticos estão próximos aos encontrados na literatura. Gonzalez (2009), encontrou 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. E no trabalho realizado foi encontrada uma faixa ótima quando o pH estava acima 4,5 até 6 e com temperatura entre 30 e 55°C.

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., (2007) 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 duas PMEs em estudo, o pH ótimo encontra-se entre 4 e 6.

A atividade em temperaturas altas é uma propriedade desejável, especialmente para a aplicação em indústrias de processamento de frutas, como clarificação de suco de maçã (KASHYAP *et al.*, 2001; FAWOLE & ONDUFA, 2003).

5.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS K_M E $V_{MÁX}$

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

Uma faixa de 2,5 a 40 g.L⁻¹ de concentração de pectina cítrica foi utilizada para ver qual o efeito causado na atividade enzimática, podendo assim obter-se os valores de K_M e V_M . Para a enzima Pectinex Ultra SP-L obteve-se um valor de 2,25 mg mL⁻¹ e 0,75 μmol.mL⁻¹. min⁻¹ para K_M e V_M respectivamente, e para Pectinex Mash 5,42 mg mL⁻¹ e 1,80 μmol mol.mL⁻¹. min⁻¹.

Leite *et al.* (2006) encontraram valores de 0,23 e 0,32 mg mL⁻¹ para K_M e 0,244 e 0,053 μmol mL⁻¹ min⁻¹ para PME extraída de goiaba. Arbaisah *et al.* (1997) avaliaram duas pectinametilesterases e encontraram valores de K_M 0.52 mg mL⁻¹ e 0,0843 mg mL⁻¹ e velocidades máximas de 154 μmol mg⁻¹ min⁻¹ e 726 μmol mg⁻¹ min⁻¹.

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).

No trabalho realizado a enzima apresentou uma menor afinidade pelo substrato do que os resultados apresentados na literatura, isso pode ter ocorrido pelo fato de não ter sido realizado um estudo prévio para saber em qual substrato a enzima melhor agiria.

5.3 IMOBILIZAÇÃO E TRATAMENTO A ALTA PRESSÃO

Nesta etapa são demonstrados e discutidos os resultados obtidos para atividade enzimática das pectinameteliesterase. As duas enzimas, Pectinex Ultra SP-L e a Pectinex Mash, foram imobilizadas e submetidas ao tratamento com fluidos pressurizados (GLP e CO₂).

5.3.1 Imobilização

Após a imobilização foram medidas a atividade enzimática e o teor de proteína, determinando-se a atividade específica das enzimas. Com a imobilização, a atividade das duas enzimas diminuiu, os resultados estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11 – Comparação da atividade enzimática na forma livre e imobilizada

	Enzima Livre			Enzima Imobilizada		
	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade (U/g)	Proteína (mg/g)	Atividade Específica (U/mg)
Pectinex MASH	39,5	0,018	1975	12,23	0,018	611,5
Pectines Ultra SP-L	44,2	0,017	2210	2,87	0,016	179,4

Pode-se perceber que depois de imobilizada, houve grande redução da atividade específica, possivelmente devido à resistência difusional causada pelo gel.

5.3.2 Avaliação do efeito do tratamento CO₂ nas duas enzimas

A pectinase Pectinex Ultra SP-L e a Pectinex Mash, previamente imobilizadas foram submetidas ao tratamento em fluidos pressurizado (CO₂). A atividade enzimática, o teor de

proteína e a atividade específica foram determinados logo após a imobilização e ao tratamento com CO₂ pressurizado.

Tabela 12- Atividade relativa residual, proteína e atividade enzimática específica, para pectinase Pectinex Ultra SP-L após tratamento enzimático.

Pectinex Ultra SP-L Tratada com fluido pressurizado CO ₂						
Ensaio	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (kg m ⁻³ min ⁻¹)	At. Rl. Residual (%)	Proteína (mg/g)	At. Específica (U/mg)
1	75(-1)	1 (-1)	10 (-1)	0,75	0,011	2,28
2	75(-1)	1 (-1)	200 (1)	0,82	0,011	2,37
3	75(-1)	6 (1)	10 (-1)	0,77	0,009	2,32
4	75(-1)	6 (1)	200 (1)	0	0,012	0
5	275(1)	1 (-1)	10 (-1)	0	0,008	0
6	275(1)	1 (-1)	200 (1)	1,28	0,011	3,28
7	275(1)	6 (1)	10 (-1)	0	0,012	0
8	275(1)	6 (1)	200 (1)	0	0,009	0
9	175(0)	3,5 (0)	105 (0)	0	0,010	0
10	175(0)	3,5 (0)	105 (0)	0	0,009	0
11	175(0)	3,5 (0)	105 (0)	0	0,011	0

Atividade Enzimática Inicial = 2,76 (U/g)

Tabela 13 - Atividade relativa residual, proteína e atividade enzimática específica, para pectinase Pectinex Mash após tratamento enzimático.

Pectinex Mash Tratada com fluido pressurizado CO ₂						
Ensaio	Pressão (bar)	Tempo (hora)	R (kg m ⁻³ min ⁻¹)	At. Rl. Residual (%)	Proteína (mg/g)	At. Específica (U/mg)
1	75(-1)	1 (-1)	10 (-1)	10,69	0,021	65,059
2	75(-1)	1 (-1)	200 (1)	3,90	0,019	23,73
3	75(-1)	6 (1)	10 (-1)	2,87	0,022	17,40
4	75(-1)	6 (1)	200 (1)	1,62	0,018	9,84
5	275(1)	1 (-1)	10 (-1)	1,78	0,019	10,86
6	275(1)	1 (-1)	200 (1)	9,71	0,021	59,11
7	275(1)	6 (1)	10 (-1)	0,35	0,022	2,15
8	275(1)	6 (1)	200 (1)	0,20	0,020	1,25
9	175(0)	3,5 (0)	105 (0)	1,053	0,021	6,40
10	175(0)	3,5 (0)	105 (0)	1,069	0,022	6,50
11	175(0)	3,5 (0)	105 (0)	1,21	0,021	7,35

Atividade Enzimática Inicial = 12,76 (U/g)

Os resultados obtidos para atividade da enzima Pectinex Ultra SP-L e Pectinex MASH submetidos a CO₂ supercrítico são apresentados na Tabela 12 e 13 respectivamente. Verifica-se que não houve aumento de atividade enzimática, e em quase todos os experimentos com a enzima Pectinex Ultra SP-L a enzima foi inativada.

Quando as enzimas são expostas aos fluidos pressurizados, sua estrutura externa tende a ficar mais rígida, essa rigidez pode favorecer a desnaturação, e por consequência, ocasionar perda de atividade (KNEZ, 2009).

O CO₂ é um solvente hidrofílico, possui a capacidade de retirar a água essencial para a manutenção da atividade da enzima causando a desnaturação desta por uma mudança conformacional levando, conseqüentemente, à uma perda de atividade. (KAMAT *et al.*, 1995). Possivelmente as enzimas estudadas neste trabalho podem ter apresentado perda de atividade por esse motivo, pois para Knez e Habulin (2001) solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, como é o caso do CO₂, tendem a retirar água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática.

Outro fator que deve ser levado em conta é o suporte utilizado para imobilização. A natureza do suporte usado para imobilizar uma enzima tem um importante papel na determinação da participação da água entre enzima, solvente e suporte e, conseqüentemente, na atividade da enzima. A imobilização em suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade enzimática, devido a mudanças conformacionais. (DALLA VECHIA *et al.* 2004). Segundo Feihrmann, (2005) a enzima Novozym 435, e a *Yarrowia lipolytica* apresentaram perda de atividade quando exposta ao tratamento com CO₂, o que pode ter ocorrido por uma não ocorrer uma boa interação entre a enzima/suporte/solvente.

A PME é inativada por calor nos processos convencionais de preservação, os quais levam a efeitos prejudiciais no sabor, cor e qualidade nutricional (HENDRICKX *et al.*, 1998). Tem sido reportado que tratamentos sob pressões podem inativar parcialmente (acima de 90%) a PME da laranja (HENDRICKX *et al.*, 1998; OGAWA *et al.*, 1990), a qual não é reativada durante o armazenamento e transporte. Neste sentido, pode-se observar a relevância da investigação de PME utilizando CO₂ como fluido supercrítico.

5.3.3 Avaliação do efeito do tratamento GLP nas duas enzimas

Nesta etapa são apresentados os resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da PME para Pectinex Ultra SP-L e Pectinex MASH, na forma imobilizada submetida ao GLP pressurizado.

5.3.3.1 *Pectinex Ultra SP-L*

Os resultados obtidos para a pectinase Pectinex Ultra SP-L imobilizada após processamento em GLP pressurizado são apresentados na Tabela 14. Pode-se verificar que não houve um aumento da atividade enzimática, assim como quando pressurizado com CO₂, porém a atividade residual foi superior a obtida anteriormente, realizando-se assim o tratamento estatístico. De acordo com a Tabela 13, a maior atividade relativa residual foi obtida no ensaio 6 (Pressão = 270; Tempo = 1h; R=100 bar.min⁻¹) com 63%, e a menor atividade relativa residual ocorreu no experimento 3 (Pressão = 30; Tempo = 1h; R=20 bar.min⁻¹), onde observamos que a pressão e a taxa de despressurização afetam a atividade enzimática.

Tabela 14 – Atividade relativa residual, proteína e atividade enzimática específica, para Pectinex Ultra SP-L após tratamento com fluido pressurizado (GLP).

Ensaio	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (bar.min ⁻¹)	At. Rl. Residual (%)	Proteína (mg/g)	At. específica (U/mg)
1	30(-1)	1 (-1)	20 (-1)	22,87	0,011	69,02
2	30(-1)	1 (-1)	100 (1)	17,34	0,013	50,21
3	30(-1)	6 (1)	20 (-1)	4,11	0,012	12,42
4	30(-1)	6 (1)	100 (1)	17,89	0,011	51,76
5	270(1)	1 (-1)	20 (-1)	36,38	0,012	74,86
6	270(1)	1 (-1)	100 (1)	63,06	0,009	161,20
7	270(1)	6 (1)	20 (-1)	6,92	0,010	20,04
8	270(1)	6 (1)	100 (1)	46,21	0,010	154,87
9	150(0)	3,5 (0)	60 (0)	20,61	0,011	53,18
10	150(0)	3,5 (0)	60 (0)	22,36	0,012	58,50
11	150(0)	3,5 (0)	60 (0)	25,69	0,011	63,99

Atividade Enzimática Inicial = 2,76 (U/g)

Com a análise estatística dos dados apresentados na Tabela 14, obteve-se a tabela de efeitos (Tabela 15). Observa-se que todas as variáveis apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$), demonstrando que com aumento da taxa de despressurização e da pressão e diminuição do tempo, maior será atividade residual relativa. Foi possível a validação do modelo para atividade residual relativa pela análise de variância (Tabela 16), em função de tempo, pressão e taxa de despressurização. Com o modelo validado foi possível construir as superfícies de resposta juntamente com as curvas de contorno apresentadas na Figura 9.

Tabela 15 – Análise dos efeitos para termos lineares e de interação das variáveis independentes para atividade da pectinase Pectinex Ultra SP-L em termos de pressão, taxa de despressurização e tempo, com GLP utilizado como fluido pressurizado.

	Efeito	Erro Padrão	p
Média	25,77	1,10	<0,01
Taxa de despressurização R	18,55	2,58	<0,01
Tempo	-16,13	2,58	<0,01
Pressão	22,58	2,58	<0,01
R x tempo	7,98	2,58	0,04
R x pressão	14,43	2,58	0,01
tempo x pressão	-7,02	2,58	0,05

$$A = 25,77 + 9,28 \times R - 8,06 \times t + 11,29 \times P + 3,99 \times R \times t + 7,21 \times R \times P - 3,51 \times t \times P$$

Equação 8

Tabela 16 – Análise de variância (ANOVA) para Pectinex Ultra SP-L em GLP pressurizado

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	2871,89	6	478,64	36,0
Resíduo	53,17	4	13,29	
Total	2925,06	10		

$$R^2 = 0,98 \quad F_{0,95} = 6,16$$

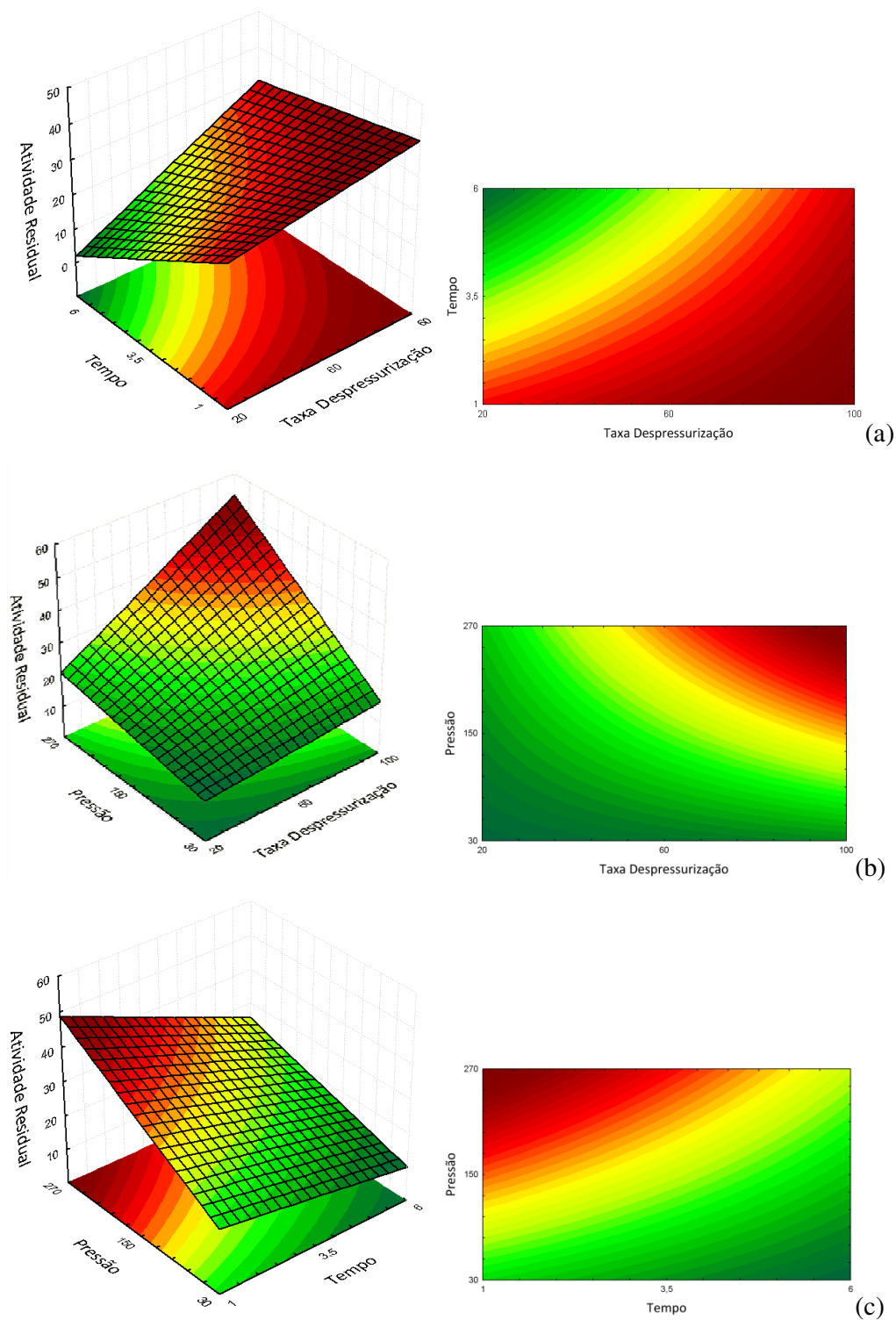


Figura 9-Superfícies de resposta e curvas de contorno para enzima Pectinex Ultra SP-L submetidas ao tratamento com GLP pressurizado: (a) taxa de despressurização (R) e tempo; (b) taxa de despressurização e pressão; (c) tempo e pressão.

5.3.3.2 *Pectinex MASH*

Os resultados obtidos para a pectinase Pectinex MASH imobilizada após ser submetida ao processo de pressurização com GLP são apresentados na Tabela 17. O maior ganho de atividade residual se deu no experimento 6 (Pressão = 270 bar; Tempo = 1 h; R = 100 bar.min⁻¹) com 117%.

Tabela 17 - Atividade relativa residual, proteína e atividade enzimática específica, para Pectinex MASH após tratamento com fluido pressurizado (GLP).

Ensaio	Pressão (bar)	Tempo (h)	R (kg m ⁻³ min ⁻¹)	Ativ. Rl. Residual (%)	Proteína (mg/g)	At. específica (U/mg)
1	30(-1)	1 (-1)	20 (-1)	49,37	0,021	300,41
2	30(-1)	1 (-1)	100 (1)	56,28	0,019	342,43
3	30(-1)	6 (1)	20 (-1)	18,76	0,022	114,17
4	30(-1)	6 (1)	100 (1)	26,52	0,019	161,46
5	270(1)	1 (-1)	20 (-1)	49,27	0,019	299,80
6	270(1)	1 (-1)	100 (1)	117,24	0,018	713,38
7	270(1)	6 (1)	20 (-1)	21,18	0,023	128,87
8	270(1)	6 (1)	100 (1)	47,71	0,021	290,32
9	150(0)	3,5 (0)	60 (0)	65,01	0,019	395,59
10	150(0)	3,5 (0)	60 (0)	65,08	0,019	396,01
11	150(0)	3,5 (0)	60 (0)	65,77	0,020	400,21

Atividade Enzimática Inicial = 12,76 (U/g)

Os dados apresentados na Tabela 17 foram tratados estatisticamente e estão apresentados na Tabela 18. É possível observar que das variáveis estudadas no tratamento com GLP apenas a variável taxa de despressurização apresentou efeito significativo ($p < 0,1$) positivo, a variável tempo efeito significativo ($p < 0,1$) negativo. Podendo assim dizer que com aumento da taxa de despressurização e diminuição do tempo pode ocorrer um aumento na atividade residual.

Com o tratamento estatístico foi possível a validação do modelo empírico para a atividade residual relativa da enzima Pectinex MASH, em função de pressão, do tempo e da taxa de despressurização (R).

Tabela 18 - Análise dos efeitos para termos lineares e de interação das variáveis independentes para atividade da pectinase Pectinex MASH em termos de pressão, taxa de despressurização e tempo, com GLP utilizado como fluido pressurizado.

	Efeito	Erro Padrão	p
Média	52,93	4,41	<0,01
Taxa de despressurização R (kg m ⁻³ min ⁻¹)	27,29	10,33	0,06
Tempo (Hora)	-39,50	10,33	0,02
Pressão (Bar)	21,12	10,33	0,11
R (kg m ⁻³ min ⁻¹) x Tempo (Hora)	-10,14	10,33	0,38
R (kg m ⁻³ min ⁻¹) X Pressão (Bar)	19,96	10,33	0,12
Tempo (Hora) X Pressão (Bar)	-9,31	10,33	0,42

O modelo codificado otimizado pra GLP é mostrado na Equação 9, sendo que foi validado pela análise de variância (ANOVA, Tabela 19), o coeficiente de determinação obtido (0,88) e o F calculado (1,3 vezes maior que o F tabelado) permitiram a validação do modelo com 90 % de confiança. Com o modelo validado foi possível construir as superfícies de resposta juntamente com as curvas de contorno apresentadas na Figura 10.

$$A = 52,93 + 13,65 \times R - 19,75 \times t + 10,56 \times P - 5,07 \times R \times t + 9,98 \times R \times P - 4,66 \times t \times P$$

Equação 9

Tabela 19- Análise de variância (ANOVA) para Pectinex MASH em GLP pressurizado

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	6678,14	6	1113,02	5,21
Resíduo	854,35	4	213,59	
Total	7532,49	10		

$$R^2=0,88 \quad F_{0,90;6;4}=4,0$$

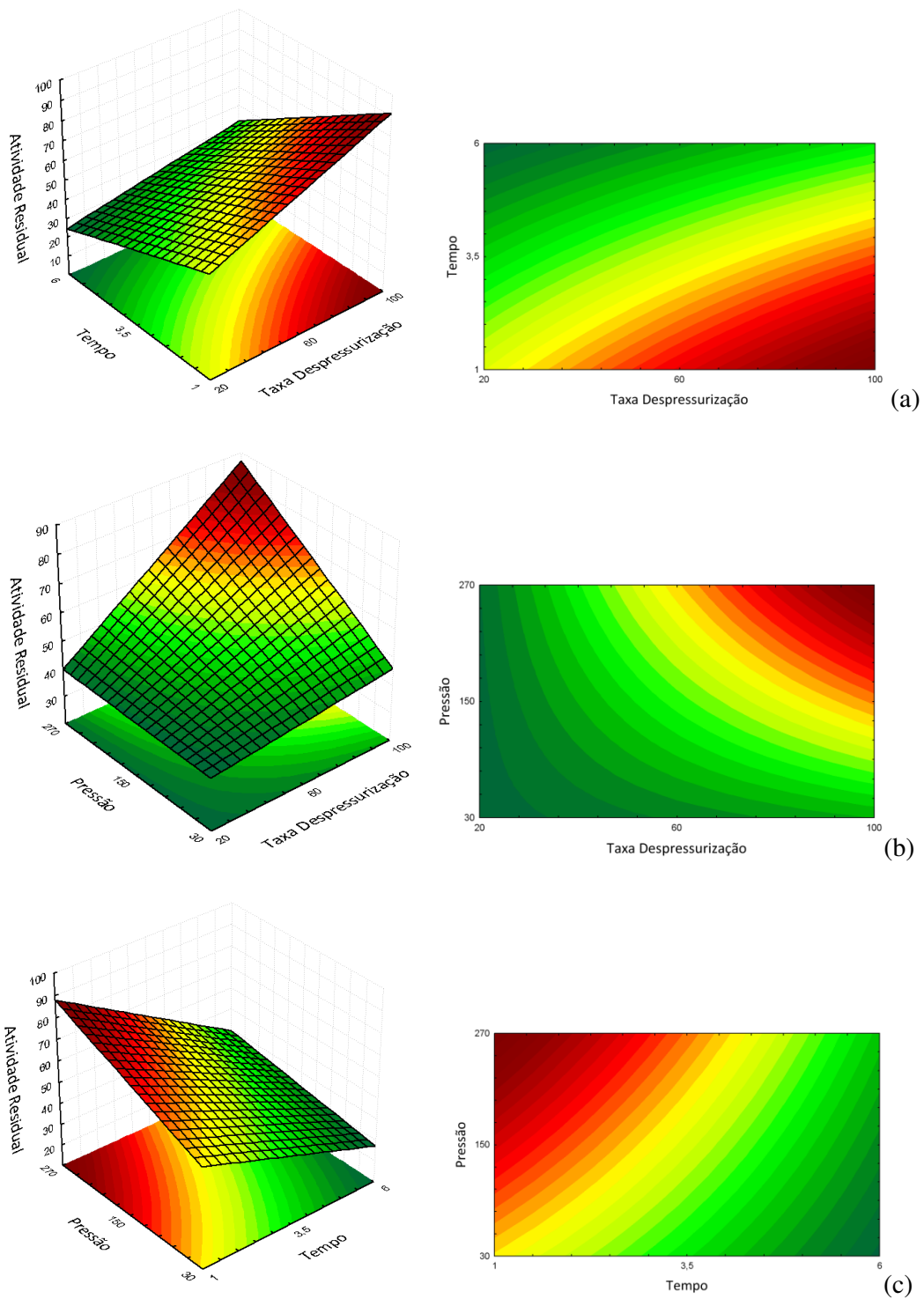


Figura 10-Superfícies de resposta e curvas de contorno para enzima Pectinex Ultra SP-L submetidas ao tratamento com GLP pressurizado: (a) taxa de despressurização (R) e tempo; (b) taxa de despressurização e pressão; (c) tempo e pressão.

As duas enzimas apresentaram comportamentos semelhantes para as três variáveis. A taxa de despressurização apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,1$), e o tempo apresentou efeito significativo negativo ($p < 0,1$), demonstrando que maiores atividades residuais são obtidas quando o tempo de exposição da enzima à pressão é pequeno e a uma despressurização rápida do sistema.

De acordo com Knez *et al.* (2004) 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 desnaturação de proteína induzida por pressão foi um tópico de pesquisa importante em anos recentes e em alguns estudos, a desnaturação pela ação da pressão parece ser um processo reversível, diferente da desnaturação causada por temperatura (JACKSON & ELLER, 2006)

Oliveira *et al.* (2006a) 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 quando estas foram expostas por menor tempo (1 hora) ao GLP do que quando exposta em gases puros. Resultados parecidos foram encontrados neste trabalho onde o melhor resultado foi encontrado quando a enzima foi submetida por apenas 1 hora ao GLP.

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 a, b; FRICKS et al., 2006)

A redução da atividade enzimática de enzimas imobilizadas pode ser devido à dificuldade encontrada pelo gás para transpor o suporte de imobilização, devido a mudanças conformacionais. (NAKAMURRA et al., 1996;1997)

5.4 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

A estabilidade enzimática foi avaliada para enzima livre, enzima imobilizada e para enzima imobilizada tratada com GLP pressurizado. Como as enzimas tratadas com CO₂ tiveram grande perda de atividade, o estudo de estabilidade não foi realizado.

A estabilidade após tratamento com fluidos pressurizados foi avaliada no ponto em que a enzima teve menor perda ou maior ganho de atividade. Como as duas pectinases obtiveram os melhores resultados nas mesmas condições experimentais, as condições avaliadas foram as mesmas, utilizando-se uma pressão de 270 bar, por 1 hora e a despressurização foi realizada com uma taxa de 100 bar.min⁻¹.

5.4.1 Estabilidade a baixas temperaturas.

Os resultados obtidos durante o teste de estabilidade enzimática da PME em função do tempo, para temperaturas de 4; -18 e -80 °C estão apresentados na Figuras 11 e 12 para a enzima Pectinex MASH e Pectinex Ultra SP-L, respectivamente, nas 3 formas estudadas.

A Figura 11 mostra a estabilidade da Enzima Pectinex MASH em temperaturas baixas na forma livre, imobilizada e imobilizada tratada com GLP pressurizado. A enzima foi monitorada durante 100 dias, período este em que a enzima manteve sua atividade apesar de ter ocorrido algumas oscilações.

Na Figura 12 pode se observar que as enzimas mantidas na temperatura de -80°C mantiveram a estabilidade, mas nas demais temperaturas ocorreu um decréscimo na atividade enzimática. A enzima na forma livre mantida a -18°C apresentou uma diminuição considerável no 1º dia de armazenamento (25%), depois de dez dias, as enzimas na forma

imobilizada e pressurizada mantidas a -18°C também apresentaram uma perda da atividade. Para as enzimas mantidas a 4°C , a forma livre foi a que menos perdeu atividade, quando comparada com as outras duas formas. Porém em nenhuma forma de armazenamento decréscimos maiores que 50% foram observados.

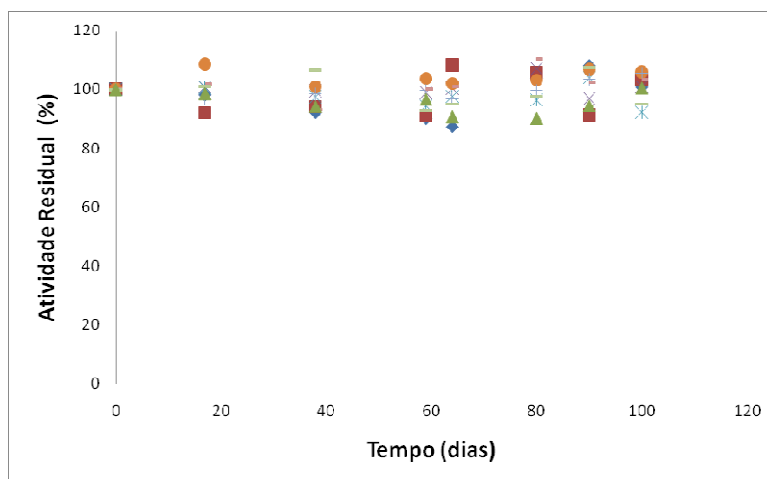


Figura 11 - Estabilidade da Pectinex MASH, (◆) 4°C Livre; (■) 4°C Imobilizada; (▲) 4°C Pressurizada; (X) -18°C Livre; (⋈) -18°C Imobilizada; (●) -18°C Pressurizada; (-) -80°C Imobilizada; (+) -80°C Livre; (-) -80°C Pressurizada.

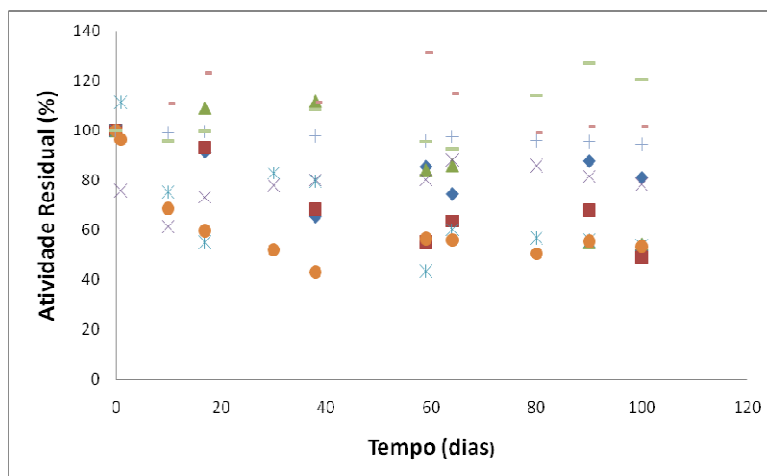


Figura 12 - Estabilidade da Pectinex Ultra SP-L, (◆) 4°C Livre; (■) 4°C Imobilizada; (▲) 4°C Pressurizada; (X) -18°C Livre; (⋈) -18°C Imobilizada; (●) -18°C Pressurizada; (-) -80°C Imobilizada; (+) -80°C Livre; (-) -80°C Pressurizada;

Comparando as duas figuras pode-se perceber que a enzima Pectinex MASH possui uma maior estabilidade em baixas temperaturas enquanto a enzima Pectinex Ultra SP-L não.

5.4.2 Estabilidade a altas temperaturas.

A estabilidade térmica em temperaturas altas (30, 40, 50 e 60°C) está representada nas Figuras 13 a 16. Na Figura 13 estão representados os resultados para a temperatura de 30°C.

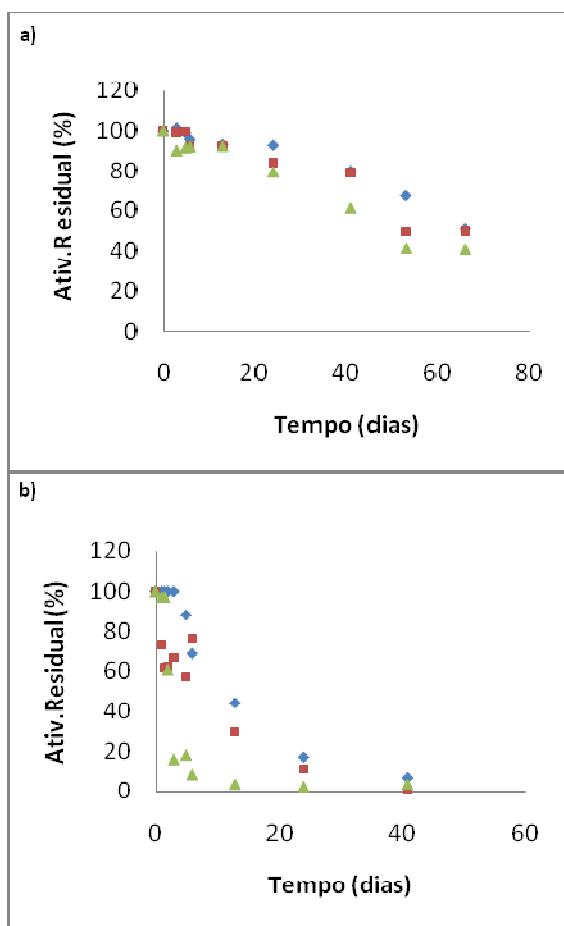


Figura 13 – Estabilidade enzimática na temperatura 30°C: a) Pectinex MASH b) Pectinex Ultra SP-L. (♦) Livre; (■) Imobilizada; (▲) Pressurizada.

Pode-se verificar que a enzima Pectinex MASH apresentou comportamento semelhante para as três formas da enzima, mas a enzima Pectinex Ultra SP-L apresentou comportamento diferenciado, onde a enzima imobilizada apresentou um decréscimo (30%) no primeiro dia e manteve-se estável por 2 dias, enquanto que a enzima na forma imobilizada submetida ao tratamento com fluido pressurizado apresentou apenas no 2° porém perdeu atividade mais rapidamente. No 3° dia esta mantinha apenas 15% da atividade residual, enquanto a atividade da enzima livre diminuiu somente a partir do 5° dia de armazenamento.

A Figura 14 apresenta os resultados de estabilidade a 40°C, onde pode se observar que a enzima Pectinex MASH na forma livre teve um decréscimo na atividade maior que 50% depois de 24 dias de armazenamento, enquanto que nas outras duas formas este percentual é apresentado com apenas 6 dias de estocagem. A enzima Pectinex Ultra SP-L na mesma forma livre foi a primeira a ter a sua atividade reduzida, em 12 horas de armazenamento apresentava menos de 50% da atividade inicial, a enzima na forma imobilizada apresentou essa diminuição após 24 horas, e a enzima pressurizada teve um comportamento semelhante com a mantida a 30°C só ocorrendo decréscimo a partir do 2° dia de armazenamento.

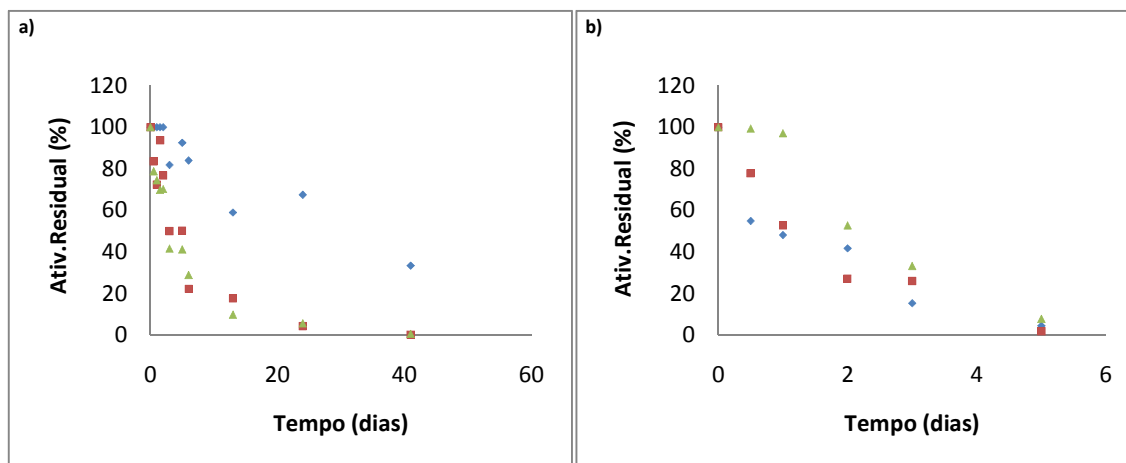


Figura 14 - Estabilidade enzimática na temperatura 40°C: a) Pectinex MASH b) Pectinex Ultra SP-L. (◆) Livre; (■) Imobilizada; (▲) Pressurizada.

A Figura 15 apresenta a estabilidade das enzimas a 50°C. Observa-se que nenhuma manteve a atividade por mais de 6 horas. A 50°C a primeira a reduzir mais de 50% da

atividade inicial foi a enzima na forma livre, perto de 2 horas de incubação para enzima Pectinex MASH, e alguns minutos para a Pectinex Ultra SP-L. As enzimas Pectinex MASH na forma imobilizada e imobilizada pressurizada apresentaram uma diminuição de atividade semelhante, sendo que só sofreram uma redução de mais de 50% da atividade após 4 horas de exposição. A enzima Pectinex UltraSP-L na forma imobilizada apresentou mais de 50% de queda na atividade depois de 2 horas de incubação, enquanto que a enzima imobilizada pressurizada apresentou redução depois de 4 horas de exposição à temperatura.

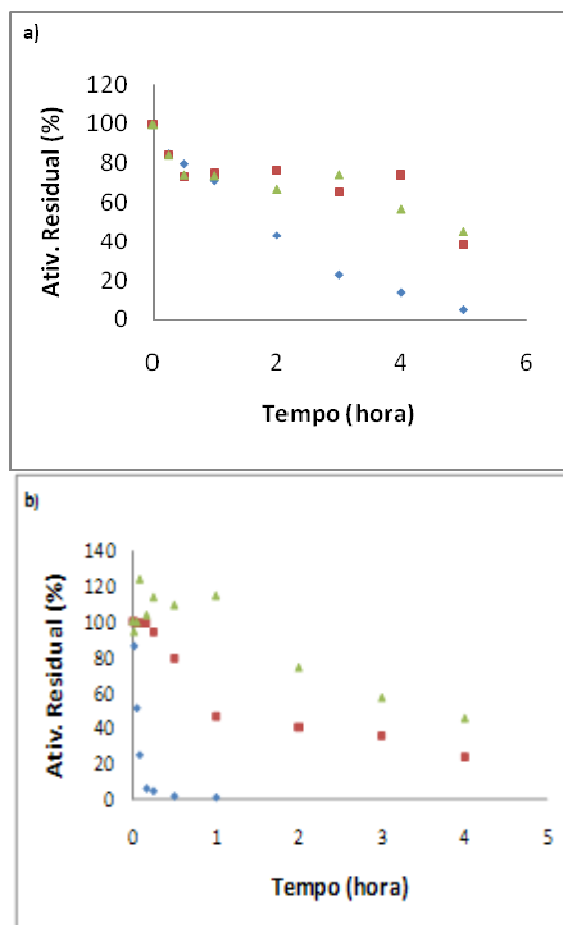


Figura 15 - Estabilidade enzimática na temperatura 50°C: a) Pectinex MASH b) Pectinex Ultra SP-L. (♦) Livre; (■) Imobilizada; (▲) Pressurizada.

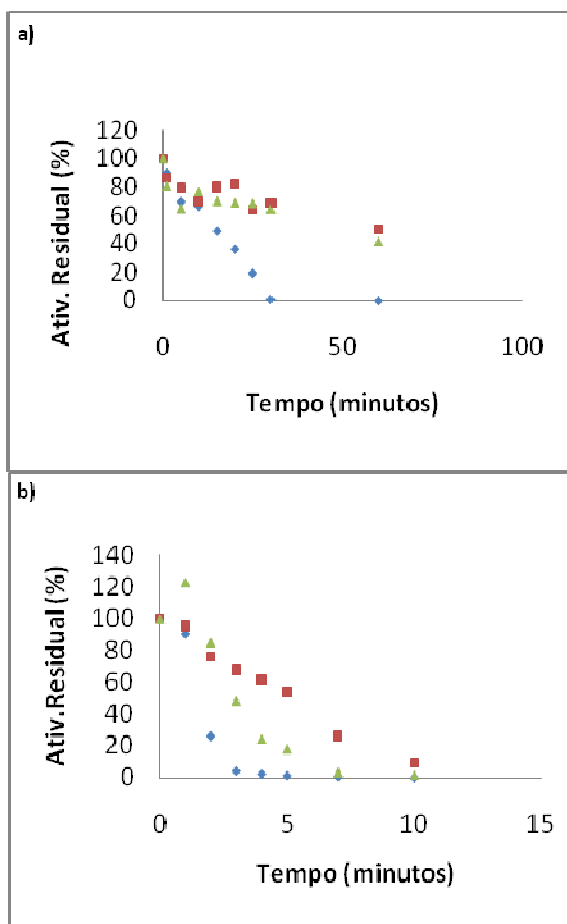


Figura 16 - Estabilidade enzimática na temperatura 60°C: a) Pectinex MASH b) Pectinex Ultra SP-L. (♦) Livre; (■) Imobilizada; (▲) Pressurizada.

Na figura 16 estão relatados os resultados do armazenamento das enzimas as 60°C. Todas as formas das enzimas apresentaram queda na atividade enzimática desde o primeiro minuto de exposição à temperatura, as formas livres de Pectinex MASH e ULTRA SP-L foram inativadas em 30 e 7 minutos, respectivamente. Com 10 minutos de exposição, a enzima Pectinex Ultra SP-L não apresentava mais atividade em nenhuma das formas estudadas, enquanto que a enzima Pectinex MASH apresentou diminuição de mais de 50 % da atividade total depois de uma hora de estocagem.

Com os resultados apresentados pode-se concluir que a atividade enzimática varia de forma significativa dependendo da enzima, da temperatura e da forma que a enzima se apresenta.

Glinka e Liao (2011) realizaram um estudo de estabilidade térmica durante 5 e 10 minutos para uma enzima produzida por *Fusarium asiaticum*, nas temperaturas entre 25°C e 55°C a enzima permaneceu estável. Na temperatura de 65°C após 10 minutos a enzima foi inativada. A PME de *A. oryzae* permaneceu estável a temperaturas de até 55 ° C e inativada acentuadamente a temperaturas mais elevadas (Kitamoto et al. 1999). Dirix et al. (2005) relataram que, após tratamento para 15 min a 50 ° C, 57% da atividade inicial é mantida, enquanto apenas 3% da atividade permanece após 15 min a 55 ° C.

Vivar-Vera *et al* (2007) ao avaliar a estabilidade enzimática de *Crataeys pubescens* encontrou resultados semelhantes para temperatura de 60°C onde a enzima perdeu mais de 50% da atividade residual relativa em 25 minutos. Ünal e Bellur (2009) incubaram a enzima extraída de cenoura por 5 minutos, em temperaturas acima de 55°C a taxa de inativação aumentou muito, indicando que a PME extraída de cenouras é sensível ao calor.

5.4.2.1 Determinação da Constante de Inativação Enzimática e do Tempo de Meia Vida

A Tabela 20 apresenta os valores encontrado para constante de inativação térmica e para o tempo de meia vida para cada temperatura.

Os parâmetros de inativação térmica de PME são apresentados na Tabela 20. As constantes de primeira ordem inativação (kD) aumentou com o aumento da temperatura, indicando que a enzima era menos termoestável a temperaturas mais elevadas. A meia-vida ($t_{1/2}$) é um outro parâmetro importante utilizado na caracterização da estabilidade da enzima.

Podemos observar também que conforme o aumento de temperatura a uma inversão na estabilidade nas formas enzimáticas, a enzima Pectinex MASH nas temperaturas de 30 e 40°C a enzima livre apresentou maiores valores para o tempo de meia vida, mas quando tratou-se de temperaturas mais altas a enzima pressurizada obteve maiores resultados, a enzima imobilizada apresentou resultados semelhantes. A enzima Pectinex Ultra SP-L livre apresentou resultados superiores para a temperatura de 30 °C, para as demais temperaturas melhores resultados são apresentados pela enzima imobilizada pressurizada.

Tabela 20 - Constantes de inativação térmica (Kd) da lipase livre e imobilizada e seus respectivos tempos de meia-vida ($t_{1/2}$).

Forma	Enzima Pectinex Mash			Enzima Pectinex Ultra SP-L		
	Temperatura	Kd (min)	Tempo 1/2 (min)	Temperatura	Kd (min)	Tempo 1/2 (min)
Livre	30	7.10^{-6}	99021	30	5.10^{-5}	13862
	40	2.10^{-5}	34657	40	4.10^{-4}	1732
	50	0,01	77	50	0,28	2,4
	60	0,05	15	60	0,94	0,73
Imobilizada	30	9.10^{-6}	74036	30	8.10^{-5}	8664
	40	9.10^{-5}	7701	40	6.10^{-4}	1155
	50	3.10^{-3}	231	50	0,01	115
	60	0,01	63	60	0,13	5,41
Imobilizada Pressurizada	30	9.10^{-6}	76858	30	$2,8.10^{-4}$	2402
	40	8.10^{-5}	8701	40	$2,5.10^{-4}$	2768
	50	2.10^{-3}	273	50	3.10^{-3}	224
	60	9.10^{-3}	73	60	0,44	1,5

Pelos resultados obtidos, pode se afirmar que quando houver necessidade de submeter as enzimas Pectinex ULTRA e MASH à temperaturas superiores a 40°C, é aconselhável que a mesma seja imobilizada, podendo assim permanecer ativa por mais tempo.

Segundo Bampi (2010) que avaliou a condição otimizada, para uma pectinase, quanto à estabilidade em diversas temperaturas verificou que a enzima polimegalacturonase imobilizada apresentou os maiores tempos de meia vida ($t_{1/2}$) a 55°C (346 horas) e 25°C (231 horas) o que o fez concluir que a imobilização é um importante agente protetor possibilitando a aplicação industrial da enzima em produtos.

Castro *et al.* (2006) encontrou resultados que mostram que o tratamentos combinando pressão e temperatura aumentam a atividade e a estabilidade enzimática.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÕES

A consecução do presente trabalho permite, de maneira geral, concluir que:

A pectinases quando relacionadas à medida de atividade de pectinametilesterase apresentam diferentes comportamentos dependendo do solvente utilizado, mesmo quando submetidas a condições semelhantes.

A enzima Pectinex Ultra SP-L obteve decréscimo de atividade residual relativa nos dois solventes utilizados.

A enzima Pectinex MASH obteve um incremento na atividade residual de 17% quando submetida a uma pressão de 270 bar por 1 hora e despressurizada a uma taxa de 100 bar/min, tratada com GLP. Para o fluido CO₂ a enzima apresentou perdas de atividade significativas em todos os experimentos.

Quando avaliada a estabilidade enzimática em temperaturas acima da ambiente observou-se um comportamento semelhante para as duas enzimas. Ao ser estocada em temperaturas mais altas (50 e 60 °C) a enzima imobilizada pressurizada em GLP foi a que demorou mais tempo para atingir o tempo de meia vida, mas a 30 °C a forma livre das enzima apresentou maior resistência.

A estabilidade em baixas temperaturas apresentou comportamento distinto para as duas enzimas em estudo. A Pectinex MASH manteve-se estável durante 100 dias. A Pectinex Ultra SP-L manteve a estabilidade apenas para as enzimas estocadas a -80 °C, quando armazenadas a 4 e -18 °C obteve-se um decréscimo na atividade residual, embora a enzima não tenha mais de 50% da atividade.

6.2 SUGESTÕES

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser apontadas:

- Análise da mudança conformacional ocorrida nas enzimas após serem submetidas a altas pressões através de técnicas como: microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Análise de Infra-vermelho.
- Determinação do teor de água das pectinases, visando correlacionar os resultados obtidos com as características dos solventes utilizados.
- Utilizar os resultados obtidos neste trabalho em aplicações da enzima, como extração de suco.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKORTA, I., GARBISU, C., LLAMA, J.M., SERRA, J.L.; **Industrial applications of pectic enzymes: a review.** *Process Biochemistry*. 1998: v.33: 21-28.
- 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.
- ANTUNES, O.A.C.; **Interfaces com a Indústria.** *Química Nova*. 2005: v.28
- AQUINO, L. **Produção de pectinase e lipase a partir de um agente biológico.** FAPEMIG. Instituto de Inovação. http://www.institutoinovacao.com.br/download/Produção_enzimas.pdf. Acesso em 28/02/12.
- ARBAISAH, S.M., ASBI, B., JUNAINAH, A.H., JAMILAH, B.; **Purification and properties of pectinesterase from soursop (*Anona muricata*) pulp.** *Food Chemistry*, 1997: v.59: 33-40.
- ARROYO, M., SANCHEZ-MONTERO, J.M., SINISTERRA, J.V.; **Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida Antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media.** *Enzyme Microbiology Technology*. 1999: v.24: 3-12.
- ASSIS, S.A., FERREIRA B.S., FERNANDES, P., GUAGLIANONI, D.G., CABRAL J.M.S., OLIVEIRA, O.M.M.F.; **Gelatin-immobilized pectinametilsterase for production of low methoxyl pectina.** *Food Chemistry*. 2004: v.86: 333-337.
- BAMPI, G.B.; **Estudo da imobilização e caracterização parcial de poligalacturonase** *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Campus de Erechim, RS*, 2010.
- BARROS, S.T.D., MENDES, E.; PERES, L.; **Influence of despectinization in the ultrafiltration of west indian cherry (*Malpighia glabra* L.) and pineapple (*Ananas comosus* (L. Meer) juices.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2004: v. 24: n.2: 194 - 200.
- BASRI, M., YUNUS, W.Z.W., YOONG, W.S., AMPON, K., RAZAK, C.N.A., SALLEH, A.B.; **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters.** *Journal of Chemical, Technology and Biotechnology*. 1996: v.6: 169-173.
- BELITZ, H.D., GROSH, W.; **Química de los alimentos**, 2ªed. Zaragoza: Acribia, 1997.
- BENEN, J.A.E., VAN ALEBEEK, G.J.W.M., VORAGEN, A.G.J.; **Handbook of food enzymology.** New York: Basel, 2003
- BERMEJO, M.D., COCERO, M.J.; **Supercritical water oxidation: a technical review.** *AICHE J.* 2006: v.52: 3393-3451.

- BHAT, M.K.; **Cellulases and related enzymes in biotechnology.** *Biotechnol. Adv.*, 2000: v.18: 355-383.
- BLANCO, P., SIEIRO, C., VILLA, T.G.; **Production of pectin enzymes in yeasts.** *FEMS Microbiology Letters*. 1999: v. 175: 1-9.
- 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*. 2000: v.24: 137-152.
- BRÍGIDA, A.I.S., **Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Cândida antártica* utilizando fibra da casca de coco verde como suporte.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química Federal doCeará, Fortaleza 2006.
- BURKERT, J.F.M., MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I.; **Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp* using factorial desing.** *Bioresouce Technology*, 2004: v. 91: 77-84.
- CAMPOS, F.P.; **Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos.** *Brazilian journal of Food Techonology*, 2003: v.6: n.2: 351-357.
- CARVALHO, S.; **Pectinases produzidas pelo Agente “G088”: Extração e purificação.** *Lavras Minas Gerais –Brasil*, 2007.
- CASTRO, S.M., LOEY, A.V., SARAIVA, J.A., SMOUT, C., HENDRICKX, M.; **Identification of pressure/temperature combinations for optimal pepper (*Capsicum annuum*) pectin methylesterase activity.** *Enzyme and Microbial Technology*, 2006: v.38: 831-838.
- 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*. 1992: v.40: 2345-2349.
- CORREIA, A.A.S; **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.
- COX, P.M.; **Ultracongelation de alimentos: guia de La teorá y práctica.** *Zaragoza Acribia*, 1987: 459.
- DALLA-VECCHIA, R., NACSIMENTO, M.G., SOLDI, V.; **Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros.** *Química Nova*, 2004: v.27
- DAVOLI P., MIERAU V., WEBER R.W.S.; **Carotenoids and fatty acids in res yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*.** *Appl. Bioch and Microb.*, 2004: v.40: 392-397.

DE GREGORIO, A., MANDALARI, G., ARENA, N., NUCITA, F., TRIPODO, M.M., LO CURTO, R.B.; **SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps.** *Biores. Technol.* 2002: V.83: 89-94

DEMIR, N., ACAR, J., SARIOGLU, K., MUTLU, M.; **The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment.** *Journal of Food Engineering.* 2001: v.47: 275-280.

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,* 2007: v.131: 128-137.

DIRIX, C., DUVETTER, T., VAN LOEY, A., HENDRICKX, M., HEREMANS, M.; **The in situ observation of the temperature and pressure stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase with Fourier transform IR spectroscopy reveals an unusual pressure stability of β -helices.** *Biochemical Journal.* 2005: v.392: 565-571.

DZIEZAK, J.D.; **Enzymes: catalyses for food process.** *Food Tech.,* 1991: v.45: 78-85.

EISENMENGER, M.J., REYES-DE-CORCUERA, J.I.; **High pressure enhancement of enzymes: A review.** *Enzyme and Microbial Technology,* 2009: v.45: 331-347.

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

FAWOLE, O.B., ODUNFA, S.A.; **Some factors affecting,production of pectin enzymes by *Aspergillus niger*.** *Int. Biodet. Biodeg.* 2003: v.52: 223-227.

FEIHRMANN, A.C.; **Avaliação da ativiade enzimática de lípase imobilizada em fluidos pressurizados.** *apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Campus de Erechim, RS,* 2005.

FENNEMA, O.R.; **Química de los alimentos,** *Zaragoza: Acribia,* 1993: p.1095.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., ÚBEDA, J.F., VASUDEVAN, T.G., CORDERO OTERO, R.R., BRIONES, A.I.; **Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains.** *FEMS Microbiol. Lett.* 2004: V.237: 261 – 266.

FILHO, E.X.F., **Clarificação enzimática do suco de caju.** *Pesquisa. Agropequária Brasileira.* 1991: v.26: 1647-1653.

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

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.* 2006: v.38: 347-353.

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.*, 1994: v. 10: n. 10: 1311-1319.

GARCIA-GONZÁLES, L., GEERAERD, A.H., SPILIMBERGO, S., ELEST, K., VAN GINNEKEN, L., DEBEVER, J., VAN IMPE, J.F., DEVLIEGHERE, F.; **High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future.** *International Journal of Food Microb.*, 2007: v.117: 1-28.

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

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

GLINKA, E.M., LIAO, Y.; **purification and partial characterisation of pectin methylesterase produced by *Fusarium asiaticum*.** *Fungal Biology.* 2001: v.115: 1112-1121.

GONZALEZ, S.L., **Determinação da atividade de Pectinametilesterase 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.

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*, 2003: v.33: 544–555.

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

HELBIG, J., LAPERCHE, S.; **Production of colour-intensive and colour stable juice.** *Fruit Processing.* 2001: v.2: 324-347.

HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; VAN den BROECK, I.; WEEMAES, C. **Effects of High pressure on enzymes related to food quality (review).** *Trends in Food Science & Technology*, 1998: v.9: n.5: 197-203.

HERNALSTEENS S., MAUGERI, F.; **Partial Purification and Characterization of Extracellular Fructofuranosidase with Transfructosylating Activity from *Candida sp.*** *Food bioprocess Tech.*, 2010: v.3: 568 – 576.

HERTZBERG, P.A., KVITTINGEN, L., ANTHOSEN, T.; **Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions.** *Enzyme Microbiology Technology.* 1992: v.12: 42-47.

HODES, M., MARRONE, P.A., HONG, G.T.; **Salt precipitation and scale control in supercritical water oxidation (A): fundamentals and research.** *J. Supercritical Fluids.* 2004: v.29: 265-288.

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

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

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

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

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*. 2006: v.37: 173-177.

KAMAT, S., BECKMAN, E.J., RUSSEL, A.J.; **Enzyme activity in supercritical fluids.** *Critical Reviews in Biotech*. 1995: v.15: 41-71.

KASCHE, V., SCHLOTHAUER, R., BRUNNER, G.; **Enzyme denaturation in supercritical CO₂: stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step.** *Biotechnology Letters*. 1988: v.10: 569-574.

KASHYAP, D. R., CHANDRA, S., KAUL, A., TEWARI, R.; **Production purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000: v.16: 277-282.

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

KAUR, G., KUMAR, S., SATYANARAYANA, T.; **Production, charac-terization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile apinis*.** *Bioresource Technology*. 2004: v.94: 239-243.

KEMENY, D. M., CHALLACOMBE, S.J.; **Elisa amd other solid phase immunoassays.** *New York, John Wiley & Sons Ltda*, 1988.

KITAMOTO, N., OKADA, H., YOSHINO, S., OHMIYA, K., TSUKAGOSHI, N.; **Pectin methylesterase gene (pmeA) from *Aspergillus oryzae* KBN616: its sequence analysis and overexpression, and characterization of the gene product.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1999: v.63: 120-124.

KLIBANOV, A.M.; **Improving enzymes by using them in organic solvents.** *Nature*, 2001: v.409: 241-246.

KNEZ, Z.; **Ezymatic reactions in dense gases.** *J. cf Supercritical Fluids*, 2009: v.47: 357-372.

KNEZ, Z., HABULIN, M.; **Compressed gases as alternative enzymatic-reactino solvents: a short review.** *Journal of Supercritical Fluids*. 2002: v.23: 29-42

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

KRISHNA, S.H.; **Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media.** *Biotech. Adv.*, 2002: v.20: 239-266.

KUHN, G., MARANGONI, M., FREIRE, D.M.G., SOARES, V.F., GODOY, M.G., CASTRO, A.M., DI LUCCO, M., TREICHEL, H., MAZUTTI, M. A., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V.; **Esterification activities of non-commercial lípases after pre-treatment in pressurized propane.** *J. Chem. Tech. Biotech.*, 2010: v.85: 839-844.

KUMAR, R., MADRA, S., MADAK, J. **Enzimatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide.** *Industrial Eng. and Chemical Resesarch*, 2004: v.43: 1568-1573.

LANG, C., DÖRNENBURG, H. **Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000: v.53: 366-375

LEE, J.M. **Biochemical Engineering.** *New Jersey :Prentice Hall*, 1992.

LEE, J.W., PARK, J-Y., KWON, M., CHOI, I-G.; **Purification and characterizationof a thermostable xilanase from the brown-rot fungus Laetiporus sulphureus.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009: v.107: n.1: 33-37.

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

LI, T., WANG, N., LI, S., ZHAO, Q., GUO, M., ZHANG, C.; **Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support.** *Biotechnology Letters*, 2007: v.29: n.9: 1413-1416.

LIANG, L., LI, Y., YANG, V.; **Biomedical application of immobilized enzymes.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000: v. 89: 979-990.

MALDONADO, M.C., STRASSET, de SAAD, A.M.; **Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Apergillus niger* in subemerges and solid state system.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1998: v.20: 34-38

MALDONADO, R.R.; **Produção purificação e caracterização da lípase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais.** *Dissertação de Mestrado*, UNICAMP, São Paulo, 2006

MARRONE, P.A., HODES, M., SMITH, K.A.; **Salt precipitation and scale control in supercritical water oxidation – Part B: Commercial/fullscele applications.** *J. Supercritical Fluids*. 2004: v.29:289-312

MARTINS, E.; **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido.** Tese de doutorado (programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

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

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

MESSIANO, A.J., ENICK, R.M., BECKMAN, E.J., RUSSEL, A.J.; **The phase behavior of fluorinated diols, divinyl adipate and a fluorinated polyester in supercritical carbon dioxide.** *Fluid Phase Equilibra*. 2001: v.178: 169-177

MINUSSI, R.C., BARACAT-PEREIRA, M.C., COELHO, J.L.C., SILVA, D.O.; **Methylxanthinas as inducers of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose.** *Lett. App. Microbiol*. 1997:24: 369-372.

NAKAMURA, T., OGATA, Y., HAMADA, S., OTHA, K.; **ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Ferm. Bioeng.* 1996: v.81: 564-566.

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*. 1997: v.84: 313-318.

OGAWA, H., FUKUHISA, K., KUBO, Y., FUKUMOTO, H.; **Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, ph, and organic acids, and comparsion with heat sanitation.** *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990: v. 54: 1219-1225.

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

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

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.** *The Journal of Supercritical Fluids* 2006: v.38: 127-133

OLIVEIRA, J.V., OLIVEIRA, D.; **Kinetics of the enzymatic alcoholysis palm kernel oil in supercritical CO₂.** *Ind. Ans Eng. Chemistry Research*, 2000: v,39: 4450-4454.

- PARK, J.P., BAE, J.T., YOU, D.J., KIM, B.W., YUN, J.W.; **Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endoinulinase from *Xanthomonas* sp.** *Biotech. Letters, Netherlands*, 1999: v.21: 1043-1046.
- PATEL, R.N.; **Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals.** *Enz. Microb. Tech.*, 2002: v.31: 804-826.
- PICCOLI-VALLE, R.H., PASSOS, F.M.L., PASSOS, F. J.V., SILVA, D.O.; **Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer.** *Braz. J. Microbiol.* 2001: v.32: 135-140.
- PIZARRO, A.V.L., PARK, E.Y.; **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth.** *Process Biochemistry*. 2003: v 38: 1077-1082.
- POWEEL, L.W.; **Microbial enzyme and biotechnology.** *Elsevier Science Publishers*, 1990.
- PRIMO, M.S., CENI, G.C., MARCON, N.S., ANTUNES, O.A.C., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V.; **Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves.** *Journal of Supercritical Fluids*. 2007: v.43: 697-704.
- 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*, 2006: v.38: 697-704.
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L., & MARKOVIC, O.; **Pectic enzymes.** *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry*. 1976: v.33: 323–385.
- RICHETTI, A., MUNARETTO, C.B., LERIN, L.A., BATISTELLA, L., OLIVEIRA, J.V., ROGERIO M. DALLAGO, R.M., ASTOLFI, A., DI LUCCIO, M., MAZUTTI, M.A., OLIVEIRA, D., TREICHEL, H. **Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads.** *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012: V.35: 383–388
- RIGO, E.; **Produção e caracterização parcial de lípases com atividade de hidrólise e síntese por fermentação em estado sólido.** *Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em Química e Engenharia de Alimentos)* UFSC, Florianópolis, 2009.
- RISSO, F.V., MAZUTTI, M.A., TREICHEL, H., COSTA, F., MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I.; **Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in an organic medium.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2009: v.27: 507-516
- ROCHA, W.S., GROSSO, C.R.F.; **Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose.** *Sitientibus, Feira de Santana*, 2006: v.35: 125-148.

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

RODRIGUEZ, J.A., MATEOS, J.C., NUNGARAY, J., GONZÁLEZ, V., BHAGNAGAR, T., ROUSSOS, S., CORDOVA, J., BARRATI, J.; **Improving lipase productin by nutrient source modification using *Rhyzopus homothallicus* cultured in solid state fermentation.** *Process biochemistry*, 2006: v.41:2264-2269.

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

SANTI, L.; **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais.** *Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Biologia celular e molecular) UFRGS, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre*, 2005.

SARIOGLU, K., DEMIR, N., ACAR, J., MUTLU, M. **The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase.** *Journal of Food Engineering*. 2001: V.47: 271-274

SAVAGE, P.E., GOPALAN, S., MIZAN T.I., MARTINO, C.J., BROCK, E.E.; **Reactions at supercritical conditions: applications and fundamentals.** *AIChE Journal*. 1995: v.41: 1723-1778.

SAWADA K, UEDA M. **Enzyme Processing in Textiles in Reverse Micellar Solution.** *J. Biotechnol.* 2001: v.89: 263-269

SCHIMID, A., HOLLMANN, F., PARK, J.B., BÜHLER, B.; **The use of enzyme in the chemical industry in Europe.** *Current Opinion in Biotech.*, 2002: v.13: 359-366.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia.** Editora Manole: São Paulo. 1985: 498

SHARMA , D.C., SATYANARAYANA, T.; **A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods.** *Bioresour Technol.* 2006: v.97: 727-33.

SHIN, H.T, BAIG, S.Y., LEE, S.W., SUH, D.X., KWON,S.T., LIM, Y.B., LEE, J.H.; **Production of fructo- oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells.** *Bioresource Tech.*, 2004: v.93: 59-62.

SILVA, C.F., SCHWAN, R.F., DIAS, E.S., WHEALS, A.E.; **Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil.** *International Journal of Food Microbiology*.2000: v.60: 251-260

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; **Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3.** *Process Biochemistry*; 2007: v.40: 285-289.

SILVA, M.F.; **Avaliação da atividade da enzima inulinase em fluidos pressurizados e aplicação na síntese de fruto-oligossacarídeos.** *Exame de qualificação de Doutorado, Engenharia de Alimento URI-Campus de Erechim.* Erechim, 2011.

SØRENSEN, J.F., KRAGH K.M., SIBBESSEN. O., DELCOUR J., GOESAERT, H., SVENSSON, B., TAHIR, T.A., BRUFAU, J., PEREZ-VENDRELL, A.M., BELLINCAMPI, D., D'OVIDIO, R., CAMARDELLA, L., GIOVANE, A., BONNIN, E., JUGE, N.; **Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications.** *Biochim Biophys Acta.* 2004: v.1696: 275-287.

SOUZA, J.V.B., SILVA, E.S., MAIA, M.L.S., TEIXEIRA, M.F.S. **Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peecilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1.** *Process Biochemistry.* 2003: v.39: 455-45.

SRIROTH, K., CHOLLAKUP, R., CHOTINEERANAT, S., PIYACHOMKWAN, K., OSTES, C.G.; **Processing of cassava waste for improved biomass utilization.** *Bio-Resource Technol.* 2000: v.71: 63– 69.

SUN, Y., WANG, Z., WU, J., CHEN, F., LIAO, X., HU, X.; **Optimising enzymatic maceration in pre-treatment of carrot juice concentrate by response surface methodology.** *Int. J. Food Sci. Technol.* 2006: v.41 n.9: 1082-1089.

TAJCHAKAVIT, S., BOYE, J.I., COUTURE, R.; **Effect of processing on post-bottling haze formation in apple juice.** *Food Research International.* 2001: v.34: 415-424.

TAKAYANAGI, T., UCHIBORI, T., YOKUTSUKA, K.; **Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grapes skins.** *Am. J. Enology and Viticulture.* 2001: v.52: n.1: 41-44.

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

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

TORRES, M.C.L., SOARES, N. F. F., MAIA, J.F.; **Parâmetros cinéticos da glutatona s-tranferase e sua ativação por extratos de vegetais.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.,* 2004: v.24: n.2: 243-248.

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.

UEDA, S., FUJIO, Y., LIM, J.Y.; **Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3.** *J. appl.biochem.,* 1982: v.4: 524-532.

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

ÜNAL, M. Ü., BELLUR, E.; **Extraction and characterization of pectin methylesterase from black carrot (*Daucus carota L.*)**. *Food Chemistry*. 2009: v.116: 836-840.

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*. 1999: v.47: 2950–2958.

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

VIVAR-VERA, M.A., SALAZA-MONTOYA, J.A., CALVA-CALVA, G., RAMOS-RAMÍREZ, E.G.; **extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit**. *Science direct*. 2007: v.40 278-284.

VORA, H.; KYLE, W.; SMALL, D. **Effect of enzymes treatment of carrots pulp on juice yield and quality**. *Food Australia*. 1999: v.51: 146-147

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

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

YADAV, S, YADAV, P.K., YADAV, D., YADAV, K.D.S., **Pectin lyase: A review**. *Process Biochemistry*. 2009: v.44: 1–10.

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

ZAKS, Z., KLIBANOV, A.M.; **Why does ribonuclease irreversibly inactive at high temperatures?** *Biochemistry*. 1985: v.12: 5432-5444

ZANDERNOWSKI, R.; BOROWSKA, F.; KOWALSA, M.; BUDREWICZ, G.; SZAJDEK, A. **Quality of carrots juice as conditioned by raw material and technology**. *Fruit Processing*. 2003: 183-192.