UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES - URI - ERECHIM DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CINDY ELENA BUSTAMANTE VARGAS

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO DE Aspergillus niger ATCC 9642 EM MATRIZ POLIMÉRICA-INORGÂNICA

ERECHIM, RS – BRASIL MARÇO DE 2013

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO DE Aspergillus niger ATCC 9642 EM MATRIZ POLIMÉRICA- INORGÂNICA

CINDY ELENA BUSTAMANTE VARGAS

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos: Área de Concentração - Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim. Orientadores: Prof^a. Dra. Geciane Toniazzo e Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago.

ERECHIM, RS – BRASIL MARÇO DE 2013

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO DE Aspergillus niger ATCC 9642 EM MATRIZ POLIMÉRICA-INORGÂNICA

Cindy Elena Bustamante Vargas

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação 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:

Prof^a. Dr^a Geciane Toniazzo Orientador

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago Orientador

Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira UCS

> Prof^a. Dr^a Eunice Valduga URI - Erechim

Erechim, 15 de Março de 2013

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 – ERECHIM.

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad". (Albert Einstein)

Dedico esta conquista em especial aos amores da minha vida: David e Malena e a todos aqueles que acreditaram nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus a quem pertence tudo o que sou e tenho.

À minha filha Malena, por ser minha maior motivação e por trazer-me tantos momentos de amor, alegria e felicidade.

Ao meu esposo David, pelo amor, apoio incondicional, por acreditar nos meus sonhos e fazer cada dia da minha vida mais feliz.

À minha família, em especial a minha mãe Mabel, por sua imensa dedicação, amor e por sempre ser meu guia e pilar nos momentos difíceis.

Aos meus sogros Fermín e Yamile, por sua ajuda e apoio. Minha gratidão.

Ao meu tio Roberto e sua esposa Elisiane, obrigada pela motivação, por toda a ajuda recebida nesta etapa tão importante e por sempre acreditar em mim.

Aos professores Rogério Marcos Dallago e Geciane Toniazzo, pela valorosa orientação, paciência, compreensão e amizade, mas principalmente, pelos ensinamentos e confiança no meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-ERECHIM, em especial à professora Eunice Valduga, pelos conhecimentos compartilhados e amizade.

Às minhas queridas amigas Mirian, Simone e Viviane, pela amizade verdadeira, ensinamentos, hospitalidade, pelos belos momentos compartilhados e por fazer-me sentir mais perto de casa quando precisei.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos e Termodinâmica que de uma forma ou outra sempre estiveram à disposição para ajudar-me, em especial à Jamile, Jonaina e Simone. Muito obrigada a todos.

À URI- ERECHIM, que forneceu todas as ferramentas para a realização deste trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

A todos que não citei, mas que de alguma forma fizeram parte 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.

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO DE Aspergillus niger ATCC 9642 EM MATRIZ POLIMÉRICA-INORGÂNICA

Cindy Elena Bustamante Vargas

Março/2013

Orientadores: Geciane Toniazzo

Rogério Marcos Dallago

As enzimas pectinolíticas têm como função catalisar a degradação ou modificação das sustâncias pécticas. Cepas de Aspergillus spp. são as mais utilizadas para a bioprodução desse tipo de enzimas. As técnicas de imobilização permitem obter enzimas com maior estabilidade em comparação com a sua forma solúvel, além de sua recuperação e reutilização. Neste contexto, estudou-se a imobilização do extrato enzimático pectinolítico de Aspergillus niger ATCC 9642 em matriz polimérica-inorgânica de alginato-gelatina-oxalato de cálcio (AGOCa) e sua comparação com as matrizes controle de alginato-oxalato de cálcio (AOxal) e alginato de cálcio (ACa), em termos de caracterização parcial, morfologia, rendimento e reúso. A imobilização se realizou por encapsulamento empregando o método de geleificação iônica do alginato de cálcio. Caracterizou-se a matriz de encapsulamento de AGOCa. Selecionaram-se para o processo de imobilização o tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) e a proporção enzima/tampão de 3:10 (v/v). Os tempos para a medida de atividade de Exo-PG do imobilizado e de contato das esferas com a solução de CaCl₂ e gelatina foram fixados em 5 e 10 minutos, respectivamente. Demonstrou-se que há uma relação proporcional entre a incorporação do cálcio na matriz de AGOCa e o tempo de contato com a solução de CaCl₂ e gelatina. O extrato pectinolítico imobilizado nas matrizes de AGOCa e AOxal apresentou valores ótimos de atividade de Exo-PG nas faixas de pH entre 5,0 a 6,0 e de temperatura entre 60 a 80 °C. Para a matriz de ACa os valores ótimos de atividade de Exo-PG foram observados para um pH entre 5 e 6 e uma temperatura entre 40 e 80°C. Demonstrou-se que o extrato imobilizado mantém sua atividade inicial após 33 dias de armazenamento a 4 °C. Obtiveramse valores de Km de 3,0, 1,3 e 2,2 mg/mL e Vmáx de 3,85, 4,32 e 3,17 µmol/min.g para AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente. Através das análises morfológicas percebeu-se que o tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) conduziu a formação de esferas com forma arredondada e com menor rugosidade na superfície. O maior rendimento de imobilização foi de 72,7 % em AGOCa, seguido de 55,8 % em AOxal e 52,9 % em ACa. Foram possíveis 9, 7 e 6 ciclos de reúso para o extrato imobilizado em AGOCa, AOxal e AÇA, mantendo 56,3, 50,6 e 57,6 % de sua atividade inicial, respectivamente.

Palavras Chaves: pectinolítico, imobilização, matriz polimérica-inorgânica.

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

STUDY OF IMMOBILIZATION OF PECTINOLYTIC ENZYMATIC EXTRACT FROM *Aspergillus niger* ATCC 9642 IN INORGANIC POLYMERIC MATRIX

Cindy Elena Bustamante Vargas

March/2013

Advisors: Geciane Toniazzo

Rogério Marcos Dallago

Pectinolytic enzymes function is to catalyze the degradation or modification of pectic substances. Strains of Aspergillus spp are the most used at the production of this enzyme. The techniques for enzyme immobilization produce biocatalysts with higher stability compared to soluble enzyme and allow the recovery and reuse of these. In this context, the immobilization of the pectinolytic enzyme extract of Aspergillus niger ATCC 9642 in inorganic polymer matrix of alginate-gelatin-calcium oxalate (AGOCa) was studied and compared with the control matrix of alginate -calcium oxalate (AOxal) and alginate-water (ACa) in terms of partial characterization, morphology, yield and reuse. The immobilization was carried out by encapsulating the pectinolytic enzyme extract, employing the method of ionic gelation of calcium alginate. The characterization from matrix encapsulation AGOCa was done. Sodium oxalate buffer (100 mM) was selected as adjuvant of the immobilization process for showing precipitation with calcium at pH 5.5 and the enzyme to buffer ratio was defined as 3:10 (v/v). The times to measure enzymatic activity of Exo-PG immobilized and the spheres contact with the CaCl₂ solution and gelatin were set at 5 and 10 minutes, respectively. The atomic absorption analysis revealed that there is incorporation of calcium into the matrix encapsulating AGOCa as it increases the contact time in such CaCl₂ solution and gelatin. The pectinolityc extract immobilized in matrices and AGOCa, AOxal presented optimal values of Exo-PG activity in the pH ranges from 5.0 to 6.0 and temperature between 60 and 80 °C. For the matrix ACa optimum values of Exo-PG activity was observed for a pH between 5 and 6 and temperature between 40 and 80 °C. It was demonstrated that, the extract immobilized maintains its initial activity after 33 days of storage at 4 °C. K_m values of 3.0, 1.3 and 2.2 mg/ ml and V_{max} of 3.85, 4.32 and 3.17 mol / min.g were obtained for AGOCa, AOxal and ACa, respectively. From the morphological analysis, it was observed that, the sodium oxalate buffer (100 mM, pH 5.5) led to the formation of spheres with a rounded shape with less roughness at the surface. The highest yield of immobilization was 72.7% in AGOCa, followed by 55.8% and 52.9% in AOxal and ACa, respectively. Were possible 9, 7 and 6 cycles of reuse to extract immobilized on AGOCa, AOxal and ACa, maintaining 56.3, 50.6 and 57.6% of the initial activity, respectively.

Key Words: Pectinolytic, immobilization, polymer-inorganic matrix.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGOCa matriz polimérica-inorgânica de alginato, gelatina e oxalato de cálcio
- AOxal matriz polimérica-inorgânica de alginato e oxalato de cálcio
- ACa matriz polimérica-inorgânica de alginato e água
- PG-Poligalacturonase
- Exo-PG- Exo-poligalacturonase
- Endo-PG- Endo-poligalacturonase
- ATCC- American Type of Culture Collection
- CaCl₂ cloreto de cálcio
- DNS- Ácido 3,5 dinitrosalisílico
- °C graus Celsius
- % percentual
- μ micro
- E.C Enzyme Comission
- g gramas
- K_m constante de Michaelis-Menten
- V_{máx} velocidade máxima
- L litro
- m/v massa por volume
- $v\!/v$ volume por volume
- mg miligramas
- mL mililitro
- MM massa molecular
- mm milímetro
- mM milimolar
- pH potencial hidrogeniônico
- rpm rotações por minuto
- ppm- partes por milhão
- T temperatura
- U unidades de atividade enzimática (µmol/min)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal contendo as moléculas de pectina2	0
Figura 2. Estrutura da molécula de pectina, apresentando somente o ácido galacturônico	
metil-esterificado (maior componente das pectinas). As cadeias com resíduos de	
galactose, arabinose e xilose não estão incluídos na figura2	1
Figura 3. Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das	
substancias pécticas. (a) Radical H para PG e CH3 para PMG; (b) PE e (c) Radical H	
para PGL e CH ₃ para PL. As flechas indicam os locais onde as pectinases atuam nas	
substâncias2	5
Figura 4. Principais métodos de imobilização enzimática	3
Figura 5. Fragmentos da cadeia polimérica do alginato formado por blocos M, blocos G e os	5
blocos MG 3	4
Figura 6. Mecanismo de geleificação do alginato em presença de íons de cálcio 3	5
Figura 7. Imobilização de enzimas utilizando a técnica de aprisionamento	6
Figura 8. Representação esquemática do processo de formação das esferas de AGOCa (a) e	
de AOxal e ACa (b)4	4
Figura 9. Aspecto visual da formação de precipitado de cálcio: tampões acetato de sódio (a),	
citrato de sódio (b), fosfato de potássio (c) e oxalato de sódio (d), todos na concentração	
100 mM e pH 5,5	1
Figura 10. Aspecto visual das esferas de AGOCa com o extrato enzimático pectinolítico	
imobilizado antes (a) e depois (b) da lavagem com o tampão oxalato de sódio (100 mM,	
pH 5,5)	3
Figura 11 Aspecto visual das esferas AGOCa antes (a) e depois (b) de 48 h de	
armazenamento em tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,5)5	5
Figura 12. Detalhe do armazenamento das esferas AGOCa em sílica gel	5
Figura 13. Influência do tempo de contato das esferas com a solução de cloreto de cálcio-	
gelatina sobre a atividade de Exo-PG (U/g)5	7
Figura 14. Incorporação do cálcio nas esferas de alginato em relação ao tempo de contato	
com a solução de CaCl ₂ e gelatina5	8
Figura 15. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de Exo-PG (U/g))
obtida em função do pH e a temperatura (°C) para o extrato pectinolítico imobilizado en	1
AGOCa	4

Figura 16. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de Exo-PG (U/g) obtida em função do pH e a temperatura (°C) para o extrato pectinolítico imobilizado em **Figura 17.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de Exo-PG (U/g)obtida em função do pH e a temperatura (°C) para o extrato pectinolítico imobilizado em Figura 18. Estabilidade térmica a 4 °C do extrato enzimático imobilizado em AGOCa, AOxal Figura 20. Análises morfológica das matrizes de AGOCa (a), AOxal(b) e Aca (c), obtidas com Lupa Leb-3 (Lambda) de Ocular WF 10x e resolução 1280x1024......70 Figura 21. Reúso do extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa, AOxal e ACa......72 Figura 22. Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de Exo-PG em relação à concentração de substrato pectina cítrica para o extrato Figura 23 Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de Exo-PG em relação à concentração de substrato pectina cítrica para o extrato Figura 24. Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de Exo-PG em relação à concentração de substrato pectina cítrica para o extrato

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de enzimas pectinolíticas por diferentes cepas de micro-organismos 28
Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2) , para a atividade de Exo-PG do extrato
enzimático imobilizado nas matrizes de AGOCa, AOxal e ACa
Tabela 3. Atividade específica do extrato enzimático pectinolítico imobilizado com diferentes
relações de enzima/tampão52
Tabela 4. Atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato pectinolítico imobilizado em
AGOCa após 24 horas de armazenamento
Tabela 5. Atividade de Exo-PG (U/g) durante 60 minutos de contato das esferas de AGOCa
com a solução de CaCl ₂ e gelatina
Tabela 6. Atividade de Exo-PG (U/g) do extrato imobilizado durante 20 minutos de reação a
37 °C utilizando substrato de pectina citrica (0,5 %, pH 5,5)
Tabela 7. Matriz do planejamento experimental DCCR 2^2 (valores codificados e reais com a
resposta atividade de Exo-PG) para a caracterização parcial da enzima imobilizada 60
Tabela 8 . Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento 2^2 para
atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em AGOCa. 61
Tabela 9. Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento 2^2 para
atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em AOxal 61
Tabela 10. Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento 2^2 para
atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em ACa 61
Tabela 11. Análise de variância para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato
enzimático imobilizado em AGOCa62
Tabela 12. Análise de variância para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato
enzimático imobilizado em AOxal63
Tabela 13. Análise de variância para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato
enzimático imobilizado em ACa63
Tabela 14. Atividade de Exo-PG (U/g) do extrato pectinolítico imobilizado em função da
concentração do substatro pectina cítrica
Tabela 15. Valores de Km e Vmáx para o extrato enzimático pectinolítico imobilizado em
AGOCa, AOxal e ACa
Tabela 16. Rendimento de imobilização (%) para as matrizes de imobilização. 71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	. 16
2 OBJETIVOS	. 18
2.1 Objetivo Geral	. 18
2.2 Objetivos específicos	. 18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	. 19
3.1 As substâncias pécticas	. 19
3.2 Pectinases	. 21
3.2.1 Enzima desmetoxilante ou desesterificante	. 22
3.2.2 Enzimas despolimerizantes	. 22
3.2.2.1 Hidrolases	. 22
3.2.2.2 Liases	. 23
3.2.3 Protopectinases (PPase)	. 24
3.3 Pectinases: aplicações industriais	. 25
3.3.1 Indústrias de sucos de frutas	. 26
3.3.2 Indústrias de vinhos	. 26
3.3.3 Extração de óleos vegetais	. 27
3.3.4 Fermentação de chá, cacau e café	. 27
3.4 Micro-organismos produtores de pectinases	. 28
3.4.1 Aspergillus niger	. 30
3.5 Imobilização de enzimas	. 31
3.6.1 Alginato de sódio como suporte de imobilização	. 33
3.6.2 Gelatina	. 35
3.7.1 Imobilização por geleificação iônica	. 37
3.8 Mineralização biomimética	. 37
3.9 Imobilização de pectinases	. 38
3.10 Considerações finais	. 39
4 MATERIAL E MÉTODOS	. 41
4.1 Materiais	. 41
4.1.1 Reagentes	. 41
4.2 Micro-organismo	. 42
4.3 Preparo do inoculo do Aspergillus niger ATCC 9642	. 42
4.4 Bioprodução do extrato enzimático pectinolítico	. 42
4.5 Imobilização do extrato enzimático pectinolítico	. 43
4.6 Etapa 1: Caracterização do processo de imobilização do extrato enzimático na matriz	de :
encapsulamento polimérica-inorgânica de AGOCa	. 43
4.6.1 Seleção do tampão para a imobilização	. 43
4.6.2 Relação extrato enzimático/tampão	. 44
4.6.3 Seleção do tampão para lavagem e armazenamento	. 44

4.6.4 Influência do tempo de contato das esferas com a solução de cloreto de cálcio ((75
mM) sobre a atividade de Exo-PG	. 45
4.6.5 Cinética do tempo ótimo de reação para a dosagem de atividade de Exo-PG	. 45
4.6.6 Estudo da incorporação de cálcio na matriz AGOCa	. 45
4.7 Etapa 2: Parâmetros cinéticos e operacionais do extrato enzimático pectinolít	ico
imobilizado em AGOCa e nas matrizes controle	. 46
4.7.1 Determinação da temperatura e o pH ótimo do extrato pectinolítico imobilizado .	. 46
4.7.2 Manutenção da atividade de Exo-PG do extrato pectinolítico imobilizado	. 47
4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos V _{máx} e K _m	. 47
4.7.4 Análise morfológica	. 47
4.7.5 Rendimento da imobilização (RI)	. 48
4.7.6 Reúsos	. 48
4.8 Determinações analíticas da atividade enzimática Exo-poligalacturonásica	. 48
4.8.1 Preparação do reativo DNS	. 49
4.8.2 Preparação do substrato	. 49
4.8.3 Atividade enzimática de Exo-PG do extrato enzimático pectinolítico livre	. 49
4.8.4 Atividade enzimática de Exo-PG do extrato enzimático pectinolítico imobilizado	, 49
4.8.5 Atividade enzimática de Exo-PG do sobrenadante	. 50
4.9 Análise estatística	. 50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	. 51
5.1 Caracterização da matriz de encapsulamento polimérica-inorgânica de algina	to-
gelatina-oxalato de cálcio (AGOCa)	. 51
5.1.1 Seleção do tampão de imobilização	. 51
5.1.2 Relação enzima/tampão (v/v) a ser utilizada no processo de imobilização	. 52
5.1.3 Seleção do tampão para lavagem e armazenamento	. 53
5.1.4 Influência do tempo de contato das esferas com a solução de cloreto de cálcio ((75
mM) sobre a atividade de Exo-PG.	. 56
5.1.5 Cinética do tempo de reação na medida de atividade de Exo-PG do extr	ato
enzimático imobilizado	. 58
5.2 Determinação de parâmetros operacionais e cinéticos do extrato de Exo-PG imobiliza	ado
em AGOCa e a sua comparação com as matrizes controle	. 59
5.2.1 pH e temperatura ótima	. 60
5.2.2 Estabilidade do extrato enzimático imobilizado	. 66
5.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{máx}$ e K_m	. 67
5.2.4 Morfologia e estrutura	. 69
5.2.5 Rendimento	. 71
5.2.6 Reúso do extrato pectinolítico imobilizado	. 72
6 CONCLUSÕES	71
	. 74
6.1 Sugestões para trabalhos futuros	. 74
 6.1 Sugestões para trabalhos futuros 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 	. 74 . 75 . 77

1 INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas o desenvolvimento tecnológico tem atingido dimensões incalculáveis e, dentro desse contexto, os processos biotecnológicos industriais merecem destaque especial (ALVES *et al.*, 2006). As enzimas produzidas podem ser utilizadas em áreas diversas como a indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, detergentes e no tratamento de efluentes (KASHYAP *et al.*, 2001).

A biocatálise e a tecnologia enzimática são processos que apresentam significativa relevância social, ambiental e econômica, uma vez que constituem ferramentas promissoras para a síntese de compostos de alto valor agregado, resolvem problemas no manejo de efluentes, podem substituir processos químicos por processos biocatalíticos, gerando um menor impacto ambiental e, além disso, as enzimas geradas com essas técnicas apresentam vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como alta especificidade, condições brandas de reação, baixo consumo de energia e maior atividade catalítica (MONTES, 2006; PEREIRA, 2005).

Porém, apesar dos benefícios, a substituição de catalisadores químicos por biológicos não é generalizado nos processos industriais, devido principalmente à instabilidade de algumas enzimas nas condições do processo, queda da atividade durante as reações, contaminação do produto final pela presença do catalisador em solução, dificuldade da sua eliminação da mistura de reação e à impossibilidade da sua recuperação e reutilização (ARROYO, 1998; ARMISEN, 1997).

Frente a isso, as técnicas de imobilização de enzimas surgiram como alternativa para solucionar tais inconvenientes, pois, com a imobilização, o catalisador homogêneo, facilmente perdido após a reação, torna-se um catalisador heterogêneo, separável do meio reacional, com maior estabilidade em comparação com a enzima solúvel e reutilizável, permitindo que o processo biotecnológico seja economicamente viável (DATTA *et al.*, 2013).

As pectinases são um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica (UENOJO e PASTORE, 2007). De acordo com seu mecanismo de ação se classificam em, protopectinases, esterases e despolimerases (incluem as enzimas hidrolíticas e liases). A produção de pectinase ocupa cerca de 10% da produção total de preparações enzimáticas (PEDROLLI *et al.*, 2009).

As pectinases são enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas e na indústria de alimentos, utilizam-se comumente para a clarificação e aumentar o rendimento da produção de sucos, produção de vinhos e nos processos de extração e maceração de frutas e vegetais (JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013; SEMENOVA *et al.*, 2006; JAYANI *et al.*,2005).

Preparações comerciais de pectinases são normalmente de origem fúngicas, especialmente de *Aspergillus* e *Penicillium*, as quais exibem características de alta atividade de pectinametilesterase, poligalacturonase e pectina liase (SIEIRO *et al.*,2012; ZENI, 2011). Geralmente, são vendidas no estado solúvel, apresentando os problemas de aplicação antes mencionados.

Levando em conta o exposto anteriormente, neste trabalho, estudou-se a imobilização do extrato enzimático pectinolítico de *A. niger* ATCC 9642 em matriz de alginato-gelatina-oxalato de cálcio (AGOCa) e a sua comparação com matrizes controle de alginato-oxalato de cálcio (AOxal) e alginato-água (ACa), em termos de caracterização parcial, estabilidade ao armazenamento, parâmetros cinéticos, morfologia, rendimento e reúso.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a imobilização do extrato enzimático pectinolítico de *Aspergillus niger* ATCC 9642 em matriz polimérica- inorgânica de AGOCa.

2.2 Objetivos específicos

Com base no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- selecionar o tampão coadjuvante do processo de imobilização e a razão enzima/tampão (v/v) a ser utilizada;
- caracterizar a matriz de AGOCa em termos de tempo de contato com a solução de cloreto de cálcio e gelatina, tempo de reação para a dosagem de atividade de Exopoligalacturonásica e incorporação de cálcio na matriz de encapsulamento;
- comparar a matriz de AGOCa com as matrizes controle de AOxal e ACa, em relação à temperatura e pH ótimos, estabilidade ao armazenamento, parâmetros cinéticos (K_m e V_{máx}), morfologia, rendimento e reúso.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, realiza-se uma descrição da composição química e a estrutura das substâncias pécticas e detalha-se a classificação das enzimas pectinolíticas e as aplicações industriais. Posteriormente, faz-se referência às características do *Aspergillus* spp. A última parte concerne à imobilização de enzimas, sendo abordada de forma mais detalhada a imobilização por encapsulamento utilizando a técnica de geleificação iônica do alginato de sódio; abordando conceitos sobre o alginato, gelatina e suas características gerais. Assim como também fundamentação sobre a mineralização biomimética e seu uso como nova alternativa para o desenvolvimento de suportes de nova geração para a imobilização de enzimas. Além disso, serão apresentadas informações a respeito da imobilização de pectinases e por fim, as considerações finais em relação ao exposto neste capítulo.

3.1 As substâncias pécticas

As substâncias pécticas compreendem um complexo de polissacarídeos ácidos de alto peso molecular, carregados negativamente e localizados principalmente na matriz da parede primária e na lamela média de células vegetais superiores; são as principais responsáveis pela integridade estrutural e coesão de tecidos vegetais (PEDROLLI *et al.*, 2009). Quimicamente, sua estrutura básica é composta de moléculas de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas α -D-(1,4) e, em menor quantidade, de ramnose, arabinose e galactose. Nesta estrutura, algumas das carboxilas podem estar esterificadas com grupos metílicos ou em forma de sais. Também se encontram associadas com outros hidratos de carbono, como as hemiceluloses e celuloses (DÍAZ, 1999). A Figura 1 apresenta a estrutura da parede celular contendo as moléculas de pectina.

A composição das substâncias pécticas varia com a fonte, condições de extração, localização e outros fatores ambientais. A Sociedade Americana de Química as classificou em quatro tipos principais: protopectina, ácidos pécticos, ácidos pectínicos e pectina (MONTEIRO, 2008; ALKORTA *et al.*, 1999; THAKUR *et al.*, 1997):

- **protopectina**: é uma substância péctica insolúvel em água, presente em tecidos intactos e em hidrólise restrita produzem ácido pectínico ou pectina;
- ácidos pécticos: são substâncias solúveis em água, compostas de ácido poligalacturônico coloidal, onde os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metil éster. Os sais do ácido péctico são conhecidos como pectatos;

- ácido pectínico: é formado de cadeias de poligalacturonas com parte dos seus ácidos galacturônicos metilados;
- pectina (polimetil galacturonato): é o material polimérico no qual, pelo menos, 75% dos grupos carboxílicos das unidades de galacturonatos estão esterificados com metanol. Isto confere rigidez à parede celular quando está ligada com a celulose. A principal função biológica das pectinas é de carácter estrutural, e seu grau de esterificação varia em função do vegetal do qual a sustância péctica é extraída (RODRIGUEZ e SERRAT, 2008).



Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal contendo as moléculas de pectina.

Fonte: MARTIN (2006).

A estrutura química da pectina, composta principalmente por resíduos de ácido Dgalacturônico, que formam cadeias homogalacturonadas com diferentes porcentagens de ésteres metilo unidos por ligações α -(1,4) é apresentada na Figura 2. O ácido galacturônico se apresenta em forma de cadeias em zig-zag com ramificações curtas de açúcares neutros (Lramnose, D-glucose, L-arabinose, D-xilose e D-galactose) (DIAZ, 2009). **Figura 2.** Estrutura da molécula de pectina, apresentando somente o ácido galacturônico metil-esterificado (maior componente das pectinas). As cadeias com resíduos de galactose, arabinose e xilose não estão incluídos na figura.



Fonte: SERRA et al.(1992).

3.2 Pectinases

As enzimas pectinolíticas ou pectinases constituem um complexo sistema de enzimas encarregadas da degradação ou modificação das substâncias pécticas, até seus açúcares constitutivos (CONTRERAS, 2003). Encontram-se na maioria das plantas superiores e são produzidas também por fungos filamentosos, bactérias, algumas leveduras e insetos (ROJAS, 2009; SIROTEK *et al.*, 2005; SILVA, 2005) a fim de degradar (para obter fonte de carbono) ou para modificar (fruto em amadurecimento) o heteropolissacarídeo pectina (MALLER, 2008). Porém, são os fungos os mais utilizados para a produção de pectinases, uma vez que, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, sendo excelentes decompositores de material orgânico. Além disso, as pectinases produzidas por fungos apresentam características importantes para a aplicação em bioprocessos, como estabilidade ao pH e à temperatura (MARTIN *et al.*, 2004).

A complexidade estrutural da pectina tem certas implicações sobre as enzimas envolvidas na sua degradação. Desta forma, as pectinases são classificadas de acordo ao modo de ataque à molécula de pectina, podendo ser divididas em dois grupos principais: o das enzimas que atuam sobre a estrutura principal da pectina e tem função de degradá-la até suas unidades monoméricas básicas e o constituído pelas enzimas acessórias (MARTINEZ, 2009).

Dentro do primeiro grupo, as pectinases se subclassificam, de acordo com o modo de ataque à parte galacturonada da molécula de pectina, em três tipos: (i) esterases, cuja função é catalisar a desesterificação da pectina mediante a remoção dos grupos metil éster da cadeia principal (MALVESSI e SILVEIRA, 2004), (ii) as despolimerizantes, que, mediante dois mecanismos diferentes, hidrólise (hidrolases) e trans-eliminação (liases), catalisam a clivagem hidrolítica das ligações α -1,4 entre monômeros de ácido D-galacturônico das substâncias

pécticas (CODNER, 2001) e, por ultimo, (iii) as protopectinases, que degradam a protopectina insolúvel para formar pectina solúvel altamente polimerizada.

3.2.1 Enzima desmetoxilante ou desesterificante

As pectinaesterases (PE) também conhecidas como pectinametilesterases (PME), catalisam a hidrólise dos grupos éster carboxílicos metilados da pectina em ácido péctico e metanol (KASHYAP *et al.*, 2001). Atuam preferencialmente sobre o grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade de galacturonato não esterificado (PEDROLLI *et al.*, 2009). Biologicamente, são de grande importância, pois permitem a ação posterior de pectinases, que só atuam sobre compostos pécticos com menor grau de esterificação. A pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase (PG). O modo de ação da PE varia de acordo com sua origem (MICHELI, 2001). As PEs fúngicas agem por um mecanismo multicadeia, removendo os grupos metil aleatoriamente. Em contraste, as PEs de plantas agem preferencialmente, ou seja, tanto pela extremidade não redutora quanto pela próxima ao grupo carboxila livre, e continua ao longo da molécula por um mecanismo de cadeia simples (SINGH *et al.*, 2005).

3.2.2 Enzimas despolimerizantes

Segundo Uenojo e Pastore (2007), as enzimas com função despolimerizantes podem ser classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas, mecanismos endo-(randômica) ou exo (a partir do final da molécula) de ação e preferência por ácido péctico ou pectina como substrato.

3.2.2.1 Hidrolases

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases (MURAD e AZZAZ, 2011).

polimetilgalacturonases (PMG): catalisam a clivagem hidrolítica da ligação glicosídica α-1,4 da pectina altamente esterificada (JAYANI *et al.*, 2005), podendo ser endo-PMG, catalisam a clivagem randômica da ligação glicosídica α-1,4, ou exo-PMG, causam clivagem sequencial da ligação glicosídica α-1,4 na extremidade não redutora da cadeia da pectina;

poligalacturonases (PG): catalisam a hidrólise da ligação glicosídica α-1,4 do ácido poligalaturônico por uma ação que pode ocorrer tanto no interior do polímero (endo) como a partir das extremidades (exo) (BADUI, 1999). As Endo-PG (EC 3.2.1.15) hidrolisam de forma randômica as ligações glicosídicas α-1,4 do ácido péctico, gerando misturas de oligômeros, tri e di galacturonatos e ácido galacturônico, reduzindo a viscosidade da solução que contem o substrato (CONTRERAS, 2003). As Exo-PG (EC 3.2.1.67) catalisam a hidrólise sequencial da ligação glicosídica α-1,4 do ácido péctico na extremidade não redutora da cadeia, formando mono ou dímeros, ocasionando uma lenta diminuição da viscosidade (DÍAZ, 1999). As PGs agem mais em pectato que em pectina e resultam em mono ou dissacarídeos.

A PG originada de micro-organismos é a pectinase mais importante utilizada na indústria (ANDRADE *et al.*, 2011). A fonte principal de sua produção são fungos do gênero *Aspergillus* spp. Este micro-organismo, como outros, produz diferentes enzimas pécticas em resposta às condições do cultivo, obtendo-se ao final da bioprodução uma mistura complexa de enzimas que degradam tanto pectina como outros polissacarídeos da parede celular. Por ser um micro-organismo seguro, o fungo *A. niger* é o mais empregado para a produção de pectinases na indústria alimentícia (BUGA *et al.*, 2010). Produz muitas formas de poligalacturonases com massas moleculares que estão entre 30 e 60 kDa (RODRIGUES e SERRAT, 2008). Maller *et al.* (2011) demonstraram que o fungo *A. niveus* produz altos teores de PG quando se desenvolve sobre resíduos agroindustriais como a casca de laranja, limão e maracujá.

Segundo Konno *et al.* (1983) é aceitável que a Exo-PG em conjunto com a Endo-PG promovam a hidrólise completa da pectina, uma vez que a Endo-PG participa da liberação das frações insolúveis da pectina presente nos diversos frutos e, após essa solubilização, a Exo-PG catalisa a degradação das frações livres de pectina. As PGs podem ter suas atividades analisadas pelo surgimento de grupos redutores ou pela redução da viscosidade da solução do substrato (REXOVÁ-BENKOVÁ e MARKOVIC, 1976).

3.2.2.2 Liases

As liases são enzimas despolimerizantes que clivam as ligações glicosídicas α -1,4 por transeliminação de hidrogênio, o que resulta em galacturonídeos com ligação insaturada entre

C4 e C5 no final não redutor do ácido galacturônico formado (KASHYAP *et al.*, 2001). Entre estas, incluem-se:

- pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL): as PMGL (EC 4.2.2.10) catalisam a quebra das ligações glicosídicas α-1,4 por um mecanismo de β-eliminação (transeliminação); as Endo-PMGL realizam uma hidrólise randomizada do polímero e as Exo-PMGL atuam sequencialmente pelo extremo não redutor (JACOB e PREMA, 2006);
- pectato-liase (poligalacturonato liase, PGL): as PGL (EC 4.2.2.2) catalisam a clivagem das ligações α-1,4 do ácido péctico de modo exo (Exo-PGL, EC 4.2.2.9) ou endo (Endo-PGL, EC 4.2.2.2) por transeliminação, sendo dependentes de Ca²⁺ para sua atividade. Possuem pH ótimo na categoria neutro-alcalino, na faixa de 8-10, o que limita o seu uso na indústria alimentícia (MONTEIRO, 2008).

3.2.3 Protopectinases (PPase)

As protopectinases catalisam a solubilização da protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada (JAYANI *et al.*, 2005; KASHYAP *et al.*, 2001; ALKORTA *et al.*, 1999). São classificadas em dois tipos principais: as que reagem com a região do ácido poligalacturônico da protopectina (tipo A) e outras, que reagem com cadeias de polissacarídeo que podem conectar o ácido poligalacturônico com os constituintes da parede celular (tipo B) (SAKAI *et al.*, 1993). A Figura 3 mostra diferentes tipos de pectinases e o seu modo de ação sobre as substâncias pécticas.

Figura 3. Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das substancias pécticas. (a) Radical H para PG e CH_3 para PMG; (b) PE e (c) Radical H para PGL e CH_3 para PL. As flechas indicam os locais onde as pectinases atuam nas substâncias.



Fonte: GUMMADI e PANDA (2003).

3.3 Pectinases: aplicações industriais

As enzimas são utilizadas na indústria há mais de 60 anos. Na atualidade, o setor de alimentos emprega uma ampla gama de enzimas tais como lipases, xilanases, amilases, celulases, glucanases, enzimas proteolíticas, pectinases, entre outras. As pectinases são utilizadas principalmente para incrementar a eficiência dos processos extrativos, estabilização de produtos e melhora do sabor, além de serem utilizadas na desintegração dos tecidos durante o processamento de frutas e vegetais (MURAD e AZZAZ, 2011; KASHYAP *et al.*, 2001).

Sieiro *et al.* (2012); Pedrolli *et al.* (2009); Rodrigues e Serrat. (2008); Uenojo e Pastore (2007); Jayani *et al.* (2005); Kashyap *et al.* (2001) Lang e Dornenburg (2000) e Alkort *et al.* (1998) descreveram algumas aplicações das enzimas pectinolíticas na indústria de alimentos, as quais são citadas a seguir.

3.3.1 Indústrias de sucos de frutas

A moderna tecnologia do processamento de frutas exige a degradação rápida e intensa das substâncias pécticas, responsáveis pelas propriedades coloidais, turbidez, consistência e aparência dos sucos das frutas e, cuja presença, causa um aumento considerável na viscosidade do suco, dificultando as etapas de prensagem, filtração e concentração (ALKORT *et al.*, 1998; RODRIGUES e SERRAT., 2008).

A adição de pectinases permite um processamento mais eficiente da fruta, pela degradação da pectina e compostos de alto peso molecular, melhorando tanto a sacarificação quanto a cor e aroma do suco, prevenindo a formação de gel, aumentando o rendimento do suco e diminuindo em até 50% o tempo de filtração, o que reduz os gastos com energia no processo de produção (JAYANI *et al.*, 2005; LANG e DORNENBURG., 2000).

Em sucos clarificados, como no de maçã, as enzimas pectinolíticas são adicionadas para incrementar o rendimento durante a prensagem e para a remoção do material em suspensão, responsável pela viscosidade e turbidez (UENOJO e PASTORE., 2007). Além disso, também são utilizadas para evitar a turvação e formação de precipitados durante a estocagem, na reconstituição do produto concentrado ou após o envasamento do suco e para auxiliar na separação de partículas em suspensão por meio da sedimentação, filtração ou centrifugação (SIEIRO *et al.*, 2012).

As pectinases em combinação com outras enzimas como celulases e hemicelulases compõem as chamadas enzimas de maceração, as quais são utilizadas após o corte da matériaprima, 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 (UENOJO e PASTORE., 2007; JAYANI *et al.*, 2005; ALKORT *et al.*, 1998).

A extração de sucos de frutas por maceração enzimática pode incrementar em até 90% o rendimento, comparado com a extração mecânica convencional, além de melhorar as propriedades organolépticas (cor e aroma), nutricionais (vitaminas) e aumentar a eficiência tecnológica do processo (fácil filtração) (PEDROLLI *et al.*, 2009).

3.3.2 Indústrias de vinhos

As enzimas pécticas são utilizadas na produção de vinhos para auxiliar o processo de extração, maximizar o rendimento do suco, facilitar a filtração e intensificar o sabor e a cor nos

vinhos tintos (UENOJO e PASTORE, 2007). A adição de pectinases durante a maceração das uvas ou no mosto reduz a viscosidade, o tempo de clarificação e permite o agrupamento de partículas suspensas em agregados maiores, que podem ser removidos por sedimentação. Também aumentam a relação de compostos fenólicos responsáveis pela cor e de precursores aromáticos, incrementando assim o aroma dos vinhos (SIEIRO *et al.*, 2012; JAYANI *et al.* 2005)

3.3.3 Extração de óleos vegetais

Os óleos, como o de canola, palma, soja e oliva, são obtidos por processos de extração com solventes orgânicos como o hexano. A utilização de enzimas pectinolíticas constitui uma tecnologia limpa, pois, mediante essa, obtém-se a extração do óleo vegetal por processo aquoso, pela liquefação dos componentes estruturais das paredes celulares das sementes que contêm o óleo. Preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulases e hemicelulases têm sido utilizadas para a extração de óleo. O tratamento enzimático não só melhora o rendimento e estabilidade do óleo, mas também aumenta a quantidade de agentes antioxidantes e de vitamina E, reduz a indução ao ranço, melhora o fracionamento na centrifugação e produz óleo com baixo teor de umidade (SIEIRO *et al.*, 2012; UENOJO e PASTORE., 2007; JAYANI *et al.* 2005; KASHYAP *et al.*, 2001).

3.3.4 Fermentação de chá, cacau e café.

As pectinases são de grande utilidade para aumentar a produtividade, a eficiência e reduzir o tempo nas fermentações naturais (KASHYAP *et al.*, 2001). Assim, por exemplo, aceleram a fermentação do chá e eliminam a espuma que formam os grãos de café devido à degradação da pectina (RODRIGUES e SERRAT, 2008). Tradicionalmente, a fermentação do café é realizada com micro-organismos pectinolíticos, obtidos da fermentação de resíduos de mucilagem; com o mesmo objetivo, preparações comercias contendo enzimas pécticas são adicionadas para remover a camada de mucilagem dos grãos, acelerando o processo de fermentação (SIEIRO *et al.*, 2012). A fermentação do cacau é essencial para o desenvolvimento dos aromas do chocolate. Esta fermentação é conduzida por diferentes micro-organismos, alguns deles pectinolíticos (SIEIRO *et al.*, 2012). Enzimas pécticas permitem a degradação da polpa de cacau e são indispensáveis para a boa qualidade do processo de fermentação (OUATTARA *et al.*, 2010).

Hoondal *et al.* (2000) e Pedrolli *et al.* (2009) reportaram outros usos das pectinases, tais como sua utilização no tratamento de efluentes contendo resíduos de pectina, na indústria têxtil na maceração de fibras vegetais como linho, cânhamo e juta, empregados na produção de algodão e para reduzir a viscosidade da ração animal, a fim de aumentar a absorção e liberação de nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis. Sousa *et al.* (2010) empregaram o extrato bruto de pectinases produzidas por *Streptomyces lydicus* no tratamento de fibras naturais como a da banana. Murad e Azzaz (2011) recomendaram o uso de pectinases como aditivo para a elaboração de ração para animais, uma vez que essas poderiam melhorar a digestibilidade da matéria orgânica.

3.4 Micro-organismos produtores de pectinases

Diversas espécies de microrganismos apresentam habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas, mas são os fungos os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (UENOJO e PASTORE, 2006). A ocorrência de pectinases em alguns micro-organismos é apresentada na Tabela 1.

MICRO-ORGANISMOS	PMGE	PG	PGL	PMG	PMGL
Aspergillus niger	+	+		+	+
Aspergillus sojae					+
Aspergillus saito		+			
Bacillus sp.			+		
Bacillus polymixa			+		
Bacillus pumilus			+		
Bacillus sphaericus			+		
Bacillus stearothermophilus			+		
Cercocpora arachidicola		+	+		
Cephalosporium sp			+		
Clostridium multifermentans	+		+		
Clostridium aurantibutyricum	+		+		
Clostridium felsineum		+	+		
Cytophaga johnsonii			+		
Cytophaga deprimata			+		
Cytophaga albogilva			+		

Tabela 1. Produção de enzimas pectinolíticas por diferentes cepas de micro-organismos.

Continuação Tabela 1

Erwinia aroideae		+	+		+
Erwinia carotovora		+	+		
Fusarium culmorum			+		
Fusarium oxysporum			+		
Fusarium solani			+		+
Penicillium expansum		+			
Penicillium italicum					+
Penicillium digitatum	+			+	+
Penicillium chrysogenum	+	+			
Pseudomonas sp			+		
Pseudomonas fluorescens			+		
Pseudomonas marginalis	+	+	+		
Rhizoctania fragariae		+			
Rhizoctania solani	+	+			
Rhizopus arrhizus		+			
Streptomyces nitrosporeus			+		
Trichoderma koningii		+			
Trichoderma pseudokoningii		+			
Xanthomonas sp	+		+		
Xanthomonas campestris	+		+		
Xanthomonas cyanopsidis			+		

Fonte: UENOJO e PASTORE (2006) modificado.

A indústria de suco de frutas e vegetais utiliza principalmente pectinases ácidas de origem fúngica, obtidas geralmente a partir do *Aspergillus* spp. (SIEIRO *et al.*, 2012). Os micro-organismos do gênero *Aspergillus* são fungos filamentosos que se desenvolvem em matéria orgânica, sob condições aeróbias. Encontram-se no solo, no ar e em matérias vegetais em decomposição. Crescem em uma faixa de temperatura de 6 a 47 C, com uma temperatura ótima entre 35 a 37 C e pH entre 1,4 e 9,8 (SHUSTER *et al.*, 2002). Estes saprófitos têm a capacidade de desenvolver-se em distintas fontes de carbono e degradar moléculas complexas nos materiais derivados de células vegetais por secretarem uma variedade de enzimas hidrolíticas (DE VRIES e VISSER, 2001).

Muitas espécies de *Aspergillus*, principalmente aquelas pertencentes aos grupos de cor negra, são utilizadas para a produção de enzimas e de metabolitos primários (vitaminas, ácidos orgânicos, ácidos graxos e aminoácidos) e nos processos de bioconversão. Os fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de secretar elevados níveis de proteínas, possuem boas propriedades fermentativas, permitindo a produção de uma ampla gama de enzimas em larga escala, tanto com atividade endo quanto exo, que degradam polissacarídeos da parede celular vegetal (MONTEIRO, 2008). O gênero *Aspergillus* compreende aproximadamente 180 espécies, das quais algumas são patogênicas para humanos, animais e plantas e as outras têm um rol muito importante na indústria biotecnológica para a produção de químicos, enzimas e drogas (BAKER, 2006). Devido a isto, só após comprovados os benefícios e segurança, permite-se a utilização desse micro-organismo em vários ramos industriais, incluindo o setor de alimentos. A USFDA (*United States Food and Drug Administration*) têm classificados alguns fungos do gênero *Aspergillus* como geralmente reconhecidos como seguros ou por suas siglas em inglês GRAS (*Generally Regarded As Safe*), dentre estes estão o *A. niger, A. oryzae, A.sojae* e *A.nidulantes*, entre outros.

3.4.1 Aspergillus niger

Esta espécie é especialmente conhecida como produtora de enzimas despolimerizantes. Segundo Pandey *et al.* (1999), o *A. niger* tem a capacidade de produzir 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo das condições de crescimento, da indução e/ou do substrato. Um aspecto positivo do emprego desta espécie é a inexistência de restrições na indústria de alimentos ao uso de enzimas dela derivadas (CASTILHO *et al.*, 1999).

O fungo filamentoso tem a capacidade de penetrar nos espaços intergranulares e intragranulares por meios mecânicos ou enzimáticos, com a firme fixação das hifas na superfície do substrato e posteriormente intensa ramificação e penetração na parede celular do substrato pela atuação de enzimas extracelulares produzidas e excretadas pelos microorganismos (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

A espécie *A. niger* é a mais utilizada na produção industrial de enzimas pectinolíticas (DINU *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2000; NAIDU e PANDA, 1998). Costa *et al.* (2007) reportaram a utilização do *A. niger* para a produção simultânea de Exo-poligalacturonase e alfa-amilase em fermentação submersa utilizando resíduo de casca de arroz como substrato. Rodríguez-Nogales *et al.* (2006) otimizaram a hidrólise da pectina usando enzimas pectinolíticas de *A. niger* CECT 2088. De Souza *et al.* (2010) caracterizaram parcialmente a poligalacturonase de *A. niger* produzida por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do

maracujá como substrato e determinaram que o extrato enzimático tinha boa estabilidade térmica até temperaturas de 50 °C e permaneceu estável em pH entre 3,5 e 5,5.

3.5 Imobilização de enzimas

Em solução, as moléculas de enzimas estão verdadeiramente dispersas no meio e têm um movimento completamente livre. A imobilização enzimática é uma técnica especialmente desenvolvida para restringir total ou parcialmente o movimento das enzimas, dando lugar a uma forma insolúvel no meio da reação, ocasionando, na maioria das vezes, um efeito benéfico na estabilidade da enzima, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima (GOMES *et al.*, 2006). A atividade e funcionalidade das enzimas imobilizadas estão ligadas à manutenção da integridade da conformação terciária e, em particular, do sítio ativo da enzima (ABDELMAJEED *et al.*, 2012).

Os processos de imobilização devem ser métodos controlados, não agressivos, que respeitem a estrutura nativa da proteína e, além disso, as ligações formadas entre a enzima e o suporte devem excluir os aminoácidos envolvidos diretamente na reação catalítica (RIOS e ARIAS, 2002). As enzimas podem ser imobilizadas sobre uma ampla variedade de suportes naturais ou sintéticos, a seleção do suporte e/ou a técnica depende da natureza da enzima, do substrato e da aplicação (BUGA *et al.*, 2010).

Fajardo-Ochoa *et al.* (2011) relataram que as enzimas imobilizadas apresentam várias vantagens em comparação com a enzima livre, tais como:

- permitem um uso contínuo e controle das concentrações de proteínas empregadas;
- melhoram a estabilidade e atividade da enzima em função do pH e da temperatura;
- aumentam a eficiência do sistema;
- permitem a recuperação e reutilização do biocatalisador imobilizado, diminuindo os custos do processo.

Porém, a imobilização também pode apresentar certas desvantagens; como por exemplo, a atividade da enzima pode ser afetada pelo processo de imobilização e a velocidade de reação pode estar limitada pela velocidade de difusão de substratos e produtos no sistema. Além disso, a imobilização pode ocasionar alteração da conformação da enzima a respeito do seu estado nativo e o biocatalisador imobilizado é mais caro que a enzima no estado solúvel (ARROYO, 1998).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização é muito importante para proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderá provocar inativação, impossibilitando a catálise da reação. Na maioria dos casos, após a imobilização, as enzimas permanecem estáveis ou mesmo aumentam a sua atividade e estabilidade, além de facilitar sua recuperação (SCHERER, 2010).

Segundo Abdelmajeed *et al.* (2012) a imobilização de enzimas é uma técnica valiosa, pois permite obter imobilizados facilmente reutilizáveis por múltiplas vezes para a mesma reação, com maiores tempos de meia vida e menor degradação; além disso, tem-se um método simples de controlar a velocidade e o período de inicio e término da reação, além de auxiliar na prevenção da contaminação do substrato com compostos enzima/proteína ou de outro tipo, o que diminui os custos de purificação.

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em métodos físicos e químicos. A imobilização pode ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel ou ainda empregando um reagente multifuncional, através de ligações cruzadas e confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento através de uma membrana polimérica (RICHETTI, *et al.*, 2012; MUNARETTO, 2011; DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

Porém, não existe um método único e um suporte que seja o melhor para todas as enzimas e suas aplicações (ARROYO, 1998). Isto é devido às características químicas dos suportes, a composição das enzimas, as propriedades dos substratos e as aplicações posteriores dos biocatalizadores imobilizados. Na Figura 4 se apresentam resumidamente, os métodos mais utilizados para a imobilização enzimática.

3.6 Suportes de imobilização

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

orgânicos, encontram-se os polissacarídeos como a celulose, amido, alginato, etc. e, as proteínas fibrosas como o colágeno, queratina e a gelatina (KLEIN, 2010).



Figura 4. Principais métodos de imobilização enzimática.

Fonte: KOURKOUTAS et al. (2004) modificado.

3.6.1 Alginato de sódio como suporte de imobilização

As esferas de alginato cálcico representam um dos suportes mais comumente utilizados para a imobilização de enzimas e proteínas, assim como também para o controle da liberação de fármacos (ALMEIDA e ALMEIDA, 2004). Os alginatos são heteropolissacáridos lineares, extraídos a partir de algas marrons pertencentes à classe *Phaeophyceae*, compostos de dois ácidos urônicos, o ácido β -*D*-manurônico (M) e o ácido α -*L*-gulurônico (G), unidos por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4) em três tipos de segmentos poliméricos (IWAKI, 2010):

• blocos M constituídos por monossacarídeos de ácido D-manurônico;

- blocos G constituídos por monossacarídeos de ácido L-gulurônico;
- blocos MG constituídos por monossacarídeos de ácido *D*-manurônico e ácido *L*gulurônico.

As propriedades físicas dos alginatos são determinadas pela composição e a extensão das sequências dos ácidos e pela massa molecular; desta forma, alginatos com maior porcentagem de blocos G formam géis mais rígidos e quebradiços, que podem sofrer sinérese. Já os géis de alginato com maior porcentagens de blocos M são mais elásticos e dificilmente sofrem sinérese (IWAKI, 2010). Na Figura 5, apresenta-se a estrutura molecular do alginato.

Figura 5. Fragmentos da cadeia polimérica do alginato formado por blocos M, blocos G e os blocos MG.



Fonte: LIMA (2006).

As interações iônicas entre blocos guluronato e íons Ca²⁺ produz um gel com elevada termoestabilidade, cujas propriedades dependem amplamente das características do polímero (proporção e disposição das unidades dos ácidos manurônico e gulurônico) e do método de preparação (TONNESEN e KARLSEN, 2002).

Segundo Fundueanu *et al.* (1999), as propriedades de geleificação do alginato, derivam da ligação cooperativa de cátions bivalentes localizados entre blocos homopoliméricos de resíduos de guluronato (blocos G), os quais se alinham para formar cavidades eletronegativas que permitem que íons Ca fiquem localizados dentro delas, assemelhando-se a ovos dentro de uma caixa de ovos. Por esta razão, o modelo proposto para explicar as propriedades geleificantes dos alginatos ao reagir com os sais cálcicos é chamado "modelo de caixa de ovo" ou *egg- box model*. Na Figura 6, se ilustra a formação do gel na presença de íons Ca.



Figura 6. Mecanismo de geleificação do alginato em presença de íons de cálcio.

Fonte: FLORES (2011).

3.6.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína composta de material hidrocolóide, rica em aminoácidos e pode absorver até 10 vezes o seu peso em água (DATTA *et al.*, 2013). Obtém-se a partir da hidrólise controlada ácida ou alcalina do colágeno do tecido conectivo, principalmente da pele e dos ossos dos animais, após ser eliminado todo o material contaminante (BADUI, 1999). O processo alcalino é amplamente utilizado para o pré-tratamento do couro bovino e tratamento ácido para a pele suína. A gelatina obtida pelo método ácido é denominada de Tipo A e pelo método básico é do Tipo B (KEMPKA, 2012). Sua vida de prateleira tem atraído a atenção para imobilização de enzimas (DATTA *et al.*, 2013).

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

O aumento do índice de *Bloom* leva a uma notável melhoria das propriedades mecânicas e a uma redução significativa da capacidade de absorção de água (LAI, 2009). O uso de gelatina como agente imobilizante é barato, biocompatível e sua estrutura facilita múltiplas combinações de interações moleculares.

3.7 Imobilização por encapsulamento

O método de imobilização por aprisionamento consiste na retenção física da enzima nas cavidades interiores de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros foto-entrecruzáveis ou polímeros do tipo poliacrilamida, colágeno, alginato ou resinas de poliuretano (ARROYO, 1998). Diferentemente da adsorção e da ligação covalente, as moléculas de enzimas mediante esta técnica ficam livres em solução, tendo seu movimento restrito pela estrutura reticular do gel (ABDELMAJEED *et al.*, 2012), tal e como se mostra na Figura 7.



Figura 7. Imobilização de enzimas utilizando a técnica de aprisionamento.

Fonte: ABDELMAJEED et al. (2012) modificado.

O aprisionamento permite confinar a enzima dentro da matriz e a difusão do substrato e produtos se dá através da membrana porosa formada (FAJARDO-OCHOA *et al.*, 2011).

Esta técnica apresenta diversas vantagens como a execução rápida, necessidade de pouca quantidade de enzima para obter derivados ativos, a enzima não sofre nenhuma alteração na sua estrutura, o processo envolve condições amenas e constitui uma técnica econômica e fácil. As principais limitações do aprisionamento são a possível lixiviação lenta das enzimas durante o uso contínuo e os fenômenos de transferência de massa que podem ser dificultados se a taxa de difusão for influenciada por diferentes condições da matriz (KEPMKA, 2012). Quando o aprisionamento se dá por inclusão da enzima em uma cápsula ou esfera polimérica recebe o nome de encapsulamento (MARQUES, 2011).

A matriz de imobilização pode ser de origem natural ou sintética e são classificadas como géis úmidos, secos (xerogéis) ou em aerossol (aerogéis). Neste método, as enzimas são suspensas em uma solução que, posteriormente, é geleificada por ação da temperatura ou pela adição de reagentes químicos polimerizantes (FAJARDO-OCHOA *et al.*, 2011). A
geleificação iônica do alginato é um dos métodos mais utilizados para o encapsulamento de enzimas e proteínas (VELINGS e MESTDAGH, 1994).

3.7.1 Imobilização por geleificação iônica

A geleificação iônica é uma técnica de imobilização enzimática, em que se utiliza principalmente alginato como componente da membrana e a combinação de íons bivalentes como o cálcio, para induzir a geleificação. O material que vai ser encapsulado é usualmente mesclado com uma solução de alginato e a mistura é gotejada em outra solução que contem geralmente íons cálcio, resultando na formação das esferas de alginato-cálcico que contem confinado o material de interesse. Na interação do alginato com os íons cálcio é possível um entrecruzamento iônico entre os íons de cálcio e as unidades de ácido gulurônico do alginato, formando o gel instantaneamente. Os íons continuam difundindo-se no gel formado à medida que transcorre o tempo em que esse permanece em contato com a solução de cloreto de cálcio que contem os íons, permitindo o endurecimento do gel (FUNDUEANU *et al*, 1999).

3.8 Mineralização biomimética

Os biopolímeros têm sido amplamente empregados como suportes para a imobilização de enzimas, principalmente por seu baixo custo e biocompatibilidade; porém, muitas vezes essas matrizes poliméricas apresentam inconveniente como baixa resistência mecânica e a solventes. Em contraste, as matrizes inorgânicas têm excelentes propriedades mecânicas e resistência a diferentes solventes (ZHANG *et al.*, 2008). Levando em conta as inerentes vantagens, tanto de materiais poliméricos quanto inorgânicos, surgiram os materiais híbridos polimérico-inorgânicos, obtidos através de reações de mineralização biomimética, que permitem obter suportes considerados como a próxima geração de matrizes para o encapsulamento e estabilização de enzimas (SHEN *et al.*, 2011).

Segundo Betancor e Luckarift (2008) a técnica de mineralização biomimética utiliza modelos biológicos e análogos sintéticos para catalisar a formação de óxidos inorgânicos em condições amenas. Tais materiais proporcionam ambientes biocompatíveis para a imobilização de enzimas, além de ser uma metodologia simples e fácil, em contraste com o sol-gel que é o método mais comum para a obtenção de materiais híbridos, o qual se caracteriza por ser um método demorado e trabalhoso e envolver o uso de surfactantes e solventes orgânicos, que podem ter efeitos prejudiciais sobre a enzima imobilizada (LU et al., 2012).

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

Lu *et al.* (2012) imobilizaram lisozima em microesferas biométicas obtidas pela mineralização do carbonato de cálcio e a carboximetilcelulose, conseguindo uma capacidade de adsorção máxima de 450 mg/g a pH 9,2 e 25° C.

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

3.9 Imobilização de pectinases

Industrialmente, as pectinases apresentam ampla utilização nas indústrias de alimentos e bebidas (RODRÌGUEZ e SERRAT, 2008). Para a maioria dos usos industriais, as poligalacturonases imobilizadas produzidas por fungos provaram ser úteis pela atividade pectinolítica e ótimo de ação em faixa de pH baixo, servindo para grande parte das aplicações em processos envolvendo frutas e vegetais (DE MELO *et al.*, 2008).

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

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

Por meio de uma análise detalhada da literatura, verificou-se que existe pouca informação de imobilização de poligalacturonases de *A. niger*. Alguns estudos encontrados

relatam a imobilização de poligalacturonases em diferentes suportes. Dentre eles, podem ser citados os trabalhos de Buga *et al.* (2010) imobilizando poligalacturonase parcialmente purificada de *A. niger* (SA6) em alginato de sódio. Os autores determinaram que o imobilizado possui uma temperatura e um pH ótimos em 45°C e 4,5, respectivamente, e pode ser utilizado por três ciclos catalíticos, mantendo 14,8 % de sua atividade relativa inicial no terceiro ciclo.

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

Serrat e Valverde (2005) imobilizaram covalentemente Endo-poligalacturonase de *Kluveromyces marxianus* CECT 11769 em alginato de sódio ativado com glutaraldeído, obtendo 26,4% de rendimento da imobilização e uma atividade enzimática imobilizada de 195 U/g. Rao *et al.* (2000) determinaram que a Endo-poligalacturonase de *A. ustus* quando imobilizada covalentemente em sílica gel modificada retém 28 % da sua atividade original e pode ser reutilizada por 10 ciclos de reação com cerca de 90% de retenção da sua atividade original.

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

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

3.10 Considerações finais

De acordo com as informações apresentadas no decorrer deste capítulo, percebe-se a importância das técnicas de imobilização, para permitir um melhor aproveitamento das enzimas nos processos industriais, uma vez que através dessas, obtêm-se catalisadores que mantêm suas propriedades catalíticas, as quais podem ser afetadas quando a enzima é disposta

de forma livre no meio reacional e, além disso, a enzima imobilizada torna-se mais estável, facilmente recuperável e reutilizável no processo catalítico.

Não foram encontrados relatos na literatura a respeito da imobilização de extratos brutos pectinolíticos de *A. niger* ATCC 9642, nem estudos onde se utilizaram matrizes hibridas poliméricas-inorgânicas para a imobilização de pectinases. Neste contexto, é de grande importância a realização do presente estudo, o qual permitirá abordar o concernente à imobilização do extrato pectinolítico de *A. niger* ATCC 9642 em matriz polimérica-inorgânica, propondo uma nova metodologia para a imobilização do extrato, assim como também, a definição de certas características bioquímicas tais como; a estabilidade, reúsos, pH e temperatura ótima, parâmetros cinéticos entre outros, que visarão as possíveis aplicações industriais do imobilizado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, faz-se uma descrição dos materiais e métodos que foram empregados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental para a imobilização por encapsulamento do extrato enzimático pectinolítico de *A. niger* ATCC 9642. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Erechim.

Tendo como base a metodologia modificada descrita por Shen *et al.* (2011) a estratégia experimental realizada no presente trabalho foi dividida em duas etapas.

A primeira etapa consistiu na caracterização da matriz de imobilização poliméricainorgânica de alginato-gelatina–oxalato de cálcio (AGOCa), mediante a seleção do tampão de imobilização e da relação enzima/tampão, definição dos tempos de reação para a medida de atividade de Exo-poligalacturonase e de contato das esferas com a solução de cloreto de cálcio e avaliação da incorporação de cálcio na matriz.

Na segunda etapa foram realizados em paralelo experimentos caracterizados como controle, somente com alginato dissolvido em água (ACa) e alginato dissolvido no tampão oxalato de sódio 100 mM, pH 5,5 (AOxal), ambos sem presença de gelatina na solução de cloreto de cálcio. Os resultados destes experimentos serão apresentados juntamente com os resultados obtidos da matriz de imobilização caracterizada na primeira fase do estudo.

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados durante o desenvolvimento deste estudo foram de grau analítico. Para a imobilização do extrato enzimático pectinolítico se utilizaram os seguintes reagentes:

- alginato de sódio (Cinética Reagentes-Soluções®);
- gelatina alimentícia de origem bovina com um $Bloom \leq 260g$ (Gelita®).
- tampão oxalato de sódio (MERCK®) pH 5,5;
- solução de cloreto de cálcio 75 mM (Vetec®);.

Para a etapa de determinação da atividade Exo-poligalacturonásica (Exo-PG) do extrato enzimático livre, no sobrenadante e no imobilizado, foram utilizados:

- pectina cítrica (Vetec®);
- tampão acetato de sódio (Vetec®); pH 5,5;
- DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Vetec®);
- tartarato duplo de sódio potássio (Vetec®);

4.2 Micro-organismo

Utilizou-se a cepa de *A. niger* ATCC 9642 obtida de forma liofilizada, gentilmente doada pela FIOCRUZ (Brasil). A cepa foi mantida em Potato Dextrose Ágar (PDA- Difco®), subcultivada periodicamente e armazenada a 4°C.

4.3 Preparo do inoculo do Aspergillus niger ATCC 9642

O *A.niger* ATCC 9642 foi cultivado por 7 dias a 30°C em um meio de cultivo contendo 39 g/L de Potato Dextrose Ágar (PDA - Difco®). Posteriormente, realizou-se a coleta dos esporos adicionando 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v) e pérolas de vidro estéreis ao frasco, para uma melhor remoção desses. Para a contagem dos esporos, 1 mL da suspensão resultante foi diluído de 10 a 10^3 vezes em solução aquosa esterilizada de Tween 80 (0,1 %, v/v) e aproximadamente 0,5 mL da solução diluída foram transferidos a uma câmara de Neubauer para realizar a contagem dos esporos (FREIRE, 1996), que seriam utilizados na bioprodução do extrato enzimático.

4.4 Bioprodução do extrato enzimático pectinolítico

O extrato enzimático bruto pectinolítico foi obtido mediante fermentação submersa, segundo a metodologia otimizada descrita por Gomes (2010). Para isto, utilizou-se um meio sintético otimizado constituído de 32g/L de pectina cítrica, 2 g/L de L- asparagina, 0,06 g/L de fosfato de potássio, 1,0 g/L de sulfato de ferro. A concentração de esporos utilizada foi de $5x10^6$ esporos/mL. As condições empregadas para a bioprodução foram: 180 rpm, 30°C, pH inicial de 5,5 e tempo de 24 horas. A dosagem de atividade de Exo-PG foi conduzida como descrito no item 4.8.3.

4.5 Imobilização do extrato enzimático pectinolítico

O extrato enzimático pectinolítico bruto foi imobilizado utilizando-se alginato de sódio e gelatina segundo a metodologia de Shen *et al.* (2011) modificada. O alginato de sódio 2% (m/v) foi suspenso em uma proporção de 3:10 (v/v) de extrato enzimático e tampão (fixada em testes preliminares descritos posteriormente); para isto o alginato foi misturado com 10 mL de solução tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5), aquecido até sua completa dissolução e posteriormente resfriado a temperatura ambiente. A seguir, 3 mL do extrato enzimático foram adicionados na suspensão de alginato de sódio. O gel de alginato/extrato enzimático foi gotejado em uma solução precipitante de cloreto de cálcio (CaCl₂) (75 mM) e gelatina (até uma concentração final de 1 % (m/v)) mantida sob agitação constante com o uso de agitador magnético.

Durante 10 minutos, as esferas permaneceram na solução de CaCl₂ - gelatina para garantir a sua solidificação, posteriormente foram separadas da solução e lavadas com 100 mL de água destilada e 100 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,5). Após o término do processo de lavagem, as esferas foram filtradas com bomba a vácuo (Tecnal TE-085) por 20 minutos. Para os experimentos controle, seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, com a diferença que a solução precipitante de CaCl₂ (75 mM) não continha gelatina e durante a formação das matrizes controle se utilizou para dissolver o alginato de sódio água destilada (ACa) e tampão oxalato de sódio em uma concentração 100 mM e pH 5,5 (AOxal), respectivamente. A Figura 8 esquematiza o procedimento experimental utilizado para a formação das matrizes de encapsulamento do extrato enzimático pectinolítico.

4.6 Etapa 1: Caracterização do processo de imobilização do extrato enzimático na matriz de encapsulamento polimérica-inorgânica de AGOCa.

4.6.1 Seleção do tampão para a imobilização

Considerando que o tampão fosfato de potássio não precipita em pH 5,5 e desta forma não participa na formação estrutural da matriz de encapsulamento, fez-se necessária a seleção de outro tampão que em pH 5,5 (pH ótimo da enzima), formasse um composto de baixa solubilidade, que precipitasse com o cálcio e interagisse com a gelatina presente na solução de CaCl₂ (75 mM), permitindo a formação da matriz polimérica-inorgânica de encapsulamento.

Com tal objetivo foram colocados em tubos de ensaios individuais 10 mL dos tampões acetato de sódio, oxalato de sódio e citrato de sódio, todos na concentração 100 mM e pH 5,5. Posteriormente, foram adicionadas 20 gotas de uma solução de CaCl₂ (75 mM). O tampão selecionado foi aquele que formou precipitado em pH 5,5.

Figura 8. Representação esquemática do processo de formação das esferas de AGOCa (a) e de AOxal e ACa (b).



Fonte: SHEN et al. (2011) modificado.

4.6.2 Relação extrato enzimático/tampão

Foram realizados testes preliminares relacionados à definição da relação extrato enzimático/tampão (3:10 e 5:10, v/v) para o processo de imobilização. A escolha das relações utilizada para o estudo preliminar foram baseadas em Bampi (2010) e Coghetho (2011). O processo de imobilização foi realizado como descrito no item 4.5 e posteriormente, efetuou-se a dosagem de atividade de Exo-PG como descrito no item 4.8.4, com a diferença que a reação foi incubada a 37 °C por 5 minutos.

4.6.3 Seleção do tampão para lavagem e armazenamento

Para avaliar, durante as etapas de lavagem e armazenamento, a influência do tampão e do seu pH, na atividade de Exo-PG do extrato enzimático pectinolítico imobilizado em AGOCa, foram testados para a lavagem das esferas 100 mL dos tampões acetato de sódio, fosfato de potássio e oxalato de sódio, todos 100 mM e em pH 5,5 e para o armazenamento 50

mL dos mesmos tampões em pH 5,5 e 7,5. O tampão selecionado, tanto para a lavagem como para o armazenamento, foi aquele que apresentou menor influência na atividade enzimática de Exo-PG.

4.6.4 Influência do tempo de contato das esferas com a solução de cloreto de cálcio (75 mM) sobre a atividade de Exo-PG

Esferas de AGOCa contendo o extrato enzimático imobilizado, foram deixadas por diferentes tempos (3, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) em contato com a solução de cloreto de cálcio (75 mM) e gelatina. Após cada tempo pré-determinado, 0,5 g de amostra foram retiradas e submetidas à dosagem de atividade de Exo-PG, como descrito no item 4.8.4 com a diferença que a reação foi incubada a 37 °C por 6 minutos.

4.6.5 Cinética do tempo ótimo de reação para a dosagem de atividade de Exo-PG

O estudo cinético do tempo ótimo de reação foi conduzido com o objetivo de determinar em qual tempo de reação seriam obtidos os maiores valores de atividade de Exo-PG. Para isto, utilizaram-se 0,5 g de amostras de esferas contendo o extrato enzimático imobilizado que haviam permanecido por 10 minutos na solução de CaCl₂ e gelatina. Posteriormente, foram adicionados ao substrato e a reação incubada a 37 °C por períodos de reação de 3, 5, 10 e 20 minutos. A dosagem de atividade de Exo-PG foi realizada como descrito no item 4.8.4.

4.6.6 Estudo da incorporação de cálcio na matriz AGOCa

Com a finalidade de avaliar a incorporação do cálcio na matriz de encapsulamento em função do período de contato na solução de CaCl₂ (75 mM) e gelatina, foi realizado um estudo no qual se retiraram amostras das esferas de AGOCa aos 3, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos de contato com a solução. Posteriormente, determinou-se espectrofotometricamente a quantidade de cálcio incorporado na matriz de encapsulamento, utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica com fonte de linha (LS AAS) modelo VARIAN AA50 com lâmpadas de cátodo oco. Para isso, pesaram-se 1g de amostra em tubo de microkjedahl e adicionou-se 3 mL de HNO₃. A amostra foi aquecida em bloco digestor a 100 °C durante 1 hora e, posteriormente, foi adicionado 1 mL de H₂SO₄ (30%). Após constatar a solubilização

da amostra, a solução obtida da digestão foi transferida para um balão de 25 mL e aferido seu volume com água. A quantificação do teor de cálcio foi conduzida comparativamente empregando o método de calibração com padrões externos.

4.7 Etapa 2: Parâmetros cinéticos e operacionais do extrato enzimático pectinolítico imobilizado em AGOCa e nas matrizes controle

Neste item, são apresentadas as análises realizadas para determinar os parâmetros cinéticos e operacionais do extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa e sua comparação com as matrizes controle de AOxal e ACa, buscando-se avaliar as diferenças e semelhanças entre as matrizes de imobilização com a adição de gelatina (*Bloom* \leq 260) e as matrizes controle sem adição desta.

4.7.1 Determinação da temperatura e o pH ótimo do extrato pectinolítico imobilizado

Para estudar o efeito da temperatura e do pH sobre a atividade de Exo-PG do extrato enzimático pectinolítico imobilizado, realizou-se um delineamento composto central rotacional 2² (DCCR), totalizando 11 experimentos. A atividade enzimática de Exo-PG do imobilizado foi medida através da dosagem dos açúcares redutores pelo método DNS modificado descrito no item 4.8.4. Como substrato, utilizaram-se soluções de 0,5 % (m/v) de pectina cítrica preparada com tampão acetato de sódio 100 mM nos diferentes pH estudados. O tempo total de reação foi de 5 minutos e as faixas de pH e temperaturas avaliadas são apresentadas na Tabela 2. Os valores ótimos das variáveis estudadas foram determinados considerando a máxima atividade de Exo-PG obtida durante os experimentos. As faixas de pH e temperatura foram baseadas em estudos prévios realizados por Gomes (2010). As variáveis estudadas e seus respectivos níveis se encontram descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2) , para a atividade de Exo-PG do ext	rato
enzimático imobilizado nas matrizes de AGOCa, AOxal e ACa.	

Níveis					
Variáveis independentes	-1,41	-1	0	+1	+1,41
рН	3	3,4	4,5	5,5	6
Temperatura	30	37	55	73	80

4.7.2 Manutenção da atividade de Exo-PG do extrato pectinolítico imobilizado

A estabilidade do extrato enzimático imobilizado a baixa temperatura foi avaliada mediante seu armazenamento à temperatura de 4º C, determinando-se periodicamente a atividade de Exo-PG, como descrito no item 4.8.4. Na equação 1, mostra-se como foi definida a estabilidade do armazenamento (EA) do extrato imobilizado.

$$EA(\%) = \frac{u_A}{u_I} x 100$$
 (1)

Onde EA é a estabilidade do armazenamento (%), U_I é a atividade de Exo-PG inicial (U/g) do extrato enzimático imobilizado e U_A é a atividade de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado após o armazenamento.

4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos V_{máx} e K_m

Com a finalidade de conhecer e comparar as propriedades cinéticas do extrato pectinolítico imobilizado, tanto na matriz de AGOCa quanto nas matrizes controle de AOxal e ACa, determinou-se a atividade de Exo-PG usando-se como substrato pectina cítrica a diferentes concentrações: 0,5, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 13 e 15 mg/mL.

A temperatura utilizada para as reações foi 73 °C. Para a determinação dos parâmetros cinéticos, utilizou-se a equação 2 do modelo de Lineweaver-Burk (1934). Graficou-se 1/V em função de 1/S, e através da equação obtida dos dados linearizados, obteve-se o valor de $V_{máx}$ e K_m .

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{s} \cdot \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max}} \tag{2}$$

Onde V é a velocidade inicial, $V_{máx}$ é a velocidade máxima, S é a concentração inicial de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

4.7.4 Análise morfológica

Para a análise morfológica as esferas foram preparadas conforme descrito no item 4.5. Posteriormente, amostras das matrizes de AGOCa, AOxal e ACa foram visualizadas em Lupa Leb-3 (Lambda) de Ocular WF 10x e resolução 1280x1024. As imagens morfológicas das estruturas foram capturadas digitalmente utilizando-se o programa Motic Images Plus 2.0.

4.7.5 Rendimento da imobilização (RI)

Para determinar o rendimento da imobilização (RI) foram quantificadas as atividades de Exo-PG tanto do extrato pectinolítico livre quanto do sobrenadante (solução de CaCl₂ com ou sem gelatina), seguindo os procedimentos especificados nos itens 4.8.3 e 4.8.5, respectivamente. O cálculo do rendimento foi realizado empregando a equação 3.

RI (%) =
$$\frac{(v_T - v_S)}{v_T} x 100$$
 (3)

Onde RI é o rendimento (%), U_T é a atividade de Exo-PG (U/mL) do extrato pectinolítico livre e U_S é a atividade de Exo-PG (U/mL) do sobrenadante.

4.7.6 Reúsos

As esferas do extrato pectinolítico imobilizado foram usadas sucessivamente em diferentes ciclos de reações. A atividade de Exo-PG da primeira reação foi considerada como 100%. Após cada um dos ciclos, as esferas contendo o extrato enzimático foram removidas do meio reacional, lavadas com água destilada e solução tampão de acetato de sódio (100 mM, pH 5,5). Após a remoção do excesso de solução aquosa, com o auxilio de bomba a vácuo (Tecnal TE-085), foi realizada a dosagem de atividade de Exo-PG empregando a metodologia descrita no item 4.8.4. A equação 4 fornece o cálculo para a atividade relativa (RA) de cada ciclo.

$$RA(\%) = \frac{Atividade de Exo-PG do extrato no ciclo n}{Atividade de Exo-PG do extrato no ciclo 1} x100$$
(4)

4.8 Determinações analíticas da atividade enzimática Exo-poligalacturonásica (Exo-PG)

A atividade de Exo-PG do extrato enzimático pectinolítico livre, imobilizado e no sobrenadante foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores, usando-se o método do ácido dinitrosalisílico (DNS), proposto inicialmente por Miller (1959), com algumas modificações. As atividades de Exo-PG do extrato enzimático livre e no sobrenadante foram expressas em unidades de atividade por mL (U/mL) e para o extrato enzimático imobilizado foram expressas em unidades de atividade por g de suporte (base úmida) (U/g).

Desconsiderou-se a determinação de proteína como metodologia para a medição de atividade devido à matriz de AGOCa conter gelatina.

4.8.1 Preparação do reativo DNS

A solução de DNS foi preparada dissolvendo 10,6 g de ácido 3,5- dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH em 1,416 mL de água destilada, em seguida foram adicionados 7,6 mL de fenol fundido a 50 °C e 8,3 g de metabisulfito de sódio.

4.8.2 Preparação do substrato

Utilizou-se como substrato uma solução contendo 0,5 % (m/v) de pectina cítrica em tampão acetato de sódio em concentração 100 mM e pH 5,5.

4.8.3 Atividade enzimática de Exo-PG do extrato enzimático pectinolítico livre

Foram incubados 1000 μ L de substrato a 37 C por 15 minutos para a estabilização de temperatura. A seguir, 500 μ L do extrato enzimático dissolvido em tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) em proporção 3:10 (v/v) foram adicionados ao substrato e a reação foi incubada a 37 °C por 6 minutos. Posteriormente, 1000 μ L do volume reacional foram misturados com 1000 μ L de DNS. Para a formação de cor a mistura foi mantida em ebulição por 8 minutos, resfriada em banho de gelo e adicionados 8 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para a estabilização de cor.

4.8.4 Atividade enzimática de Exo-PG do extrato enzimático pectinolítico imobilizado

Foram incubados 2000 µL de substrato a 73 °C por 15 minutos para a estabilização de temperatura. Posteriormente, 0,5 g de esferas contendo o extrato enzimático pectinolítico imobilizado foram adicionadas ao substrato e a reação incubada a 73 °C por 5 minutos

(definido a partir dos resultados apresentados item 5.2.1). A seguir, 1000 μ L do volume reacional foram misturados com 1000 μ L de DNS. Para a formação de cor a mistura foi mantida em ebulição por 8 minutos, resfriada em banho de gelo e adicionados 8 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para a estabilização de cor.

4.8.5 Atividade enzimática de Exo-PG do sobrenadante

Foram incubados 1000 μ L de substrato a 37 C por 15 minutos para a estabilização de temperatura. A seguir, 1000 μ L do sobrenadante (solução de cloreto de cálcio com ou sem gelatina) se adicionaram ao substrato e a reação foi incubada a 37 °C por 6 minutos. Em seguida, 1000 μ L do volume reacional foram misturados com 1000 μ L de DNS. Os tubos de ensaio foram colocados em ebulição por 8 minutos, resfriados em banho de gelo e adicionados 8 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para a estabilização de cor.

As absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (Beckman Coutler, model DU640, 540nm) contra o branco. Uma unidade Exo-PG foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto (U= µmol/min). A quantificação foi conduzida pelo método dos padrões externos, empregando uma curva de calibração estabelecida com ácido α -D-galacturônico (Fluka Chemical®, massa molecular 212,6) como açúcar redutor.

4.9 Análise estatística

A tabulação dos resultados, cálculo de médias e desvio padrão foram realizados utilizando o Microsoft Excel® 2010 (Microsoft Co), seguido de análise de variância (ANOVA), Teste de t-Student e Teste de Tukey, em nível de 95 % de confiança, empregando software Statistica® 7.0 (STATSOFT, INC). A análise estatística dos efeitos e da interação entre as variáveis estudadas no planejamento proposto foi realizada utilizando-se o software Statistica® 7.0 (STATSOFT, INC) em nível de confiança de 95 %, (p<0,05).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer do estudo, referentes à caracterização do processo de imobilização do extrato enzimático pectinolítico de *A. niger* ATCC 9642 utilizando-se matriz polimérica inorgânica de AGOCa, bem como a sua comparação com as matrizes controle de AOxal e ACa em termos de caracterização parcial, determinação das constantes cinéticas V_{max} e K_m , avaliação da estabilidade da atividade de Exo-PG, análise morfológica, reúso e rendimento da imobilização.

5.1 Caracterização da matriz de encapsulamento polimérica-inorgânica de alginatogelatina-oxalato de cálcio (AGOCa)

Na continuação, são apresentados os resultados e discussão obtidos na primeira etapa da estratégia experimental concernentes à caracterização da matriz de encapsulamento de AGOCa.

5.1.1 Seleção do tampão de imobilização

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos na avaliação da formação de precipitado em presença de cálcio dos tampões de acetato de sódio, fosfato de potássio, citrato de sódio e oxalato de sódio, todos na concentração 100 mM e pH 5,5.

Figura 9. Aspecto visual da formação de precipitado de cálcio: tampões acetato de sódio (a), citrato de sódio (b), fosfato de potássio (c) e oxalato de sódio (d), todos na concentração 100 mM e pH 5,5.



Observar-se que o tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) foi o único que

apresentou precipitação com cálcio no pH estudado. O oxalato de cálcio formado pela interação do tampão oxalato de sódio 100 mM e a solução de cloreto de cálcio 75 mM tem baixa solubilidade (0,00067 g/100mL), conduzindo a formação de um precipitado. Com base nestes resultados, o tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) foi selecionado como coadjuvante do processo de imobilização.

Shen *et al.* (2011) utilizaram o tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5), o qual ao entrar em contato com a solução de CaCl₂ (75 mM) e gelatina, conduz a formação do fosfato de cálcio, que interage com a gelatina para formar a matriz polimérica-inorgânica de encapsulamento para a imobilização da β -galactosidase. Neste trabalho, não se empregou esse tampão para o encapsulamento do extrato enzimático pectinolítico, pois em testes preliminares se comprovou que sua utilização ocasionava a perda total da atividade enzimática de Exo-PG. Esta tendência pode estar associada ao elevado pH (7,5) empregado na etapa de imobilização. Gomes (2010) reportou que o extrato pectinolítico contendo Exo-PG produzido por *A. niger* ATCC 9642 apresenta pH ótimo de 5,5, com uma acentuada diminuição da sua estabilidade a pH maiores de 7.

5.1.2 Relação enzima/tampão (v/v) a ser utilizada no processo de imobilização

A Tabela 3 apresenta a atividade enzimática de Exo-PG (U/g) nas diferentes relações de enzima/tampão.

Relação	Atividade Exo-PG (U/g)*		
Enzima/tampao	1.20 0.10		
3:10	$1,20\pm 0,12^{n}$		
5:10	1,05 ±0,15"		

Tabela 3. Atividade específica do extrato enzimático pectinolítico imobilizado com diferentes relações de enzima/tampão.

*Média \pm desvio padrão seguida de letras iguais não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste t- Student).

Verifica-se que não houve diferença significativa (p<0,05) entre as relações 3:10 e 5:10 (v/v) de enzima/tampão. Com intuito de utilizar a menor quantidade de enzima, fixou-se em 3:10 a relação enzima/tampão a ser utilizada na imobilização. Este resultado esta coerente com a relação enzima tampão utilizada por Bampi (2010) e Coghetto (2011).

5.1.3 Seleção do tampão para lavagem e armazenamento

Os testes feitos para a lavagem e armazenamento das esferas de AGOCa, indicaram a incompatibilidade do emprego do tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) para tal finalidade, uma vez que esse ocasionava a aglomeração das esferas de AGOCa, bem como sua deterioração (Figura 10).

Figura 10. Aspecto visual das esferas de AGOCa com o extrato enzimático pectinolítico imobilizado antes (a) e depois (b) da lavagem com o tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5).



Neste contexto, foram conduzidos ensaios de lavagem e armazenamento somente com as soluções tampões de acetato de sódio e fosfato de potássio a 100 mM e pH 5,5. As soluções avaliadas proporcionam bons resultados; ou seja, não se constatou aglomeração nem deterioração das esferas de AGOCa. Porém, o tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,5) foi selecionado para a lavagem das esferas, já que se presumiu que o tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 5,5) poderia causar problemas na atividade enzimática, uma vez que em testes preliminares de imobilização, usou-se como coadjuvante do processo o tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5), obtendo-se como resultado a queda total da atividade de Exo-PG do extrato enzimático imobilizado. Para comprovar tal hipótese, e verificar se a perda total de atividade de Exo-PG foi devida a composição do tampão, ou seja, ao fosfato, ou ao pH da solução tampão, realizaram-se testes de armazenamento das esferas de AGOCa, por um período de 24 horas, em soluções tampão de acetato de sódio e fosfato de potássio, em concentração 100 mM e nos pHs 5,5 e 7,5.

Na Tabela 4, são apresentados os valores de atividade de Exo-PG (U/g) obtidos nos testes de armazenamento.

Solução tampão	Atividade Exo-PG (U/g) *
Extrato imobilizado (EI)	$1,88 \pm 0,096$ ^a
EI - Acetato de sódio (100 mM, pH 5,5)	$1,72 \pm 0,22^{a}$
EI - Acetato de sódio (100 mM, pH 7,5)	$0,88\pm0,35~^{\rm b}$
EI - Fosfato de potássio (100 mM, pH 5,5)	$0{,}22\pm0{,}07\ ^{\rm c}$
EI - Fosfato de potássio (100 mM pH 7,5)	Sem Atividade

Tabela 4. Atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa após 24 horas de armazenamento.

*Média \pm desvio padrão seguido de letras iguais não difere estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey).

Observa-se que o tampão fosfato de potássio influencia negativamente na atividade de Exo-PG do extrato pectinolítico imobilizado, pois se verificou que seu emprego, independente do pH (5,5 ou 7,5) conduziu à uma diminuição acentuada da atividade em relação ao valor de referência (1,88 U/g), obtido antes do armazenamento. Para o pH 7,5, observa-se uma perda total da atividade enzimática. Os ensaios conduzidos com o tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,5) apresentaram a melhor atividade enzimática. No entanto, há que salientar que no primeiro momento o tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,5) foi selecionado para o armazenamento das esferas de AGOCa, porém seu emprego foi desconsiderado nos ensaios posteriores, devido ao fato que após 48 horas de armazenamento, verificou-se que as esferas apresentaram inchamento e deformação, o que levou à deterioração das mesmas (Figura 11).

Baseados nestes resultados, definiu-se os tampões oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) e acetato de sódio (100 mM, pH 5,5) para a síntese e lavagem das esferas, respectivamente.

Com o intuito de evitar a degradação da matriz de AGOCa, posteriormente à lavagem, as esferas foram filtradas por 20 minutos, utilizando uma bomba a vácuo, e depois armazenadas em sílica gel para a remoção da umidade residual, como mostra a Figura 12. O mesmo procedimento foi seguido para as matrizes controle de AOxal e ACa.

Figura 11 Aspecto visual das esferas AGOCa antes (a) e depois (b) de 48 h de armazenamento em tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,5)



Figura 12. Detalhe do armazenamento das esferas AGOCa em sílica gel.



Estes resultados foram interessantes porque demonstraram que não só variáveis como: tempo de imobilização, concentração de enzima, relação enzima/substrato, etc., comumente estudadas durante processos de imobilização enzimática podem ter uma influência significativa sobre a atividade do catalizador imobilizado, mas também as características do próprio suporte.

Fundueanu *et al.* (1999) avaliaram a influência do pH nas características físicoquímicas de micropartículas de alginato-cálcico, determinando que quando essas eram armazenadas em solução ácida (pH 3,0), havia uma substituição parcial de íons cálcio por prótons e que os íons Ca^{2+} remanentes permaneciam somente nas cavidades eletronegativas dos blocos guluronato, fornecendo um complexo mais estável. Acréscimo contínuo no pH da solução de armazenamento conduzia a um aumento progressivo na porosidade da rede polimérica, favorecendo sua deterioração, até sua completa dissociação e solubilização.

Yoo *et al.* (2006) estudaram a influência do pH na estabilidade das micropartículas de alginato-cálcico utilizadas para o encapsulamento de α -tocoforol e observaram que as estruturas do gel de alginato-cálcico são relativamente estáveis em pH ácido, mas incham facilmente e se desintegram sob condições alcalinas suaves.

Ouwerx *et al.* (1998) demonstraram que em valores de pH baixo (pH < 4,0), os grupos carboxilatos do alginato são protonados e consequentemente, a repulsão eletrostática entre estes grupos diminui, favorecendo a contração da matriz polimérica, com a consequente diminuição da porosidade, aumentando a estabilidade da rede.

O inchamento pode ser justificado pelo fato das esferas úmidas tenderem a absorver água a fim de hidratar regiões vazias que permanecem desidratadas na rede polimérica dentro das esferas, até atingir o estado de equilíbrio. Esse fenômeno é provocado pelo relaxamento da rede polimérica na presença de pressão osmótica e permanece até que a pressão osmótica se iguale às forças de ligação de *crosslinking* que mantêm a estrutura da rede polimérica estável. Quando estas duas forças são iguais, não se observa mais ganho de água pela matriz (HOFFMAN *et al.*, 2006 e PASPARAKIS e BOUROPOULOS, 2006).

5.1.4 Influência do tempo de contato das esferas com a solução de cloreto de cálcio (75 mM) sobre a atividade de Exo-PG.

A Tabela 5 e Figura 13 apresentam a variação dos valores de atividade de Exo-PG (U/g) durante 60 minutos de contato das esferas de AGOCa com a solução de CaCl₂ e gelatina. De acordo com a Tabela 5 a maior atividade foi obtida quando as esferas foram deixadas por 10 minutos em contato com a solução de CaCl₂ e gelatina. A partir desse tempo, observa-se uma queda da atividade de Exo-PG do extrato enzimático imobilizado. Os valores correspondentes aos tempos 6 e 20 minutos não diferem estatisticamente (p < 0,05) e o valor obtido aos 10 minutos (2,56 ± 0,04 U/g) é estatisticamente diferente dos demais. Em função deste resultado, o tempo de contato das esferas com a solução de CaCl₂ e gelatina foi fixado em 10 minutos.

Tempo (min)	Atividade Exo-PG (U/g) *
3	$1,47 \pm 0,07^{\rm e}$
6	$2,12 \pm 0,09^{b}$
10	$2,56 \pm 0,04^{a}$
20	$2,22\pm0,05^{\text{ b}}$
30	$1,92 \pm 0,051^{\circ}$
60	$1,67 \pm 0,05$ ^d

Tabela 5. Atividade de Exo-PG (U/g) durante 60 minutos de contato das esferas de AGOCa com a solução de CaCl₂ e gelatina.

*Média \pm desvio padrão seguida de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste Tukey).

Figura 13. Influência do tempo de contato das esferas com a solução de cloreto de cálciogelatina sobre a atividade de Exo-PG (U/g).



A diminuição da atividade de Exo-PG depois de transcorridos 10 minutos de contato, foi vinculada à contínua incorporação de cálcio na matriz polimérica-inorgânica AGOCa na medida que essas permaneciam submersas por diferentes tempos na solução de CaCl₂ e gelatina (Figura 14). A contínua incorporação do cálcio nas esferas de AGOCa, ocasiona a obstrução dos poros, e com isso um retardo na difusão molecular através da camada inorgânica de oxalato de cálcio-gelatina formada ao redor da matriz, diminuindo a atividade enzimática.



Figura 14. Incorporação do cálcio nas esferas de alginato em relação ao tempo de contato com a solução de CaCl₂ e gelatina.

Raras são as informações que relacionam a influência do tempo de contato de esferas de alginato cálcio com a solução de CaCl₂ sobre a atividade enzimática. Zhang *et al.* (2008) ao imobilizar álcool desidrogenase em suporte hibrido de alginato-carbonato de cálcio, fixaram em 10 minutos o tempo de contato das cápsulas com a solução de CaCl₂ e gelatina, o que concorda com os resultados obtidos no presente estudo.

Shen *et al.* (2010) reportaram menor atividade relativa (58,6%) da β -galactosidase imobilizada em esferas de alginato-gelatina-fosfato de cálcio, quando comparada com a atividade relativa (62,3%) da β -galactosidade imobilizada em esferas de alginato, Os autores atribuíram este resultado a problemas de transferência de massas ocasionados pela camada de fosfato de cálcio e gelatina formada no suporte.

5.1.5 Cinética do tempo de reação na medida de atividade de Exo-PG do extrato enzimático imobilizado

Realizou-se um estudo cinético a fim de otimizar o tempo de reação do extrato enzimático imobilizado. A Tabela 6 apresenta os valores de atividade de Exo-PG do imobilizado, expressos em U/g em função do tempo de reação. Observar-se que não há um ganho considerável da atividade enzimática à medida que aumenta o tempo de reação avaliado (20 minutos). Os tempos 3, 5 e 10 minutos não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p <0,05), podendo as determinações de atividade ser todas realizadas a partir

do tempo de 3 minutos. A partir destes resultados, o tempo de reação de 5 minutos foi selecionado para a realização de todas as análises, devido a não diferir significativamente (p <0,05) do tempo 3 minutos, considerado um tempo relativamente pequeno.

Tabela 6. Atividade de Exo-PG (U/g) do extrato imobilizado durante 20 minutos de reação a 37 °C utilizando substrato de pectina citrica (0,5 %, pH 5,5).

Tempo (min)	Atividade de Exo-PG (U/g)*
3	$1,56 \pm 0,05$ ^b
5	$1,54 \pm 0,12^{\text{ b}}$
10	$1,84\pm0,12~^{\rm ab}$
20	$2,03 \pm 0,20^{\rm a}$

*Média \pm desvio padrão seguida de letras iguais não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste Tukey).

Zeni (2011) realizou uma cinética para a medida de atividade de Exo-PG produzidas por *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa e determinou que a 40 °C de incubação, 6 minutos é o tempo de reação ótimo para a medida de atividade enzimática. Gomes *et al.* (2011) realizaram estudo de medida de atividade de Exo-PG em incubação a 37 °C e 6 minutos de reação, utilizando *A. niger* ATCC 9642 em fermentação submersa. Maller (2008) realizou a medida de atividade da PG produzida por *A. niveus*, incubando por 10 minutos a 40 °C. Rehman *et al.* (2013) determinaram como 10 minutos o tempo ótimo de reação sobre a atividade relativa da pectinase de *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 imobilizada em esferas de alginato cálcico.

5.2 Determinação de parâmetros operacionais e cinéticos do extrato de Exo-PG imobilizado em AGOCa e a sua comparação com as matrizes controle

Neste item, mostram-se os resultados obtidos referentes à segunda etapa do presente trabalho, na qual foram realizados estudos comparativos da imobilização do extrato enzimático de Exo-PG em AGOCa e nas matrizes controles de ACa e AOxal, em termos de caracterização parcial (temperatura e pH ótimos e estabilidade), parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$), análises morfológicas das esferas obtidas, avaliação dos reúsos e rendimento da imobilização (RI %).

5.2.1 pH e temperatura ótima

Dentre os parâmetros a serem estudados, a caracterização da enzima imobilizada em termos de pH e temperatura ótima constitui uns dos mais relevantes, já que são estas variáveis as que visarão à aplicabilidade industrial deste tipo de biocatalisadores.

Após a imobilização do extrato enzimático na matriz de AGOCa e nas matrizes controle de AOxal e ACa, avaliou-se o efeito do pH e a temperatura sobre a atividade enzimática de Exo-PG dos imobilizados. A determinação dos valores de temperatura e pH ótimos para cada uma das matrizes de imobilização, foi conduzido através da realização de um planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais. Na Tabela 7, apresenta-se a matriz do planejamento experimental, bem como os valores reais, codificados das variáveis independentes e a resposta obtida para atividade de Exo-PG (U/g).

Var	Variáveis independentes		Resposta		
			Atividade o	de Exo-PG (U	J /g)
Ensaios	pН	Temperatura	AGOCa	AOxal	ACa
1	-1(3,4)	-1(37)	0,72	0,89	1,36
2	1(5,5)	-1(37)	1,17	1,54	4,34
3	-1(3,4)	1(73)	1,18	1,37	2,88
4	1(5,5)	1(73)	2,50	3,73	5,55
5	-1,41(3)	0(55)	1,05	1,45	2,36
6	1,41(6)	0(55)	1,96	2,58	5,53
7	0(4,5)	-1,41(30)	1,02	1,33	1,69
8	0(4,5)	1,41(80)	1,86	2,76	2,53
9	0(4,5)	0(55)	1,34	2,23	2,84
10	0(4,5)	0(55)	1,51	2,37	2,78
11	0(4,5)	0(55)	1,36	2,37	2,79

Tabela 7. Matriz do planejamento experimental DCCR 2^2 (valores codificados e reais com a resposta atividade de Exo-PG) para a caracterização parcial da enzima imobilizada.

Independente da matriz de imobilização observa-se um aumento da atividade com o aumento do pH e da temperatura. O ensaio 4, com valores de atividades de Exo-PG de 2,50; 3,73 e 5,55 U/g para as matrizes de AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente, foi o que apresentou as melhores respostas.

As Tabelas 8, 9 e 10 apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de t e p a um nível de confiança de 95 % das variáveis independentes pH e temperatura para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente.

	Coeficientes	Erro padrão	t(5)	р
	de regressão			
Média*	1,403652	0,083020	16,90750	0,000013
pH (L)*	0,382776	0,101831	7,51791	0,000659
pH (Q)	0,030754	0,121510	0,50620	0,634241
Temperatura (L)*	0,372909	0,101831	7,32412	0,000744
Temperatura (Q)	-0,001940	0,121510	-0,03194	0,975758
pH x T*	0,217500	0,143796	3,02512	0,029244

Tabela 8. Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento 2^2 para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em AGOCa.

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 9. Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento 2^2 para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em AOxal.

	Coeficientes	Erro padrão	t(5)	р
	de regressão			
Média*	2,323911	0,153486	15,14087	0,000023
pH (L)*	0,577129	0,188264	6,13108	0,001676
pH (Q)	-0,192033	0,224648	-1,70964	0,148026
Temperatura (L)*	0,587535	0,188264	6,24162	0,001546
Temperatura (Q)	-0,176943	0,224648	-1,57529	0,176007
pH x T*	0,427500	0,265849	3,21612	0,023567

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 10. Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento 2^2 para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em ACa .

	Coeficientes	Erro padrão	t(5)	р
	de regressão			
Média*	2,801336	0,253926	11,03208	0,000107
pH (L)*	1,268737	0,311462	8,14697	0,000453
pH (Q)*	0,701918	0,371656	3,77725	0,012926
Temperatura (L)*	0,490760	0,311462	3,15133	0,025341
Temperatura (Q)	-0,221074	0,371656	-1,18967	0,287582
pH x T	-0,077500	0,439818	-0,35242	0,738893

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Na Tabela 8, correspondente aos efeitos das variáveis para os experimentos de imobilização em AGOCa, verifica-se que o pH (L), temperatura (L) e a interação pH x T exercem um efeito positivo significativo (p<0,05) sobre a resposta. Efeitos similares foram observados para a atividade de Exo-PG na matriz de AOxal (Tabela 9).

Para a matriz de ACa (Tabela 10), constatou-se que o pH (L) e (Q) e a temperatura (L) exerceram efeitos significativos (p<0,05) e positivos sobre o processo, ou seja, que seus aumentos proporcionam um incremento da atividade de Exo-PG do extrato enzimático imobilizado.

As equações 5, 6 e 7 apresentam os modelos matemáticos empíricos, obtidos através dos coeficientes de regressão, referentes à imobilização do extrato enzimático em AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente, em termos de atividade de Exo-PG (U/g) em função do pH e temperatura, dentro da faixa estudada.

$$Exo-PG = 1,4 + 0,38 \ pH + 0,37 \ T + 0,21 \ pH.T$$
(5)

$$Exo-PG = 2,32 + 0,57 \ pH + 0,58 \ T + 0,42 \ pH.T$$
(6)

$$Exo-PG = 2,8 + 1,26 \, pH + 0,7 \, pH^2 + 0,49 \, T \tag{7}$$

Onde Exo-PG é a atividade Exo-Poligalacturonásica (U/g) do imobilizado e T é a temperatura em °C

Os modelos codificados foram validados pelas análises de variância apresentadas nas Tabelas 11, 12, e 13 referentes à imobilização do extrato enzimático em AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente.

Tabela 11. Análise de variância para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em AGOCa .

Fonte de	Soma dos	Graus de	Média	F _{calculado}
Variação	Quadrados	Liberdade	Quadrática	
Regressão	2,47	3	0,82	58,57
Resíduo	0,10	7	0,014	
Total	2,57	10		

 $R=0,95; F_{tab.0,95; 3;7}=4,35$

Soma dos	Graus de	Média	$\mathbf{F}_{\mathbf{calculado}}$
Quadrados	Liberdade	Quadrática	
6,15	3	2,05	22,77
0,64	7	0,09	
6,79	10		
	Soma dos Quadrados 6,15 0,64 6,79	Soma dos Graus de Quadrados Liberdade 6,15 3 0,64 7 6,79 10	Soma dosGraus deMédiaQuadradosLiberdadeQuadrática6,1532,050,6470,096,791010

Tabela 12. Análise de variância para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em AOxal.

 $R=0,90; F_{tab.0,95; 3;7}=4,35$

Tabela 13. Análise de variância para atividade enzimática de Exo-PG (U/g) do extrato enzimático imobilizado em ACa.

Fonte de	Soma dos	Graus de	Média	F _{calculado}
Variação	Quadrados	Liberdade	Quadrática	
Regressão	18,35	3	6,12	34
Resíduo	1,26	7	0,18	
Total	19,62	10		

R=0.93; $F_{tab.0.95; 3;7}=4.35$

Verifica-se que para todas as matrizes de imobilização o valor de F calculado foi maior que o valor tabelado, apresentando coeficientes de correlação (R) superiores a 90%, o que permitiu a validação estatística dos modelos matemáticos empíricos (p<0,05) e a construção das Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno apresentadas nas Figuras 15, 16 e 17 para a atividade de Exo-PG (U/g) do extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente.

Através das Figuras 15 a 17, fica evidenciado que nas faixas estudadas, à medida que o pH e a temperatura aumentam, ocorre um incremento na atividade de Exo-PG. Dentre os suportes, o contendo gelatina (AGOCa) foi o que apresentou os menores valores de atividade. Para o ensaio 4 (Tabela 7) foram observados os maiores valores de atividade enzimática, com 2,5, 3,73 e 5,5 U/g, para as imobilizações em AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente. O menor valor de atividade do extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa em comparação com as matrizes controle, foi vinculado a formação da camada inorgânica de oxalato de cálcio e gelatina na superfície da matriz de encapsulamento, o que pode ter causado problemas transferência de massas, pela diminuição da interação do substrato com o sitio ativo.

Figura 15. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de Exo-PG (U/g) obtida em função do pH e a temperatura (°C) para o extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa.



Figura 16. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de Exo-PG (U/g) obtida em função do pH e a temperatura (°C) para o extrato pectinolítico imobilizado em AOxal.



Figura 17. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de Exo-PG (U/g) obtida em função do pH e a temperatura (°C) para o extrato pectinolítico imobilizado em ACa.



Observou-se que na faixa de pH e temperatura estudada o extrato pectinolítico imobilizado tanto na matriz de AGOCa quanto na matriz de AOxal apresentou comportamento semelhante, obtendo-se valores ótimos de atividade de Exo-PG nas faixas de pH de 5,0 a 6,0 e de temperatura de 60 a 80 °C. Para o extrato pectinolítico imobilizado na matriz de ACa, os valores ótimos de atividade de Exo-PG foram observados na faixa de pH de 5 a 6 e em uma ampla faixa de temperatura, entre 40 e 80°C.

O uso de enzimas nos processos industriais pode requer de reações que sejam conduzidas a altas temperaturas, a fim de melhorar a produtividade do processo catalítico pelo aumento das velocidades de reação e reduzir a contaminação microbiana, consequentemente, enzimas com altas temperaturas ótimas são muito interessantes para seu uso industrial (ORTEGA *et al.*, 2004, KUMAR *et al.*, 2006). Na indústria de sucos e vegetais, precisa-se que o material após a passagem por processos térmicos seja resfriado a 50°C para tratamento com as enzimas pectinolíticas, portanto o uso de pectinases termoestáveis evitaria a etapa de resfriamento, reduzindo tempo e custo dos processos (GOMES *et al.*, 2007)

Comparando os resultados obtidos com os reportados por Gomes *et al.*(2011) onde ao produzir e caracterizar o extrato enzimático pectinolítico de *A. niger* ATCC 9642, reportou a máxima atividade a pH 5,5 e temperatura 37 °C, demonstra-se que o extrato enzimático pectinolítico imobilizado manteve o mesmo pH ótimo em comparação com a sua forma livre. No entanto, a imobilização ocasionou um aumento significativo da temperatura ótima. Kennedy (1987) sugere que incrementos na temperatura ótima comparado com a enzima livre podem ser resultados de baixas temperaturas internas no microambiente no gel.

O pH e temperatura ótima da pectinases imobilizadas podem variar em função da cepa utilizada, do tipo de suporte e das condições de imobilização.

Pifferi e Spagna (1987) estudaram a imobilização de Endo-poligalacturonase comercial em γ -alumina e determinaram valores de pH e temperatura ótima de 5,5 e 70 °C, respectivamente. Os autores observaram que na avaliação da atividade em função da temperatura, a atividade do imobilizado aumentava à medida que se incrementava a temperatura na faixa testada de 20 a 70 °C. Segundo eles, isto pode ser explicado pela redução da viscosidade da solução de substrato com o aumento da temperatura, o que provavelmente aumentou a difusão do substrato ao sítio ativo da endo-PG imobilizada, através da estrutura porosa do suporte. Estes resultados concordam com os encontrados no presente estudo e podem justificar o aumento da atividade de Exo-PG do extrato pectinolítico imobilizado nas matrizes estudadas quando se aumenta a temperatura de reação.

Bampi (2010) descreve a poligacturonase de *P. brasilianum* imobilizada em suporte de alginato de sódio- glutaraldeído-carvão ativado, com pH ótimo de 4,5 e temperatura de 80 °C.

Buga *et al.* (2010) ao imobilizar poligalacturonase de *A. niger* SA6 em alginato de cálcio observou em pH 4,5 e temperatura 40 °C a máxima atividade.

A temperatura e o pH ótimo para a PG de *A. niger* imobilizada em nylon 6 ativado com glutaraldeído no estudo de Saxena *et al.* (2009) ficou em 50°C e 5,0, respectivamente.

Spagna *et al.* (1995) imobilizando pectina liase em poliméricos sintéticos, determinaram pHs ótimos de 5,6; 6,5 e 6,4 e, temperaturas ótimas de 75, 75 e 73 °C para a pectina liase imobilizada em Eupergit C, Nylon 6-GA e XAD 7-TCT, respectivamente.

5.2.2 Estabilidade do extrato enzimático imobilizado

A estabilidade térmica a baixas temperaturas é um parâmetro importante que deve ser avaliado, uma vez que seu estudo permitirá determinar por quanto tempo o biocatalisador imobilizado poderá ser armazenado e quanto de sua atividade inicial será mantida ao longo do período de estocagem. A estabilidade de armazenamento do imobilizado em AGOCa, AOxal e ACa foi conduzida à temperatura de 4 °C, por um período de 33 dias. Neste período, a atividade de Exo-PG do extrato imobilizado foi acompanhada em intervalos de tempo regulares de 3 dias. A Figura 18 apresenta os perfis de atividade relativa (%) para o estudo de estabilidade térmica a 4 °C.





Percebe-se que existem diferenças na estabilidade dependendo da matriz de imobilização empregada. O extrato enzimático pectinolítico imobilizado na matriz de AGOCa

apresentou maior estabilidade ao armazenamento, bem como uma maior atividade relativa (≅ 160 %) em comparação as matrizes controle, com atividades relativas de ≅100%.

Cabe destacar que independentemente da matriz utilizada como suporte, o extrato pectinolítico imobilizado, armazenado em temperatura de resfriamento (4 °C), manteve sua atividade inicial após os 33 dias de armazenamento.

Busto *et al.* (2010) ao imobilizar PG sobre esferas de polimetacrilato-divinilbenceno (pm-dvb), determinaram que a enzima imobilizada retém aproximadamente 70,5 % da sua atividade após dois meses de armazenamento.

Bampi (2010) estudou a imobilização da PG de *P. brasilianum* em suporte de alginatocarvão e observou perda de atividade de mais de 50 % após 67 h de armazenamento a 4 °C.

5.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{máx}$ e K_m

A determinação dos parâmetros cinéticos $V_{máx}$ e K_m , foi conduzida utilizando diferentes concentrações do substrato pectina cítrica, na faixa de 0,5 a 15 mg/mL. Ambos parâmetros foram obtidos pela análise das velocidades iniciais de reação nas diferentes concentrações de substrato estabelecidas para este estudo e uma única concentração de enzima.

Na Tabela 14, são apresentados os resultados da atividade de Exo-PG (U/g) do extrato pectinolítico imobilizado obtidos em função das concentrações de pectina cítrica [S].

Substrato	Atividade de Exo-PG (U/g) ± Desvio padrão		svio padrão
(g/mL)	AGOCa	AOxal	ACa
0,00025	$0{,}44\pm0{,}08$	$0,\!94 \pm 0,\!12$	$0,32 \pm 0,13$
0,0005	$0,53 \pm 0,13$	$1,\!17\pm0,\!24$	$0,\!49\pm0,\!19$
0,001	$0,82 \pm 0,1$	$1{,}53\pm0{,}09$	$0,\!67\pm0,\!16$
0,003	$1,\!30\pm0,\!12$	$2{,}08\pm0{,}21$	$1,26 \pm 0,13$
0,005	$1,\!89\pm0,\!17$	$3,08 \pm 0,11$	$1,\!56\pm0,\!05$
0,007	$2{,}70\pm0{,}09$	$3,25 \pm 0,1$	$2,61 \pm 0,11$
0,009	$3,04 \pm 0,06$	$4,10 \pm 0,21$	$2,\!67\pm0,\!15$
0,01	$3,03 \pm 0,12$	$4,\!11\pm0,\!16$	$2{,}69\pm0{,}25$
0,013	$3,\!30\pm0,\!19$	$4,\!19\pm0,\!22$	$3,35 \pm 0,15$
0,015	$4,\!36\pm0,\!22$	$4{,}50\pm0{,}12$	$\textbf{4,82} \pm \textbf{0,08}$

Tabela 14. Atividade de Exo-PG (U/g) do extrato pectinolítico imobilizado em função da concentração do substatro pectina cítrica.

Percebe-se um aumento na atividade de Exo-PG nas três matrizes de imobilização (AGOCa, AOxal e ACa), com a concentração do substrato, não apresentando inibição pelo substrato mesmo na maior concentração avaliada. O aumento da velocidade com a concentração do substrato sugere que a reação catalisada pelo extrato pectinolítico imobilizado nas matrizes de estudo se comportou como uma reação de 1ª ordem.

As equações e os R² obtidos dos perfis de linearização (Figura 22, 23 e 24, Apêndice I), utilizando-se o modelo de Lineweaver-Burk (Equação 2) para os dados de atividade de Exo-PG do extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente, são apresentados a seguir:

AGOCa:
$$\frac{1}{v} = 0,0008 \frac{1}{s} + 0,2597; R^2 = 0,984$$
 (8)

AOxal:
$$\frac{1}{v} = 0,0003 \frac{1}{s} + 0,2315; R^2 = 0,97$$
 (9)

ACa:
$$\frac{1}{v} = 0,0007 \frac{1}{s} + 0,3151; R^2 = 0,98$$
 (10)

Os elevados fatores de correlação ($R^2 > 0,97$) indicam uma boa adequação dos resultados.

Na Tabela 15, são apresentados os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} obtidos para as matrizes estudadas.

Matriz	K _m (mg/mL)	$V_{máx}$ (µmol/min.g)
AGOCa	3,0	3,85
AOxal	1,3	4,32
ACa	2,2	3,17

Tabela 15. Valores de Km e Vmáx para o extrato enzimático pectinolítico imobilizado em AGOCa, AOxal e ACa.

Observa-se que o valor de K_m encontrado para o extrato imobilizado em AGOCa foi maior que os obtidos para as matrizes de AOxal e ACa. Este aumento pode ter ocorrido devido às restrições difusionais, ou seja, limitações de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, ocasionado pela formação da camada inorgânica ao redor das esferas de AGOCa. As limitações na difusão são afetadas principalmente pelo tamanho das esferas, forma, tamanho dos poros e a carga enzimática da imobilização, assim como também pelas mudanças estruturais na enzima, com as moléculas podendo ter assumido uma conformação inativa (BUGA *et al.*, 2010, YANG *et al.*, 2010; YIGITOGLU e TEMOÇIN, 2010). Com relação ao $V_{máx}$, obteve-se maior valor deste parâmetro quando o extrato de Exo-PG foi imobilizado em AOxal.

Ortega *et al.* (2004) utilizando pectina como substrato, avaliaram as propriedades cinéticas de poligalaturonases comerciais livres e, obtiveram valores para K_m de 0,043, 0,107 e 0,220 mg mL⁻¹ e de V_{máx} 1,91, 1,37 e 2,82µmol min⁻¹ para Rapidase C80, Pectinase CCM e Pectinex 3XL, respectivamente.

Buga *et al.* (2010) obtiveram valores de K_m e $V_{máx}$ para poligalacturonase imobilizada em alginato cálcico de 11,1mg/mL e 1,65 µmol min⁻¹mg⁻¹, respetivamente.

Demirel *et al.* (2004) imobilizando Pectinex Ultra SP-L em partículas de duolite magnético-poliestireno a 20 °C e obtiveram valores para $K_m e V_{máx} de 1,87 g mL^{-1} e 5,57 \times 10^{-3} g s^{-1} g particula^{-1}$, respectivamente.

Esawy *et al.* (2013) avaliaram os parâmetros cinéticos da pectinase de *A. niger* NRC1ami imobilizada em esponja de polivinil-álcool (PVA) e encontraram valores para K_m e $V_{máx}$ de 3,2 mg mL⁻¹ e 3,8 mg mL⁻¹ min⁻¹, respectivamente, utilizando pectina como substrato.

Sarioglu *et al.* (2001) reportaram valores para $V_{máx}$ e K_m de 0,009 % (w/v)/s e 2,172 % (w/v) pectina, respectivamente, para Pectinex Ultra SP-L imobilizada em resina aniônica.

5.2.4 Morfologia e estrutura

Na Figura 19, observa-se a aparência das matrizes obtidas de AGOCa, AOxal e ACa, respectivamente.

Figura 19. Aparência das esferas de AGOCa (a), AOxal (b) e ACa (c)



Nota-se que as esferas de ACa (c) apresentaram aparência semitransparente em comparação com as de AGOCa (a) e AOxal (b), as quais apresentaram coloração branca, característica do oxalato de cálcio precipitado durante a incorporação do cálcio na matriz de encapsulamento, quando se utilizou o tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) como coadjuvante do processo de imobilização.

Na Figura 20, são apresentas as fotografias obtidas da análise morfológica das matrizes de encapsulamento, empregando-se uma Lupa Leb-3 (Lambda) de Ocular WF 10x e resolução 1280x1024.





Pode-se observar que as esferas de AGOCa (a) e AOxal (b) são morfologicamente mais arredondadas e definidas em relação com as de ACa (c). Além disso, percebe-se que as

superfícies das matrizes de AGOCa e AOxal mostram-se com menores rugosidades e são mais uniformes do que a matriz de ACa.

5.2.5 Rendimento

O rendimento é um parâmetro importante para determinar a eficiência do processo de imobilização, o qual será mais eficiente na medida em que se consiga encapsular a maior quantidade de enzima possível. Após o encapsulamento do extrato enzimático pectinolítico, realizou-se a determinação do rendimento de imobilização. A Tabela 16 apresenta os resultados de rendimento obtidos nas matrizes de estudo, desvio padrão e o Teste de Tukey, em nível de 95 % de confiança.

Tabela 16. Rendimento de imobilização (%) para as matrizes de imobilização.

Matriz	RI (%)*
AGOCa	$72,70 \pm 1,64^{a}$
AOxal	$55,58 \pm 1,26^{b}$
ACa	$52,97 \pm 1,04^{b}$

*Média \pm desvio padrão seguida de letras iguais não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste Tukey).

Pode-se observar que o maior rendimento de imobilização, com 72,7%, foi obtido pela matriz de AGOCa, seguido por 55,58 % e 52,97 %, para as matrizes de AOxal e ACa, respectivamente, sendo que estes últimos não diferem estatisticamente (p<0,05) entre si. No entanto, independente da matriz de imobilização empregada, os rendimentos obtidos são relevantes quando comparados com a literatura.

Serrat e Valverde (2005) estudaram a imobilização covalente de Endo-PG de *K. marxianus* em alginato de cálcio ativado com glutaraldeído e, obtiveram rendimento de imobilização de 26,4 %, com drástica redução da atividade (>70 %), o qual segundo os autores é característico da união covalente.

Rao *et al.* (2000), ao imobilizar Endo-PG de *A. ustus* sobre sílica gel, obtiveram uma eficiência de imobilização do 28 %.

Shukla *et al.* (2010) imobilizaram PG de *A. niger* em nylon-6- ativado com glutaraldeído e obtiveram 40 % de rendimento de imobilização.

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

5.2.6 Reúso do extrato pectinolítico imobilizado

O maior interesse ao imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador que possa ser reutilizado no processo catalítico. Ao longo dos reúsos, é comum obter diminuição da atividade enzimática. Esta queda deve ser quantificada para determinar o número máximo de vezes que a enzima imobilizada pode ser utilizada, sem afetar significativamente a produtividade do processo (KEMPKA, 2012). A Figura 24 mostra os perfis de atividade relativa (%) obtidos para o extrato enzimático de Exo-PG em relação ao reúso.





Observa-se uma perda gradativa da atividade relativa ao longo do reúso, sendo que o extrato enzimático imobilizado em AGOCa apresentou os melhores resultados, permitindo um maior número de reutilizações em comparação com as matrizes controle, mantendo 56,3
% de sua atividade inicial no 9° ciclo. Quando imobilizado nas matrizes controle de AOxal e ACa, atividades relativas superiores a 50%, com 50,63 % e 57,6 % das suas atividades iniciais foram mantidas até o 7° e 6° ciclo, respectivamente. A perda de atividade relativa pode ser explicada pela inativação da enzima em virtude da desnaturação proteica (KEPMKA, 2012). Geralmente enzimas encapsuladas em alginato de cálcio, têm diminuição da sua atividade após seu uso em diferentes ciclos catalíticos, devido à liberação da enzima do suporte como resultado da lavagem das esferas no final de cada ciclo, além de mudanças conformacionais e ao dano mecânico das esferas depois de ser utilizadas repetidas vezes (REHMAN *et al.*, 2013; WON *et al.*, 2005).

Buga *et al.* (2010) estudaram o reúso da poligalacturonase de *A. niger* (SA6) imobilizada em alginato de cálcio e determinaram que após três ciclos, esta conserva 14,8 % da sua atividade catalítica inicial. Segundo os autores, a redução da atividade pode ser devida à inativação pelo calor e à perda gradual da atividade devido à fuga de enzima ao meio reacional.

Saxena *et al.* (2008) obtiveram 50 % de perda da atividade relativa após três ciclos de reúso da poligalacturonase de *A. niger* Van Tieghem (MTCC 3323) imobilizada em suporte ativado de polietileno, enquanto, Rao *et al.* (2000) relataram uma retenção de 28 % da atividade de uma Endo-poligalacturonase, obtida a partir de *A. ustus*, imobilizada, após ser utilizada por 10 ciclos.

Valores de atividade residual nos reúsos de pectinases também são reportado na literatura. Csanádi e Sisak, (2006) ao avaliarem o reúso da enzima Pectinex Ultra SP-L imobilizada em resina de Amberlite IRA900 Cl, determinaram que ela pode ser usada por 12 ciclos consecutivos para a produção de frutooligossacarídeos.

Li *et al.* (2008) estudaram a imobilização de pectinase comercial em suporte ativado de ágar-gel e encontraram que a enzima imobilizada matem 81 % de atividade residual após 10 ciclos de reação.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi estudada a influência das variáveis no processo de imobilização do extrato enzimático pectinolítico de *A. niger* ATCC 9642 em suporte polimérico-inorgânico de AGOCa e sua comparação com as matrizes controle de AOxal e ACa em termos de caracterização parcial, parâmetros cinéticos, análise morfológica, rendimento e reúso.

O tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) foi selecionado como coadjuvante para o processo de imobilização por apresentar precipitação com cálcio no pH a ser estudado e permitir pela interação com a gelatina presente na solução de CaCl₂ a formação da camada inorgânica na superfície das esferas. Determinou-se a proporção 3:10 (v/v) como a melhor relação enzima/tampão para ser utilizada durante o processo de imobilização.

Os testes feitos para a lavagem e armazenamento das esferas de AGOCa indicaram a incompatibilidade do emprego do tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) para tal finalidade, uma vez que esse ocasionava a aglomeração das esferas de AGOCa, bem como sua deterioração. Selecionou-se o tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,5) para a lavagem das esferas, por não apresentar os problemas antes mencionados.

Verificou-se, nos testes de armazenamento, que o uso no tampão fosfato de sódio (pH 5,5 e 7,5) conduziu à desnaturação do extrato enzimático pectinolítico imobilizado em AGOCa, além disso, constatou-se que, após 48 h de armazenamento das esferas de AGOCa em solução tampão de acetato de sódio (100 mM, pH 5,5), estas apresentaram inchamento ocasionando a deterioração da matriz de encapsulamento.

Os tempos de reação para a medida de atividade enzimática e de contato das esferas na solução de $CaCl_2$ e gelatina foram fixados em 5 e 10 minutos, respectivamente.

Há um aumento na incorporação do cálcio na matriz de encapsulamento de AGOCa à medida que as esferas permanecem mais tempo submergidas na solução de CaCl₂ e gelatina.

As melhores atividades enzimática de Exo-PG para as matrizes de imobilização estudadas foram obtidas nos ensaios em que foram aplicados maiores valores de pH e temperatura. Determinou-se que, para o extrato pectinolítico imobilizado na matriz de AGOCa e ACa as faixas ótimas de atividade para o pH e a temperatura são de 5,0 a 60 e de 60 a 80 °C, respectivamente. A matriz de ACa apresentou valores ótimos de atividade de Exo-PG na faixa de pH de 5 a 6 e em uma ampla faixa de temperatura de 40 a 80°C.

Na avaliação da estabilidade de armazenamento a 4°C os valores de atividade residual obtidos para o extrato enzimático de Exo-PG imobilizado em AGOCa, AOxal e ACa foram 159,7 %, 106,3 % e 120,9 %, respetivamente. Demonstrou-se que independentemente da matriz utilizada como suporte, o extrato imobilizado pode ser armazenado a 4 °C, mantendo sua atividade inicial após 33 dias de armazenamento. Porém, a matriz polimérica de AGOCa fornece ao extrato enzimático maior estabilidade à temperatura estudada, se comparada com as matrizes controle.

A análise dos parâmetros cinéticos forneceu valores de 0,003, 0,0013 e 0,0022 (g/mL) para K_m e 3,85, 4,32 e 3,17 (μ mol/min.g) para V_{máx} para as matrizes de AGOCa, AOxal e AÇA, respectivamente. Evidenciou-se que o extrato enzimático imobilizado em AGOCa apresentando maior valor do K_m em comparação com as matrizes controle, este aumento pode ter ocorrido devido às limitações de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, ocasionado pela formação da camada inorgânica ao redor das esferas de AGOCa

Na avaliação morfológica das matrizes de encapsulamento, observou-se que quando utilizado o tampão oxalato de sódio (100 mM, pH 5,5) como coadjuvante do processo de imobilização, as esferas apresentaram-se mais arredondadas e definidas, com menores rugosidades na superfície e, portanto, mais uniformes.

O rendimento da imobilização foi obtido para todas as matrizes estudadas, sendo que a matriz de AGOCa apresentou o maior rendimento de imobilização, com aproximadamente 72,7 %. As matrizes controle de AOxal e ACa apresentaram rendimentos de imobilização de 55,6 % e 52,9 %, respectivamente.

Quanto ao reúso, o extrato imobilizado em AGOCa manteve 56,33 % de sua atividade inicial até o 9° ciclo; já quando imobilizado nas matrizes controle de AOxal e ACa, 50,63 % e 57,6 % das suas atividades iniciais foram mantidas nos 7° ciclo e 6° ciclo, respectivamente.

6.1 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo como base os resultados obtidos no presente estudo, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

 avaliar o uso de diferentes tipos de plastificantes e agentes reticulantes como o glutaraldeído, com intuito de obter uma matriz de imobilização com maior estabilidade mecânica;

- estudar a aplicação de fluidos pressurizados e a utilização do ultrassom na tentativa de aumentar a atividade enzimática;
- avaliar a estabilidade a altas temperaturas e diferentes valores de pH;
- determinar a difusividade da enzima nas matrizes estudadas;
- com as matrizes desenvolvidas, sugere-se o estudo da imobilização de outras enzimas bem como a imobilização de micro-organismos;
- como etapa complementar a este trabalho, sugere-se a realização da caracterização física das matrizes de imobilização;
- testar a aplicação do extrato pectinolítico imobilizado em reações de interesse na indústria de alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMAJEED, N.; KHELI, O.; DANIAL, E. Immobilization technology for enhancing bio-products industry, **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13528-13539, 2012.

ALMEIDA, P.; ALMEIDA, A .Cross-linked alginate–gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol, **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 431–439, 2004

ALVES, M.; CAMPOS-TAKAKI, G.; PORTO, A.; MILANEZ, A. Screening of *mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 325-330, 2006.

ALKORTA, I.; GARB, C.; LLAMA, M.; JUAN, L Industrial applications of pectic enzymes: a review, **Process Biochemistry**, v. 33, n. I, p. 21-28, 1998

ANDRADE, M.; DE LA TORRE, A.; LADEIRA, S.; MARTINS, M. Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by *thermophilic Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor, **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 204-208, 2011.

ARMISÉN, M. Nuevos métodos de caracterización y activación de geles de agarosa como soportes para la inmovilización de proteínas de interés industrial. 1997. Tesis Doctoral – Universidad Complutense de Madrid, España.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones, **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. 2, p. 23-29, 1998.

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

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

BAKER, S. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future, **Medical Mycology**, v. 44 Suppl. 1, p. S17-S21, 2006.

BAMPI, G. **Estudo da imobilização e caracterização parcial de poligalacturonase,** 2010 - Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Brasil.

BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. Bioinspired enzyme encapsulation for Biocatalysis, **Trends in Biotechnology**, v.26, n.10, p. 566-572, 2008.

BUGA, M.; IBRAHIM, S.; NOK, A. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6), **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 52, p. 8934-8943, 2010.

CASTILHO L.R., MEDRONHO R. A., ALVES T. L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*, **Bioresource Technology** 71, 45-50, 1999.

CODNER, R. C. Pectinolytic and cellulolitic enzymes in the microbial modification of plant tissues, **Journal of Applied Bacteriology**, v.84, p.147-160, 2001.

COGHETTO, C. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em suporte inorgânico. 2011-Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) -Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Brasil.

CONTRERAS, J.C. **Purificación y caracterización de poligalacturonasas de** *Aspergillus Kwachii*. 2003. Tesis Doctoral – Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

COSTA, J.; COLLA, E.; MAGAGNIN, G.; DOS SANTOS, L.; VENDRUSCOLO, M.; BERTOLIN, T. Simultaneous Amyloglucosidase and Exo-polygalacturonase Production by *Aspergillus niger* using Solid-state Fermentation, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n. 5, p. 759-766, 2007.

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

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO M.; SOLDI V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros, **Química Nova**, v. 27, n 4, p. 623-630, 2004.

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

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

DE SOUZA, S.; OLIVEIRA, L.; DA SILVA, F.; AMORIM, B. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.9, p.987–992, 2010.

DE VRIES, R.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradations of plant cell wall polysaccharides, **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 65, n. 4, p.497-552, 2001.

DEL BIANCHI, V.L., MORAES, I.O., CAPALBO, D.M.F. Biotecnologia Industrial: Fermentação em Estado Sólido. v.2. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001..

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

DEMIREL, D.; ÖZDURAL, A.; MUTLU, M. Performance of immobilized Pectinex Ultra SP-L on magnetic duolite-polystyrene composite particles Part I: a batch reactor study, **Journal of Food Engineering**, v.64, n. 4, p 417–421, 2004.

DÍAZ, A. **Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial**, 2009. Tesis Doctoral -Universidad de Cádiz, España.

DÍAZ, G. **Producción de exopoligalacturonosas de** *Aspergillus niger* por fermentación en medio solido utilizando como soporte espuma de poliuretano, 1999. Tesis (Maestría en Biotecnología) – Universidad Autónoma Metroplolitana, México.

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

EL-TANASH, A.; SHERIEF, A.; NOUR, A. Catalytic properties of immobilized tannase produced from *Aspergillus aculeatus* compared with the free enzyme, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 03, p. 381 - 391, 2011

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

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

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

FREIRE, G. Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillum restrictum*, 1996 - Tese de Doutorado. (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

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

GOMES, E.; GUEZ, M.; MARTIN,N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial, **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007

GOMES, F.; DE PAULA, A.; SILVA, G.; DE CASTRO, H. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Cândida rugosa* imobilizada

em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol, **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 710-718, 2006.

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

GOMES, J. **Produção de poligalacturonase por fermentação submersa utilizando** *Aspergillus niger* **ATCC 9642 em meio sintético**, 2010 - Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Brasil.

GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA,E. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC9642, **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 281-287, 2011.

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

HOFFMAN, A.S. Hydrogels for biomedical applications, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, n.1, p. 3–12, 2002.

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

HOONDAL, G.; TIWARI, RP.; TIWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, K. Microbial alkaline pectinases and theirs applications: a review, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409-418, 2002.

JACOB, N.; PREMA, P. "Influence of Mode of Fermentation on Production of Polygalacturonase by a Novel Strain of *Streptomyces lydicus* en Pectinases from *Actinomycetes*", **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 263-267, 2006.

JAYANI, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review, **Process Biochemestry**, v. 40, p. 2931–2944, 2005.

JEGANNATHAN, K; NIELSEN, P. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review, **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228 – 240, 2013.

KASHYAP, DR.; VOHRA, PK.; TEWARI, R. Application of pectinases in the commercial sector: a review, **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227,2001.

KENNEDY, J. **Enzyme technology**. em: Kennedy JF, Cabral JMS, editors. Biotechnology, v. 7a. Weinbein, Germany: VCH Publ. Verlagsgesellschaf tmbh; 1978.

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

KLEIN, M. Imobilização de β -galactosidade para a obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose, 2010 – Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

KONNO, H.; YAMASAKI, Y.; KATOH, K. Exopolygalacturonase from Suspension Cultures of *Marchantia polymorpha*: its presence and involvement in pectic polysaccharide degradation, **Plant Physiology**, v.73, p.216, 1983.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, **Food Microbiology**, v.21, p. 377–397, 2004.

KUMAR, R.; VISHWANATH, K.; SINGH, S., RAO, A. Entrapment of a-amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization, **Process Biochemestry**, v. 41, p. 2282–2288, 2006.

IWAKI, Y. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de alginato de sódio**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais- Universidade de São Carlos, São Carlos, 2010.

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

LANG, C.; DORNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the thecnological application of polygalacturonases, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 366-375, 2000.

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

LI. T.; LI, S.; WANG, N.; TAIN, L. Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support, **Food Chemistry**, v. p. 109 703–708, 2008.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants, **Journal of the American Chemical Society**, v.56, p. 658-666, 1934.

LIMA, A. Estudo de propriedades físico-químicas de alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistema de liberação de fármacos. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

LU, Z.; ZHANG, J.; MA,Y.; SONG, S.; GU, W. Biomimetic mineralization of calcium carbonate/carboxymethylcellulose, **Materials Science and Engineering**, v. 32, p. 1982–1987, 2012.

MALLER, A. **Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo** *Aspergillus niveus*, 2008 - Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Bioquímica) -Universidade de São Paulo, Brasil. MALLER, A.; DAMÁSIO, A.; DA SILVA, T.; JORGE, J.; TERENZI, H.; POLIZELI, M. Biotechnological Potential of Agro-Industrial Wastes as a Carbon Source to Thermostable Polygalacturonase Production in *Aspergillus niveus*, **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of Medium Composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p.693-702, 2004.

MARTIN, N.; SOUZA, R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 813-819, 2004.

MARTIN, N. Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase. 2006 - Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Rio Claro, Brasil.

MARTÍNEZ, M. Estudio cinético de la producción secuenciada de pectinasas en *Aspergillus flavipes* FP-500, 2009 – Tesis Doctoral (Doctorado en Ciencia en Bioprocesos) - Instituto Politécnico Nacional – México D.F, México.

MARQUES, P. Estudo da imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio. 2011 - Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas, Brasil.

MILLER, L. Use of dinitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry**, v. 37, p. 426–428, 1959.

MICHELI, F. Pectin methylesterase: cell wall enzymes with important roles in plant physiology, **Trend in Plants Science**, v. 6, p. 414–419, 2001.

MONTEIRO, A. **Produção de poligalacturonases por fungos termofílicos e mesofilícos em estado sólido e comparação das isoformas da enzima produzida por cada grupo**, 2006. Tesis Doctorado – Universidad Autónoma de Madrid– Madrid, España.

MONTES, T. Ingeniería de la superficie de la penicilina G acilasa para el desarrollo de nuevos métodos de inmovilización y estabilización, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" – Rio Claro, Brasil.

MUNARETTO, C. **Imobilização da inulinase de** *Kluyveromyces marxianus* **NRRLY–7571 em carvão ativado e alginato de sódio**, 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Brasil.

MURAD, H.; AZZAZ, H. Microbial pectinases and Rumiant Nutrition. **Research** Journal of Microbiology, v. 6, n. 3, p. 246-269, 2011

NAIDU, N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*, **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 57-67, 2003.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarifications, **Food Chemistry**, v. 88, p, 209–217, 2004.

OUATTARA, H.; REBERCHON, S.; NIAMKE, S.; NASSER, W. Biochemical properties of pectate lyases produced by three different *Bacillus* strains isolated from fermenting cocoa beans and characterizations of their cloned genes, **Applied and environmental Microbiology**, v. 76, p, 5214–5220, 2010.

OUWERX, C.; VELINGS, N.; MESTDAGH, M.; AXELOS, M. Physicochemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations, **Polymer Gels and Network**, v. 6, p, 393–408, 1998.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. International, **Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p 34–42, 2006.

PEDROLLI, D.; MONTEIRO, A; GOMES, E.; CARMONA, E. Pectin and pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes, **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, p. 9–18, 2009.

PEREIRA, M. **Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por,** *Kluyveromices marxyanus* utilizando sistemas de duas fases aquosas. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Portugal.

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

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

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

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O. Pectic enzymes, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, v.33, p.323-385, 1976.

RÍOS, L.; ARIAS, F. **Inmovilización de pectinases y/o celulases y determinación de algunos de sus efectos en el jugo de guayaba**. 2002. Trabajo de Grado para obtar el título de Ingeniero Químico, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

RICHETTI, A.; MUNARETTO, C.; LERIN, L.; BATISTELLA, L.; OLIVEIRA, V.; DALLAGO,R.; ASTOLFI, V.; LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.; DE OLIVEIRA D.; TREICHEL, H. Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. **35**, n. 3, p. 383-388, 2012.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. Experimental design and response surface modeling applied for the optimization of pectin hydrolysis by enzymes from *Aspergilllus niger* CECT 2088, **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 634 – 642.

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

ROJAS, N. Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación Biotecnológica: Producción y Caracterización de Ramnosidasas alcalofílicas de Acremonium murorum y Acrostalagmus luteo-albus y Poligalacturonasa acidofílica de Aspergillus kawachii, 2009. Tesis Doctoral– Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

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

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

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**, v. 47 p. 271±274, 2001.

SAXENA, S.; SHUKLA, S.; THAKUR, A.; GUPTA, R. Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification, **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.55, n.1, p. 33–51, 2008.

SCHERER, R. Estudo da imobilização de lipase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Brasil.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, D., FRISVAD, J.C., VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review, **Applied Microbiology Biotechnology.** v. 59 p.426–435. 2002.

SEMENOVA, M.; SINITSYNA, O.; MOROZOVA, V.; FEDOROVA, E.; GUSAKOV, A.; OKUNEV, O.; SOKOLOVA, L.; KOSHELEV, A.; BUBNOVA, T.; VINETSKII, Y.; SINITSYN, P. Use of preparation from fungal pectin lyase in the food industry, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 598-602, 2006.

SERRA, J.; ALKORTA, I.; LLAMA, M.; ALAIIA, A. Aplicación industrial de los enzimas pecticos. Producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectina liasa de *Penicillium italicum*, **Alimentación. Equipos y Tecnología**, v.11, p. 127-134, 1992.

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

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

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

SIEIRO, C.; GARCÍA-FRAGA, B.; LÓPEZ-SEIJAS, J.; DA SILVA, A.; VILLA, T. Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry. In: VALDEZ, B. Food Industrial Processes- Methods and Equipment. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes-methods-andequipment/microbial-pectic-enzymes-in-the-food-and-wine-industry>Acesso em: 18 fev. 2013.

SINGH, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review, **Process.** Biochemistry. V. 40, p. 2931-2944,2005.

SILVA, E; BORGES, M.; MEDINA, C.; PICCOLI, R.; SCHWAN, R. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits, **FEMS Yeast research**, v. 5, n. 9, p. 859-865, 2005.

SIROTEK, K.; MAROUNEK, M.; RADA, V.; BENDA, RV. Isolation and characterization of rabbit caecal pectinolytic bacteria, **Folia Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 79-825, 2001

SPAGNA, G.; PIFFERI, P.; TRAMONTINI, M. Immobilization and stabilization of pectinlyase on sinthetic polymers for application in the beverage industry, **Journal of Molecular Catalysis**, v.101, p.99–105, 1995.

TEIXEIRA, M.; LIMA FILHO, J.; DURÁN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p. 286-290, 2000.

THAKUR, B.; SINGH, R.;. HANDA, A. Chemistry and uses of pectin - a review, **Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

TONNESEN, H.; KARLSEN, J. Alginate in drug delivery systems, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n.6, p. 621–630, 2002.

UENOJO, M.; PASTORE, G. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 509-515, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, G. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VELINGS, M.; MESTDAGH, M. Protein adsorption in calcium alginate gel beads, **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 9, p. 133-141, 1994.

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

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

YOO, S. H.; SONG, Y. B.; CHANG, P.S; LEE, H. G. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, p. 25-30, 2006.

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

ZENI, J. **Produção e caracterização parcial de pectinases obtidas por uma nova cepa de** *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa, 2011 – Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Brasil.

ZHANG, L.; JIANG, Y.; JIANG, Z.; SUN, X.; SHI, J.; CHENG, W.; SUN, Q. Immobilized transglucosidase in biomimetic polymer–inorganic hybrid capsules for efficient conversion of maltose to isomaltooligosaccharides, **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 186–192, 2009.

ZHANG, L.; JIANG, Y.; SHI, J.; SUN, X.; LI, J.; JIANG, Z. Biomimetic polymerinorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation, **Reactive and Funcional Polymers**, v. 68, p. 1507–1515, 2008.

8 APÊNDICES

APÊNDICE I

Figura 22. Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de Exo-PG em relação à concentração de substrato pectina cítrica para o extrato pectinolítico imobilizado em AGOCa.



Figura 23 Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de Exo-PG em relação à concentração de substrato pectina cítrica para o extrato pectinolítico imobilizado em AOxal.



Figura 24. Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de Exo-PG em relação à concentração de substrato pectina cítrica para o extrato pectinolítico imobilizado em ACa.

