

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
CÂMPUS DE ERECHIM
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CINDY ELENA BUSTAMANTE VARGAS

IMOBILIZAÇÃO *in situ* DA PECTINASE COMERCIAL (Rohapect® DA6L) DE
***Aspergillus niger* EM ESPUMA RÍGIDA DE POLIURETANO E APLICAÇÃO NA**
CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE GOIABA

ERECHIM, RS

2017

CINDY ELENA BUSTAMANTE VARGAS

**IMOBILIZAÇÃO *in situ* DA PECTINASE COMERCIAL (Rohpect® DA6L) DE
Aspergillus niger EM ESPUMA RÍGIDA DE POLIURETANO E APLICAÇÃO NA
CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE GOIABA**

Tese apresentada como quesito parcial à obtenção do grau de Doutora, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Câmpus de Erechim.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago
Coorientador(a): Prof^a. Dra. Geciane Toniazzo Backes

ERECHIM, RS

2017

CINDY ELENA BUSTAMANTE VARGAS

IMOBILIZAÇÃO *in situ* DA PECTINASE COMERCIAL (Rohapect® DA6L) DE *Aspergillus niger* EM ESPUMA RÍGIDA DE POLIURETANO E APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE GOIABA

Tese apresentada como quesito parcial à obtenção do grau de Doutora, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Câmpus de Erechim.

Erechim, 28 de março de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago
Orientador - URI Erechim

Prof^a. Dra. Geциane Toniazco Backes
Coorientadora - URI Erechim

Prof. Dr. Marcelo Luís Mignoni
URI Erechim

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira
UCS

Dra. Ilizandra Aparecida Fernandes
URI Erechim

Dra. Simone Maria Golunski
UFFS

Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida, David e Malena, e a todos aqueles que acreditaram nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus reconhecimentos e agradecimentos acima todos e de tudo a Deus, por haver-me permitido vivenciar umas das melhores experiências da minha vida e ter colocado nesta trajetória a tantas pessoas que me apoiaram, motivaram e auxiliaram para que pudesse realizar este sonho.

Agradeço à minha filha, Malena, por ser minha principal motivação e por tantos momentos maravilhosos de amor e alegrias que tornam minha vida mais feliz. Você me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Eu te amo imensamente!

A meu esposo, David, pelo apoio incondicional, estímulo e positivismo quando mais precisei, por acreditar em mim, por proporcionar-me tantos momentos bons, por haver-me acompanhado nesta caminhada e ter contribuído de inúmeras formas para que eu concretizasse este sonho. Esta conquista não teria sido alcançada sem ti.

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

A meu tio Roberto e a sua esposa Elisiane, pela motivação, pela acolhida e por sempre estarem dispostos a ajudar-me. Minha gratidão!

Ao Professor, Rogério Marcos Dallago, por ser mais que um orientador, um amigo e conselheiro. Não há palavras que expressem a minha infinita gratidão por sua valorosa orientação, incentivo, amizade e ajuda. Você é um exemplo como professor e pessoa, e levarei seus ensinamentos por toda a minha vida. Querido Tuca, foi um prazer e uma honra haver convivido com você ao longo desses anos e ter-lhe tido como meu orientador. Obrigada por tudo!

Agradeço também à Professora, Geciane Toniazzo Backes, pela sua coorientação para a realização desta pesquisa. Por sua compreensão em tantos momentos, pela amizade, mas principalmente, pelos ensinamentos e por ter acreditado no meu potencial.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim pelos conhecimentos compartilhados e amizade.

Às bolsistas de iniciação científica, Evelin, Tailine e Paula que me auxiliaram na realização das diversas análises. Muito obrigada.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos e Termodinâmica que sempre estiveram à disposição para ajudar-me, por todos os momentos de troca de conhecimento ou de simples descontração. Muito obrigada a todos.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira, Prof. Dr. Marcelo Luís Mignoni, Dra. Simone Maria Golunski e Dra. Ilizandra Aparecida Fernandes.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, pelo fornecimento de todos os meios para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS, pela concessão da bolsa de doutorado sem a qual não houvesse sido possível a realização desta tese.

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

Minha gratidão!

Hoy es el día más hermoso de nuestra vida, querido Sancho; los obstáculos más grandes, nuestras propias indecisiones; nuestro enemigo más fuerte, el miedo al poderoso y a nosotros mismos; la cosa más fácil, equivocarnos; la más destructiva, la mentira y el egoísmo; la peor derrota, el desaliento; los defectos más peligrosos, la soberbia y el rencor; las sensaciones más gratas, la buena conciencia, el esfuerzo para ser mejores sin ser perfectos, y sobre todo, la disposición para hacer el bien y combatir la injusticia donde quiera que estén.

(Miguel de Cervantes Saavedra)

Así es- suspiró el coronel-, la vida es la cosa mejor que se ha inventado.

(Gabriel García Márquez)

RESUMO

As pectinases catalisam a degradação ou modificação das substâncias pécicas mediante reações de despolimerização e desesterificação. Podem ser empregadas em diversas aplicações industriais, principalmente, no processamento das frutas nas etapas de extração e clarificação dos sucos. Contudo, o uso das pectinases é ainda limitado, devido, principalmente a problemas operacionais como a instabilidade nas condições do processo. As enzimas imobilizadas surgiram como alternativas a esses inconvenientes, pois, na maioria dos casos, melhoram a estabilidade enzimática e possibilitam o reúso do biocatalisador. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo imobilizar *in situ* na espuma rígida de poliuretano (ERPU) a pectinase comercial Rohapect® DA6L de *Aspergillus niger* e estudar seu desempenho, comparando-a com a forma livre (líquida e imobilizada), quanto à temperatura e pH ótimo, estabilidade, parâmetros cinéticos e termodinâmicos e aplicação na clarificação de suco de goiaba. Na primeira etapa do trabalho, foi determinado o perfil proteico e enzimático da pectinase comercial e estabelecida a melhor condição experimental para a imobilização. Foi determinado que o preparado comercial de pectinase está constituído por um complexo proteico com massas moleculares que estão na faixa dos 30 a 120 kDa, apresentando as maiores atividades específicas para poligalacturonase (PG; 612,92 U mg⁻¹) e pectina metil esterase (PME; 98,8 U mg⁻¹). Foi obtido, aproximadamente, 178 % de rendimento de imobilização usando 0,2 g de pectinase liofilizada em uma proporção de 3:2 dos monômeros poli-ol e isocianato. As condições ótimas de pH e temperatura foram definidas em 3,5, 37 °C e 4,5, 55 °C para a pectinase livre e imobilizada, respectivamente. Na avaliação da estabilidade de armazenamento a 4 °C foi observada a hiperativação da atividade enzimática da pectinase imobilizada, a qual aumentou em 98 % sua atividade inicial após 229 dias de estocagem. O estudo de estabilidade térmica mostrou que a imobilização exerceu um efeito protetor à enzima quando submetida a altas temperaturas, minimizando os processos de desnaturação, provavelmente como resultado do microambiente criado dentro da ERPU. Foram obtidos valores de K_m de 0,01, 0,007 e 0,0075 g mL⁻¹ e V_{max} de 599,82 U mL⁻¹, 1091,60 U mL⁻¹ e 46,41 U g⁻¹ para a pectinase líquida, liofilizada e imobilizada na ERPU, respectivamente. A modelagem matemática dos dados de atividade residual obtidos na faixa de 50 a 80 °C demonstrou que a inativação da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada segue uma cinética de primeira ordem. Os valores de K_d comprovaram que a pectinase nas suas formas livres é muito mais rapidamente inativada que a imobilizada em ERPU. Os valores de t_{1/2}, D e Z estimados, confirmaram o aumento da termoestabilidade da pectinase após imobilização. Esse fato também foi corroborado pelos parâmetros termodinâmicos ΔH°, ΔG° e ΔS°, cujos valores mostraram a superioridade da enzima imobilizada frente à livre, em termos de resistência à inativação por efeito do calor (termoestabilidade). Na avaliação operacional do derivado imobilizado foi possível reutilizar consecutivamente a pectinase imobilizada na ERPU durante seis ciclos catalíticos de hidrólise de pectina cítrica mantendo 35 % da atividade inicial. Durante a clarificação e redução da turbidez do suco de goiaba, foi possível reutilizar quatro vezes a enzima imobilizada, obtendo-se no último ciclo 24,3 % de clarificação e 16% de redução da turbidez. Devido ao bom desempenho do derivado imobilizado obtido, esse se apresenta como uma boa alternativa para ser utilizado na concepção de reatores e para a aplicação industrial.

Palavras Chaves: Pectinase comercial. Imobilização. Espuma rígida de poliuretano.

ABSTRACT

Pectinases catalyze the degradation or modification of pectic substances by depolymerization and de-esterification reactions. Pectinases can be used in several industrial applications, mainly in the processing of fruits, employed to extraction and clarification of juices. However, the uses of pectinases are still limited, mainly due to operational problems such as instability in the process conditions. Immobilized enzymes have emerged as alternatives from these drawbacks, since, in most cases, they improve enzymatic stability and allow reuse of the biocatalyst. In this context, the objective of the present work was to immobilize in the rigid polyurethane foam (ERPU) the commercial pectinase Rohapect® DA6L from *Aspergillus niger* and to study its performance, comparing it with its free form (liquid and immobilized). In terms of temperature and pH optimum, stability, kinetic and thermodynamic parameters and application in the clarification of guava juice. In the first stage of the work, the protein and enzymatic profile of the commercial pectinase was established and the best experimental condition for the immobilization was established. It was determined that the commercial preparation of pectinase consist of a protein complex about molecular weights ranging from 30 to 100 kDa, presenting the highest specific activities for polygalacturonase (PG; 612.92 U mg⁻¹) and pectin methyl esterase (PME; 98.8 U mg⁻¹). Approximately 178% immobilization yields were obtained using 0.2 g of lyophilized pectinase in a ratio of 3:2 of the polyol and isocyanate monomers. Optimum pH and temperature conditions were set at 3.5, 37 °C and 4.5, 55 °C for free and immobilized pectinase, respectively. In the evaluation of storage stability at 4 °C, the enzymatic activity of pectinase immobilized was observed, which increased its initial activity by 98% after 229 days of storage. The thermal stability study showed that the immobilization exerted a protective effect on the enzyme when subjected to high temperatures, minimizing the denaturation processes, probably as a result of the microenvironment created inside in the ERPU matrix. The K_m -values of 0.01, 0.007 and 0.0075 g mL⁻¹ and V_{max} -values of 599.82 U mL⁻¹, 1091.60 U mL⁻¹ and 46.41 U g⁻¹ were obtained for liquid pectinase, lyophilized and immobilized in ERPU, respectively. The mathematical modeling of the residual activity data obtained in the range of 50 to 80 °C showed that the inactivation of free (liquid and lyophilized) and immobilized pectinase follows a first order kinetics. The K_d -values showed that free pectinase is much more rapidly inactivated than that immobilized pectinase in ERPU. The estimated $t_{1/2}$, D and Z-values confirmed the increase in pectinase thermostable after immobilization. This fact was also corroborated by the thermodynamic parameters ΔH° , ΔG° and ΔS° , whose values show the superiority of the enzyme immobilized compared to the free enzyme in terms of resistance to heat inactivation (thermostability). In the operational evaluation of the immobilized derivative it was possible to consecutively reuse the immobilized pectinase ERPU during six catalytic cycles of hydrolysis of citrus pectin maintaining 35% of the initial activity. During the clarification and reduction of the turbidity of the guava juice, it was possible to reuse four times the immobilized enzyme, obtaining in the last cycle 24, 3% of clarification and 16% of reduction of the turbidity. Due to the good performance of the obtained immobilized derivative, this presents as a good alternative to be used in the design of reactors and for the industrial application.

Keywords: Comercial pectinase. Immobilization. Rigid polyurethane foam.

LISTA DE ABREVIATURAS

A_f - atividade residual da enzima

A_L - atividade residual para a forma termolábil da isoenzima

A_R - atividade residual para a forma termorresistente da isoenzima

A_0 - atividade enzimática inicial

A_{tr} - atividade enzimática inicial da fração termorresistente

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

E_d - energia de energia de desativação enzimática

ERPU – espuma rígida de poliuretano

FPase - celulase

kDa - kilodalton

K_d - constante de velocidade da inativação enzimática (h^{-1})

K_L - constantes de velocidade de inativação para a forma termolábil (h^{-1})

K_m - constante de Michaelis-Menten

K_R - constantes de velocidade de inativação para a forma termorresistente (h^{-1})

PC - porcentagem de clarificação

PE – pectina esterase

PG- poligalacturonase

PL - pectina liase

PME – pectinametilesterase

PU – poliuretano

r - fração de atividade do grupo de isoenzimas termorresistentes em relação ao total da enzima

RT – redução da turbidez

SDS-PAGE - Eletroforese em géis de poliacrilamida

$t_{1/2}$ - tempo de meia vida

U - unidades de atividade enzimática ($\mu\text{mol min}^{-1}$)

$V_{m\acute{a}x}$ - velocidade máxima

v/v – volume por volume

XE - xilanase

ΔH° – entalpia (kJ mol^{-1})

ΔG° - energia livre de Gibbs (kJ mol^{-1})

ΔS° - entropia ($\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquematização da estrutura da molécula de pectina.	20
Figura 2 - Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das substâncias pécticas.	25
Figura 3 - Principais métodos de imobilização enzimática.	32
Figura 4 - Reação química da formação da ligação uretânica.	35
Figura 5 - Imobilização de enzimas via ligação covalente em espumas de poliuretano.	37
Figura 6 - Segmentação da ERPU contendo a pectinase Rohapect® DA6L imobilizada.	46
Figura 7 - Análise das massas moleculares da pectinase Rohapect® DA6L por SDS-PAGE.	57
Figura 8 - Microscopia (MEV) da ERPU contendo a pectinase imobilizada.	61
Figura 9 - Influência do tempo de reação sobre a atividade enzimática da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada <i>in situ</i> em ERPU.	61
Figura 10 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade pectinolítica obtida em função do pH e a temperatura (°C) para a pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma líquida (a e b), liofilizada (c e d) e imobilizada em ERPU (e e f).	66
Figura 11 - Perfil de estabilidade de armazenamento a 4 °C para a pectinase livre e imobilizada em ERPU.	69
Figura 12 - Estabilidade térmica da pectinase Rohapect® DA6L imobilizada (a), liofilizada (b) e líquida (c) a várias temperaturas por diferentes intervalos de tempo.	71
Figura 13 - Modelagem da inativação térmica da pectinase imobilizada em ERPU (a), liofilizada (b) e líquida (c) usando o modelo de cinético de primeira ordem a diferentes temperaturas.	76
Figura 14 - Estabilidade operacional da pectinase imobilizada em reações em batelada.	81
Figura 15 - Curvas de contorno para a PC (%) do suco de goiaba obtida em função da temperatura e as unidades de atividade (a) e o tempo e as unidades de atividade (b).	84
Figura 16 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a RT (%) do suco de goiaba em função do tempo e as unidades de atividade da pectinase líquida.	86
Figura 17 - Curvas de contorno para a redução da viscosidade (%) do suco de goiaba em função do tempo e temperatura (a) e a unidades de atividade e a temperatura (b), usando a pectinase líquida.	87
Figura 18 - Tratamento enzimático do suco de goiaba usando a pectinase líquida e imobilizada em ERPU. Porcentagem de clarificação (PC), redução da turbidez (RT), suco sem	

tratamento previamente filtrado (SST), suco tratado com a pectinase líquida (STL) e sucos tratados reutilizado a enzima imobilizada no ciclo 1, 2, 3 e 4 (STI1, STI2, STI3 e STI4).	89
Quadro 1 - Produção de enzimas pectinolíticas por diferentes espécies de micro-organismos	29
Quadro 2 - Componentes utilizados para a preparação dos géis de resolução e empilhamento para a eletroforese SDS-PAGE.....	44
Quadro 3 - Componentes utilizados para a preparação da solução de revelação.	45
Quadro 4 - Modelos cinéticos usados para a análise da inativação da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2), para a maximização da atividade pectinolítica da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU.....	47
Tabela 2 - Variáveis e níveis do DCCR (2^3) empregado para o tratamento enzimático do suco de goiaba com a pectinase líquida e imobilizada em ERPU.....	53
Tabela 3 - Atividades enzimáticas e proteína total da enzima comercial Rohapect® DA6L. .	56
Tabela 4 - Efeito da quantidade inicial de pectinase liofilizada sobre a atividade enzimática (pH 4,5; 37 °C) e o rendimento de imobilização (γ).....	59
Tabela 5 - Atividade pectinolítica da ERPU obtida após a segmentação do suporte para avaliação da distribuição da enzima.	60
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental com os valores codificados e reais e a resposta atividade pectinolítica ($U\ g^{-1}$) para a pectinase livre e imobilizada in situ na ERPU e o rendimento de imobilização (RI).....	63
Tabela 7. Parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada in situ na ERPU.	67
Tabela 8 - Modelos matemáticos avaliados para representar a cinética de inativação térmica da pectinase livre e imobilizada em ERPU.	74
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos do processo de inativação térmica da pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU.....	77
Tabela 10 - Parâmetros termodinâmicos da inativação térmica da pectinase livre e imobilizada em ERPU.....	79
Tabela 11. Matriz do planejamento experimental com os valores codificados e as respostas: PC (%), RT (%) e ρ (%) do suco de goiaba tratado com a pectinase Rohapect® DA6L na forma líquida e imobilizada em ERPU.....	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Substâncias pécticas	20
3.2 Pectinases.....	22
3.2.1 Pectinase desmetoxilante ou desesterificante	22
3.2.2 Pectinases despolimerizantes.....	23
3.2.2.1 Hidrolases	23
3.2.2.2 Liases.....	24
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	27
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
3.5 Imobilização de enzimas	30
3.5.1 Métodos de imobilização	31
3.5.1.1 Adsorção.....	33
3.5.1.2 Ligação covalente	33
3.5.1.3 Confinamento	34
3.6 Suportes de imobilização.....	34
3.6.1 Poliuretano.....	35
3.6.1.1 Estrutura química.....	35
3.6.1.2 Espuma de poliuretano como suporte de imobilização	36
3.7 Imobilização de pectinases.....	37
3.8 Considerações finais	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Materiais.....	40

4.2 Caracterização do perfil enzimático e proteico da pectinase	40
4.2.1 Métodos analíticos para a determinação do perfil enzimático da pectinase comercial (Rohapect®DA6L)	40
4.2.1.1 Atividade de exo-poligalacturonase (PG).....	40
4.2.1.2 Atividade de Pectina liase (PL)	41
4.2.1.3 Atividade de Pectinametilesterase (PME)	42
4.2.1.4 Atividade de celulase (FPase).....	42
4.2.1.5 Atividade de xilanase (XE)	43
4.2.2 Métodos analíticos para a determinação do perfil proteico da pectinase comercial (Rohapect®DA6L)	43
4.2.2.1 Conteúdo de proteína total.....	43
4.2.2.2 Determinação das massas moleculares por eletroforese (SDS-PAGE).....	43
4.3 Liofilização da pectinase	45
4.4 Imobilização da pectinase comercial em ERPU.....	45
4.5 Avaliação da distribuição da pectinase na ERPU	46
4.6 Análise morfológica da ERPU contendo a pectinase imobilizada.....	46
4.7 Rendimento de imobilização.....	47
4.8 Estudo cinético do tempo ótimo de reação	47
4.9 Caracterização parcial da pectinase livre e imobilizada.....	47
4.9.1 Efeitos do pH e a temperatura sobre a atividade pectinolítica	47
4.9.2 Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m	48
4.9.3 Estabilidade ao armazenamento	48
4.9.4 Perfil de estabilidade térmica	49
4.9.5 Estudo da desnaturação da pectinase livre e imobilizada em ERPU.....	49
4.9.5.1 Termoinativação da pectinase	49
4.9.5.1 Modelagem matemática da cinética de inativação da pectinase.....	49
4.9.5.2 Estimativa dos parâmetros cinéticos de inativação	51
4.9.5.3 Estimação dos parâmetros termodinâmicos	52
4.10 Estabilidade operacional.....	52
4.11 Aplicação da pectinase livre e imobilizada na clarificação de suco	53
4.11.1 Tratamento enzimático	53
4.11.2 Determinação da porcentagem de clarificação	54
4.11.3 Determinação da redução de turbidez	54
4.11 Determinação das atividades pectinolíticas da enzima livre e imobilizada.....	55

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Perfil proteico e enzimático da pectinase comercial.....	56
5.2 Imobilização da pectinase na ERPU	58
5.3 Avaliação da distribuição da pectinase na ERPU	59
5.4 Morfologia da ERPU contendo a pectinase imobilizada.....	60
5.5 Cinética do tempo de reação.....	61
5.6 Caracterização parcial da pectinase livre e imobilizada.....	63
5.6.1 Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade pectinolítica.....	63
5.6.3 Estabilidade ao armazenamento	69
5.6.4 Estabilidade térmica da pectinase livre e imobilizada.....	70
5.6.5 Modelagem da cinética da inativação térmica da pectinase livre e imobilizada em ERPU.....	72
5.6.5.1 Termodinâmica da termoestabilidade da pectinase	78
5.7 Estabilidade operacional.....	81
5.8 Aplicação da pectinase livre e imobilizada na clarificação de suco de goiaba.....	82
5.8.1 Clarificação.....	82
5.8.2 Redução da Turbidez	85
5.8.3 Viscosidade.....	86
5.8.4 Tratamento enzimático com a pectinase imobilizada.....	87
6 CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

As pectinases constituem um complexo sistema enzimático cuja função é catalisar a degradação ou modificação das substâncias pécticas até suas unidades monoméricas básicas. Essas enzimas têm várias aplicações, principalmente, na indústria de processamento de frutas, onde são empregadas para aumentar a produtividade dos processos, melhorar a liquefação, a maceração e a extração de tecidos vegetais, e na clarificação e filtração de sucos, contudo também são utilizadas na indústria têxtil para a maceração e a degomagem de fibras e no tratamento de efluentes na indústria de papel (DEMIR et al., 2001).

Atualmente, têm surgido outras aplicações para as pectinases em biorrefinarias; como a produção de ácido D-galacturônico (principal produto da hidrólise da pectina) para ser utilizado na obtenção do ácido múcico e o ácido L-galactônico (BIZ, 2012; KUIVANEN et al., 2014). Ambos são precursores de outras substâncias de alto valor agregado como o ácido 2,5 furandicarboxílico, cujo material de partida para sua síntese química é o ácido múcico, considerado como um dos doze compostos químicos de maior valor agregado produzidos a partir de biomassa (STOCK, 2013).

Apesar de as pectinases serem consideradas, por suas características próprias como catalisadores verdes, sua aplicação em escala industrial é ainda limitada à clarificação de sucos, devido principalmente a problemas operacionais relacionados a outros processos, pois, assim como a grande maioria das enzimas, agem dissolvidas no meio reacional em sistemas de catálise homogênea, o que dificulta sua separação e reutilização em um novo ciclo catalítico, além de poderem ser facilmente desnaturadas se utilizadas em condições diferentes às ideais (WANG et al., 2013; LIU et al., 2014).

Em contrapartida, as enzimas imobilizadas apresentam vantagens tecnológicas em relação a suas formas livres, tais como o aumento da estabilidade operacional, facilidade na separação, os múltiplos reúsos e o uso contínuo nos processos biotecnológicos. Existem diversos métodos de imobilização enzimática, cujas técnicas são baseadas na adsorção física, a ligação covalente, na inclusão em matrizes formadas por géis poliméricos, o encapsulamento em membranas poliméricas ou ainda empregando um reagente multifuncional por meio da formação de ligações cruzadas em um material insolúvel (SHELDON, 2007).

Embora, a técnica de imobilização tenha um papel fundamental na eficiência do sistema de imobilização, as propriedades físico-químicas das matrizes ou suportes utilizados também são de grande importância, pois suas características podem afetar a conservação da

estrutura conformacional e a capacidade catalítica do biocatalisador, conseqüentemente, a eficiência e desempenho da catálise (TALBERT e GODDARD, 2012).

Dependendo da sensibilidade do processo catalítico e do uso posterior do derivado imobilizado, um suporte deve possuir certas características ideais, como por exemplo; a resistência física e microbiológica, fácil separação do meio reacional, seus grupos funcionais não devem interagir com os aminoácidos essenciais para a catálise e o microambiente criado dentro do suporte deve proteger à enzima do ambiente exterior.

Recentemente, nas áreas bioquímicas e biotecnológicas, as espumas de poliuretano vêm destacando-se, pelas excelentes propriedades físicas (resistência mecânica e a solventes) e a biocompatibilidade, como um suporte promissor para a imobilização de micro-organismos (PRAMOD e LINGAPPA, 2008), enzimas (CADENA et al., 2011; SANTIN et al., 2014) e na concepção de dispositivos biomédicos (FRITZEN-GARCIA et al., 2013).

Quimicamente, os poliuretanos (PU) são uma classe de polímeros formados por cadeias orgânicas unidas por ligações de uretano, sintetizados por uma reação de poliadição entre polióis e poliisocianato na presença de um catalisador (CADENA et al., 2010; BERNARDINI et al., 2015).

As enzimas podem ser imobilizadas nas espumas de PU mediante duas técnicas, na primeira, a imobilização acontece sobre a superfície do suporte por adsorção física e inclusão da enzima e, na segunda, a imobilização se dá *in situ* durante a síntese da espuma de PU. Neste caso, há divergências entre os autores, alguns propõem que a enzima é imobilizada via confinamento acoplado com ligações químicas, e outros sugerem que a imobilização ocorre pela formação de ligações covalentes e por adsorção física sobre a superfície, sendo que o confinamento na espuma de PU tem pouca influência (GORDON et al., 1999; ROMASKEVIC et al., 2006). Em ambos os casos as espumas de PU fornecem ambientes biocompatíveis com as enzimas tornando possível e promissora sua aplicação como suporte de imobilização.

Considerando o exposto anteriormente e com intuito de preencher a lacuna encontrada na literatura a respeito da imobilização de pectinases em espumas rígidas de poliuretano (ERPU), com a realização deste estudo pretende-se contribuir para o desenvolvimento de uma estratégia de imobilização da pectinase comercial Rohapect® DA6L de *Aspergillus niger* em ERPU e avaliar seu desempenho mediante estudos comparativos com a forma livre, no que tange à caracterização parcial, estabilidade, parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Assim como também, no referente à sua capacidade de reuso na reação de hidrólise de oligossacarídeos pécnicos e sua potencialidade de aplicação na clarificação de suco de goiaba.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a imobilização *in situ* da pectinase comercial (Rohapect® DA6L) de *Aspergillus niger* na espuma rígida de poliuretano (ERPU) e sua aplicação na clarificação de suco de goiaba.

2.2 Objetivos específicos

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

- a) caracterizar a pectinase comercial (Rohapect® DA6L) em termos de *i*) perfil enzimático e proteico, mediante a determinação das atividades enzimáticas de exopoligalacturonase (PG), pectinametilesterase (PME), pectina liase (PL), celulase (FPase) e xilanase (XE); e do *ii*) perfil proteico por determinação do conteúdo total de proteínas e das massas moleculares por eletroforese SDS-PAGE;
- b) avaliar a imobilização *in situ* da pectinase comercial (Rohapect® DA6L) na ERPU, determinando a melhor relação enzima: suporte que permita a maximização da atividade enzimática, bem como a distribuição (homogeneidade) da enzima no suporte;
- c) caracterizar a pectinase livre e imobilizada em termos de tempo de reação para a dosagem de atividade PG, pH e temperatura ótima, parâmetros cinéticos e termodinâmicos e estabilidade térmica;
- d) determinar a cinética de inativação da pectinase livre e imobilizada mediante modelagem matemática;
- e) verificar a capacidade de reutilização da pectinase imobilizada na reação de hidrólise do substrato pectina cítrica;
- f) avaliar a aplicação e reúso da pectinase imobilizada na clarificação do suco de goiaba.

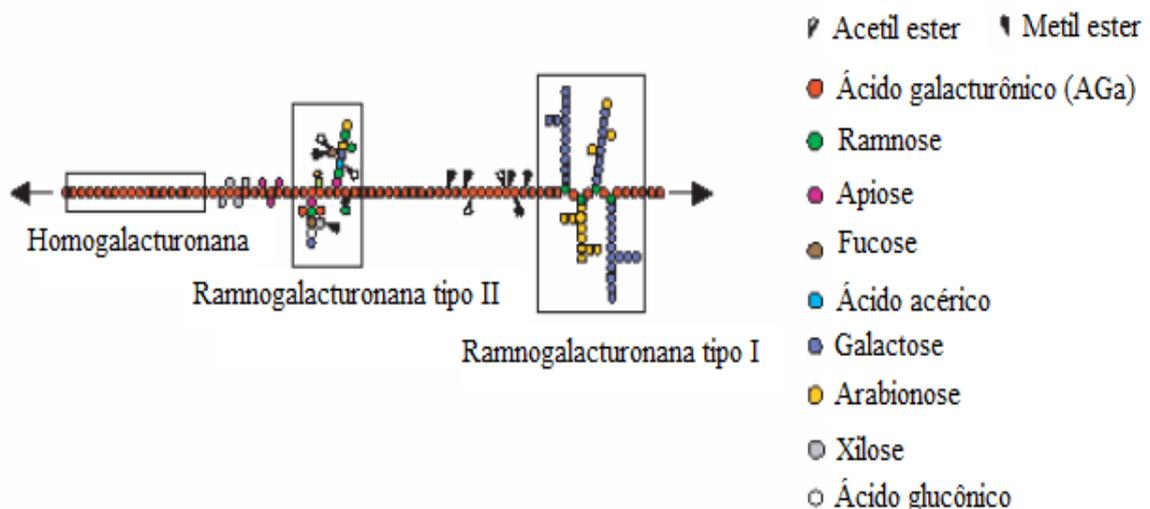
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, apresenta-se o referencial teórico utilizado para dar suporte ao desenvolvimento desta pesquisa. Primeiramente serão abordados conceitos sobre a composição química e a estrutura das substâncias pécicas, a classificação das enzimas pectinolíticas, suas aplicações industriais e as particularidades do fungo filamentoso *Aspergillus* spp. Posteriormente, discorre-se sobre os métodos de imobilização enzimática e os suportes empregados para tal fim, sendo abordado mais detalhadamente, o poliuretano: o conceito, as características gerais e o seu aproveitamento como suporte de imobilização. De forma complementar, são dadas informações a respeito da imobilização de pectinases em diferentes suportes. Por fim, fazem-se as considerações finais em relação ao exposto neste capítulo.

3.1 Substâncias pécicas

As substâncias pécicas, também chamadas de pectinas, são as principais responsáveis pela integridade estrutural e coesão de tecidos vegetais. Compreendem um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos de massas moleculares não definidas (variando de 25 a 360 kDa), carregados negativamente e localizados, principalmente, na parede primária e na lamela média das células vegetais de plantas superiores (PEDROLLI et al., 2009). Na Figura 1, está esquematizada a estrutura química das substâncias pécicas, constituída, basicamente, por dois grupos de polímeros: as homogalacturonanas (HG) e as ramnogalacturonanas (RG).

Figura 1 - Esquematização da estrutura da molécula de pectina.



As HG, que constituem a região lisa ou *smooth region* da cadeia de pectina, são formadas por homopolímeros de resíduos de ácido D-galacturônico (AGa) unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1,4), podendo o AGa ter suas carboxilas parcialmente esterificadas com grupos metílicos e parcialmente ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases. As propriedades funcionais e estruturais da pectina dependem do grau de esterificação com metanol do AGa. Além dessa esterificação, as HG podem ter alguns grupos hidroxilos acetilados no C-2 ou C-3 da cadeia carbônica (JAYANI et al., 2005; BIZ, 2012).

As ramnogalacturonanas (RG) são o segundo grupo de polímeros que compõem a região ramificada ou *hairy region* da estrutura da pectina. Caracterizam-se pela presença de dímeros de AGa e L-ramnose unidos por ligação α -(1,4) e α -(1,2), respectivamente, aos quais se ligam cadeias laterais que contém resíduos de D-galactose e L-arabinose. Destas cadeias laterais podem originar-se outras ramificações formadas por monossacarídeos como D-glucose, D-xilose, D-manose, L-fucose e o ácido D-glucurônico (ROJAS, 2009; SIEIRO et al., 2012).

A composição das substâncias pécticas varia com a fonte, as condições de extração, a localização da célula vegetal e outros fatores ambientais. A Sociedade Americana de Química as classificou em quatro tipos principais, a protopectina, os ácidos pécticos, os ácidos pectínicos e a pectina (PASHA et al., 2013; TAPRE e JAIN, 2014):

- a) protopectina: é uma substância péctica insolúvel em água, presente em tecidos intactos, que pela hidrólise enzimática são transformadas em ácido pectínico ou pectina;
- b) ácidos pécticos: são substâncias solúveis em água, compostas de ácido poligalacturônico coloidal, onde os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metílicos. Os sais do ácido péctico são conhecidos como pectatos;
- c) ácido pectínico: é formado por cadeias de poligalacturonas com parte dos seus ácidos galacturônicos metilados;
- d) pectina (polimetil galacturonato): constitui um material polimérico no qual, pelo menos, 75% dos grupos carboxílicos das unidades de galacturonatos estão esterificados com grupos metílicos. Isto confere rigidez à parede celular quando a pectina está ligada junto 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 substância péctica é extraída (RODRIGUEZ e SERRAT, 2008).

3.2 Pectinases

As enzimas pectinolíticas ou pectinases constituem um complexo sistema de enzimas encarregadas da degradação ou modificação das substâncias pécicas, até seus açúcares constitutivos. Encontram-se na maioria das plantas superiores e são produzidas por fungos filamentosos, bactérias, algumas leveduras e insetos com o propósito de degradar (para obter fonte de carbono) ou modificar (fruto em amadurecimento) o heteropolissacarídeo pectina (SIROTEK et al., 2001).

Os fungos filamentosos são os mais utilizados para a produção industrial de pectinases, já 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 melhor 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 grupo das pectinases que atuam sobre a estrutura principal da pectina e tem função de degradá-la até suas unidades monoméricas básicas e o grupo constituído pelas enzimas acessórias (MARTINEZ, 2009).

Dentro do primeiro grupo, as pectinases se subclassificam em três tipos, de acordo com o modo de ataque à parte galacturonada da molécula de pectina:

- a) as esterases, cuja função é catalisar a desesterificação da pectina mediante a remoção dos grupos metílicos da cadeia principal;
- b) as despolimerizantes que mediante dois mecanismos diferentes, hidrólise (hidrolases) e trans-eliminação (liases), catalisam a clivagem hidrolítica das ligações α -1,4 entre os monômeros de ácido D-galacturônico das substâncias pécicas;
- c) as protopectinases que degradam a protopectina insolúvel para formar pectina solúvel altamente polimerizada (PEDROLLI et al., 2009; SIEIRO et al., 2012).

3.2.1 Pectinase desmetoxilante ou desesterificante

As pectinaesterases (PE) também conhecidas como pectinametilesterases (PME), catalisam a hidrólise dos grupos éster carboxílicos metilados da pectina em ácido pécico e

metanol (KASHYAP et al., 2001). Atuam preferencialmente sobre o éster metílico da unidade de galacturonato próxima a uma unidade de galacturonato não esterificado (KOHLI et al., 2015).

Biologicamente, as PE são de grande importância, pois permitem a ação posterior de pectinases que só atuam sobre compostos pécticos com menor grau de esterificação. Assim, a pectina de baixo teor de metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase (PG). O modo de ação da PE varia de acordo com sua origem. As PE fúngicas agem por um mecanismo multicadeia, removendo os grupos metílicos aleatoriamente. Em contrapartida, as PE de plantas agem tanto pela extremidade não redutora quanto pela próxima ao grupo carboxila livre, e continuam ao longo da molécula por um mecanismo de cadeia simples (SINGH et al., 2005).

3.2.2 Pectinases despolimerizantes

As pectinases com função despolimerizantes podem ser classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas, e subclasificadas segundo o mecanismo de ação em endo-(randômica) ou exo (a partir do final da molécula), além da preferência por ácido péctico ou pectina como substrato (MURAD e AZZAZ, 2011).

3.2.2.1 Hidrolases

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases:

- a) polimetilgalacturonases (PMG): catalisam a clivagem hidrolítica da ligação glicosídica α -1,4 da pectina altamente esterificada podendo ser Endo-PMG ou Exo-PMG, catalisando a clivagem randômica da ligação glicosídica α -1,4 e a clivagem sequencial da ligação glicosídica α -1,4 na extremidade não redutora da cadeia da pectina, respectivamente (JAYANI et al., 2005);
- b) 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) (REHMAN et al., 2015) . 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 (KASHYAP et al., 2001). As PG 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, especialmente o *A. niger*, o qual sintetiza diferentes enzimas pécticas em resposta às condições do cultivo, obtendo-se da bioprodução uma mistura complexa de enzimas que degradam tanto pectina como outros polissacarídeos da parede celular (BUGA et al., 2010; KANT et al.; 2013).

3.2.2.2 Liases

As liases são enzimas despolimerizantes que quebram as ligações glicosídicas α -1,4 por transeliminação de hidrogênio, o que resulta em galacturonídeos com ligação insaturada entre C4 e C5 no extremo não redutor do ácido galacturônico formado (KASHYAP et al., 2001). Entre estas, incluem-se:

- a) pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL): as PMGL (EC 4.2.2.10) catalisam o rompimento das ligações glicosídicas α -1,4 por um mecanismo de β -eliminação (transeliminação) e são subdivididas em Endo e Exo-PMGL. As Endo-PMGL realizam uma hidrólise randomizada do polímero e as Exo-PMGL atuam sequencialmente pelo extremo não redutor (CHAUDHRI E SUNEETHA, 2012);
- b) 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 Ca^{2+} para sua atividade (CHAUDHRI E SUNEETHA, 2012).

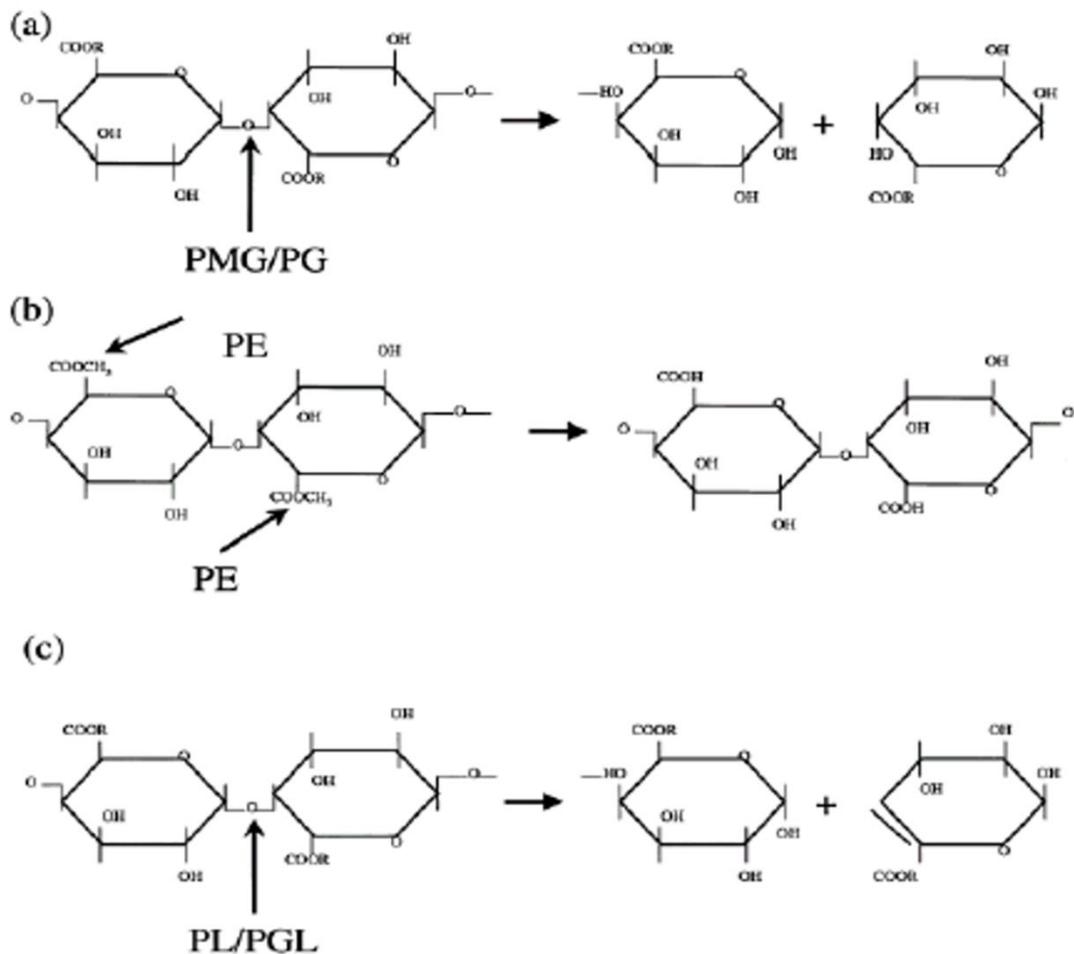
3.2.3 Protopectinases (PPase)

As protopectinases catalisam a solubilização da protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada (JAYANI et al., 2005). São classificadas em dois tipos principais:

- a) as protopectinases tipo A: essas enzimas reagem com a região do ácido poligalacturônico da protopectina;

- b) as protopectinases tipo B: reagem com cadeias de polissacarídeo que podem acoplar o ácido poligalacturônico com os constituintes da parede celular (tipo B) (UENOJO e PASTORE, 2007). A Figura 2 mostra os tipos de pectinases e os modos de ação sobre as substâncias pécnicas.

Figura 2 - Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das substâncias pécnicas. (a) Radical H para PG e CH₃ para PMG; (b) PE e (c) Radical H para PGL e CH₃ para PL. As setas indicam os locais onde as pectinases atuam nas substâncias pécnicas.



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 como as lipases, xilanases, amilases, celulases, glucanases, enzimas proteolíticas, pectinases, entre outras (JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013). As principais atuações tecnológicas das pectinases são o incremento da eficiência dos processos extrativos, a desintegração dos tecidos durante o processamento de

frutas e vegetais, a estabilização de produtos e a melhora do sabor (MURAD e AZZAZ, 2011).

Alkorta et al. (1998); Kashyap et al. (2001); Jayani et al. (2005); Uenojo e Pastore (2007); Rodrigues e Serrat. (2008); Pedrolli et al. (2009) e Sieiro et al. (2012) 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 tecnologia do processamento de frutas exige a degradação rápida e intensa das substâncias pécicas responsáveis pelas propriedades coloidais, turbidez, consistência e aparência dos sucos de frutas, cuja presença causa um aumento considerável na viscosidade do suco, dificultando as etapas de prensagem, filtração e concentração (ALKORTA et al., 1998; RODRIGUES e SERRAT, 2008). Neste sentido, a adição de pectinases permite um processamento mais eficiente da fruta, pela degradação da pectina e compostos de alto peso molecular.

As pectinases junto com outras enzimas, como as celulases e hemicelulases, compõem as chamadas enzimas de maceração, as quais são utilizadas após o corte da fruta, para macerar o tecido vegetal até a liquefação parcial ou total da fruta (ALKORTA et al., 1998; JAYANI et al., 2005; UENOJO e PASTORE, 2007). A extração de sucos de frutas por maceração enzimática pode incrementar o rendimento em até 90% se 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), reduzindo de forma significativa os gastos energéticos na produção. (JAYANI et al., 2005; PEDROLLI et al., 2009; LEI et al., 2015).

Após o processo de extração, a grande maioria dos sucos de frutas apresenta turbidez e alta viscosidade devido à presença das substâncias pécicas, as quais são mantidas em suspensão pela repulsão da sua carga superficial negativa (KLOBITZ, 2008).

Durante os processos de clarificação, a adição de pectinases reduz a turbidez dos sucos, pela desestabilização eletrostática das partículas de pectina. Na hidrólise das substâncias pécicas, o núcleo proteico fica exposto (carregado positivamente), o que possibilita a atração deste com as partículas de pectina e permite a formação de aglomerados que precipitam e são facilmente removidos nas etapas de centrifugação e/ou filtração, obtendo-se um suco de frutas clarificado (KLOBITZ, 2008; PINELO et al., 2010). Em sucos

clarificados, como o 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). As enzimas pectinolíticas também são utilizadas para evitar a turvação e formação de precipitados durante a estocagem e após a reconstituição do produto concentrado ou o envasamento do suco (SIEIRO et al., 2012).

3.3.2 Indústrias de vinhos

As pectinases 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 que incrementam o aroma dos vinhos (JAYANI et al. 2005; SIEIRO et al., 2012).

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, acarretando problemas ambientais pelos rejeitos do processo. Como alternativa, a utilização de enzimas constitui uma tecnologia limpa, pois, o óleo vegetal é extraído mediante um processo aquoso, no qual são liquefeitos pela ação das enzimas, os componentes estruturais das paredes celulares das sementes que contêm o óleo. Preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulasas e hemicelulasas 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, vitamina E, reduz a indução ao ranço, melhora o fracionamento na centrifugação e produz óleo com baixo teor de umidade (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al. 2005; UENOJO e PASTORE., 2007; SIEIRO et al., 2012).

3.3.4 Fermentação de chá, cacau e café

As pectinases são de grande utilidade para aumentar a eficiência 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 dos resíduos da mucilagem; com o mesmo objetivo, as preparações comerciais 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). As 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. (2002) e Pedrolli et al. (2009) reportaram outros usos das pectinases, como o tratamento de efluentes contendo resíduos de pectina, na indústria têxtil e na maceração de fibras vegetais (como linho, cânhamo e juta).

Murad e Azzaz (2011) recomendaram o uso de pectinases como aditivo para reduzir a viscosidade da ração animal, a fim de aumentar a absorção e liberação de nutrientes por meio da hidrólise das fibras não biodegradáveis, proporcionando melhoras na digestibilidade da matéria orgânica.

Kuivanen et al. (2014) utilizaram pectinases, obtidas a partir do *A. niger* geneticamente modificada, na hidrólise de pectinas de casca de laranja para a produção de ácido L-galactônico. Os autores reportaram uma conversão de 90 % de ácido D-galacturônico em L-galactônico usando a pectinase.

3.4 Micro-organismos produtores de pectinases

Diversas espécies de micro-organismos podem ser empregadas para a síntese de enzimas pectinolíticas. Em escala industrial, os fungos são os preferidos para a bioprodução de pectinases (KANT et al., 2013), pois cerca de 90% das enzimas metabolizadas podem ser secretadas no meio de cultura, diminuindo custos operacionais decorrentes dos processo de recuperação e purificação (UENOJO e PASTORE, 2006). A ocorrência de pectinases em alguns micro-organismos é apresentada no Quadro 1.

A indústria de suco de frutas e vegetais utiliza principalmente pectinases ácidas de origem fúngica, obtidas na sua maioria a partir do *Aspergillus* spp. (KHATRI et al., 2015). Os micro-organismos do gênero *Aspergillus* são fungos filamentosos que se desenvolvem em matéria orgânica em condições aeróbicas. Encontram-se no solo, no ar e em matérias vegetais

em decomposição. Estes saprófitos têm a capacidade de reproduzir-se em distintas fontes de carbono, e por secretarem uma variedade de enzimas hidrolíticas, degradam moléculas complexas nos materiais derivados de células vegetais (DE VRIES e VISSER, 2001).

Quadro 1 - Produção de enzimas pectinolíticas por diferentes espécies de micro-organismos.

MICRO-ORGANISMOS	PMGE	PG	PGL	PMG	PMGL
<i>Aspergillus niger</i>	+	+		+	+
<i>Aspergillus sojae</i>					+
<i>Aspergillus saito</i>		+			
<i>Bacillus sp.</i>			+		
<i>Bacillus polymixa</i>			+		
<i>Bacillus pumilus</i>			+		
<i>Bacillus sphaericus</i>			+		
<i>Bacillus stearothermophilus</i>			+		
<i>Cercocpora arachidicola</i>		+	+		
<i>Cephalosporium sp</i>			+		
<i>Clostridium multifermentans</i>	+		+		
<i>Clostridium aurantibutyricum</i>	+		+		
<i>Clostridium felsineum</i>		+	+		
<i>Cytophaga johnsonii</i>			+		
<i>Cytophaga albogilva</i>			+		
<i>Erwinia aroideae</i>		+	+		+
<i>Erwinia carotovora</i>		+	+		
<i>Fusarium culmorum</i>			+		
<i>Fusarium oxysporum</i>			+		
<i>Fusarium solani</i>			+		+
<i>Penicillium expansum</i>		+			
<i>Penicillium italicum</i>					+
<i>Penicillium digitatum</i>	+			+	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+			
<i>Pseudomonas sp</i>			+		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			+		
<i>Pseudomonas marginalis</i>	+	+	+		
<i>Rhizoctania fragariae</i>		+			
<i>Rhizoctania solani</i>	+	+			
<i>Rhizopus arrhizus</i>		+			
<i>Streptomyces nitrosporeus</i>			+		
<i>Trichoderma koningii</i>		+			
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>		+			
<i>Xanthomonas sp</i>	+		+		

Fonte: Uenojo e Pastore (2007) modificado

O gênero *Aspergillus* compreende aproximadamente 180 espécies, das quais algumas são patogênicas para humanos, animais e plantas e as outras têm um papel muito importante na indústria biotecnológica para a produção de químicos, enzimas e drogas (BAKER, 2006). Esses fungos são capazes de secretar elevados níveis de proteínas, possuem boas propriedades fermentativas, permitindo a produção de uma ampla gama de enzimas em larga escala. Muitas espécies de *Aspergillus*, principalmente aquelas pertencentes aos grupos da 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. A USFDA (*United States Food and Drug Administration*) classificou 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. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na sua resolução N° 53, de 07 de outubro de 2014, permite o uso de pectinases de *A. niger* para uso em alimentos destinados ao consumo humano.

A espécie *A. niger* é a mais utilizada na produção industrial de enzimas pectinolíticas (DINU et al., 2007). 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).

3.5 Imobilização de enzimas

Em solução, as moléculas de enzimas estão dispersas no meio e têm um movimento completamente livre. A imobilização enzimática é uma técnica especialmente desenvolvida para restringir total ou parcialmente essa movimentação, dando lugar à formação de um derivado insolúvel no meio de reação, ocasionando, na maioria das vezes, um efeito benéfico na estabilidade enzimática, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas do biocatalisador (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 do sítio ativo envolvidos diretamente na reação catalítica (BRENA et al., 2013). 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:

- a) permitem um uso contínuo e controle das concentrações de proteínas empregadas;
- b) melhoram a estabilidade e atividade da enzima em função do pH e da temperatura;
- c) aumentam a eficiência do sistema;
- d) 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 taxa de difusão de substratos e produtos no sistema. A complexidade das enzimas, embora ótima para a especificidade biológica, apresenta desafios quando essas são expostas a um processo de imobilização. Quando uma enzima é removida de suas condições nativas para ser utilizada em um sistema concebido pode ser alterada a dinâmica da proteína com o seu ambiente e ocorrer mudanças no equilíbrio molecular entre o estado nativo e desdobrado da proteína (TALBERT e GODDARD, 2012).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização é muito importante para proteger as enzimas da interação com o meio no qual é realizada a reação, pois esse poderá provocar a inativação, impossibilitando a catálise. Na maioria dos casos, após a imobilização, as enzimas permanecem estáveis ou mesmo aumentam a sua atividade catalítica e estabilidade operacional, além de facilitar sua separação, recuperação e uso contínuo nos processos biotecnológicos (MATEO et al., 2007).

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

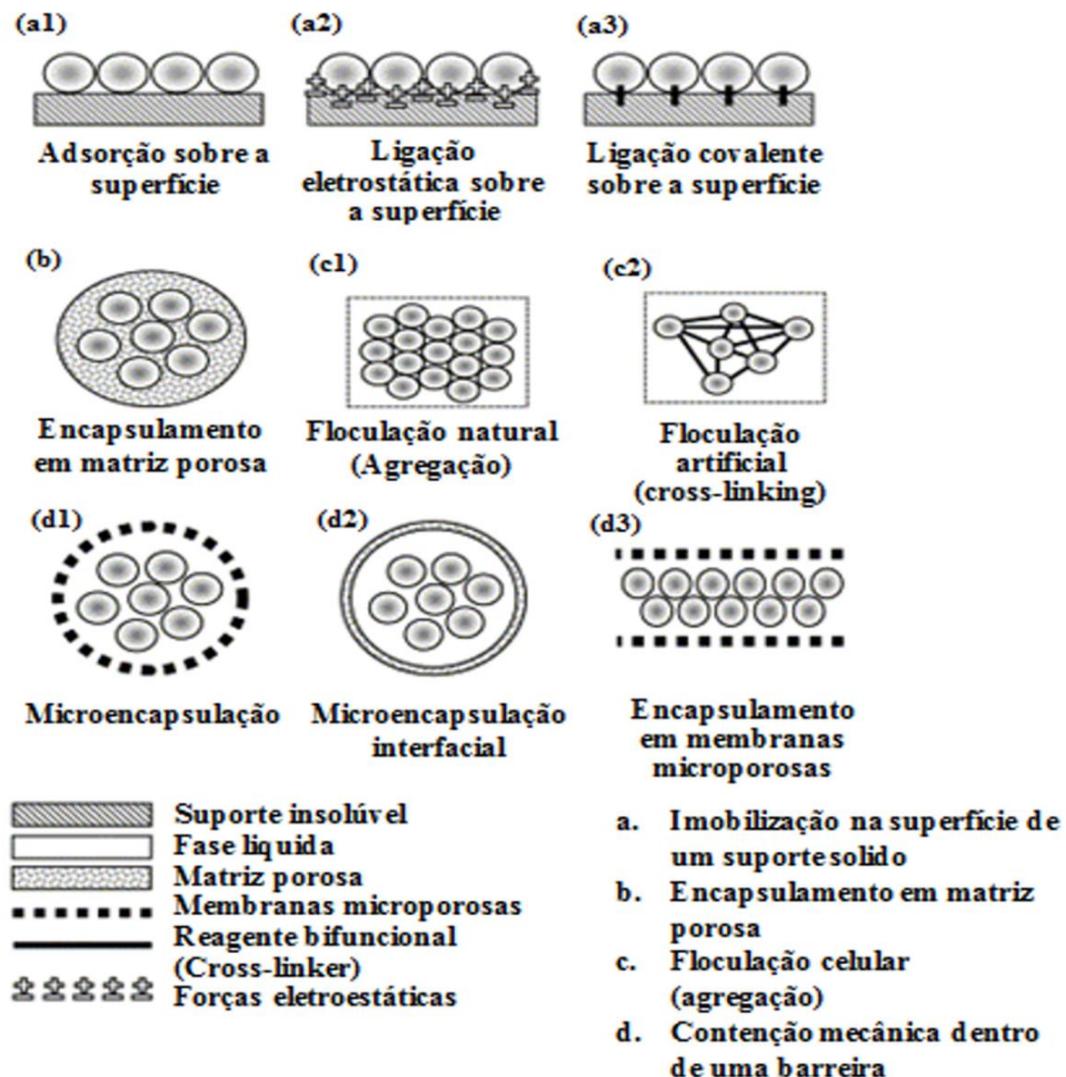
3.5.1 Métodos de imobilização

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em métodos físicos e químicos. A imobilização de enzimas pode ocorrer por

adsorção física, ligação covalente, por inclusão em matrizes formadas por géis poliméricos, encapsulamento em uma membrana polimérica ou ainda empregando um reagente multifuncional para a formação de ligações cruzadas em um material insolúvel (SHELDON, 2007; RICHETTI, et al., 2012).

Como decorrência da natureza das enzimas, das características químicas, tanto dos suportes como os substratos empregados, e os usos posteriores dos derivados imobilizados; não existe um único método de imobilização e/ou suporte que seja o melhor para todas as enzimas e suas aplicações. Na Figura 3, apresentam-se os métodos mais comumente empregados para a imobilização enzimática, posteriormente, descrevem-se resumidamente cada um deles.

Figura 3 - Principais métodos de imobilização enzimática.



3.5.1.1 Adsorção

Este método utiliza suportes orgânicos e inorgânicos insolúveis que possuem um composto ativo que permite a retenção das na superfície do suporte, mediante interações iônicas ou ligações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, entre outras. A adsorção mantém intata a estrutura nativa da enzima, já que a ligação entre a enzima e o suporte é fraca e não altera a conformação catalítica, porém, apresenta como desvantagem a sensibilidade do derivado imobilizado a fatores como mudanças do pH e a temperatura, a natureza do solvente e força iônica do meio de reação, que podem acarretar a dessorção do biocatalisador (FAJARDO-OCHOA et al., 2011; DATTA et al., 2013).

Na adsorção iônica a enzima se une ao suporte por atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas presentes na superfície do suporte e a enzima, formando uma união mais efetiva que a adsorção física (uniões fracas), contudo inferior quando comparada com outros métodos de imobilização (CARDOSO et al., 2009).

3.5.1.2 Ligação covalente

Neste método o biocatalisador é acoplado ao suporte, previamente funcionalizado, por meio da formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais da superfície do suporte e os resíduos de aminoácidos da enzima, como por exemplo, o grupo amina (NH_2) da lisina e arginina ou grupo $-\text{SH}$ da cisteína (CARDOSO et al., 2009). A vantagem do método está na natureza irreversível da ligação formada entre o suporte e a enzima que torna incomum a lixiviação do biocatalisador durante o processo catalítico (TAN et al., 2010). Este método pode afetar a capacidade catalítica das enzimas, devido à alteração do sítio ativo, como resultado da ligação covalente de aminoácidos essenciais para a atividade enzimática com o suporte (FAJARDO-OCHOA et al., 2011).

As principais vantagens da ligação covalente são: maior resistência do biocatalisador às variações de pH e temperatura, à influência de solventes orgânicos e a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização. Os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado (NICOLETTI, 2014).

3.5.1.3 Confinamento

O método de imobilização por confinamento 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). Diferente 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), permitindo que a difusão do substrato e produtos se dê através da membrana porosa formada (FAJARDO-OCHOA et al., 2011). As principais limitações do método 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 pelas características morfológicas da matriz. Quando o confinamento é por meio da inclusão do biocatalisador em uma cápsula ou esfera polimérica recebe o nome de encapsulamento.

3.5.1.4 Ligação cruzada

Neste método os suportes não são necessários, uma vez que a imobilização ocorre pela ligação direta entre as enzimas que formam uma estrutura tridimensional complexa, essa interação enzimática pode ser em alguns casos auxiliada por um agente de ligação (bi ou multifuncionais). Como desvantagens do método estão; a baixa retenção da atividade e estabilidade mecânica, o que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade (NICOLETTI, 2014).

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, devem considerar-se diversos fatores como o pH, a temperatura, a força iônica, a conjugação de cofatores e o processo de separação dos produtos. Dependendo da sensibilidade do processo catalítico, as propriedades ideais de um suporte para a imobilização incluem: a resistência física à compressão, a biocompatibilidade, a resistência ao ataque microbiano, a disponibilidade e o baixo custo (EŞ et al., 2015).

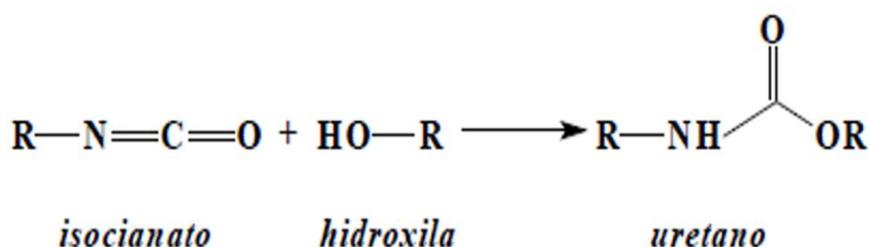
Brena et al.(2013) reportaram que os suportes podem ser classificados de acordo a sua composição química em suportes orgânicos, subdivididos em orgânicos sintéticos e naturais, e inorgânicos. No caso dos suportes orgânicos naturais, podem ser empregados inúmeros materiais como os polissacarídeos (celulose, agarose, alginato, quitina, etc) e as proteínas fibrosas como o colágeno, a queratina e a gelatina. Dentre dos suportes orgânicos sintéticos, encontram-se polímeros como os poliuretanos, os poliacrilatos, as poliacrilamidas e as poliamidas. Os suportes inorgânicos podem estar constituídos por minerais naturais, como a bentônita e a sílica, ou por materiais processados como o vidro e metais.

3.6.1 Poliuretano

3.6.1.1 Estrutura química

Os poliuretanos (PU) são uma classe de polímeros formados de cadeias orgânicas unidas por ligações de uretano, sintetizados por uma reação de poliadição entre um poliisocianato, composto que contém o grupo $[-N=C=O]$, e glicóis (polióis, poliglicóis, poliéster ou polieter polióis) na presença de um catalisador (CADENA et al., 2010; BERNARDINI et al., 2015). As ligações de uretano resultam da reação de um isocianato, na dupla ligação $C=N$, e um composto que contenha o grupo $-OH$. Desta forma, o átomo de hidrogênio da hidroxila é transferido ao nitrogênio do isocianato formando a ligação uretânica, cuja estrutura constitui a base química da cadeia poliuretânica que compõe os PU (Figura 4).

Figura 4 - Reação química da formação da ligação uretânica.



Fonte: Soares (2012)

Na formação das espumas de PU, paralelamente à reação de polimerização do isocianato e o polioliol, os grupos isocianato do polímero reagem com a água ou ácidos

carboxílicos para produzir a liberação de dióxido de carbono (agente de expansão) em um meio fluido que polimeriza simultaneamente ao expandir seu volume, dando origem à massa polimérica formada por pequenos bulbos ou células, ao mesmo tempo em que ocorre a reticulação (SOARES, 2012). As espumas de PU também podem conter na cadeia polimérica um grande número de outros grupos funcionais, diferentes às ligações de uretano, como os grupos éster, éteres, amida e ureia (CADENA et al., 2010). Desses grupos funcionais e de fatores como a relação entre o isocianato e o polioliol, a força de ligação, a densidade de reticulação e a flexibilidade, dependerão as propriedades químicas e físicas das espumas de PU (ROMAŠKEVIČ et al., 2006).

Segundo Nicoletti et al. (2015), o PU é um material inerte de excelentes propriedades mecânicas, como a alta elasticidade e flexibilidade, características que permitem uma melhor estabilidade e resistência à deformação por compressão. Além disso, as espumas de PU possuem uma grande área superficial e por serem um material altamente poroso, podem reduzir a limitação à difusão e evitar problemas de transferência de massa.

3.6.1.2 Espuma de poliuretano como suporte de imobilização

O PU é classificado como um material funcional que tem grande aplicação em muitas áreas industriais e é utilizado, principalmente, como material para elaboração de calçados, indústria de máquinas, revestimentos e tintas, isolamento rígido, fibras elásticas, espuma rígida e flexível, dispositivos médicos, elastômeros duráveis, adesivos de alto desempenho, entre outros (ROMAŠKEVIČ et al., 2006).

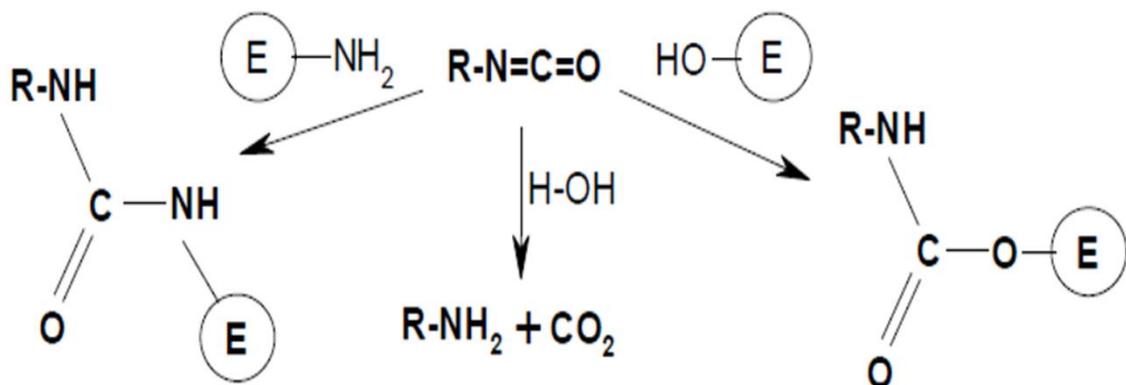
Nas áreas bioquímicas e biotecnológicas, o poliuretano vem sendo utilizado como suporte para a imobilização de micro-organismos (PRAMOD e LINGAPPA, 2008), enzimas (SANTIN et al., 2014; CADENA et al., 2011) e na concepção de dispositivos biomédicos (FRITZEN-GARCIA et al., 2013). Na imobilização de enzimas, o PU pode ser utilizado na forma de espuma, microesferas, microcápsulas, nanocompostos e membranas.

De acordo Romaškevič et al. (2006), as enzimas podem ser imobilizadas na espuma de PU mediante ligações covalentes, adsorção física, por inclusão ou por acoplamento físico e químico. Os autores reportaram que existem duas técnicas para a imobilização de enzimas na espuma de PU:

- a) o catalisador é imobilizado sobre a superfície da espuma mediante adsorção física e inclusão;
- b) a imobilização se dá *in situ* durante a síntese da espuma de PU.

Nesse último caso, há divergências entre os autores, alguns propõem que a enzima é imobilizada via confinamento acoplado com ligações químicas durante a síntese da espuma de PU e outros sugerem que a imobilização é devida a ligações covalentes e à adsorção física sobre a superfície, sendo que o confinamento tem pouca influência (ROMASKEVIC et al., 2006; GORDON et al., 1999). Na ligação covalente da enzima com o suporte de PU, os grupos amino e/ou grupos hidroxilo da enzima reagem com os grupos isocianato do poliuretano. Como o processo de imobilização ocorre em meio aquoso, a água reage com os grupos isocianato, formando CO_2 que permite a expansão da espuma (ROMASKEVIC et al., 2006). Na Figura 5, ilustram-se as reações químicas da imobilização enzimática via ligação covalente em espumas de poliuretano.

Figura 5 - Imobilização de enzimas via ligação covalente em espumas de poliuretano.



Fonte: Romaškevič et al. (2006)

3.7 Imobilização de pectinases

Como discutido anteriormente, as pectinases podem ser utilizadas em diversas áreas da indústria. Na maioria dos casos, as pectinases imobilizadas são úteis para diversas aplicações, mantendo a atividade catalítica da sua forma nativa. A seguir, são apresentados, sucintamente, estudos de pectinases imobilizadas em diferentes suportes.

Amin et al. (2017) estudaram a imobilização da Exo-poligacturonase de *Penicillium notatum* usando alginato de sódio como suporte e duas técnicas de imobilização, por ligação covalente e adsorção. Os autores reportaram que a imobilização covalente foi mais eficiente em termos de atividade relativa (45,89 %) e rendimento de imobilização (71,6 %). Ambas as

técnicas aumentaram a estabilidade térmica da enzima após o processo de imobilização. A pectinase imobilizada covalentemente e adsorvida no alginato conservou 50 e 41 % da suas atividades iniciais, respectivamente, depois de sete ciclos consecutivos em batelada.

Lei et al. (2015) estudaram a imobilização de pectinases em nanopartículas magnéticas. A enzima imobilizada manteve mais de 50% de sua atividade inicial ao longo de 40 dias de armazenamento. Houve aumento no pH e na temperatura ótima da enzima imobilizada em comparação com a forma livre. O derivado imobilizado exibiu excelente estabilidade operacional, conservando 75% da atividade residual após dez reações descontínuas.

Bustamante-Vargas et al. (2015) imobilizaram pectinase de *A. niger* ATCC 9642 via confinamento em suporte híbrido biomimético de alginato/gelatina/oxalato de cálcio, obtendo um rendimento de imobilização de 72,7 %. O derivado manteve seu pH ótimo em comparação com a forma livre, porém apresentou mudanças na temperatura ótima, a qual aumentou de 37 °C (livre) para 73 °C (imobilizada). Os autores atribuíram esse comportamento ao aumento na estabilidade térmica da enzima, pela proteção do suporte aos efeitos do calor. O derivado imobilizado foi reutilizado, consecutivamente, na hidrólise do substrato pectina cítrica, durante nove ciclos catalíticos conservando 56% da atividade inicial.

Wu et al. (2013) avaliaram o processo de imobilização da pectinase, mediante a formação de ligações covalentes entre os grupos aldeídos das fibras de celulose funcionalizadas e os aminos da enzima. A pectinase imobilizada mostrou maior estabilidade térmica em uma faixa de temperatura mais ampla (40 -70 °C) que a enzima livre, e deslocamento no pH ótimo de 8 (livre) para 8,8 (imobilizada). Além disso, o derivado imobilizado apresentou boa estabilidade operacional (seis ciclos) na diminuição da demanda catiônica dos efluentes da indústria de fabricação de papel.

Rehman 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, se comparada com a enzima livre, o tempo ótimo de reação para a degradação de pectina de 5 a 10 min e a temperatura ótima de reação de 45 a 55 °C, no entanto, reportaram que o pH ótimo (7) foi o mesmo para os dois derivados enzimáticos.

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

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 com 50 % da sua atividade inicial.

Delcheva et al. (2007) imobilizaram pectinase de *A. niger* em membrana copolimérica de poliacrilonitrilo ativada ou não com glutaraldeído, e encontraram um 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.

3.8 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 e desempenho dos biocatalisadores nos processos industriais. Os diversos métodos de imobilização permitem a obtenção de derivados enzimáticos que, na maioria dos casos, mantêm ou incrementam a capacidade catalítica em comparação com a forma nativa. Ao mesmo tempo em que podem ser mais estáveis às características do meio reacional e tornam-se facilmente recuperável e reutilizável no processo catalítico.

Não foram encontrados relatos na literatura a respeito da imobilização de pectinases comerciais em espumas rígidas de poliuretano. Neste contexto, é de grande valia a realização do presente estudo, no qual foi avaliada de forma abrangente a imobilização *in situ* da pectinase comercial (Rohapect® DA6L) na espuma rígida de poliuretano, consolidando-se como uma nova metodologia para a imobilização do biocatalisador, assim como também, foram definidas as características bioquímicas da pectinase livre e imobilizada, em termos de perfil enzimático e proteico, pH e temperatura ótima, parâmetros cinéticos e termodinâmicos, estabilidade enzimática, reúsos e aplicação para a clarificação do suco de goiaba.

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 *in situ* da pectinase comercial Rohapect DA6L® na ERPU. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

4.1 Materiais

A pectinase comercial Rohapect® DA6L de *Aspergillus niger* empregada durante este estudo foi adquirida de AB Enzymes (Alemanha). Os precursores utilizados para a síntese do suporte de PU foram o poliol e isocianato fornecidos pela Empresa Mannes (Brasil). A pectina cítrica esterificada utilizada como substrato para as reações de hidrólise e o ácido α -D-galacturônico monohidratado usado para a realização da curva padrão foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Suíça). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Caracterização do perfil enzimático e proteico da pectinase

A pectinase comercial Rohapect® DA6L foi caracterizada em termos do perfil enzimático pelas dosagens das atividades enzimáticas de exo-poligalacturonase (PG), pectinametilesterase (PME), pectina liase (PL), celulase (FPase) e xilanase (XE) e proteico mediante a quantificação do teor de proteína total e das massas molares por eletroforese (SDS-PAGE). Os métodos empregados para a determinação dos perfis estão descritos na continuação:

4.2.1 Métodos analíticos para a determinação do perfil enzimático da pectinase comercial (Rohapect®DA6L)

4.2.1.1 Atividade de exo-poligalacturonase (PG)

A atividade de PG da pectinase comercial foi estimada, pela quantificação do ácido galacturônico produzido na reação de hidrólise da pectina cítrica, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico descrito por Miller (1959) e uma curva de calibração estabelecida

com ácido α -D-galacturônico (massa molecular 212,6 g/mol) como açúcar redutor e o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). A atividade da PG foi quantificada da seguinte forma:

Um volume de 500 μ L de substrato (0,5 % m/v em tampão acetato de sódio 100 mM; pH 4,5) foi incubado a 37 °C por 15 minutos para a estabilização de temperatura. A seguir, 500 μ L da solução de pectinase (diluída 1:100) foram adicionados ao substrato e a reação foi incubada a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1000 μ L do reagente DNS. Para a formação da cor, a mistura foi aquecida em banho maria a 100 °C por 8 minutos, resfriada em banho de gelo, após foram adicionados 8 mL de solução de tartarato duplo de sódio-potássio (50 mM) para a estabilização da cor, e finalmente as absorbâncias das amostras foram medidas em um espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU640) a 540 nm contra o branco, o qual foi preparado da mesma forma como descrito anteriormente, com a diferença que o volume de enzima foi substituído por água destilada.

Uma unidade de atividade pectinolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto ($U = \mu\text{mol min}^{-1}$) sob as condições estudadas. As atividades de PG da pectinase comercial foram expressas em $U \text{ mL}^{-1}$.

Para todos os estudos realizados neste trabalho foi considerada como resposta a atividade enzimática pectinolítica vinculada à poligacturonase (PG).

4.2.1.2 Atividade de Pectina liase (PL)

A atividade da PL foi determinada segundo o método descrito por Pitt (1988). Foi preparada uma mistura reacional contendo 5 mL do substrato de pectina cítrica (1 % m/v em tampão Tris-HCl 0,05M; pH 8,5), 1 mL da solução de CaCl_2 (0,01 M), 1 mL da pectinase comercial e 3 mL de água destilada. Após a incubação por 2 h a 30 °C, foram adicionados 0,6 mL de uma solução de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (9 % m/v) e 0,6 mL de NaOH (0,5 M). Posteriormente, as proteínas precipitadas e o substrato não consumido na reação, foram removidos por centrifugação a 3000 g por 10 minutos. Em seguida, 5 mL do sobrenadante foram adicionados a uma mistura de 3 mL de ácido tiobarbitúrico (0,04 M), 1,5 mL de HCl (0,1 M) e 0,5 mL de água destilada. A mistura obtida foi aquecida em banho-maria por 30 minutos, resfriada e medida a absorbância a 550 nm contra o branco, o qual continha os mesmos reagentes que a amostra, porém sem incubação (tempo zero), antes da adição da solução de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (9 % m/v) e do NaOH (0,5 M). Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,01 na absorbância a 550 nm nas condições do ensaio.

4.2.1.3 Atividade de Pectinametilesterase (PME)

A determinação da atividade de pectinametilesterase (PME) foi realizada conforme o método descrito por Hultin et al. (1966), com algumas modificações. Em um beacker de 100 mL, foram adicionados 30 mL do substrato de pectina cítrica (1 % m/v em NaCl 0,2 M) e ajustado o pH para 7 com a adição de NaOH (0,01 M) sob agitação constante. Posteriormente, à solução de pectina neutralizada foi adicionado 1 mL da pectinase comercial. Em seguida, a mistura reacional foi titulada com NaOH (0,01 M) até pH em torno 7, que foi mantido por 10 minutos a 20 °C. O branco da reação foi realizado nas mesmas condições, mas sem a adição da enzima. Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação da pectina correspondente à quantidade de NaOH (μmol) consumido por minuto para manter o pH constante.

4.2.1.4 Atividade de celulase (FPase)

A dosagem de atividade de celulase na solução comercial de pectinase foi determinada como atividade de papel filtro (FPA) e expressa em unidades de papel filtro (FPU – *Filter Paper Units*) por volume de enzima, como recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987).

A quantificação da glicose liberada da reação da celulase com o papel filtro foi quantificada pelo método descrito por Miller (1959). Assim, em cada tubo de ensaio foram adicionados 1000 μL de tampão citrato de sódio (0,05 M; pH 4,8) e 50 mg de papel filtro enrolado em forma espiral (tiras de aproximadamente $1,0 \times 6,0$ cm de papel filtro Whatman Nº 1). Posteriormente, para a estabilização da temperatura, os tubos foram colocados em banho termostático a 50 °C por 10 minutos. A seguir, adicionaram-se 500 μL da pectinase comercial e a reação de hidrólise foi conduzida a 50 °C por 60 minutos. Após esse período, retiraram-se 500 μL do meio reacional e adicionaram-se 500 μL do reagente DNS. Para a formação da cor, os tubos foram colocados em ebulição por 5 minutos, resfriados em banho de gelo e, posteriormente, em cada tubo foram adicionados 8 mL de tartarato de sódio e potássio. As absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640) a 540 nm contra um branco preparado pela adição de 1500 μL do tampão citrato e 50 mg de papel filtro, após os 60 minutos de reação, foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente. Uma unidade de atividade FPase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor (glicose) por minuto ($U = \mu\text{mol min}^{-1}$) nas condições do ensaio.

4.2.1.5 Atividade de xilanase (XE)

Conforme descrito por Bailey et al. (1992), a atividade de xilanase na solução comercial de pectinase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da xilana usada como substrato. Os açúcares redutores foram dosados segundo Miller (1959) conforme descrito na continuação:

Um volume de 1800 μL do substrato de xilana (1% m/v em tampão citrato de sódio 0,05 M; pH 5,3) foi incubado em banho termostaticado a 50 °C por 5 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 200 μL da pectinase comercial e a reação foi incubada por 5 minutos. Do meio reacional, foram retirados 500 μL e adicionados a 500 μL de DNS. A mistura foi mantida em ebulição por 5 minutos e resfriada em banho de gelo. Após a adição de 8 mL da solução tartarato de sódio e potássio, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU640) a 540 nm contra o branco, preparado como descrito anteriormente, com a exceção que o volume de enzima foi substituído por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de xilose por minuto ($U = \mu\text{mol min}^{-1}$) a 50°C.

4.2.2 Métodos analíticos para a determinação do perfil proteico da pectinase comercial (Rohapect®DA6L)

4.2.2.1 Conteúdo de proteína total

A concentração de proteínas totais presentes na pectinase comercial Rohapect® DA6L foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando uma solução de 1 mg mL^{-1} de albumina sérica bovina (BSA) para a construção da curva padrão e o reagente de Bradford. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU640) em um comprimento de onda de 595 nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

4.2.2.2 Determinação das massas moleculares por eletroforese (SDS-PAGE)

As massas moleculares da pectinase comercial foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante (LAEMMLI, 1970) como descrito a seguir:

- a) preparo das amostras: em tubos *Eppendorfs*, foram colocados 100 μL da pectinase comercial e adicionados 40 μL de ácido tricloroacético (TCA). Posteriormente, a

mistura foi armazenada a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Transcorrido esse período, as amostras foram centrifugadas a 10000 g e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos e o sobrenadante foi removido. Posteriormente, adicionaram-se $100\text{ }\mu\text{L}$ de acetona gelada (90 % v/v) para lavar o *pellet* formado e novamente as amostras foram centrifugadas. Esse mesmo procedimento foi realizado duas vezes, após isso, o precipitado foi ressuspenso com $50\text{ }\mu\text{L}$ do tampão da amostra (β -mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos;

- b) eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE): os géis de resolução e de empilhamento foram preparados misturando os reagentes e as quantidades registradas no Quadro 2.

Quadro 2 - Componentes utilizados para a preparação dos géis de resolução e empilhamento para a eletroforese SDS-PAGE.

Gel de resolução	Componentes
Solução de acrilamida/ bis-acrilamida (30:0,8)	4925 μL
Solução tampão Tris-HCl (0,75 M; pH 8,8)	5000 μL
APS (persulfato de amônio 10 %)	75 μL
TEMED (tetrametiletilenodiamina)	5 μL
Gel de empilhamento	
Solução de acrilamida/ bis-acrilamida (30:0,8)	500 μL
Solução tampão Tris-HCl (0,25 M; pH 6,8)	2500 μL
Água destilada	1925 μL
APS (persulfato de amônio 10 %)	75 μL
TEMED (tetrametiletilenodiamina)	7,5 μL

Primeiramente, a solução para a formação do gel de resolução foi transferida à célula de eletroforese e deixada polimerizar por 40 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, depois, sobre o gel de resolução já polimerizado, foi vertida a solução para a formação do gel de empilhamento e aguardado o tempo necessário para a polimerização a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após a polimerização dos géis, $15\text{ }\mu\text{L}$ do marcador de massa molecular (10 a 200 kDa; Thermo scientific) e $20\text{ }\mu\text{L}$ da amostra foram adicionados nos poços formados. A célula de eletroforese foi colocada em uma cuba de eletroforese vertical, na qual foi vertido o tampão de corrida, preparado dissolvendo 14 g de glicina, 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 3 g de Tris base e 1000 mL de água destilada.

A corrida das amostras no gel foi efetuada sob corrente constante de 300 mA e voltagem de 250 V durante aproximadamente 1 hora. Transcorrido esse tempo, o gel de empilhamento foi removido, e o gel de resolução foi corado com a solução corante de revelação (Quadro 3) durante 24 h. Posteriormente, para a descoloração do gel, esse foi submerso em água destilada e aquecido em micro-ondas até a perfeita visualização das bandas.

Quadro 3 - Componentes utilizados para a preparação da solução de revelação.

Componentes	Quantidades
Corante Coomassie Brilliant Blue R-250	1 g
Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
Água destilada	500 mL

4.3 Liofilização da pectinase

Para a liofilização da pectinase, 30 mL de solução enzimática foram armazenados em freezer a - 80 °C por 24 horas. Posteriormente, as amostras congeladas foram liofilizadas em liofilizador Edwards® modulyo 4K a uma pressão de vácuo de 1×10^3 mbar e temperatura aproximadas de -50 °C.

4.4 Imobilização da pectinase comercial em ERPU

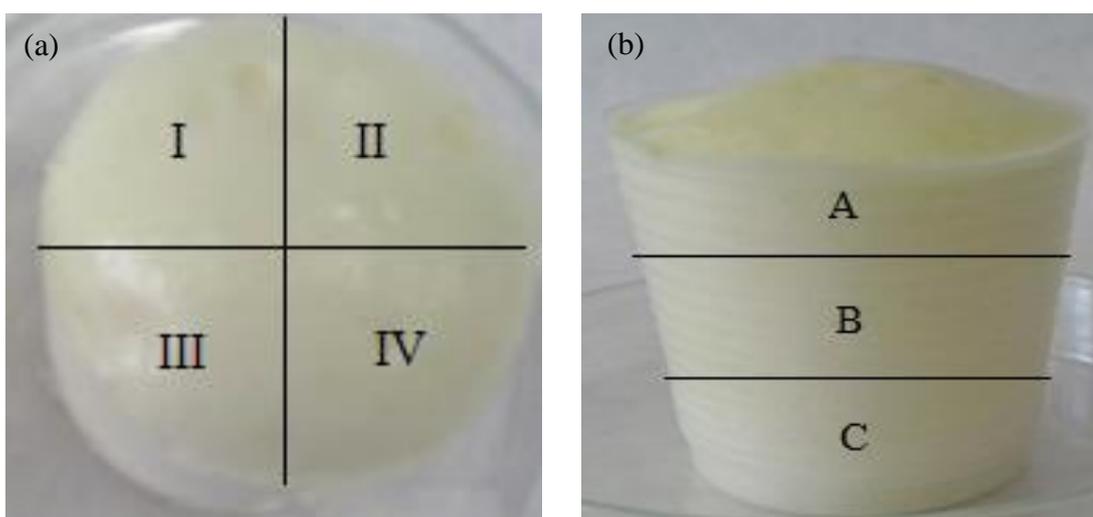
A imobilização da pectinase Rohapect®DA6L foi realizada *in situ* durante a síntese da espuma rígida de poliuretano (ERPU), mediante a adaptação do método descrito por Silva et al. (2013). Para a reação de polimerização dos monômeros poliálcool e isocianato foi mantida a proporção 3:2 (v/v), respectivamente, e um volume total de 5 mL. Para a imobilização, uma determinada quantidade de enzima liofilizada (0,1, 0,2 e 0,4 g) foi misturada com o poliálcool até sua completa solubilização. Em seguida, foi adicionado o isocianato e a mistura foi homogeneizada completamente, por aproximadamente 20 segundos, a modo de iniciar a reação de polimerização da ERPU. A espuma formada, contendo a enzima, foi deixada em repouso por 24 h para a sua completa solidificação. Posteriormente, foi fracionada, lavada

com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,5), seca por 20 minutos com auxílio de uma bomba (Tecnal TE-085) e armazenada a 4 °C em frascos de vidro contendo sílica gel.

4.5 Avaliação da distribuição da pectinase na ERPU

A homogeneidade da distribuição da pectinase na ERPU foi avaliada mediante a determinação da atividade pectinolítica (PG) presente em segmentos da ERPU. Após a imobilização da pectinase na ERPU, a espuma foi dividida em quatro quadrantes longitudinais (I, II, III e IV) e em seguida cada um desses foi fracionado em três partes transversais iguais (A, B e C), totalizando doze segmentos, como mostrado na Figura 6. Para a avaliação da atividade de PG, cada segmento foi codificado, pesado e triturado.

Figura 6 - Segmentação da ERPU contendo a pectinase Rohapect® DA6L imobilizada. Fracionamento na vertical em quadrantes longitudinais (I, II, III e IV) (a) e subdivisão de todos os quadrantes transversalmente em três segmentos iguais (b).



Fonte: O autor (2017)

4.6 Análise morfológica da ERPU contendo a pectinase imobilizada

A morfologia da ERPU contendo a pectinase imobilizada foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando o equipamento modelo JSM-6510LV-LGS. As amostras foram fixadas com fita de carbono sobre a superfície de um suporte. Posteriormente, foram recobertas com uma camada de ouro (ErnestFullam) por 30 segundos e analisadas a 22 kV. As análises de MEV foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.7 Rendimento de imobilização

O rendimento do processo de imobilização (γ) da pectinase na ERPU foi quantificado pela Equação 1.

$$\gamma (\%) = \frac{U_I}{U_L} \times 100 \quad (1)$$

Sendo que γ é o rendimento de imobilização (%), U_I representa a atividade total experimental do imobilizado (calculada considerando o total da massa de enzima imobilizada) e U_L é a atividade total da enzima liofilizada oferecida para a imobilização.

4.8 Estudo cinético do tempo ótimo de reação

O estudo cinético foi conduzido com o objetivo de determinar o melhor tempo de reação correspondente aos maiores valores de atividade pectinolítica tanto para a pectinase livre (líquida e liofilizada) quanto para a imobilizada em ERPU. As amostras da pectinase líquida (500 μ L de uma diluição 1:100 v/v), liofilizada (500 μ L de uma diluição 0,1:30 m/v) e imobilizada (0,1 g) foram incubadas em 500 μ L (livre) e 3000 μ L (imobilizada) de solução de pectina cítrica (0,5 % m/v; pH 4,5) por diferentes tempos (3 a 40 minutos) a 37 °C. Posteriormente, foi dosada a atividade enzimática como descrita no item 4.2.1.1.

4.9 Caracterização parcial da pectinase livre e imobilizada

4.9.1 Efeitos do pH e a temperatura sobre a atividade pectinolítica

Os efeitos do pH e a temperatura sobre a atividade pectinolítica da pectinase livre e imobilizada, foram avaliados mediante um delineamento composto central rotacional (DCCR 2²), totalizando onze experimentos. A atividade enzimática foi calculada com base à quantidade de ácido galacturônico produzido. Como substrato, foram utilizadas soluções de 0,5 % (m/v) de pectina cítrica preparada com tampão acetato de sódio 100 mM nos diferentes pH estudados. Os valores ótimos das variáveis estudadas foram determinados considerando a maximização da atividade pectinolítica durante os experimentos. As variáveis e seus respectivos níveis se encontram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2), para a maximização da atividade pectinolítica da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU.

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

4.9.2 Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m

Para determinação da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante cinética de Michaelis-Menten (K_m) da enzima livre e imobilizada em ERPU, foram conduzidos ensaios de atividade enzimática empregando diferentes concentrações ($0,5-17 \text{ mg mL}^{-1}$) do substrato pectina cítrica. A velocidade inicial de reação (V_0) foi determinada para cada concentração do substrato [S], fixando as variáveis de tempo de reação em 6 minutos e as temperaturas de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e $55 \text{ }^\circ\text{C}$, para a pectinase livre e imobilizada, respectivamente. O cálculo dos parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ e K_m) foi realizado conforme o modelo cinético de Michaelis-Menten apresentado na Equação 2 com o auxílio do software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc., EUA).

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

4.9.3 Estabilidade ao armazenamento

A estabilidade ao armazenamento da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU foi avaliada mediante a estocagem das amostras dos derivados enzimáticos na temperatura de 4°C . Periodicamente, as atividades pectinolíticas foram monitoradas e calculadas as atividades residuais conforme a Equação 3. No tempo zero, a atividade pectinolítica foi considerada como 100 %. Todos os ensaios foram realizados em triplicata

$$R(\%) = \frac{U_F}{U_I} \times 100 \quad (3)$$

Sendo que R (%) é a atividade residual, U_I e U_F correspondem à atividade inicial e após a incubação à temperatura avaliada, respectivamente.

4.9.4 Perfil de estabilidade térmica

Foram conduzidos experimentos para estudar os perfis de estabilidade térmica da pectinase livre e imobilizada em ERPU. Amostras dos derivados enzimáticos foram incubadas à temperatura ambiente (entre 10 e 30 °C), 40, 55, 60, 70 e 80 °C por diferentes períodos de tempo. As atividades residuais foram calculadas como descrito na Equação 3. Todos os ensaios foram realizados em triplicata

4.9.5 Estudo da desnaturação da pectinase livre e imobilizada em ERPU

4.9.5.1 Termoinativação da pectinase

O efeito da temperatura sobre a inativação térmica da pectinase comercial (livre e imobilizada em ERPU) foi avaliado entre 50 e 80 °C. Com esse propósito, foram conduzidos experimentos nos que as amostras da enzima, na ausência de substrato, foram incubadas em frascos de vidro (esterilizados) fechados, em estufa com temperatura controlada, por diferentes tempos. Periodicamente, os frascos foram retirados, resfriados rapidamente em banho de gelo, para interromper o aquecimento térmico, e em seguida foi dosada a atividade pectinolítica. Esse procedimento foi realizado até se obter um valor de atividade residual menor a 50 %. A atividade após 1 minuto de aquecimento foi considerada como atividade inicial, desta forma são eliminados os efeitos do aquecimento e avalia-se o processo isotérmico (SANT'ANNA et al., 2013). Para cada tempo avaliado foram utilizadas amostras novas, que após a dosagem de atividade foram descartadas.

4.9.5.1 Modelagem matemática da cinética de inativação da pectinase

Como decorrência da complexidade dos processos que envolvem a inativação enzimática, que pode ocorrer por reações de desnaturação, agregação, decomposição química ou coagulação (MALHEIROS et al., 2015.; SANT'ANNA et al., 2013), têm sido propostos diversos modelos matemáticos para explicar este fenômeno. Segundo Ladero et al. (2006), os modelos podem ser baseados em mecanismos de primeira ordem, em reações consecutivas e paralelas. Neste estudo, os dados de atividade residual dos experimentos de inativação térmica da pectinase livre e imobilizada na ERPU foram ajustados aos modelos cinéticos apresentados no Quadro 4, usando-se a regressão não linear baseada no algoritmo de Quasi-Newton (*software* STATISTICA versão 7.0, StatSoft Inc., EUA).

Quadro 4 - Modelos cinéticos usados para a análise da inativação da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU.

Modelo	Equação cinética	Referência
Primeira-ordem (PO)	$A_r = e^{(-k_d t)}$ (4)	Labus et al. (2015)
Henley-Sanada (HS)	$A_r = (1 - \alpha)e^{(-k_d t)} + \alpha$ (5)	Henley e Sanada (1985)
Series (SE)	$A_r = \alpha_2 + \left[1 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1}\right] e^{(-k_1 t)} - \left[\frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_1}{k_2 - k_1}\right] e^{(-k_2 t)}$ (6)	Tavares et al. (2015)
Duas frações (DF)	$A_r = \alpha e^{(-k_L t)} + (1 - \alpha)e^{(-k_R t)}$ (7)	Chen e Wu (1998)
Isoenzimas distintas (ID)	$A_r = A_L e^{(-k_L t)} + A_S e^{(-k_R t)}$ (8)	Terefe et al. (2009)
Multicomponente de primeira ordem (MPO)	$A_r = \{e^{(-k_1 t)} + r e^{(-k_2 t)}\} / (1 + r)$ (9)	Fujikawa e Itoh (1996)
Conversão fracional (CF)	$A_r = A_{tr} + (A_0 - A_{tr})e^{(-k_d t)}$ (10)	Fachin et al. (2003)

Nas equações, A_r representa a atividade residual da enzima; K_d é a constante de velocidade da inativação enzimática (h^{-1}); t é o tempo da duração do tratamento térmico (horas); α representa a relação da atividade específica do estado final e inicial; K_L e K_R são as constantes de velocidade de inativação para a forma termolábil (h^{-1}) e termorresistente (h^{-1}) da enzima, respectivamente; A_L e A_R correspondem às atividades residuais para a forma termolábil e termorresistente da isoenzima, respectivamente; r é a fração de atividade do grupo de isoenzimas termorresistentes em relação ao total da enzima; A_0 e A_{tr} são as atividades enzimáticas inicial e da fração termorresistente, respectivamente.

A seleção do modelo cinético com a melhor adequação aos dados de atividade residual foi realizada pela análise de critérios estatísticos e físicos, conforme descrito por Malheiros et al. (2015). Os parâmetros estatísticos; qui-quadrado (X^2) (Equação 11), coeficiente de determinação (R^2) e o erro padrão da média (S) (Equação 12) foram utilizados como critério estatísticos de comparação dos modelos cinéticos.

$$X_2 = \frac{\sum(\alpha_{medido} - \alpha_{previsto})^2}{m-p} \quad (11)$$

$$S = \frac{\sum(\alpha_{medido} - \alpha_{previsto})^2}{\sqrt{m}} \quad (12)$$

Onde: m é o número de observações, p é o número de parâmetros na equação, α_{medido} e $\alpha_{previsto}$ são os valores de atividade residual obtido experimentalmente e pela aplicação do modelo, respectivamente.

O modelo com maior valor R^2 e menor valor de X^2 e S , foi considerado como o mais adequado para a descrição do comportamento cinético da inativação térmica em função do tempo. Como critério físico para a seleção do modelo, levou-se em consideração que os parâmetros estimados dos modelos não podiam ser negativos e/ou iguais (RUDRA et al., 2008).

4.9.5.2 Estimativa dos parâmetros cinéticos de inativação

A influência da temperatura (50 a 80 °C) sobre a constante de velocidade de inativação enzimática (K_d) foi analisada pela lei de Arrhenius, representada na Equação (13). Os parâmetros E_d e A foram calculados por regressão não linear usando o *software* STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., USA).

$$K_d = Ae^{\frac{-E_d}{RT}} \quad (13)$$

Onde: A é a constante pré-exponencial de Arrhenius, E_d é a energia de energia de desativação enzimática, R é a constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K).

Foi determinado o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) (Equação 14) e o valor de redução decimal (D) (Equação 15), cujos valores correspondem aos tempos necessários para obter uma redução de 50 e 90 % da atividade inicial a uma dada temperatura, respectivamente.

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln}(2)}{K_d} \quad (14)$$

$$D = \frac{\text{Ln}(10)}{K_d} \quad (15)$$

O valor Z, especificado como a variação da temperatura requerida para que o valor D sofra uma redução de um ciclo logarítmico, foi estimado pelo inverso do coeficiente angular da reta no gráfico de log (D) versus temperatura (°C).

4.9.5.3 Estimação dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos entalpia (ΔH° ; kJ mol⁻¹), energia livre de Gibbs (ΔG° ; kJ mol⁻¹) e entropia (ΔS° ; kJ mol⁻¹ K⁻¹) do processo de desnaturação da pectinase livre e imobilizada foram determinados segundo Abdel-Naby et al. (2015) mediante as equações apresentadas na continuação:

$$\Delta H^\circ = E_d - RT \quad (16)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \text{Ln} \left(\frac{K_d h}{K_b T} \right) \quad (17)$$

$$\Delta S^\circ = \frac{(\Delta H - \Delta G^\circ)}{T} \quad (18)$$

Sendo que E_d é a energia de desativação enzimática, R é a constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3}$ kJ mol⁻¹ K⁻¹), T é a temperatura absoluta (K), K_d é a constante de velocidade da desnaturação, h é a constante de Plank ($1,84 \times 10^{-40}$ kJ h) e K_b é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-26}$ kJ K⁻¹).

4.10 Estabilidade operacional

A reutilização da pectinase imobilizada na ERPU foi determinada empregando uma quantidade definida do derivado imobilizado, em sucessivos ciclos, em batelada, durante a hidrólise da pectina cítrica (0,7 % m/v, pH 4,5) a 55 °C. Após cada batelada, as amostras foram removidas do meio reacional, lavadas com água destilada e solução tampão de acetato

de sódio (50 mM, pH 4,5) e adicionadas em um nova solução de pectina cítrica. A atividade do primeiro ciclo foi considerada como 100 %. A eficiência do reuso foi calculada conforme apresentado na Equação 19.

$$ER (\%) = \frac{\text{Atividade pectinolítica ciclo } n}{\text{Atividade pectinolítica ciclo } 1} \times 100 \quad (19)$$

4.11 Aplicação da pectinase livre e imobilizada na clarificação de suco

Para avaliar a eficiência da pectinase comercial Rohapect® DA6L livre (líquida) e imobilizada em ERPU na clarificação de suco, empregou-se como amostra um suco de goiaba comercial. Para tanto foram realizados ensaios estudando a influência da temperatura (°C), o tempo (minutos) e as unidades de atividade enzimática (U) na hidrólise das substâncias pécticas presentes no suco.

A polpa comercial de goiaba da marca Mais Fruta® foi utilizada como matéria-prima para a obtenção do suco empregado durante o tratamento enzimático. A preparação do suco foi efetuada seguindo as recomendações do fabricante, desta maneira, 100 g de polpa de goiaba foram dissolvidos em 200 mL de água destilada. O suco obtido foi armazenado a 4 °C até seu uso posterior. Toda a polpa utilizada foi de um mesmo lote.

4.11.1 Tratamento enzimático

O delineamento composto central rotacional (DCCR 2³) mostrado na Tabela 2 foi utilizado para avaliar a eficiência do tratamento enzimático do suco de goiaba empregando a pectinase líquida e imobilizada em ERPU, sobre as respostas porcentagens de clarificação, redução de turbidez e viscosidade do suco tratado. As faixas das variáveis estudadas foram selecionadas baseadas em dados apresentados na literatura e em testes preliminares (dados não mostrados). Durante o tratamento enzimático foi mantido o pH natural (3,93 ± 0,03) do suco de goiaba.

Em cada experimento foram utilizados 20 mL de suco de goiaba, os quais se adicionaram a um béquer de 50 mL, que posteriormente foi colocado em um banho termostático (UNIQUE Ultrasonic Cleaner; modelo: USC-1800A), para o controle da temperatura. Após o suco ter atingido a temperatura desejada, a enzima {massa (ERPU) ou volume (livre) correspondente às unidades de atividade desejadas} foi adicionada e aguardado

o tempo reacional referente a cada ensaio do planejamento (Tabela 6). Depois do tratamento enzimático, a enzima foi inativada mediante o aquecimento do suco a 90 °C por 5 minutos (LEE et al., 2006). Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, centrifugadas a 4000 g por 20 minutos a 5°C e filtradas usando papel filtro Whatman nº 1. O sobrenadante foi coletado para a realização das análises de viscosidade com o viscosímetro “Falling Ball” (Gilmont GV 2200) (SANTIN et al., 2008), porcentagem de clarificação e redução de turbidez. O mesmo procedimento descrito foi seguido para o suco controle, porém não foi adicionada a enzima. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Tabela 2 - Variáveis e níveis do DCCR (2³) empregado para o tratamento enzimático do suco de goiaba com a pectinase líquida e imobilizada em ERPU.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Tempo (min)	10	30	60	90	110
Temperatura (°C)	23	30	40	50	57
Unidades de atividade (U)	7	10	15	20	23

Variáveis fixas: 20 mL de suco. Respostas: %clarificação (PC), redução da turbidez (RT) e viscosidade (μ)

4.11.2 Determinação da porcentagem de clarificação

A determinação da porcentagem de clarificação do suco de goiaba foi realizada conforme descrito por Sandri et al. (2014). As absorbâncias do suco com e sem tratamento enzimático foram medidas em espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640) a 440 e 520 nm. O percentual de clarificação (PC) foi determinado utilizando a equação (20).

$$PC(\%) = \frac{(IC_{SS} - U_{ST})}{IC_{SS}} \times 100 \quad (20)$$

Onde IC_{SS} e IC_{ST} correspondem à somatória dos resultados das leituras das absorbâncias, em 440 e 520 nm, do suco sem e com tratamento enzimático, respectivamente.

4.11.3 Determinação da redução de turbidez

A redução de turbidez (RT) no suco de goiaba foi calculada segundo Chatterjee et al. (2004). A absorbância dos sucos foi medida a 540 nm, contra água como

branco, em espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU640). O percentual de redução de turbidez foi calculado conforme a equação (21).

$$RT (\%) = \frac{(A_{SS} - A_{ST})}{A_{SS}} \times 100 \quad (21)$$

Onde: A_{SS} e A_{ST} correspondem às absorvâncias a 540 nm do suco sem tratamento e tratado, respectivamente.

4.11 Determinação das atividades pectinolíticas da enzima livre e imobilizada

Após o estudo da maximização das condições para a dosagem da atividade pectinolítica dos derivados enzimáticos, foram redefinidas as variáveis tempo, temperatura, pH e concentração do substrato. Desta forma, o método descrito no item 4.2.1.1 para a determinação da atividade pectinolítica foi empregado apenas com modificações nestas variáveis, conforme definidas nos itens 4.8, 4.9.1 e 4.9.2. Cabe salientar que para a dosagem da atividade da pectinase imobilizada em ERPU foi utilizado 3000 μ L de substrato de pectina cítrica, um volume seis vezes maior ao utilizado para a enzima livre, isso para permitir que a enzima imobilizada ficasse completamente imersa na solução.

4.12 Análise estatística

A análise estatística relacionada à estimação dos efeitos de cada variável foi realizada utilizando o erro global e o desvio padrão relativo entre os dados previstos e experimentais. Os demais resultados foram tratados por análise de variância seguida do teste de Tukey. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc., EUA), considerando um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados concernentes à caracterização do perfil enzimático e proteico da pectinase comercial e do processo de imobilização da pectinase em ERPU (rendimento de imobilização e reúso), bem como a comparação da pectinase imobilizada em ERPU com a sua forma livre (líquida e liofilizada), quanto à caracterização parcial, os parâmetros cinéticos, as características termodinâmicas e a estabilidade em condições de armazenamento e a altas temperaturas e ao potencial de aplicação da pectinase imobilizada em ERPU.

5.1 Perfil proteico e enzimático da pectinase comercial

A pectinase comercial Rohapect® DA6L foi caracterizada em termos do perfil enzimático e proteico por dosagem das atividades enzimáticas de PG, PME, PL, FPase e XE, quantificação do conteúdo de proteínas e pela determinação das massas moleculares mediante eletroforese (SDS-PAGE) em condições desnaturantes. Na Tabela 3 e a Figura 7, estão registrados, respectivamente, os resultados do perfil enzimático e da eletroforese (SDS-PAGE) realizada à solução enzimática.

Tabela 3 - Atividades enzimáticas e proteína total da enzima comercial Rohapect® DA6L.

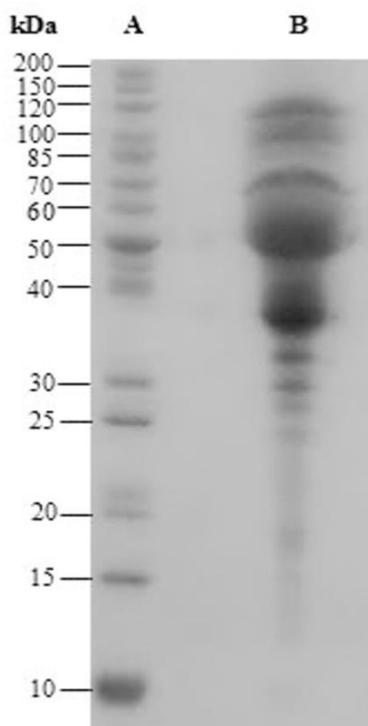
Atividade enzimática específica (U mg ⁻¹ proteína)					Proteína total (mg mL ⁻¹)
PG	PME	PL	FPase	XE	
612,92 ± 7,06	98,8 ± 3,63	12,5 ± 3,96	2,0 ± 0,53	68,13 ± 0,12	0,39 ± 0,02

Os resultados dispostos na Tabela 3, referentes às atividades enzimáticas quantificadas, mostraram que a pectinase comercial Rohapect® DA6L apresentou os maiores valores de atividade específica para a PG (612,92 U mg⁻¹) e PME (98,8 U mg⁻¹) e o menor para a FPase (2,0 U mg⁻¹).

Da análise da eletroforese SDS-PAGE (Figura 7) foi observado que a pectinase comercial (coluna B) não apresenta um elevado grau de pureza, proporcionando uma dispersão dos valores das massas moleculares, as quais estão na faixa de 30 kDa a 120 kDa, com predomínio de uma banda acentuada entre 50 kDa e 60 kDa. Segundo Rodrigues e Serrat (2008), o *A. niger* tem a capacidade de produzir muitas formas de PG com massas moleculares que estão entre 30 e 60 kDa. Nesse sentido, a banda acentuada encontrada na

eletroforese pode ser atribuída a uma maior presença da PG no preparado comercial de pectinase.

Figura 7 - Análise das massas moleculares da pectinase Rohapect® DA6L por SDS-PAGE. Coluna A: marcador de massa molecular; coluna B: pectinase comercial.



Fonte: O autor (2017)

Combo et al. (2012) caracterizaram por SDS-PAGE seis tipos de pectinase comercial (Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L, Pectinase, EPG-M2, Pectinase 62L e Macer8 Fj) produzidos por cepas de *Aspergillus*, os autores observaram que todos os preparados comerciais avaliados, com exceção de EPG-M2 que apresentou uma única banda relativa à endo-poligalacturonase (41kDa), exibiram dispersão nas massas moleculares quando comparados com o padrão (24 kDa a 200 kDa), mas também apresentaram uma banda acentuada em torno dos 55 kDa, o que comprova a falta de pureza dos preparados comerciais, pela presença na sua composição de uma mistura heterogênea de proteínas. Os resultados reportados pelos autores concordam com os obtidos neste estudo, uma vez que na determinação do perfil enzimático da pectinase comercial foi observado que esta apresentou a máxima atividade específica para PG, mas também exibiu em menor proporção atividades específicas para celulase e xilanase.

5.2 Imobilização da pectinase na ERPU

Testes preliminares de imobilização na ERPU foram conduzidos usando o preparado comercial na forma líquida. Após a imobilização constatou-se a perda total da atividade enzimática. Esse comportamento foi associado à reação exotérmica de polimerização do PU que, provavelmente, ocasionou a desnaturação da enzima pelo aumento acentuado da temperatura durante a síntese da ERPU.

A inativação das enzimas solúveis pelo efeito da temperatura é um fenômeno comumente observado, que começa com o desdobramento da molécula de proteína, seguido de alterações irreversíveis devidas à agregação e à formação de estruturas desorganizadas, como consequência da quebra das ligações químicas, resultando em dano aos sítios ativos, que induzem à perda da capacidade catalítica, a qual pode estar relacionada à desnaturação do biocatalisador (ZHANG et al., 2009; SEENUVASAN et al., 2014).

Neste contexto, para prevenir a desnaturação da enzima pelo efeito do calor durante a síntese e imobilização *in situ* da pectinase na ERPU, optou-se por liofilizar a pectinase antes do processo de imobilização. Para isto, 30 mL da pectinase solúvel ($5831,57 \text{ U} \pm 4,90$) foram liofilizados sem prévia diluição, resultando em 6,736 g de material liofilizado com atividade total de $2827,01 \text{ U} \pm 4,07$. A pectinase liofilizada conservou 48 % da atividade pectinolítica da enzima livre antes da liofilização.

Segundo Aguiar-Oliveira e Maugeri (2012), a diminuição da atividade das enzimas liofilizadas pode ser atribuída ao conteúdo de água (acima ou abaixo do limite ideal da camada de água) que, após a liofilização, permanece fortemente ligado à estrutura proteica. Esta água promove nas enzimas um aumento da flexibilidade interna das moléculas, além de atuar como ativador de reações de deterioração. Ambos os casos, conduzem à perda da atividade da enzima. Da mesma forma, a formação de agregados irreversíveis, durante ou imediatamente depois à liofilização e/ou à reconstituição do material liofilizado, podem também resultar na perda da atividade enzimática.

Com o intuito de determinar a melhor condição experimental para a imobilização da pectinase na ERPU, foi avaliado o efeito da quantidade de enzima liofilizada oferecida (0,1, 0,2 e 0,4 g) para o processo de imobilização sobre a atividade pectinolítica e o rendimento de imobilização (Tabela 4). Cabe salientar que na análise de atividade pectinolítica do sobrenadante obtido após a lavagem do derivado enzimático não foi constatada atividade enzimática; por tal motivo esses valores não foram considerados para o cálculo do rendimento de imobilização.

Tabela 4 - Efeito da massa inicial de pectinase liofilizada sobre a atividade enzimática (pH 4,5; 37°C) e o rendimento de imobilização (γ).

Pectinase liofilizada adicionada (g)	Atividade oferecida (U)	Pectinase imobilizada em ERPU			
		Massa total gerada (g)	Atividade pectinolítica (U g ⁻¹)	Atividade total (U)	γ (%)
0,1	41,97	5,18	16,20 ± 0,57 ^a	83,89 ± 2,95 ^a	199,90 ± 7,03 ^a
0,2	83,94	5,29	28,33 ± 1,46 ^b	149,94 ± 7,75 ^b	178,64 ± 9,40 ^a
0,4	167,87	5,49	30,16 ± 0,70 ^b	165,49 ± 3,82 ^b	98,58 ± 2,28 ^b

*Média (n=3) ± desvio padrão seguido de letras iguais não difere estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey).

O máximo rendimento de imobilização encontrado foi de aproximadamente 199,9 %, correspondente ao processo de imobilização com adição de 0,1 g de pectinase liofilizada. Foi verificado que com o incremento da enzima oferecida para a imobilização, houve dois fenômenos diferentes, a diminuição do rendimento de imobilização e o aumento da atividade enzimática dos derivados imobilizados (Tabela 4). Nos testes com a adição de 0,2 e 0,4 g de pectinase liofilizada foram conseguidas as máximas atividades enzimáticas da pectinase imobilizada em ERPU (28,33 e 30,16 U g⁻¹, respectivamente), esses valores não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Com a finalidade de tornar o processo de imobilização mais econômico, fixou-se em 0,2 g a massa de pectinase liofilizada oferecida para a imobilização.

Um comportamento semelhante ao encontrado neste estudo foi reportado para a pectinase imobilizada em nanopartículas magnéticas de quitosana-Fe₃O₄ (SEENUVASAN et al., 2013). O decréscimo do rendimento de imobilização pode ser explicado pela saturação da superfície do suporte com o excesso de enzima oferecida, que causa, pelo fenômeno de aglomeração, bloqueios dos sítios de ligação da enzima com o suporte, mas também pode ser devido a impedimentos estéricos entre as moléculas de enzima, ocasionado pelas interações proteína-proteína que dificultam a exposição dos sítios ativos e inibem a conversão do substrato (LEI et al., 2011; WU et al., 2014).

5.3 Avaliação da distribuição da pectinase na ERPU

Para determinar a homogeneidade da distribuição da pectinase na ERPU, foram dosadas as atividades enzimáticas de várias frações da ERPU contendo a enzima imobilizada. O derivado imobilizado foi segmentado em quadrantes longitudinais e transversais (Figura 6), os quais, após uma etapa de trituração para homogeneização da amostra, foram submetidos,

independentemente, à dosagem da atividade pectinolítica. A Tabela 5 apresenta os resultados da atividade pectinolítica de cada fração do imobilizado (ERPU).

Verifica-se que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as atividades pectinolíticas mensuradas nos cortes longitudinais (I, II, III e IV) realizados na ERPU. Porém, quando a análise foi realizada considerando a atividade dosada nos cortes transversais, observa-se que existe diferença significativa entre os segmentos superiores (A e B) e o segmento inferior (C) da ERPU que possui a maior atividade pectinolítica ($29,44 \text{ U g}^{-1}$). Esta tendência sugere que a pectinase, aparentemente homogeneizada no polioliol, por ser um material liofilizado, provavelmente, com maior densidade que o monômero (polioliol), tenha uma maior resistência à dispersão nas partes superiores da espuma, em relação à parte inferior. Considerando esses resultados, para os testes subsequentes de atividade enzimática, optou-se por triturar e homogeneizar toda a massa gerada da ERPU e utilizar amostras aleatórias desta mistura.

Tabela 5 - Atividade pectinolítica da ERPU obtida após a segmentação do suporte para avaliação da distribuição da enzima.

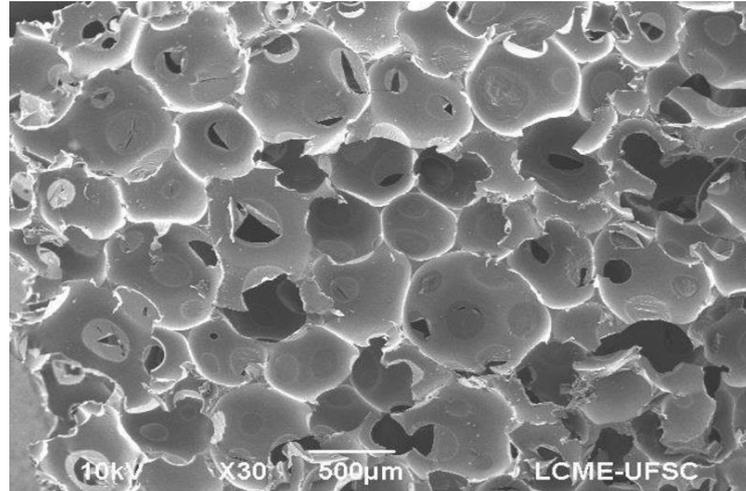
Corte	Atividade pectinolítica (U g^{-1})
Longitudinal	Média das Frações A, B e C
I	$24,68^a \pm 5,23$
II	$25,99^a \pm 2,36$
III	$23,25^a \pm 2,92$
IV	$27,35^a \pm 5,01$
Transversal	Média das Frações I, II, III e IV
A	$23,29^a \pm 2,48$
B	$23,22^a \pm 2,41$
C	$29,44^b \pm 2,78$

*Média ($n=3$) \pm desvio padrão seguido de letras iguais não difere estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey).

5.4 Morfologia da ERPU contendo a pectinase imobilizada

A análise da micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 8) mostra que devido à liberação do dióxido de carbono durante a síntese do poliuretano, a ERPU está constituída por uma rede polimérica porosa dispersa.

Figura 8 - Microscopia (MEV) da ERPU contendo a pectinase immobilizada.

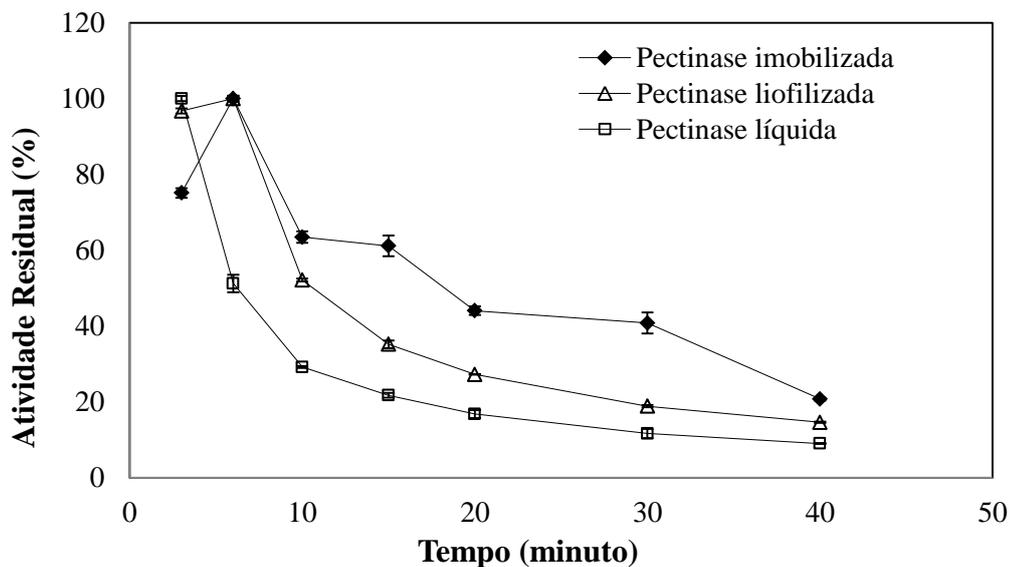


Fonte: O autor (2017)

5.5 Cinética do tempo de reação

O estudo cinético para determinar o tempo ótimo de reação para a maximização da atividade enzimática da pectinase livre (líquida e liofilizada) e immobilizada em ERPU foi realizado mediante a incubação de uma quantidade definida de enzima e substrato por diferentes tempos reacionais (3 a 40 minutos). A Figura 9 mostra os resultados de atividade relativa obtidos da avaliação cinética do tempo reacional.

Figura 9 - Influência do tempo de reação sobre a atividade enzimática da pectinase livre (líquida e liofilizada) e immobilizada *in situ* em ERPU.



Fonte: O autor (2017)

A análise da Figura 9 permitiu verificar que tanto a pectinase liofilizada quanto a imobilizada exibem a máxima atividade enzimática em 6 minutos de reação, inferindo que a imobilização *in situ* da enzima na ERPU não influenciou o tempo ótimo de reação quando comparada com a forma livre (liofilizada) empregada durante o processo de imobilização. No entanto, constatou-se que referente à pectinase líquida, o derivado imobilizado incrementou de 3 para 6 minutos o tempo necessário para atingir a máxima atividade. Nesse caso, atribui-se o aumento do tempo de reação ao retardo na difusão do substrato através da estrutura polimérica da ERPU, o que acarreta um maior tempo para que as moléculas deste atinjam o sítio ativo da enzima imobilizada. Esses problemas difusionais, geralmente, não acontecem quando se utilizam enzimas na forma solúvel, já que nesse estado os sítios ativos do biocatalisador estão disponíveis para a reação, sem ter nenhuma barreira que impeça a formação do complexo enzima-substrato. Com base nestes resultados, foram definidos os tempos reacionais de 3 minutos para a pectinase líquida e de 6 minutos para a enzima liofilizada e imobilizada em ERPU.

Percebeu-se que depois de atingidos os melhores tempos para a maximização da atividade pectinolítica, houve declínio da atividade residual dos derivados enzimáticos (livre e imobilizado), apesar disso, a pectinase imobilizada em ERPU manteve maior atividade residual em comparação com a forma livre (líquida e liofilizada). A diminuição da atividade residual da enzima livre pode ser devida à inibição da atividade enzimática pelo aumento na concentração de produto liberados com o incremento do tempo reacional (REHMAN et al., 2014a). Provavelmente, a imobilização da pectinase em ERPU, trouxe mudanças na estrutura conformacional do biocatalisador e, por conseguinte, o derivado imobilizado em comparação com suas formas livres teve a sua atividade enzimática menos afetada pelo aumento na concentração do produto durante a reação catalítica.

Outros autores estudaram os tempos ótimos de reação para a atividade pectinolítica. Bustamante-Vargas et al. (2015) imobilizaram o extrato pectinolítico de *A. niger* ATCC 9642 em matriz híbrida biomimética de alginato/gelatina/oxalato de cálcio e reportaram que 5 minutos é o tempo necessário para a maximização da atividade pectinolítica do extrato enzimático imobilizado. Rehman et al. (2013) determinaram como 10 minutos o tempo ótimo de reação da pectinase de *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 imobilizada em esferas de alginato cálcico. Os tempos de reação encontrados neste estudo são semelhantes aos reportados na literatura.

5.6 Caracterização parcial da pectinase livre e imobilizada

Neste item, são apresentados os resultados e discussão concernentes aos estudos comparativos da imobilização da pectinase comercial Rohapect® DA6L e sua forma livre (líquida e liofilizada), em termos de caracterização parcial (temperatura e pH ótimos e estabilidade), parâmetros cinéticos e termodinâmicos, estabilidade de armazenamento, térmica e operacional.

5.6.1 Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade pectinolítica

O efeito do pH e a temperatura sobre a atividade catalítica da pectinase livre e imobilizada em ERPU foi estudado utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2²), nas faixas de pH de 3 a 6 e de temperatura de 30 °C a 80 °C. Os resultados dos experimentos estão listados na Tabela 6, na qual se apresenta a matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais das variáveis independentes) e as respostas em termos de atividade pectinolítica para a pectinase comercial livre (atividade expressa em U mL⁻¹ para a forma líquida e U g⁻¹ para o derivado liofilizado) e imobilizada na ERPU (U g⁻¹). Da mesma forma, mostram-se os resultados do rendimento de imobilização (%) determinados em cada ensaio do planejamento.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental com os valores codificados e reais e a resposta atividade pectinolítica (U g⁻¹) para a pectinase livre e imobilizada *in situ* na ERPU e o rendimento de imobilização (RI).

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade pectinolítica			RI* (%)
			Líquida (U mL ⁻¹)	Liofilizada (U g ⁻¹)	Imobilizada (U g ⁻¹)	
1	-1(3,5)	-1(37)	197,46	474,15	18,80	105,7
2	1(5,5)	-1(37)	170,20	393,74	2,76	18,7
3	-1(3,5)	1(73)	167,30	398,98	14,50	96,9
4	1(5,5)	1(73)	66,06	80,22	1,81	60,0
5	-1,41(3)	0(55)	160,38	415,13	24,41	156,8
6	1,41(6)	0(55)	22,84	58,19	2,00	91,7
7	0(4,5)	-1,41(30)	184,15	435,54	15,02	92,0
8	0(4,5)	1,41(80)	151,87	349,34	6,79	51,8
9	0(4,5)	0(55)	196,13	453,90	25,01	146,9
10	0(4,5)	0(55)	192,19	460,05	26,81	155,4
11	0(4,5)	0(55)	190,65	464,17	25,63	147,2

*Massa oferecida da enzima liofilizada para a imobilização: 0,2 g; massa total gerado do derivado imobilizado: 5,33 g.

A pectinase imobilizada na ERPU mostrou atividades enzimáticas na faixa de $1,81 \text{ U g}^{-1}$ a $26,81 \text{ U g}^{-1}$, o valor mais alto de atividade pectinolítica ($26,81 \text{ U g}^{-1}$) foi obtido à temperatura de 55°C e pH 4,5 (ensaio 10). As triplicatas (ensaio 9, 10 e 11) indicaram a boa reprodutibilidade dos resultados. Levando em consideração que no processo de imobilização foram utilizados 0,2 g de enzima liofilizada e gerado, aproximadamente, 5,3 g de pectinase imobilizada em ERPU, os rendimentos de imobilização obtidos, considerando os efeitos do pH e da temperatura na atividade pectinolítica foram de 18,7 a 156,8 % (Tabela 6).

Em contrapartida, as formas livres da enzima apresentaram as máximas atividades enzimáticas de $197,46 \text{ U mL}^{-1}$ (pectinase líquida) e $474,15 \text{ U g}^{-1}$ (pectinase liofilizada) a pH 3,5 e temperatura de 37°C (ensaio 1). Comumente, enzimas imobilizadas apresentam deslocamentos das condições ótimas de reação (pH e temperatura) quando comparadas com a sua forma livre. A mudança do pH ótimo para uma região menos ácida, pode ser justificada pelo acúmulo de cátions, incluindo prótons, na vizinhança da superfície do suporte que afetam o pH da reação de hidrólise do substrato (LI et al., 2007). Por outro lado, aumentos na temperatura ótima de reação podem ser vinculados às melhoras na taxa de difusão molecular promovidas pela diminuição da viscosidade do substrato com o aumento da temperatura (SPAGNA et al., 1995), ao acréscimo na energia de ativação e às interações entre o suporte e a enzima, fornecendo maior rigidez e estabilidade à estrutura conformacional da enzima, o que resulta na proteção do biocatalisador contra aumentos na temperatura e a desnaturação (WANG et al., 2013; REHMAN et al., 2014b).

Após a exclusão dos efeitos que não foram significativos no processo, obtiveram-se os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de t e p a um nível de confiança de 95 % das variáveis independentes, para os derivados enzimáticos livres e imobilizados em ERPU (Apêndice A, B e C). Da análise dos efeitos da pectinase comercial (líquida e liofilizada) constatou-se que o pH (L) e (Q) e a temperatura (L) exercem um efeito negativo significativo ($p < 0,05$) sobre a resposta (Apêndice A e B), conseqüentemente, aumentos nas variáveis estudadas ocasionam a diminuição da atividade pectinolítica. Em relação à pectinase imobilizada em ERPU foram observados resultados similares (Apêndice C) aos encontrados para os derivados solúveis, verificando-se que o pH (L) e (Q) e a temperatura (L) e (Q) exerceram efeitos negativos significativos ($p < 0,05$) sobre o processo, ou seja, que seus aumentos proporcionam a diminuição da atividade enzimática do biocatalisador imobilizado.

As equações (22), (23) e (24) apresentam os modelos matemáticos empíricos obtidos a partir dos coeficientes de regressão da análise dos efeitos (Apêndice A, B e C), que descrevem

a atividade pectinolítica da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em função das variáveis independentes na faixa estudadas.

$$AP_L = 186,09 - 40,42 pH - 43,59 pH^2 - 22,54 T \quad (22)$$

$$AP_F = 433,24 - 113,15 pH - 98,07 pH^2 - 63,97T \quad (23)$$

$$AP_I = 25,82 - 7,56 pH - 6,98 pH^2 - 63,97T - 8,13 T^2 \quad (24)$$

Onde: AP_L , AP_F e AP_I corresponde às atividades pectinolíticas da pectinase líquida ($U mL^{-1}$), liofilizada ($U g^{-1}$ de enzima liofilizada) e imobilizada ($U g^{-1}$ de suporte).

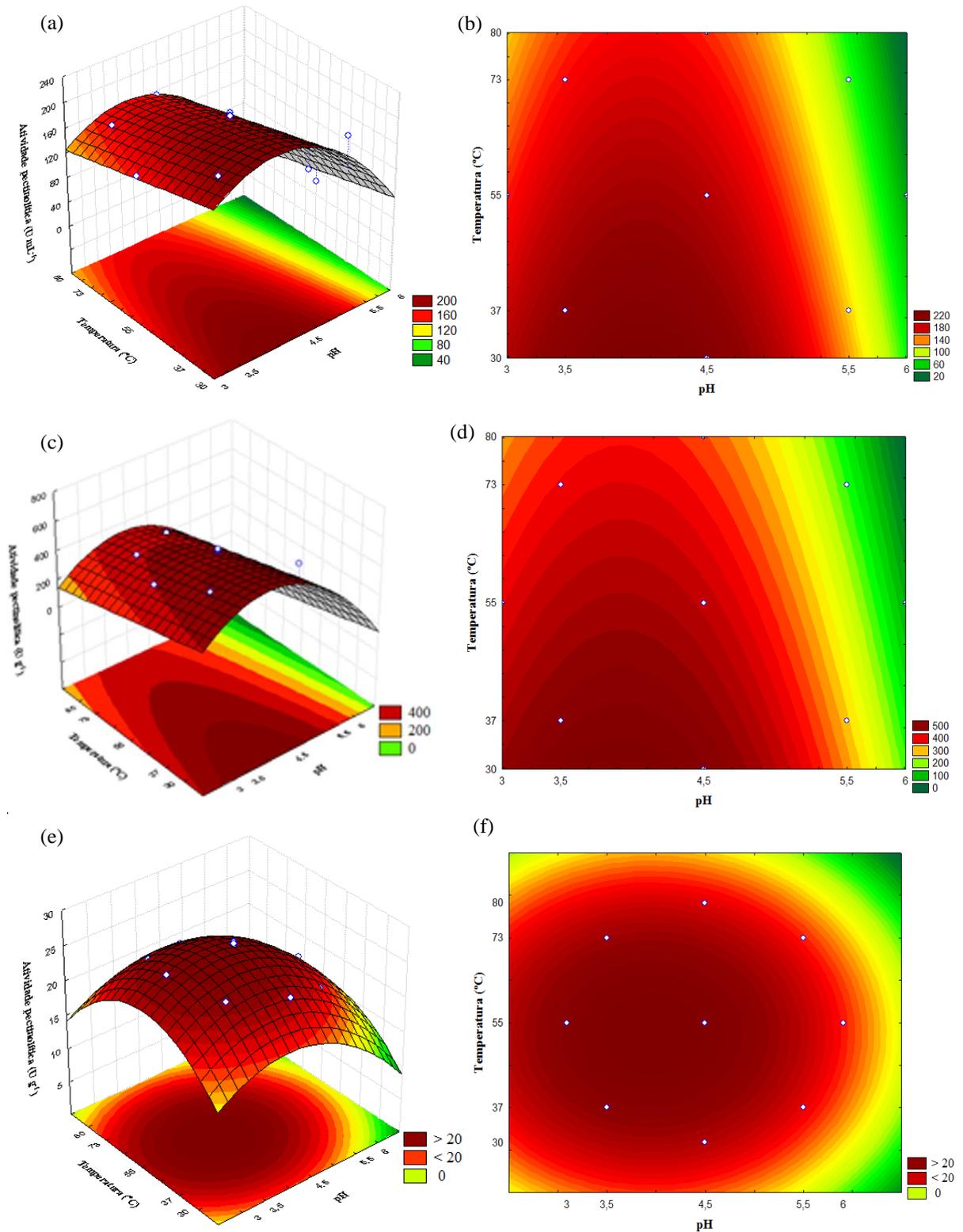
Os modelos para atividade pectinolítica da pectinase líquida, liofilizada e imobilizada foram validados pelas análises de variância (ANOVA; $p < 0,05$) (Apêndice D, E e F). Foi verificado que para todos os derivados enzimáticos, o valor de F calculado foi maior que o tabelado e os coeficientes de correlação (R) foram superiores a 0,93. Por conseguinte, foi possível construir as superfícies de resposta e curvas de contorno das atividades enzimáticas da pectinase líquida, liofilizada e imobilizada em função do pH e temperatura (Figura 10).

De acordo com os resultados, constatou-se que perante as mudanças das variáveis estudadas, a pectinase livre (líquida e liofilizada) e a imobilizada na ERPU apresentaram um comportamento semelhante, observando-se incrementos na atividade pectinolítica do biocatalisador à medida que o pH e a temperatura diminuíram nas condições avaliadas neste estudo. Constatou-se que a pectinase livre, na forma líquida (Figuras 10a e b) e liofilizada (Figuras 10c e d), apresentou os melhores valores de atividade pectinolítica nas faixas de pH de 3,0 a 4,5 e de 30 a 55 °C. Com relação à pectinase imobilizada, foi evidenciada uma região de elevada atividade enzimática na mesma faixa de pH da pectinase livre, porém houve deslocamento na faixa ótima de temperatura que ficou entre 37 e 55 °C (Figuras 10e e f).

A partir dos dados discutidos anteriormente, foram fixadas as condições de pH e temperatura para a dosagem de atividade em 3,5 e 37 °C para a pectinase livre e 4,5 e 55 °C para a pectinase imobilizada em ERPU, respectivamente.

Os resultados deste estudo são semelhante aos encontrados por Delcheva et al. (2007). Os autores atribuíram as alterações nos valores de pH e temperatura ótimos às mudanças causadas no microambiente das enzimas como resultado do processo de imobilização.

Figura 10 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade pectinolítica obtida em função do pH e a temperatura (°C) para a pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma líquida (a e b), liofilizada (c e d) e imobilizada em ERPU (e e f).



Fonte: O autor (2017)

Alguns processos biotecnológicos podem requerer reações enzimáticas 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; conseqüentemente, enzimas com elevadas temperaturas ótimas são muito interessantes para seu uso industrial (ORTEGA et al., 2004a, KUMAR et al., 2006). Na indústria de sucos e vegetais, precisa-se que o material, após a etapa de aquecimento, seja resfriado para o tratamento com as enzimas pectinolíticas; portanto o uso de pectinases termoestáveis evitaria a etapa de resfriamento, reduzindo os tempo e custo da produção (GOMES et al., 2007)

5.6.2 Parâmetros Cinéticos

O parâmetro cinético $V_{m\acute{a}x}$ se define como a maior velocidade de reação para a formação do produto, que pode ser atingida quando todos os sítios ativos da enzima estão saturados com o substrato. Esse parâmetro mostra as características intrínsecas das enzimas, mas em biocatalisadores imobilizados pode ser afetado por problemas difusionais (LEI e BI, 2007). O K_m é a constante de Michaelis – Menten que representa a concentração de substrato necessária para que a enzima alcance a metade da sua velocidade máxima.

Neste estudo, os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU, foram determinados por regressão não linear, pela análise das velocidades iniciais de reação nas diferentes concentrações de substrato (0,5 a 17 mg.mL⁻¹) e uma única concentração de enzima.

Nos Apêndice G, H e I, estão representados os perfis de atividade enzimática da pectinase livre e imobilizada em ERPU em função da concentração do substrato, obtidos do ajuste por regressão não linear ao modelo de Michaelis-Menten (Equação 2). Os coeficientes de correlação maiores a 0,89 indicam uma boa adequação dos dados de atividade ao modelo cinético. Na Tabela 7, apresentam-se os parâmetros cinéticos determinados para os derivados enzimáticos estudados.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada *in situ* na ERPU.

Pectinase	K_m (g mL ⁻¹)	$V_{m\acute{a}x}$
Líquida	0,01	599,82 U mL ⁻¹
Liofilizada	0,0070	1091,60 U g ⁻¹ de liofilizado
Imobilizada em ERPU	0,0075	46,41 U g ⁻¹ de suporte

Constatou-se que os valores estimados de K_m para a pectinase liofilizada e imobilizada *in situ* na ERPU foram praticamente iguais, demonstrando que o processo de imobilização não causou efeitos adversos sobre a formação do complexo enzima-substrato durante a reação catalítica. Consequentemente, confirmou-se que a imobilização da pectinase na ERPU não ocasionou mudanças na afinidade da enzima pelo substrato, nem problemas de transferência de massa, comuns em biocatalisadores imobilizados. Em relação à pectinase líquida, foi determinado um valor de K_m ($0,01 \text{ g mL}^{-1}$) ligeiramente maior ao obtido para a pectinase imobilizada ($0,0075 \text{ g mL}^{-1}$). Esse mesmo fenômeno também foi reportado para pectinases imobilizadas em nanopartículas magnéticas (RAMANKANNAN et al., 2013; SEENUVASAN et al., 2014). Os autores atribuíram à diminuição do valor do K_m da pectinase imobilizada em comparação com a livre, à maior afinidade da pectinase imobilizada pelo substrato, devido ao aumento da disponibilidade dos sítios ativos, em decorrência à expansão da pectinase sobre a superfície do suporte. Matrizes porosas de poliuretano incrementam a área superficial e também minimizam as limitações difusionais de substratos e produtos (SILVA et al., 2013).

Contudo, verificou-se que a pectinase livre (liofilizada) pode atingir uma velocidade máxima de reação ($1091,60 \text{ U g}^{-1}$) superior à da pectinase imobilizada *in situ* na ERPU ($46,41 \text{ U g}^{-1}$). Decréscimos na $V_{m\acute{a}x}$ das enzimas imobilizadas podem estar relacionados à falta de flexibilidade da molécula de proteína, causada pelas interações da enzima com o suporte, o que aumenta a rigidez da estrutura terciária e diminui a capacidade catalítica, afetando o volume de produto liberado.

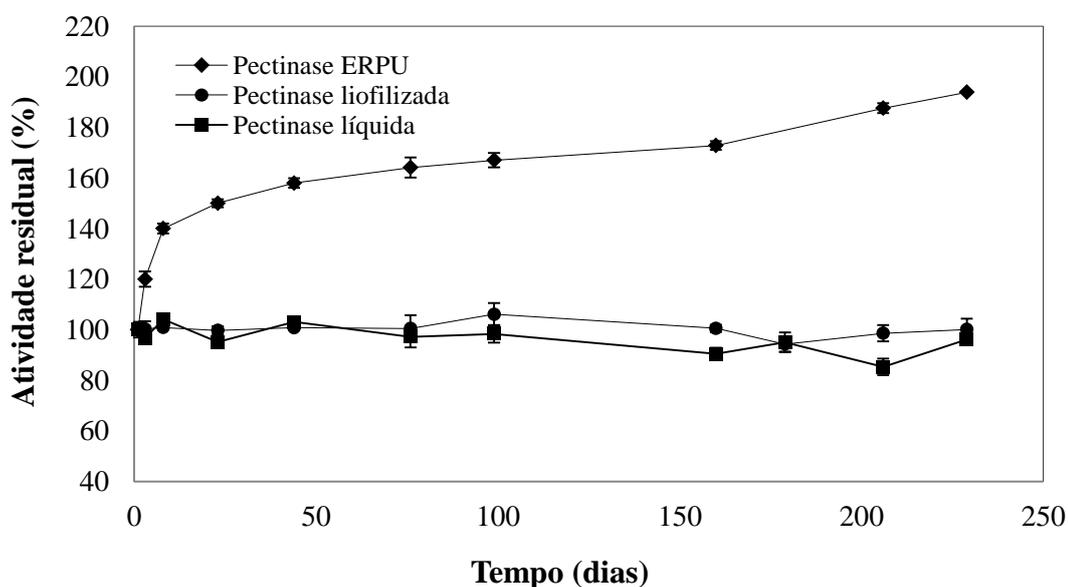
Dependendo do tipo de suporte empregado durante a imobilização, na literatura são reportados diversos valores dos parâmetros cinéticos para as pectinases imobilizadas. Esawy et al. (2013) avaliaram os parâmetros cinéticos da pectinase de *A. niger* NRC1ami imobilizada em esponja de polivinil-álcool (PVA) e encontraram valores para K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de $0,0032 \text{ g mL}^{-1}$ e $3,8 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente, utilizando pectina como substrato. Valores menores aos observados para a pectinase imobilizada em ERPU. Porem, Buga et al. (2010) obtiveram valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para poligalacturonase imobilizada em alginato cálcico de $0,011 \text{ g mL}^{-1}$ e $1,65 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, respectivamente. Comparando esse resultado com o encontrado neste estudo, pode constatar-se que sob o ponto de vista cinético, a pectinase imobilizada em ERPU é mais promissora para ser usada como catalisador, pois tem maior afinidade pelo substrato e velocidade de reação.

5.6.3 Estabilidade ao armazenamento

A estabilidade ao armazenamento é uma das características mais importantes das enzimas. A avaliação da estabilidade é de grande utilidade para determinar o desempenho dos biocatalisadores sob as condições de estocagem. Para determinar a estabilidade ao armazenamento da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU, as enzimas foram armazenadas, a seco, a 4 °C. Periodicamente, as atividades enzimáticas foram dosadas nas condições ótimas de pH e temperatura para cada derivado enzimático. A Figura 11 mostra os perfis de atividade residual da pectinase livre e imobilizada em ERPU durante o período avaliado.

Considerando a atividade inicial como 100 %, os resultados revelaram que durante o tempo avaliado (229 dias) não houve queda da atividade enzimática dos derivados enzimáticos. Porém, cabe ressaltar que a pectinase imobilizada em ERPU apresentou hiperativação da atividade, determinando-se uma atividade residual de 194 % após 229 dias de estocagem. Esses resultados sugerem que o suporte de PU forneceu à enzima proteção ao ambiente exterior, permitindo o aumento da atividade pectinolítica, como resultado das melhoras no microambiente criado pela rede polimérica, que protegeu a enzima da temperatura e simulou os efeitos de aglomeração e confinamento em uma célula viva (ZHANG et al., 2008).

Figura 11 - Perfil de estabilidade de armazenamento a 4 °C para a pectinase livre e imobilizada em ERPU.



Fonte: O autor (2017)

A atividade catalítica das enzimas imobilizadas pode ser afetada pela afinidade do suporte pela água (POOJARI e CLARSON, 2013). A natureza hidrofílica-hidrofóbica do suporte é relevante para a catalise, pois é preciso que esse apresente certa afinidade com o meio reacional e promova a transferência de massa, mas também que suas características hidrofóbicas minimizem a interação deste com o microambiente e mantenham o equilíbrio aquoso da estrutura do biocatalisador (SOARES, 2012).

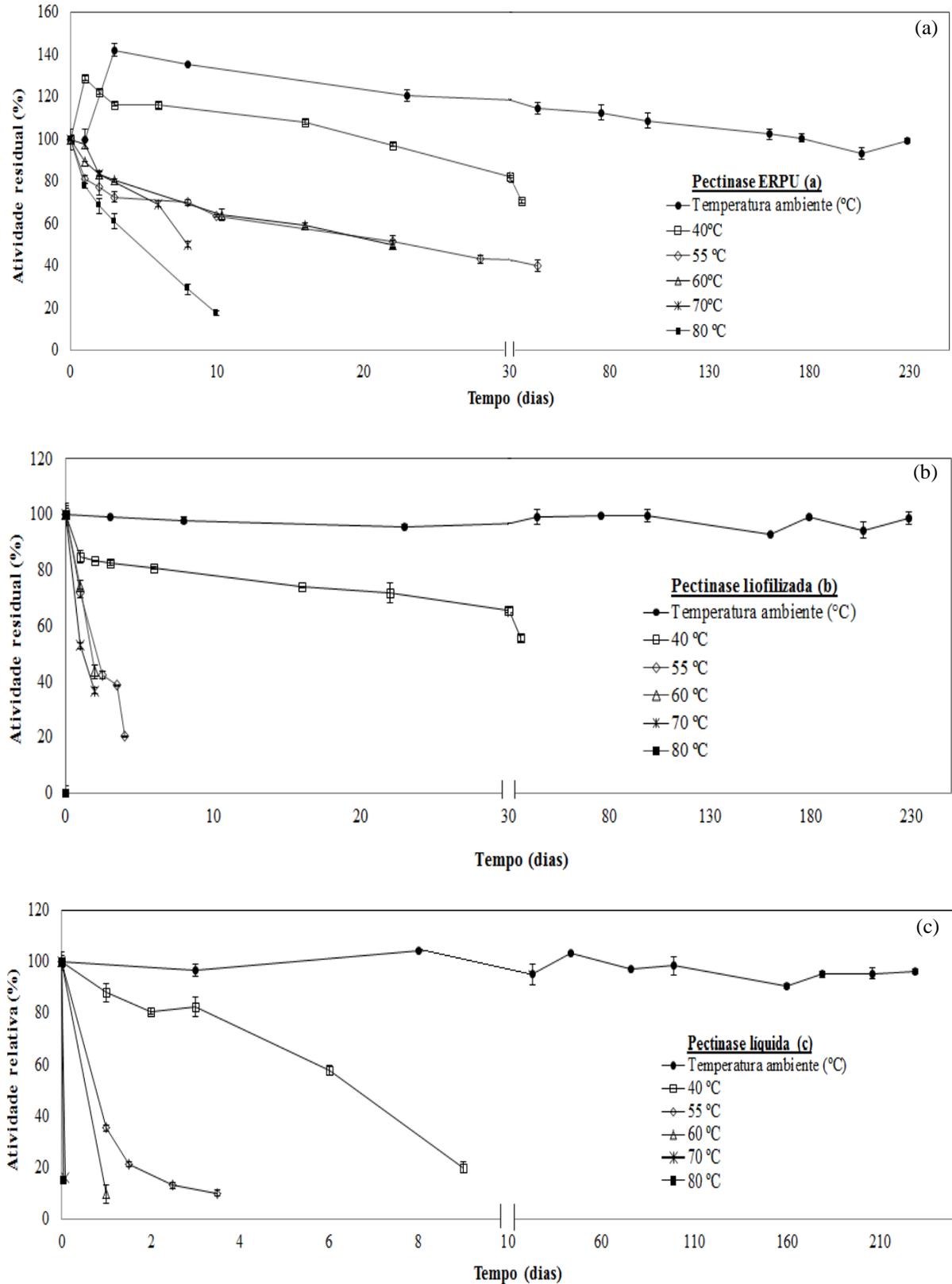
O uso de suportes como o poliuretano, pode promover a hiperativação da atividade catalítica e incremento da estabilidade enzimática, devido a que, por suas características hidrofóbicas, menos água será retida e todos os processos de desativação relacionados com o percentual de hidratação serão minimizados, melhorando a preservação da estrutura da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; BRANCO et al., 2010). Nesse aspecto, meios com baixa hidratação são recomendáveis, pois evitam a solvatação dos sítios ativos das enzimas pelo excesso de água e melhoram os processos de difusão do substrato até os sítios ativos. No caso da pectinase imobilizada, essas características permitem que a hidratação necessária para a reação de hidrólise catalisada pelo derivado enzimático ocorra em conjunto com o fornecimento do substrato (meio aquoso), sem que haja a necessidade de romper a camada de solvatação das moléculas de pectinases, como provavelmente acontece quando essas se encontram na forma livre dissolvidas em meios líquidos.

Bahrami e Hejazi (2013) estudaram a estabilidade ao armazenamento a 4° C da pectinase imobilizada em nanopartículas de AOT-Fe₃O₄ e observaram que depois de 30 dias o derivado imobilizado manteve 60 % da atividade inicial, resultados mais promissores em comparação aos reportados por estes autores foram encontrados neste estudo.

5.6.4 Estabilidade térmica da pectinase livre e imobilizada

A estabilidade térmica da pectinase livre e imobilizada em ERPU foi avaliada pela determinação da atividade residual após a incubação da pectinase livre e imobilizada, em ausência de substrato, à temperatura ambiente (entre 10 e 30 °C), 40, 55, 60, 70 e 80 °C. Sob as condições descritas, foram obtidos os perfis de estabilidade térmica da pectinase livre e imobilizada dispostos na Figura 12.

Figura 12 - Estabilidade térmica da pectinase Rohapect® DA6L imobilizada (a), liofilizada (b) e líquida (c) a várias temperaturas por diferentes intervalos de tempo.



Fonte: O autor (2017)

Observa-se que na temperatura ambiente, durante o período avaliado (229 dias), tanto a pectinase livre (liofilizada; 98 % e líquida; 96 %) como a imobilizada (99 %) conservaram suas atividades iniciais. No entanto, percebeu-se que, em altas temperaturas, a pectinase imobilizada em ERPU (Figura 12a) foi mais termoestável comparada com as formas livres (Figura 12b e c), retendo mais de 70 e 40 % da atividade inicial depois de 40 e 44 dias, incubada a 40 e 55 °C, respectivamente. Enquanto que a pectinase liofilizada apresentou 55 e 20 % da atividade residual, depois de armazenada por 35 e 4 dias a 40 e 55 °C, respectivamente e, a pectinase líquida manteve 20 e 10 % da atividade inicial, após 9 e 4 dias de armazenamento nas mesmas temperaturas.

Com relação às temperaturas mais altas, corroborou-se o aumento da termorresistência da pectinase imobilizada em ERPU, pois incubada por 22 e 8 dias a 60 e 70 °C, respectivamente, o derivado enzimático conservou 50% da atividade inicial, e a 80 °C a atividade residual foi 30 % no oitavo dia de estocagem. Nas mesmas temperaturas a pectinase livre (líquida e liofilizada) foi desnaturada nas primeiras horas de incubação.

Geralmente, a imobilização pode aumentar a rigidez da estrutura globular ativa das enzimas, devido às interações multipontuais não covalentes entre a enzima e o suporte. Desta forma, será necessária uma quantidade maior de energia de ativação para rearranjar a conformação molecular da enzima e permitir a ligação do substrato ao sítio ativo e, conseqüentemente, o biocatalisador se torna mais resistente ao calor e a inativação (WU et al., 2014). A estabilidade térmica de uma enzima pode indicar a eficiência do método de imobilização e também diferenciar o equilíbrio gerado entre a estabilidade conformacional adquirida e o microambiente circundante da enzima (RAMIREZ et al., 2013).

Esawy et al. (2013) avaliaram a estabilidade térmica da pectinase imobilizada em espuma de polivinil álcool e determinaram que a enzima retém 52,9 % da atividade inicial após 2 horas a 70° C. Esse resultado foi muito inferior ao encontrado neste estudo.

5.6.5 Modelagem da cinética da inativação térmica da pectinase livre e imobilizada em ERPU

Os estudos de inativação térmica são fundamentais para entender e prever o mecanismo de desativação das enzimas, além de fornecerem informações sobre a velocidade com que acontece o fenômeno e as estratégias que podem ser desenvolvidas com o intuito de aumentar a estabilidade dos biocatalisadores (AGUIAR-OLIVEIRA E MAUGERI, 2011; ORTEGA et al., 2004a).

Na literatura, têm sido propostos diversos modelos cinéticos para elucidar o comportamento das enzimas quando submetidas ao efeito da temperatura. O modelo de cinético de primeira ordem (Equação 4) é baseado na suposição que o rompimento de uma ligação simples ou uma estrutura é suficiente para inativar a enzima (SHALINI et al. 2008). Porém, considerando a complexidade da estrutura conformacional das enzimas e os diferentes fenômenos envolvido na inativação, outros modelos matemáticos têm surgido para explicar a inativação térmica dos biocatalisadores.

Os modelos representados pelas equações (5) e (6) são baseados em duas reações irreversíveis de primeira ordem; na primeira reação, a enzima é convertida em um intermediário com baixa atividade específica e na segunda esse intermediário é transformado irreversivelmente para uma forma inativa (RUDRA et al., 2008).

As equações (7), (8) e (9) correspondem a modelos cinéticos que sugerem que a enzima está constituída por isoenzimas com diferentes estabilidades térmicas; assim, a perda da atividade enzimática durante o processo de inativação térmica pode ser descrita pela soma de duas quedas exponenciais, uma correspondente à fração lábil e outra à termorresistência do biocatalisador (CHEN e WU., 1998; TEREFE et al., 2009; FUJIKAWA e ITOH., 1996).

O modelo de conversão fracional (Equação 10) descreve um processo de inativação de primeira ordem, que considera a não inativação da enzima após um prologando aquecimento, como decorrência da existência de uma fração da enzima extremamente resistente ao calor (SHALINI et al. 2008).

A cinética de inativação térmica da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada na ERPU foi estudada na faixa de 50 a 80 °C. Os dados de atividade residual determinados para os derivados enzimáticos foram ajustados aos modelos cinéticos especificados no Quadro 4 e descritos anteriormente. A seleção do modelo para a explicação do processo de desativação da pectinase livre e imobilizada foi efetuada com base na análise de critérios físicos (rejeição do modelo por parâmetros negativos ou iguais) e estatísticos (X^2 , R^2 e S) obtidos dos ajustes dos dados de atividade relativa aos modelos matemáticos avaliados (Tabela 8).

Constatou-se que para a pectinase livre (líquida e liofilizada), com exceção do modelo cinético de PO (Equação 4), os modelos apresentaram parâmetros estimados negativos (P_n) e/ou iguais (P_i) (Tabela 8), não sendo, portanto, apropriados para explicar a desativação térmica da pectinase na sua forma livre, conseqüentemente, foram rejeitados para a modelagem matemática dos dados de atividade relativa nas temperaturas avaliadas. A estimativação de parâmetros iguais sugere que a preparação comercial de pectinase está

constituída somente por um tipo ou por várias isoenzimas com similares características de inativação térmica. Resultados semelhantes foram obtidos por Ortega et al. (2004b) quando avaliaram a cinética de desnaturação enzimática da pectina liase em preparações comerciais de pectinase.

Considerando o exposto, o modelo cinético de primeira ordem foi selecionado para explicar o mecanismo de desativação térmica da pectinase livre, uma vez que esse rendeu um bom ajuste dos dados experimentais com coeficientes de determinação maiores que 0,96 e baixos valores de X^2 e S (Tabela 8).

Tabela 8 - Modelos matemáticos avaliados para representar a cinética de inativação térmica da pectinase livre e imobilizada em ERPU. P_n = parâmetros negativos; P_i = parâmetros iguais.

Modelo	R^2	X^2	S	Análise
Pectinase Líquida				
PO	[0,90; 0,98]	$[2,1 \times 10^{-3}; 9,3 \times 10^{-3}]$	$[3,2 \times 10^{-3}; 1,9 \times 10^{-2}]$	Alto R^2 e baixo X^2 e S; aceito.
HS	[0,91; 0,99]	$[1,1 \times 10^{-4}; 9,9 \times 10^{-3}]$	$[1,1 \times 10^{-4}; 1,6 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.
SE	[0,92; 0,99]	$[9,2 \times 10^{-4}; 1,8 \times 10^{-2}]$	$[6,3 \times 10^{-5}; 1,4 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.
ID	[0,93; 0,99]	$[1,3 \times 10^{-3}; 1,7 \times 10^{-2}]$	$[5,7 \times 10^{-4}; 1,3 \times 10^{-2}]$	P_i ; rejeitado.
DF	[0,92; 0,99]	$[2,0 \times 10^{-4}; 1,2 \times 10^{-2}]$	$[9,9 \times 10^{-5}; 1,5 \times 10^{-2}]$	P_i ; rejeitado.
MPO	[0,92; 0,99]	$[2,0 \times 10^{-4}; 1,2 \times 10^{-2}]$	$[9,9 \times 10^{-5}; 1,5 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.
CF	[0,92; 0,98]	$[2,0 \times 10^{-4}; 1,2 \times 10^{-2}]$	$[1,0 \times 10^{-4}; 1,5 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.
Pectinase Liofilizada				
PO	[0,91; 0,99]	$[5,0 \times 10^{-4}; 1,8 \times 10^{-2}]$	$[1,2 \times 10^{-3}; 3,2 \times 10^{-2}]$	Alto R^2 e baixo X^2 e S; aceito.
HS	[0,90; 0,98]	$[5,0 \times 10^{-4}; 2,9 \times 10^{-2}]$	$[1,2 \times 10^{-3}; 4,7 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.
SE	[0,87; 0,99]	$[4,4 \times 10^{-4}; 2,7 \times 10^{-2}]$	$[6,2 \times 10^{-4}; 4,4 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.
DF	[0,87; 0,99]	$[5,0 \times 10^{-4}; 1,2 \times 10^{-2}]$	$[8,9 \times 10^{-4}; 1,2 \times 10^{-2}]$	P_i ; rejeitado.
ID	[0,85; 0,99]	$[7,4 \times 10^{-4}; 6,4 \times 10^{-2}]$	$[7,6 \times 10^{-4}; 1,4 \times 10^{-3}]$	P_i ; rejeitado.
MPO	[0,87; 0,99]	$[5,0 \times 10^{-4}; 2,8 \times 10^{-2}]$	$[1,2 \times 10^{-3}; 1,9 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.
CF	[0,87; 0,98]	$[5,8 \times 10^{-4}; 3,6 \times 10^{-2}]$	$[8,3 \times 10^{-3}; 4,5 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.
Pectinase Imobilizada				
PO	[0,93; 0,95]	$[2,8 \times 10^{-3}; 1,0 \times 10^{-2}]$	$[1,1 \times 10^{-3}; 3,2 \times 10^{-2}]$	Aceito
HS	[0,93; 0,99]	$[4,6 \times 10^{-4}; 4,3 \times 10^{-3}]$	$[1,4 \times 10^{-3}; 6,7 \times 10^{-3}]$	P_n ; rejeitado
SE	[0,96; 0,99]	$[3,2 \times 10^{-4}; 1,4 \times 10^{-3}]$	$[8,0 \times 10^{-4}; 3,5 \times 10^{-3}]$	P_n ; rejeitado.
DF	[0,95; 0,99]	$[2,0 \times 10^{-4}; 4,0 \times 10^{-3}]$	$[4,3 \times 10^{-4}; 7,0 \times 10^{-3}]$	Rejeitado.
ID	[0,92; 0,99]	$[2,3 \times 10^{-4}; 5,0 \times 10^{-3}]$	$[4,3 \times 10^{-4}; 1,2 \times 10^{-2}]$	P_i ; rejeitado.
MPO	[0,95; 0,99]	$[2,0 \times 10^{-4}; 4,0 \times 10^{-3}]$	$[4,3 \times 10^{-4}; 7,0 \times 10^{-3}]$	Rejeitado
CF	[0,92; 0,99]	$[3,7 \times 10^{-4}; 4,2 \times 10^{-3}]$	$[1,0 \times 10^{-3}; 1,2 \times 10^{-2}]$	P_n ; rejeitado.

Na Tabela 8, observa-se que para a pectinase imobilizada em ERPU, os modelos matemáticos de PO, MPO e DF mostraram uma boa adequação aos dados de atividade relativa, com altos valores de R^2 (0,93 a 0,99) e baixos de X^2 e S, sem nenhum critério físico que permitisse a rejeição de destes modelos. Portanto, esses modelos foram pré-selecionados

para explicar a desativação térmica do derivado imobilizado. Os ajustes dos dados de atividade relativa aos demais modelos avaliados, forneceram parâmetros negativos e/ou iguais, e valores de R^2 , X^2 e S pouco adequados, por tal motivo foram rejeitados.

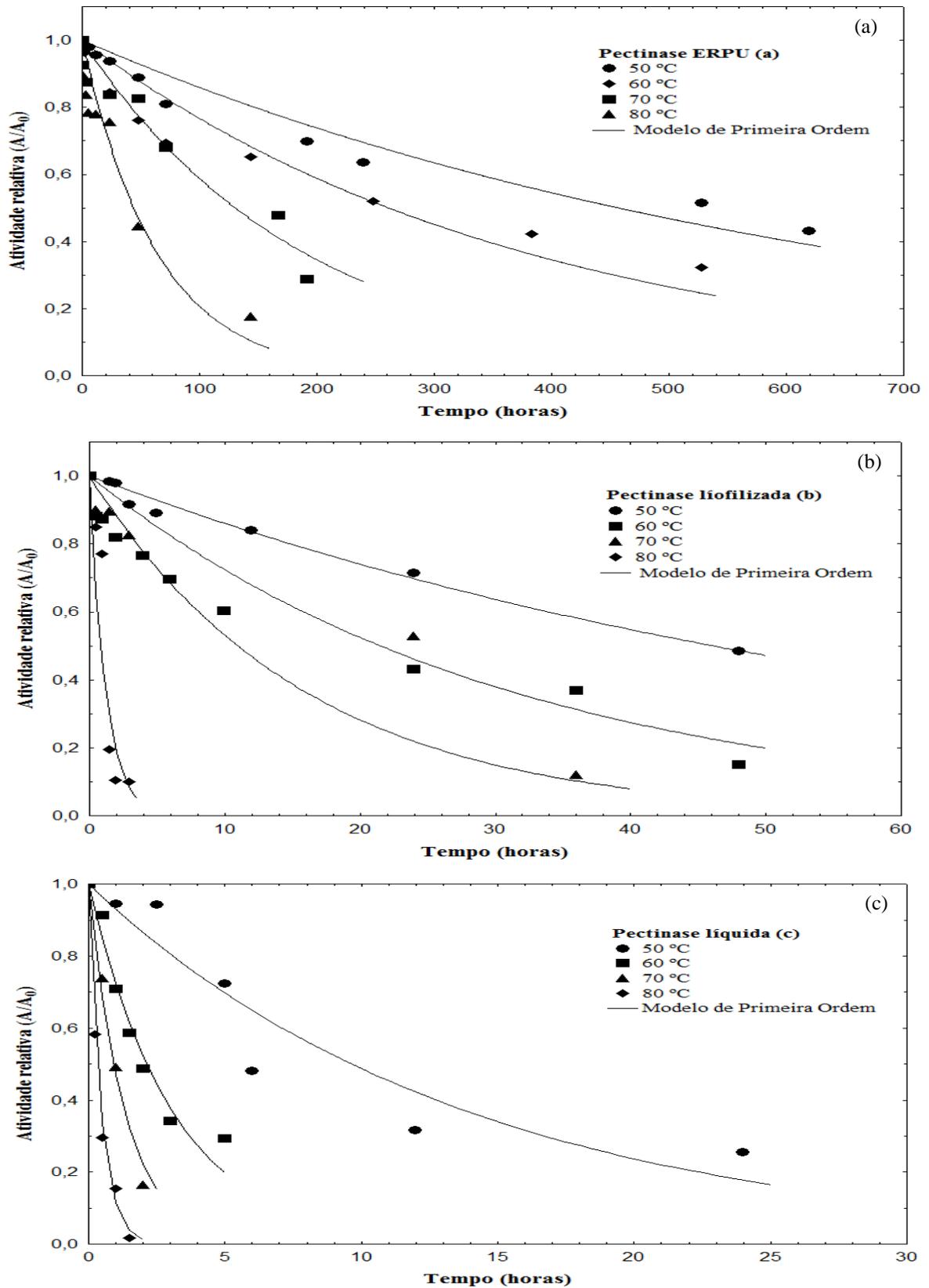
Baseados nesses resultados, a seleção final do modelo foi realizada considerando a temperatura como uma variável (LADERO et al., 2006), mediante o ajuste por regressão não linear ao modelo de Arrhenius das constantes cinéticas (K_d) determinadas utilizando os modelos de PO, MPO e DF em cada temperatura avaliada (APÊNDICE J, K e L).

Levando em consideração o coeficiente de determinação dos ajustes das constantes de inativação térmicas dos modelos pré-selecionados à equação de Arrhenius, constatou-se que para o modelo de MPO (APÊNDICE J) os ajustes das constantes cinéticas correspondentes à fração lábil (K_L ; $R^2 > 0,038$) e à termorresistente (K_R ; $R^2 > 0,069$) não foram adequados, conseqüentemente, esse modelo foi rejeitado. Da mesma forma, o modelo de DF (APÊNDICE K) não foi adequado, pois foram observados baixos coeficientes de determinação ($R^2 = 0,068$) tanto para a fração lábil quanto para a termorresistente, demonstrando-se a falta de ajuste, portanto esse modelo também foi rejeitado. Finalmente, o modelo de PO (APÊNDICE L) mostrou-se adequado para modelar as constantes de inativação em função da equação de Arrhenius, uma vez que foi obtido um alto coeficiente de determinação (K_d ; $R^2 > 0,99$). Deste modo, o modelo de PO foi selecionado para representar o processo de desativação térmica da pectinase imobilizada em ERPU.

O modelo cinético de primeira ordem tem sido reportado para explicar a cinética de inativação de diferentes enzimas; nesse caso a diminuição da atividade enzimática pode ser descrita como função do tempo em condições constantes de processamento (ORTEGA et al., 2004a; BASU et al., 2008; FACHIN et al. 2003). A inativação térmica da grande maioria das enzimas, incluindo as enzimas pectinolíticas, segue um mecanismo de primeira ordem irreversível, onde a enzima ativa é convertida diretamente a um estado inativo, sem a necessidade de intermediários (NAIDU e PANDA, 2003).

Na Figura 13, são apresentados os ajustes dos dados experimentais de atividade residual, para cada derivado enzimático, ao modelo de PO selecionado na faixa de temperatura de 50 a 80 °C.

Figura 13 - Modelagem da inativação térmica da pectinase imobilizada em ERPU (a), liofilizada (b) e líquida (c) usando o modelo de cinético de primeira ordem a diferentes temperaturas.



Fonte: O autor (2017).

Os resultados demonstraram que em todas as condições de temperaturas estudadas, a cinética de inativação térmica das pectinases livre e imobilizada é adequadamente representada pelo modelo de PO (Equação 4). Do mesmo modo, observa-se que a pectinase livre é muito mais rapidamente inativada que a imobilizada em ERPU. Atribui-se esse comportamento ao aumento nos movimentos vibracionais dos átomos da proteína devido à incubação da enzima em altas temperaturas, o que causa o rompimento das ligações químicas que mantêm estável a estrutura tridimensional proteica e, portanto, a enzima pode adquirir uma nova conformação não catalítica (TAVARES et al., 2015).

Como consequência do processo de imobilização, a estabilidade térmica é incrementada devido a uma maior rigidez da estrutura terciária, aumentando a capacidade do biocatalisador de resistir ao desdobraimento térmico e, além disso, a enzima é protegida da temperatura pelo suporte e, portanto, os movimentos vibratórios afetam em menor proporção sua conformação estrutural.

O aumento da estabilidade térmica da pectinase imobilizada em ERPU em comparação com as formas livres foi corroborado a partir dos parâmetros cinéticos estimados da avaliação isotérmica da cinética de inativação térmica, cujos resultados estão registrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos do processo de inativação térmica da pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	K_d (h ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (h)	D (h)	Z (°C)
Pectinase Líquida						
50	323,15	0,0720	0,90	9,63	31,98	20,8
60	333,15	0,3241	0,96	2,14	7,11	
70	343,15	0,7521	0,98	0,92	3,06	
80	353,15	2,1773	0,96	0,32	1,06	
Pectinase liofilizada						
50	323,15	0,0150	0,98	46,09	153,12	18,03
60	333,15	0,0323	0,91	21,44	71,24	
70	343,15	0,0633	0,99	10,95	36,38	
80	353,15	0,8431	0,93	0,82	2,73	
Pectinase Imobilizada						
50	323,15	0,0015	0,95	456,89	1517,86	29,85
60	333,15	0,0027	0,90	260,96	866,94	
70	343,15	0,0053	0,93	130,43	433,31	
80	353,15	0,0157	0,91	44,01	146,22	

De um modo geral, constatou-se que o aumento da temperatura acelera o processo de inativação térmica dos derivados enzimáticos estudados. Porém, foi observado que a velocidade com que acontece a inativação (representada pela constante K_d) do derivado imobilizado é muito menor se comparada com a pectinase livre (líquida e liofilizada). Assim, por exemplo, confrontando os K_d obtidos à temperatura de 80 °C (Tabela 9), verifica-se que o K_d da pectinase imobilizada foi 145,3 e 53,7 vezes menor que o determinado para a pectinase líquida e liofilizada, respectivamente. Essa mesma tendência foi observada nas outras temperaturas avaliadas. O baixo valor de K_d , o qual é proporcional à concentração de enzima ativa presente, da pectinase imobilizada sugere que o processo de imobilização da pectinase na ERPU protegeu à enzima da inativação térmica na faixa de temperatura de 50 a 80 °C.

Os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) e de redução decimal (D) de um biocatalisador correspondem a valores numericamente iguais ao tempo necessário para atingir uma diminuição de 50 e 10 % da sua atividade enzimática inicial, respectivamente. A pectinase imobilizada em ERPU mostrou-se mais estável à inativação térmica que as formas livres, obtendo-se tempos de $t_{1/2}$ na faixa de 456,89 a 44,01 h e valores de D de 1517,86 a 146,22 h. Valores altos desses parâmetros são desejáveis durante as operações industriais, pois garantem que a enzima é mais resistente à inativação ocasionada pelo efeito da temperatura (DE CASTRO et al., 2015).

Os valores de Z de 20,18, 18,03 e 29,03 °C (Tabela 9) indicam que uma mudança nesses intervalos de temperatura geraria uma redução de um ciclo logarítmico na atividade enzimática da pectinase líquida, liofilizada e imobilizada, respectivamente. O valor de Z da pectinase imobilizada em ERPU (29,03 °C) decorre, portanto, do aumento da termoestabilidade observado para a enzima após a imobilização.

5.6.5.1 Termodinâmica da termoestabilidade da pectinase

Nos processos enzimáticos, a determinação dos parâmetros termodinâmicos é necessária para elucidar o comportamento das moléculas frente à inativação enzimática em diferentes condições fisiológicas, assim como o efeito da temperatura na taxa com que acontece dito fenômeno (HEIDTMANN et al., 2012).

O modelo de Arrhenius foi utilizado para representar a variação da atividade enzimática em função das constantes cinéticas de inativação enzimática (K_d) a 50, 60, 10 e 80 °C mediante uma regressão não linear (Apêndices L, M e N). Os parâmetros

termodinâmicos da pectinase livre e imobilizada estimados a partir do estudo de estabilidade térmica estão registrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros termodinâmicos da inativação térmica da pectinase livre e imobilizada em ERPU.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	E_d (kJ mol ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
Pectinase Líquida					
50	323,15	83,55	108,43	80,86	-0,085
60	333,15		107,70	80,78	-0,081
70	343,15		108,62	80,69	-0,081
80	353,15		108,75	80,61	-0,080
Pectinase liofilizada					
50	323,15	88,61	112,64	85,93	-0,083
60	333,15		114,09	85,84	-0,085
70	343,15		115,68	85,76	-0,087
80	353,15		111,53	85,63	-0,073
Pectinase Imobilizada					
50	323,15	91,63	118,80	88,95	-0,092
60	333,15		121,01	88,86	-0,096
70	343,15		122,75	88,78	-0,099
80	353,15		123,22	88,70	-0,098

O maior valor de energia de desativação (E_d) da pectinase imobilizada em ERPU (91,63 kJ mol⁻¹) comparada com a enzima livre (pectinase liofilizada, 88,61 kJ mol⁻¹; pectinase líquida, 83,55 kJ mol⁻¹), indicou que a pectinase imobilizada requer uma maior quantidade de energia antes de ocorrer o desdobramento da proteína e iniciar o processo de inativação térmica (DANG-THUAN e JO-SHU, 2014).

Os parâmetros termodinâmicos de energia livre de Gibbs (ΔG°), entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°) do processo de inativação, confirmaram que a pectinase é mais estável termicamente após a imobilização. Os valores positivos de ΔG° para todos os derivados enzimáticos estudados mostraram que o processo de inativação térmica da pectinase é termodinamicamente não espontâneo (TAVARES et al., 2015). Além disso, os maiores valores de ΔG° (> 118 kJ mol⁻¹) registrados para a pectinase imobilizada demonstraram que o estado assumido pela enzima imobilizada, após o tratamento térmico, tem maior energia disponível e a conformação estrutural original permaneceu mais ativa em comparação com a enzima livre.

O desdobramento da estrutura proteica é acompanhado do rompimento das ligações não covalentes, gerando um sistema desorganizado com aumento na entropia e diminuição da energia livre de Gibbs, o que torna mais factível o processo de desnaturação enzimática (PERVEEN et al., 2006). Consequentemente, uma enzima com um estado energético maior e menor desordem, conserva mais eficientemente sua estrutura original e, portanto, é menos susceptível à inativação enzimática causada pelo tratamento térmico (AGUIAR-OLIVEIRA e MAUGERI, 2011).

Os parâmetros ΔH° e ΔS° fornecem o número de ligações não covalentes quebradas e a grau da desordem da estrutura enzimática associada com a formação do estado de transição, respectivamente (SANT'ANNA et al., 2012; ORTEGA et al., 2004b). Em termos de estabilidade enzimática existe uma relação entre os valores de ΔH° e ΔS° , portanto, altos valores de ΔH° e baixos ΔS° mostram um aumento na estabilidade da enzima (OLUSESAN et al., 2011). Como pode ser visto na Tabela 10, com o aumento da temperatura houve uma tendência de queda nos valores de ΔH° dos derivados enzimáticos. No entanto, observa-se que os valores de ΔH° da pectinase imobilizada foram maiores em comparação com a pectinase líquida e liofilizada. Assim, por exemplo, a 70 ° C, o valor de ΔH° da pectinase imobilizada (88,78 kJ mol⁻¹) foi maior do que para a pectinase liofilizada (85,76 kJ mol⁻¹) utilizada durante a imobilização.

Os valores de entalpia representam uma medida da barreira energética que deve ser superada pelas moléculas para começarem a reagir. Deste modo, corrobora-se a estabilização da pectinase após a imobilização, uma vez que a enzima imobilizada precisa mais energia para o alongamento, a compressão ou a quebra da ligação química para alcançar o estado de transição da forma nativa ao estado desnaturado (YAN et al., 2010).

Valores de E_d e ΔH° superiores e positivos da pectinase imobilizada em comparação com a pectinase livre podem ser atribuídos a uma maior resistência à desnaturação térmica e, portanto, à termoestabilização da enzima imobilizada (SOUZA et al., 2015). Esse fenômeno também foi corroborado com os valores de ΔS° da pectinase imobilizada, os quais foram menores que os da enzima livre, o que sugere que a conformação estrutural do derivado imobilizado foi alterada na direção do estado de transição parcialmente desdobrado (mais ordenada que a enzima livre) com maior estabilidade enzimática (SALEEM et al., 2005; ABDEL-NABY et al., 2015).

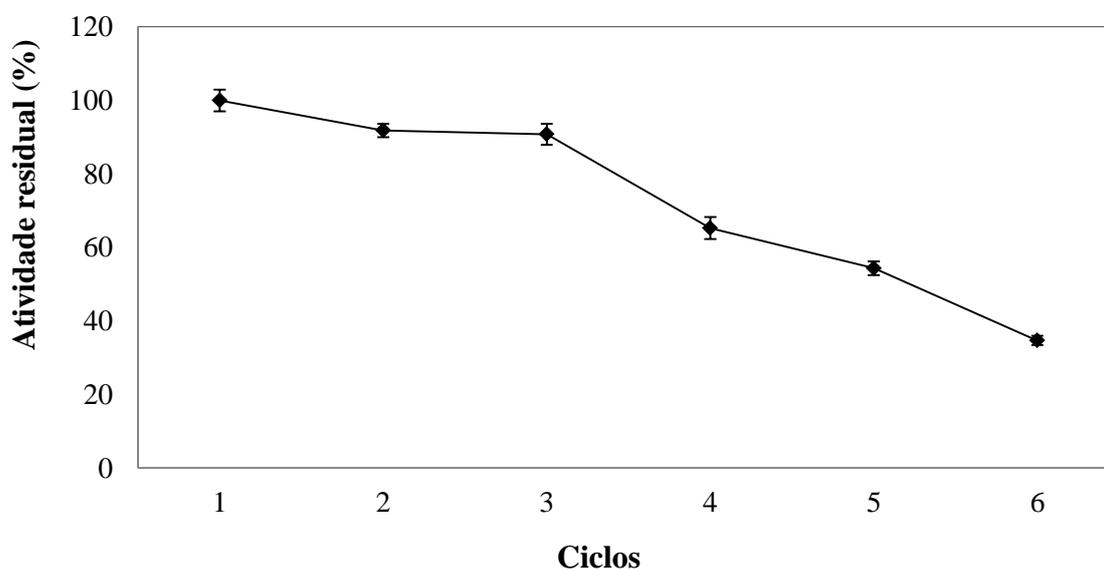
Os resultados fornecem provas convincentes de que a pectinase imobilizada na ERPU é termicamente mais estável do que a pectinase livre. Isto pode ser devido a alterações conformacionais da enzima imobilizada a altas temperaturas, a qual aparentemente foi

alterada para um estado de transição parcialmente desdobrado. Estes resultados sugerem que o suporte de poliuretano protege a pectinase contra a inativação térmica e aumenta a sua estabilidade térmica.

5.7 Estabilidade operacional

A capacidade de reutilização é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a viabilidade econômica e a aplicação industrial dos biocatalisadores imobilizados, pois melhoras no desempenho operacional permite que o uso das enzimas imobilizadas seja mais vantajoso a forma solúvel. A análise da estabilidade operacional da pectinase imobilizada em ERPU foi testada pelo reuso em batelada, na reação de hidrólise do substrato pectina cítrica, usando uma quantidade definida de enzima imobilizada. Para cada ciclo de 6 minutos, a atividade enzimática foi determinada nas condições ótimas de reação (pH 4,5 e 55 °C). Os resultados desta etapa estão representados na Figura 14.

Figura 14 - Estabilidade operacional da pectinase imobilizada em reações em batelada.



Fonte: O autor (2017)

Dos resultados, observou-se que a pectinase imobilizada em ERPU pode ser facilmente recuperada do meio reacional e reutilizada, consecutivamente, durante seis ciclos catalíticos, conservando 35 % da atividade inicial. O decréscimo na atividade ao longo dos ciclos pode ser explicado pela desnaturação e/ou à lixiviação da enzima do suporte devido ao uso repetido do biocatalisador. Estudos sobre a reutilização de pectinases são pouco

encontrados na literatura, apesar da relevância industrial que têm esses biocatalisadores. A reutilização dos derivados depende, dentre outros fatores, do suporte e da técnica empregados durante a imobilização. A técnica de imobilização e o suporte usado neste estudo mostraram-se promissores para a aplicação industrial da pectinase.

Outros autores reportaram valores de manutenção da capacidade catalítica das pectinases imobilizadas no decorrer dos reúsos. Rehman et al. (2013) reportaram que a pectinase imobilizada em alginato de cálcio mantém 9% da atividade inicial após sete ciclos. Wang et al. (2013) reportaram que a pectinase imobilizada em microesferas magnéticas de amido de milho retém 60 % da atividade inicial após oito ciclos catalíticos. Buga et al. (2010) estudaram o reuso 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 para o meio reacional.

5.8 Aplicação da pectinase livre e imobilizada na clarificação de suco de goiaba

Foi avaliada a aplicação da pectinase imobilizada no tratamento enzimático do suco de goiaba e seu desempenho foi comparado com o obtido pela pectinase livre. Com esse fim, foi usado um delineamento composto central rotacional (DCCR 2³), no qual se estudaram os efeitos das variáveis temperatura (T; 23 a 57 °C), tempo (t; 10 a 110 minutos) e unidade de atividade (U; 7 a 23 U) sobre a porcentagem de clarificação (PC), a redução de turbidez (RT) e a viscosidade (μ) do suco de goiaba. Os resultados dos experimentos utilizando a pectinase líquida e imobilizada estão listados na Tabela 11, a qual corresponde à matriz do planejamento experimental com os valores codificados das variáveis de estudo e as resposta da pectinase livre e imobilizada.

A análise estatística apresentada na continuação é referente somente aos resultados obtidos do tratamento enzimático do suco de goiaba utilizando-se a pectinase líquida.

5.8.1 Clarificação

De acordo com a Tabela 11, os percentuais de clarificação obtidos estiveram na faixa de 64,04 a 96,04 %, obtendo-se a melhor clarificação (96,04 %) no ensaio 14, cujas variáveis foram: temperatura de 40 °C, 60 minutos e atividade enzimática oferecida de 23 U.

Tabela 11 - Matriz do planejamento experimental com os valores codificados e as respostas: PC (%), RT (%) e ρ (%) do suco de goiaba tratado com a pectinase Rohapect® DA6L na forma líquida e imobilizada em ERPU.

Ensaio	T (°C)	t (min)	[E] (U)	Pectinase líquida			Pectinase imobilizada		
				PC (%)	RT (%)	μ (%)	PC (%)	RT (%)	ρ (%)
1	-1(30)	-1(30)	-1(10)	64,04	64,01	52,74	55,18	57,74	52,97
2	+1(50)	-1(30)	-1(10)	87,58	88,16	54,74	51,17	53,73	51,98
3	-1(30)	+1(90)	-1(10)	90,83	93,30	53,29	58,61	24,43	51,33
4	+1(50)	+1(90)	-1(10)	90,30	91,27	55,74	51,61	54,50	53,27
5	-1(30)	-1(30)	+1(20)	85,87	85,79	53,21	49,99	53,73	56,63
6	+1(50)	-1(30)	+1(20)	93,13	94,11	55,25	37,40	40,38	51,98
7	-1(30)	+1(90)	+1(20)	94,69	95,60	53,73	47,44	16,53	51,98
8	+1(50)	+1(90)	+1(20)	95,59	96,96	54,52	52,73	57,10	50,94
9	-1,68(23)	0(60)	0(15)	87,70	94,93	52,82	56,80	59,43	54,18
10	+1,68(57)	0(60)	0(15)	92,72	93,64	54,33	47,89	37,65	52,75
11	0(40)	-1,68(10)	0(15)	71,80	70,43	53,92	35,35	47,76	52,62
12	0(40)	+1,68(110)	0(15)	94,86	96,14	54,50	43,92	66,30	52,49
13	0(40)	0(60)	-1,68(7)	69,90	91,54	53,82	63,17	49,06	52,37
14	0(40)	0(60)	+1,68(23)	96,04	97,56	54,97	45,24	45,69	51,33
15	0(40)	0(60)	0(15)	94,11	94,86	54,88	42,11	34,41	51,33
16	0(40)	0(60)	0(15)	93,66	95,67	54,83	60,18	38,82	52,88
17	0(40)	0(60)	0(15)	94,02	94,72	54,83	36,03	37,91	51,72

A análise dos efeitos de forma isolada, após a exclusão dos que não foram significativos no processo, revelou que as variáveis que exerceram efeitos significativos positivos sobre a resposta foram a temperatura (L), o tempo (L) e as unidades de atividade (L), o que indica que seus aumentos proporcionam uma melhor clarificação do suco de goiaba. Porém, efeitos negativos foram observados para o tempo (Q), as unidades de atividade (Q) e a interação tempo e temperatura (Apêndice O).

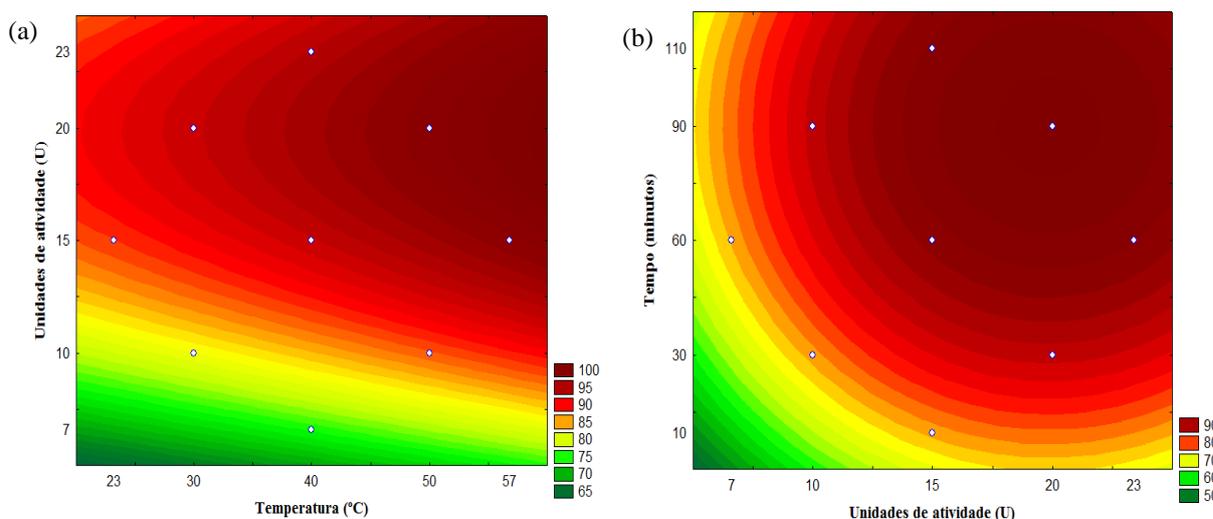
A equação (25) apresenta o modelo matemático empírico gerado para a clarificação do suco de goiaba usando a pectinase líquida, o qual foi validado pela análise de variância ($p < 0,05$), com um coeficiente de correlação de 0,93 e valor de F calculado 3,5 maior que o tabelado (Apêndice P).

$$PC (\%) = 92,85 + 2,90 X_1 + 5,83 X_2 - 2,93 X_2^2 + 5,9 X_3 - 3,06 X_3^2 - 4,14 X_1 \cdot X_2 \quad (25)$$

Onde: PC é a porcentagem de clarificação do suco de goiaba (%), X_1 , X_2 e X_3 correspondem à temperatura (°C), o tempo (minutos) e a unidade de atividade (U), respectivamente.

A validação do modelo confirmou sua adequação para a descrição da clarificação em função do tempo, as unidades de atividade e a temperatura na faixa avaliada. As curvas de contorno expostas na Figura 15 mostram a dependência da clarificação do suco de goiaba com relação às unidades de atividade e a temperatura (a) e as unidades de atividade e o tempo (b), respectivamente.

Figura 15 - Curvas de contorno para a PC (%) do suco de goiaba obtida em função da temperatura e as unidades de atividade (a) e o tempo e as unidades de atividade (b).



Fonte: O autor (2017)

Na Figura 15 (a), constatou-se um efeito linear positivo das variáveis; unidades de atividade e temperatura sobre a resposta, ou seja, observa-se que houve incrementos no percentual de clarificação do suco de goiaba na medida em que a temperatura e unidades de atividade aumentaram, obtendo-se a melhor clarificação na faixa de temperatura de 50 a 57 °C e de enzima de 15 a 23 U, mantendo-se o tempo constante. A velocidade das reações enzimáticas incrementa conforme há acréscimos na temperatura do meio reacional, desde que a temperatura se mantenha inferior à temperatura de desnaturação (LEE et al., 2006), conseqüentemente, neste caso, obteve-se um suco de goiaba mais clarificado com o incremento da temperatura.

Um comportamento similar foi observado quando houve aumentos nas unidades de atividade fornecidas e no tempo do tratamento enzimático (Figura 15 b). Nesse caso, foi constatado que o efeito linear positivo das unidades de atividade sobre a clarificação é maior ao observado em relação ao tempo do tratamento, obtendo-se um suco mais clarificado com o incremento nessa variável. Segundo Dey et al. (2014) essa tendência pode ser atribuída à degradação das moléculas insolúveis de pectina em ácido galacturônico solúvel pela ação das

pectinases, em especial da PG, que permite a formação de aglomerados de proteína e pectina, facilitando assim, após a remoção por filtração ou centrifugação dessas partes coloidais, a produção de um sobrenadante límpido (suco clarificado). De forma geral, a temperatura constante, o tempo requerido para o processo de clarificação será menor se forem aumentadas às unidades de enzima empregada (RAI et al., 2004).

Os valores ótimos das variáveis independentes foram calculados igualando a zero a primeira derivada do modelo de porcentagem de clarificação (Equação 25) como uma função da temperatura, o tempo e as unidades de atividade. A máxima porcentagem de clarificação estimada foi de 98,30 %, nos níveis +0,41, +0,70 e +0,96 de temperatura, tempo e unidade de atividade (U), correspondentes a 47,14 °C, 85 minutos e 22,68 U. Esses valores ótimos encontram-se dentro das faixas de maximização da resposta determinadas a partir dos dados experimentais para as variáveis de estudo.

5.8.2 Redução da Turbidez

A turbidez dos sucos de frutas é devida à existência de compostos como a hemicelulose, amido, pectina e celulose. Portanto, sua degradação por enzimas apropriadas promove a clarificação, melhora a qualidade e o tempo de armazenamento (SHAHRESTANI et al., 2016).

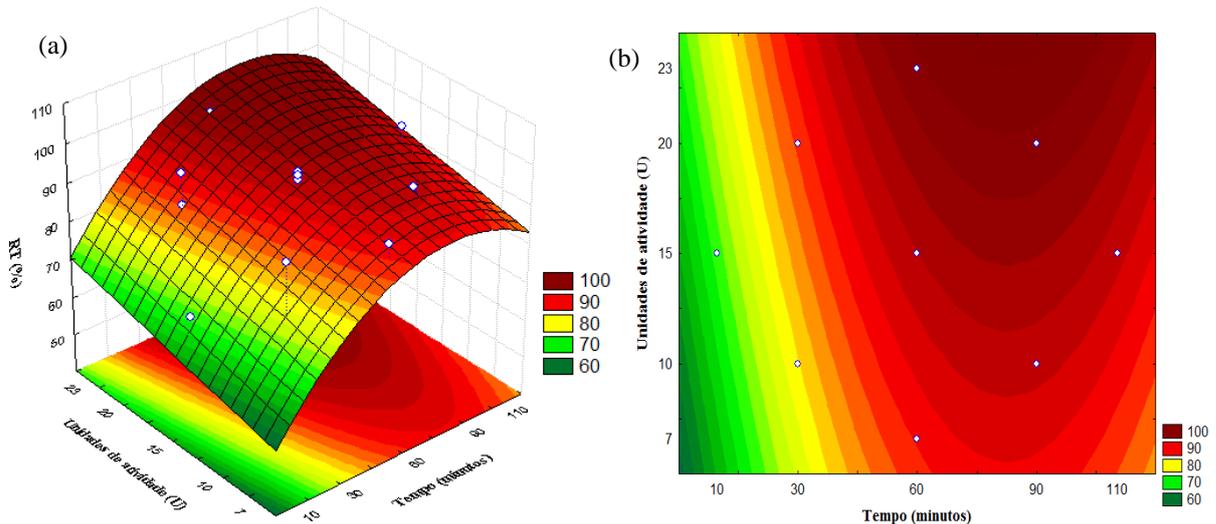
Mediante a análise dos efeitos (Apêndice Q) comprovou-se que a turbidez diminuiu quando o tempo e as unidades de atividade enzimática foram aumentados (efeitos lineares positivos). Porém, sendo a pectina a principal causa da turbidez nos sucos de frutas, esperava-se que com o aumento das unidades de atividade enzimática e, portanto, de uma maior hidrólise da pectina, houvesse uma relação inversamente proporcional entre o tempo necessário para atingir a máxima redução da turbidez e as unidades de atividades enzimáticas fornecidas durante o tratamento enzimático.

O modelo gerado (Equação 26) a partir dos coeficientes de regressão (Apêndice Q) foi validado pela análise de variância (Apêndice R). Isto permitiu a construção da superfície de resposta e a curva de contorno apresentadas na Figura 16 (a e b), respectivamente, as quais correspondem à redução da turbidez do suco de goiaba em função das unidades de atividade e o tempo do tratamento enzimático.

$$RT(\%) = 93,95 + 6,47 X_2 - 4,28 X_2^2 + 3,36 X_3 - 4,14 X_1 \cdot X_2 \quad (26)$$

Onde: RT é a porcentagem de redução da turbidez (%), X_2 e X_3 correspondem ao tempo (minutos) e a concentração de enzima (U), respectivamente.

Figura 16 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a RT (%) do suco de goiaba em função do tempo e as unidades de atividade da pectinase líquida.



Fonte: O autor (2017)

Da análise da Figura 16, verificou-se que a redução da turbidez do suco de goiaba foi devida, principalmente, ao tempo de tratamento enzimático, independentemente da temperatura utilizada. Também foi constatado que existe uma relação entre a redução da turbidez e a porcentagem de clarificação do suco de goiaba. Assim, quanto mais clarificado o suco, maior é a redução da turbidez. Um comportamento semelhante foi reportado por Sandri et al. (2014) quando empregaram pectinases para a clarificação do suco de araçá.

5.8.3 Viscosidade

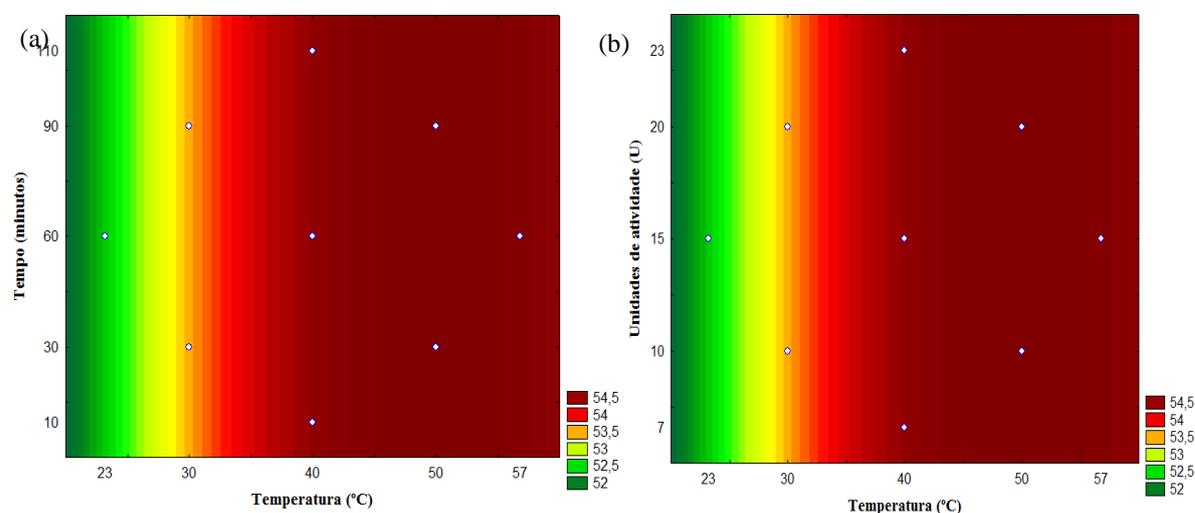
A porcentagem de redução da viscosidade dos sucos tratados foi determinada e os resultados estão apresentados na Tabela 11. Constatou-se que não existe uma variação considerável entre os valores de viscosidade dos ensaios do planejamento, onde, em todos os casos, a redução foi maior que 50%. A análise dos efeitos mostrou que somente a temperatura foi significativa no processo, sendo positivo o efeito linear e negativo o quadrático (Apêndice S). A equação (27) traz o modelo matemático empírico gerado a partir dos coeficientes de correlação, validado pela análise de variância com um F calculado (17,36) maior que o tabelado (3,73) e um coeficiente de correlação de 0,84 (Apêndice T). As curvas

de contorno para a redução da viscosidade do suco de goiaba em função da temperatura são mostradas na Figura 17.

$$\mu = 54,52 + 0,71X_1 - 0,34X_1^2 \quad (27)$$

Onde: μ é a porcentagem de redução da viscosidade (%), X_1 corresponde à temperatura (°C).

Figura 17 - Curvas de contorno para a redução da viscosidade (%) do suco de goiaba em função do tempo e temperatura (a) e a unidades de atividade e a temperatura (b), usando a pectinase líquida.



Fonte: O autor (2017)

Da Figura 17 (a e b) pode ser observado que com o aumento da temperatura têm-se melhores valores na redução da viscosidade do suco de goiaba tratado com a pectinase comercial na forma líquida. Este resultado era esperado, já que conforme comentado anteriormente, a temperatura aumenta a velocidade de reação, obtendo-se maior hidrólise da pectina com incrementos nessa variável. Após o tratamento com enzima, a degradação de pectina conduz a uma redução da capacidade de retenção de água, liberando a água livre para o sistema, reduzindo assim a viscosidade do suco (LEE et al., 2006).

5.8.4 Tratamento enzimático com a pectinase imobilizada

Após a análise estatística dos resultados do planejamento correspondentes à utilização da enzima imobilizada (Tabela 11), verificou-se que nenhuma das variáveis independentes

apresentou efeito significativo a 95 % de confiança sobre a porcentagem de clarificação e a redução de viscosidade.

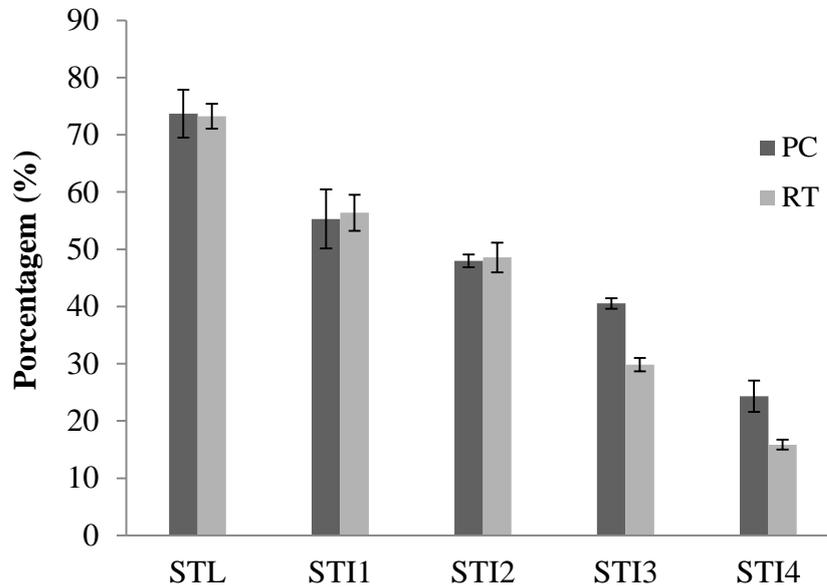
Com o intuito de dar uma explicação a essa tendência, posteriormente ao planejamento, foram realizados estudos para avaliar a influência da matriz do poliuretano (sem enzima) sobre a clarificação e redução da turbidez do suco de goiaba. Foi comprovado que a matriz de PU atua como um filtro, retendo parte do material em suspensão contido no suco de goiaba. Conseqüentemente, durante o planejamento realizado, o desempenho da enzima imobilizada foi mascarado pela matriz de PU e nenhum efeito significativo foi observado. Sendo assim, determinou-se que os ensaios de clarificação fossem conduzidos com o suco de goiaba previamente filtrado pela matriz do PU.

Apesar da utilização do suco filtrado para a realização de um novo planejamento, novamente foi constatado que nenhuma variável foi significativa no processo de clarificação. Esse comportamento foi atribuído às poucas unidades de atividade pectinolíticas (7 a 23 U) utilizada durante os ensaios, que no caso da pectinase imobilizada não exerceram o mesmo efeito observado sobre a clarificação e redução da turbidez do suco de goiaba quando empregada a pectinase livre.

Ao ser o suco de goiaba uma matriz vegetal complexa, com muitos sólidos suspensos, provavelmente no tratamento enzimático com a pectinase imobilizada houve problemas de transferência de massa através da matriz de poliuretano que afetaram a eficiência do biocatalisador na hidrólise das substâncias pécicas do suco. Contudo, para comparar o desempenho da enzima imobilizada com a livre e avaliar a eficiência dos reúsos, foram realizados ensaios nas melhores condições (40 °C, 60 minutos e 23 U) encontradas para o tratamento enzimático do suco com a pectinase livre. Além disso, foi considerado como o controle do processo o suco sem tratamento, após a filtragem com o PU. A Figura 18 traz os resultados da avaliação do desempenho da enzima imobilizada na ERPU durante o tratamento enzimático do suco de goiaba.

Os resultados demonstraram que a enzima livre foi mais eficiente para clarificar (73,67 %) e reduzir a turbidez (73,25 %) do suco de goiaba se comparada com o derivado imobilizado no primeiro ciclo de reação, no qual, obtiveram-se menores percentuais de clarificação (55,31 %) e turbidez (56,38 %).

Figura 18 - Tratamento enzimático do suco de goiaba usando a pectinase líquida e imobilizada em ERPU. Porcentagem de clarificação (PC), redução da turbidez (RT), suco sem tratamento previamente filtrado (SST), suco tratado com a pectinase líquida (STL) e sucos tratados reutilizado a enzima imobilizada no ciclo 1, 2, 3 e 4 (STI1, STI2, STI3 e STI4).



Fonte: O autor (2017)

Com o propósito de avaliar a reutilização da pectinase imobilizada durante o tratamento enzimático do suco de goiaba, o derivado imobilizado utilizado no ciclo 1 foi reusado em uma nova amostra de suco filtrado. Como mostrado na Figura 19, no segundo ciclo de aplicação foi possível obter 48 % e 49 % de porcentagem de clarificação e redução turbidez, respectivamente. O derivado imobilizado foi usado consecutivamente por quatro ciclos catalíticos, obtendo-se no ultimo ciclo 24,3 % de clarificação e 16% de redução da turbidez.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a imobilização da pectinase comercial Rohapect® DA6L em ERPU. Com esse intuito, primeiramente, fez-se uma caracterização da pectinase quanto a seu perfil enzimático e proteico, a qual forneceu informações a respeito das frações enzimáticas que compõem o preparado comercial, determinando-se que esse possui maior atividade de PG em comparação com outras enzimas avaliadas e uma massa molecular que varia de 30 a 120 kDa.

A pectinase comercial foi imobilizada *in situ* em ERPU mediante um método simples e de baixo custo. A melhor condição experimental para a imobilização foi 0,2 g de pectinase liofilizada em uma proporção 3:2 dos monômeros poliol e isocianato, respectivamente. Sob essas condições o rendimento de imobilização foi de aproximadamente 178 %.

Comprovou-se que a imobilização aumenta a temperatura e o pH ótimo de reação para a maximização da atividade pectinolítica da pectinase comercial. Do mesmo modo, foi verificada a biocompatibilidade da ERPU com a pectinase utilizada neste estudo, obtendo-se, em comparação com a pectinase livre, incrementos na estabilidade térmica e de armazenamento a 4 °C, como resultado do microambiente criado no suporte que protegeu a enzima do ambiente exterior e da desnaturação pelo efeito do calor.

A modelagem da cinética de inativação térmica da pectinase livre (líquida e liofilizada) e imobilizada em ERPU demonstrou que a inativação dos derivados segue uma cinética de primeira ordem. Constatou-se que a pectinase livre é muito mais rapidamente inativada que a imobilizada em ERPU, o que confirma o aumento da capacidade do derivado imobilizado de resistir o desdobramento da estrutura proteica em altas temperaturas.

Os parâmetros cinéticos de inativação térmica (K_d , $t_{1/2}$, D e Z) confirmaram o aumento da termoestabilidade da pectinase após a imobilização. Esse fenômeno foi corroborado pela caracterização termodinâmica dos derivados enzimáticos, cujos resultados mostraram que durante o tratamento térmico, em todas as temperaturas avaliadas, a pectinase imobilizada manteve sua conformação estrutural original mais ativa se comparada com a sua forma livre (líquida e liofilizada), demonstrando o aumento da estabilidade térmica e a superioridade no desempenho da enzima imobilizada.

A pectinase imobilizada apresentou melhoras no desempenho operacional, exibindo boa recuperação e reutilização. O derivado imobilizado foi usado consecutivamente por quatro ciclos reacionais durante a hidrólise de pectina cítrica e na clarificação e redução da turbidez do suco de goiaba.

Em geral, a proposta de imobilização da pectinase comercial na ERPU, mostrou-se promissora para a obtenção de um derivado imobilizado com alta potencialidade para ser utilizado industrialmente e para a concepção de biorreatores. Além disso, os resultados obtidos podem ser uma base de referência para pesquisas posteriores que visem à otimização, assim como o *scale up* do processo de imobilização e sua posterior aplicação.

6.1 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo como base os resultados do presente estudo, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- a) como etapa complementar a este trabalho, sugere-se avaliar a aplicação do derivado enzimático desenvolvido em outras reações de interesse para a indústria;
- b) com o intuito de minimizar a lixiviação da pectinase do suporte apresentado e assim melhorar seu desempenho operacional, sugere-se estudar a imobilização da pectinase via ligação covalente na ERPU funcionalizada com glutaraldeído e/ou corantes orgânicos;
- c) avaliar a aplicação da pectinase imobilizada na ERPU biorreatores operados em modo contínuo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NABY, M. et al. Catalytic and thermodynamic properties of immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* cyclodextrin glucosyltransferase on different carriers, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 140–147, 2015.

ABDELMAJEED, N. et al. Immobilization technology for enhancing bio-products industry, **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13528-13539, 2012.

AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Effects of Lyophilization on the Catalytic Properties of Extracellular Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Research Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 96-111, 2012.

AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 363-372, 2011.

ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review, **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.

AMIN, B. et al. Improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 974–984, 2017.

ANDRADE, M. et al. 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.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 53, de 07 de outubro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 de outubro de 2014. N° 194.

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

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. **Immobilization of Enzymes: A Literature Survey**. In: GUISAN, J.M. Immobilization of Enzymes and Cells. Third Edition. United State: Humana Press, 2013.

BAHRAMI, A.; HEJAZI, P. Electrostatic immobilization of pectinase on negatively charged AOT-Fe₃O₄ nanoparticles, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 1–7, 2013.

BAILEY, M.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 257–270, 1992.

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

BASU, S. et al. Thermodynamic characterization of a highly thermoactive extracellular pectate lyase from a new isolate *Bacillus pumilus* DKS1, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8088–8094, 2008.

BERNARDINI, J. et al. Flexible polyurethane foams green production employing lignin or oxypropylated lignin, **European Polymer Journal**, v. 64, p. 147–156, 2015.

BIZ, A. **Produção de pectinases por fermentação no estado sólido para a obtenção de ácido D-galacturônico em biorrefinarias**. 2012. Dissertação (Mestrado Ciências Bioquímicas) - Universidade Federal de Paraná, Brasil, 2012.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRANCO, R. et al. Immobilization and Characterization of a Recombinant Thermostable Lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on Supports with Different Degrees of Hydrophobicity, **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

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

BUSTAMANTE-VARGAS, C. et al. Synthesis of a hybrid polymer-inorganic biomimetic support incorporating in situ pectinase from *Aspergillus niger* ATCC 9642, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1569–1577, 2015.

CADENA, P. et al. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1595–1602, 2010.

CADENA, P. et al. Kinetics and bioreactor studies of immobilized invertase on polyurethane rigid adhesive foam, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 513–518, 2011.

CARDOSO, C.; DE MORAES, M.; CASS, Q. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas, **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

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

CHATTERJEE, S. et al. Clarification of fruit juice with chitosan. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2229-2232, 2004.

CHAUDHRI, A.; SUNEETHA, V. Microbially Derived Pectinases: A Review, **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1-5, 2012.

CHEN. C.; WU, M. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinestrases in citrus juices, **Journal of Food Science**, v. 63, p. 747–750, 1998.

COMBO, A. et al. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations, **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 588-596, 2012.

CONTRERAS, J. **Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus Kwachii***, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Exatas) – Universidad Nacional de la Plata, Argentina, 2003.

DANG-THUAN. T.; JO-SHU, C. Kinetics of enzymatic transesterification and thermal inactivation using immobilized *Burkholderia lipase* as catalyst, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 481–491, 2014.

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

DE CASTRO, S. et al. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 199–207, 2015.

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.

DELICHEVA, G. et al. Immobilization of *Aspergillus niger* pectinase on Polyacrylonitrile Copolymer Membrane, **Trends in Applied Sciences Research**, v. 2, n. 5, p. 419–425, 2007.

DEMIR, N. et al. The use of commercial pectinase in fruit juice industry, Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment, **Journal of Food Engineering**, v. 47, n. 4, p. 275–280, 2001.

DEY, T. et al. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 591-595, 2014.

DINU, D. et al. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16, **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 128–137, 2007.

EŞ, I.; VIEIRA, G.; AMARAL, C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2065–2082, 2015.

ESAWY, M. et al. Evaluation of free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase applicable in industrial processes, **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1463– 1469, 2013.

FACHIN. D. et al. Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 135–142, 2003.

FAJARDO-OCHOA, R. et al. Inmovilización de células y enzimas, **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 3, n. 6, p. 42-56, 2011.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 185-197, 1998.

FRITZEN-GARCIA, M. et al. Characterization of horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 182, p. 264–272, 2013.

FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes, **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 263–271, 1996.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial, **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOMES, F. et al. 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.

GORDON, R. et al. Organophosphate skin decontamination using immobilized enzymes, **Chemico-Biological Interactions**, v. 119, n. 120, p. 463–470, 1999.

GHOSE, T. Measurement of Cellulase Activities, **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

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

HEIDTMANN, R. et al. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio, **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012.

HENLEY, J.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivation using a series-type mechanism, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 2, p. 50–60, 1985.

HOONDAL, G. et al. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409-418, 2002.

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

JAYANI, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review, **Process Biochemistry**, 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.

KANT, S.; VOHRA, A.; GUPTA, R. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. **Protein Expression and Purification**, v. 87, p. 11–16, 2013.

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

KHATRI, B. et al. Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal, **SpringerPlus**, v.4, p. 488–496, 2015.

KLOBITZ, M. **Bioquímica de Alimentos - Teoria e Aplicações Práticas**, Primeira edição, Brasil: Editorial Guanabara Koogan. 2008.

KOHLI, P.; KALIA, M.; GUPTA, R. Pectin Methylsterases: A Review, **Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 5, p. 1–7, 2015.

KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, **Food Microbiology**, v. 21, p. 377–397, 2004.

KUIVANEN, J. et al. Conversion of orange peel to L-galactonic acid in a consolidated process using engineered strains of *Aspergillus niger*, **AMB Express**, v. 4, n. 33, p.1–8, 2014.

KUMAR, R. et al. Entrapment of α -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2282–2288, 2006.

LABUS, K.; BRYJAK, J.; POLAKOVIC, M. Kinetics of thermal inactivation of immobilized *Agaricus bisporus* tyrosinase, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 136–140, 2015.

LADERO, M. et al. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: comparison to the free enzyme, **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, p. 14–24, 2006.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v. 227, p. 680–85, 1970.

LEE, W. et al. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM), **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 55–63, 2006.

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.

LEI, M. et al. Preparation and characterization of hollow magnetic composite nanoparticles for immobilized pectinase, **Surface & Coatings Technology**, v. 271 p. 2–7, 2015.

LEI, Z.; JIANG, Q. Synthesis and Properties of Immobilized Pectinase onto the Macroporous Polyacrylamide Microspheres, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2592–2599, 2011.

LI, T. et al. Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support, **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p.1413-1416, 2007.

LIU, Y. et al. Immobilisation of acid pectinase on graphene oxide nanosheets, **Chemical Papers**, v. 68, n. 6, p. 732–738, 2014.

MALHEIROS, P. et al. Kinetic modeling of thermal inactivation of antimicrobial peptides produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, **Thermochimica Acta**, v. 605, p. 95–99, 2015.

MARTIN, N. et al. 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.

MARTÍNEZ, M. **Estudio cinético de la producción secuenciada de pectinasas en *Aspergillus flavipes* FP-500**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência em Bioprocessos) - Instituto Politécnico Nacional – México, México D.F., 2009.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

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

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

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

NYARI, N. **Estudo da imobilização de lipase de *Candida antarctica* b em poliuretano**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI Erechim, Brasil, 2013.

NICOLETTI, G. **Imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranyl propionato**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2014.

NICOLETTI, G. et al. Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 9, p. 1739-1748, 2015.

ORTEGA, N. et al. Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarifications, **Food Chemistry**, v. 88, p. 209–217, 2004a.

ORTEGA, N. et al. Kinetic behavior and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing, **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 631–639, 2004b.

OLUSESAN. A. et al. Purification. characterization and thermal inactivation kinetics of a non-regioselective thermostable lipase from a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8, **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 738-745, 2011.

OUATTARA, H. et al. 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.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PASHA, K.; ANURADHA, P.; SUBBARAO, D. Applications of Pectinases in Industrial Sector, **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology**, v. 16, n. 1, p. 89-95, 2013.

PEDROLI, D. et al. Pectin and pectinases: Production. characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes, **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, p. 9–18, 2009.

PERVEEN. R. et al. Kinetic and Thermodynamic Properties of an Immobilized Glucoamylase from a Mesophilic Fungus, *Arachniotus citrinus*, **Protein & Peptide Letters**, v. 13, p. 665-671, 2006.

PINELO, M.; ZEUNER, B.; MEYER, A. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity, **Food and Bioproducts Processing**, v. 8, n. 8, p. 259–265, 2010.

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

PRAMOD, T.; LINGAPPA, K. Immobilization of *Aspergillus niger* in polyurethane foam for citric acid production from carob pod extract, **American Journal of Food Technology**, v,3, n. 4, p. 252–256, 2008.

POOJARI, Y.; CLARSON. S. Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 7–11, 2013.

RAI, P. et al. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology, **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 397–403, 2004.

RAMANKANNAN. A. et al. Preparation and Characterization of Pectinase bound Co-precipitated Magnetic Nanoparticles, **Asian Journal of Pharmacy and Technology**, v. 13, n. 4, p. 175-180, 2013.

RAMIREZ, H. et al. Immobilization of pectinase by adsorption on an alginate-coated chitin support, **Biotecnología Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 101-10, 2013.

REHMAN. H. et al. Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21, **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 819–824, 2015.

REHMAN. H. et al. 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.

REHMAN. H. et al. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support, **Carbohydrate Polymers**, v. 102, 622-626, 2014a.

REHMAN. H. et al. Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 on chitosan beads for continuous degradation of pectin polymers, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 282–287, 2014b.

RICHETTI, A. et al. 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.

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, (Tese de Doutorado) – Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

ROMASKEVIC, T. et al. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: A review, **Chemija**, v. 17, n. 4, p. 74–89, 2006.

RUDRA, S. et al. Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase in Coriander Leaves, **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 187–195, 2008.

SALEEM, M. et al. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachniotus citrinus*, **Process Biochemistry**, v. 40, p. 849–855, 2005.

SANDRI, I. et al. Application of enzymatic preparations to produce araçá pulp and juice, **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 657-662, 2014.

SANT'ANNA, V. et al. Kinetic modeling of thermal inactivation of the *Bacillus* sp. protease P7, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 993–998, 2013.

SANT'ANNA, V.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in milk, **Food Chemistry**, v. 130, p. 84–89, 2012.

SANTIN. C. et al. esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using *Candida Antarctica* B immobilized in polyurethane foam, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 90–94, 2014.

SANTIN, M. et al. Evaluation of enzymatic treatment of peach juice using response surface methodology, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 507-512, 2008.

SEENUVASAN, M. et al. Characterization, Analysis, and Application of Fabricated Fe₃O₄-Chitosan-Pectinase Nanobiocatalyst, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n. 5, p. 2706-2719, 2014.

SEENUVASAN, M. et al. Immobilization of pectinase on co-precipitated magnetic nanoparticles for enhanced stability and activity, **Research Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 24-30, 2013.

SHAHRESTANI, H. et al. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magneticnanoparticles, **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 51–58, 2006.

HALINI, G.; SHIVHARE, U.; BASU, S. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves, **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 147–153, 2008.

SHELDON, R. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance, **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289–1307, 2007.

SHUKLA, S. et al. 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. et al. Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry, In: VALDEZ, B. **Food Industrial Processes- Methods and Equipment**, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes-methods-and-equipment/microbial-pectic-enzymes-in-the-food-and-wine-industry>> Acesso em: 4 fev. 2016.

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

SILVA, M. et al. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam, **Food and Bioproducts Processing**, v. 9, p. 54-59, 2013.

SIROTEK, K. et al. Isolation and characterization of rabbit caecal pectinolytic bacteria, **Folia Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 79-825, 2001.

SOARES, M. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para a imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Brasil, 2012.

SOUZA, P. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.81, p. 17–21, 2015.

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

STOCK, D. **Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido**, 2013 – Dissertação (Mestrado Química) - Universidade Federal de Paraná, Brasil.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K. Biodiesel production with immobilized lipase: A review, **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628–634, 2010.

TAVARES, A. et al. Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 454, p. 52–60, 2015.

TALBERT, J.; GODDARD, J. Enzymes on material surfaces, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93 p. 8–19, 2012.

TEREFE, N. et al. The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. **Food Chemistry**, v. 117, p. 20–27, 2009.

TAPRE, A.; JAIN, R. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry, **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 447-453, 2014.

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

WANG, B. et al. Immobilization of pectinase from *Penicillium oxalicum* F67 onto magnetic cornstarch microspheres: Characterization and application in juice production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 137–143, 2013.

WU, R. et al. Immobilization of pectinase on polyethyleneimine-coated pulp fiber for treatment of whitewater from papermaking, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 163-168, 2014.

WU, R. et al. Immobilization of pectinase on oxidized pulp fiber and its application in whitewater treatment, **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 523– 529, 2013.

YAN, J. et al. Kinetic and thermodynamic parameters of β -glucosidase immobilized on various colloidal particles from a paddy soil, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 298–303, 2010.

ZHANG, L. et al. 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. et al. Biomimetic polymer–inorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation. **Reactive and Funcional Polymers**, v. 68, p. 1507–1515, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo DCCR 2² para atividade pectinolítica da pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma líquida.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(7)	p
Média	186,0854	10,14272	18,34670	0,000000
pH (L)	-40,4246	8,54111	-4,73294	0,002125
pH (Q)	-43,5933	9,74955	-4,47132	0,002896
Temperatura (L)	-22,5428	8,54111	-2,63932	0,033456

APÊNDICE B - Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo DCCR 2² para atividade pectinolítica da pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma liofilizada.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(7)	p
Média	433,238	27,49278	15,75824	0,000001
pH (L)	-113,146	23,15147	-4,88721	0,001779
pH (Q)	-98,066	26,42706	-3,71083	0,007547
Temperatura (L)	-63,970	23,15147	-2,76309	0,027971

APÊNDICE C - Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo DCCR 2² para atividade pectinolítica da pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma imobilizada em ERPU.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(6)	p
Média	25,82483	1,136602	22,7211	0,000000
pH (L)	-7,56492	0,697069	-10,8525	0,000036
pH (Q)	-6,97786	0,831785	-8,3890	0,000156
Temperatura (L)	-2,11266	0,697069	-3,0308	0,023075
Temperatura (Q)	-8,13453	0,831785	-9,7796	0,000066

APÊNDICE D - Análise de variância para atividade pectinolítica da pectinase comercial Rohapect® DA6L líquida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calculado}
Regressão	28720,72	3	9573,57	16,45
Resíduo	4073,08	7	581,87	
Total	32793,79	10		

R= 0,94; F_{tab,0,95; 3;7}= 4,35

APÊNDICE E - Análise de variância para atividade pectinolítica da pectinase comercial Rohapect® DA6L liofilizada.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	193621,54	3	64540,51	15,1
Resíduo	29926,18	7	4275,168	
Total	223547,72	10		

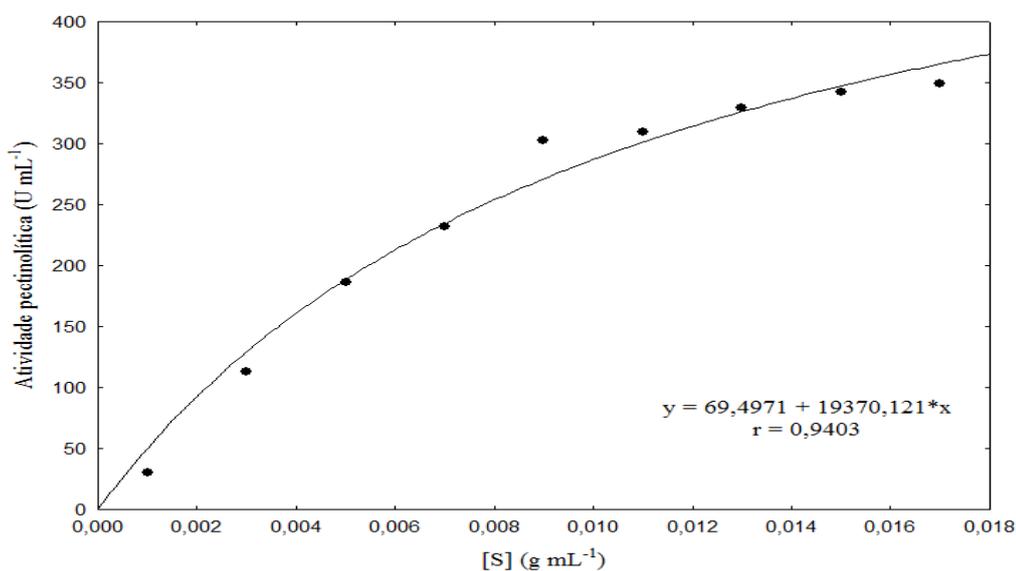
R= 0,93; F_{tab,0,95; 3;7}= 4,35

APÊNDICE F - Análise de variância para atividade pectinolítica da pectinase comercial Rohapect® DA6L imobilizada na ERPU.

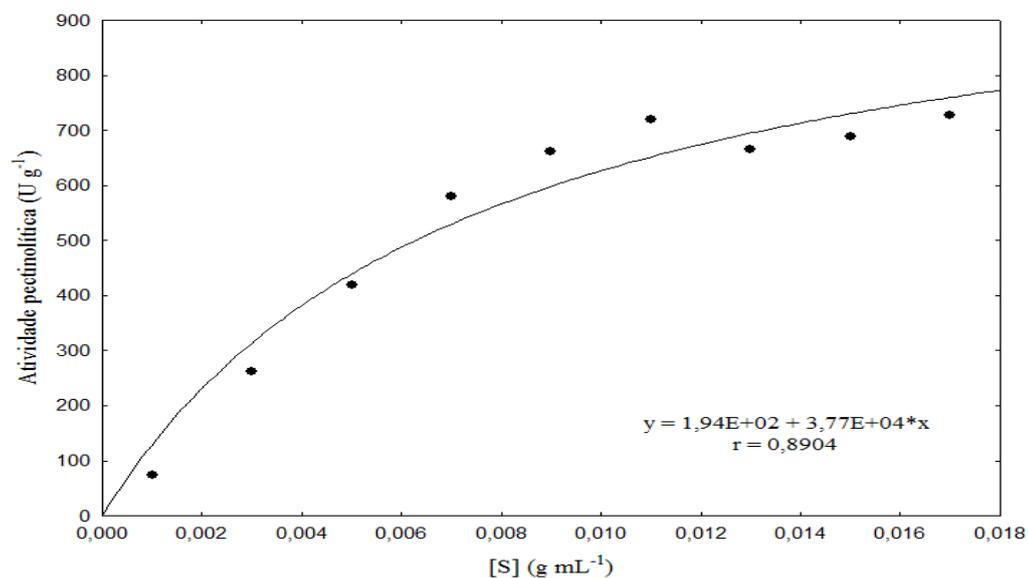
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	992,70	4	248,17	64,03
Resíduo	23,25	6	3,88	
Total	1015,95	10		

R= 0,93; F_{tab,0,95; 4;6}= 4,53

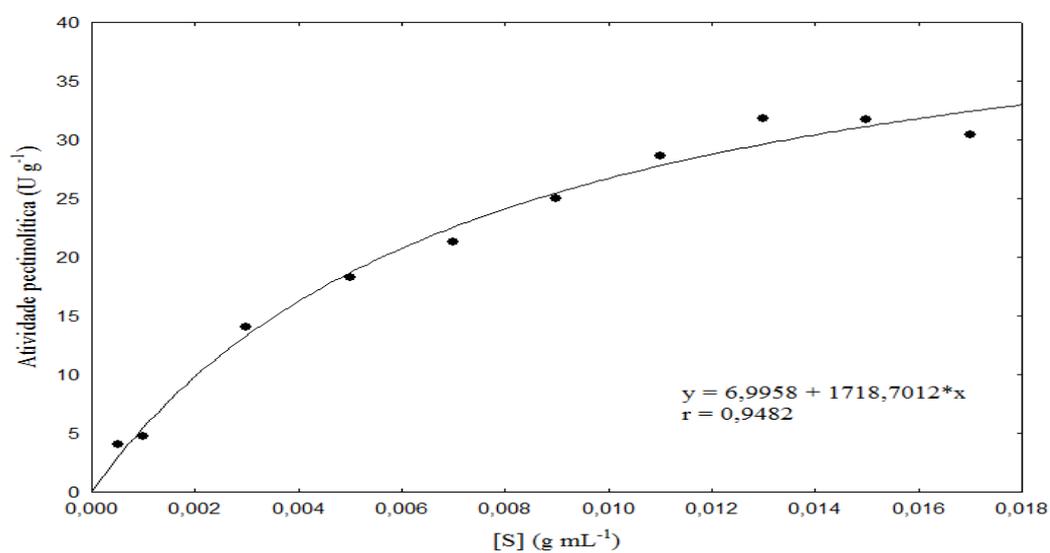
APÊNDICE G - Regressão não linear do modelo cinético de Michaelis-Mentem a partir dos dados de atividade pectinolítica da pectinase líquida com relação à concentração de pectina cítrica.



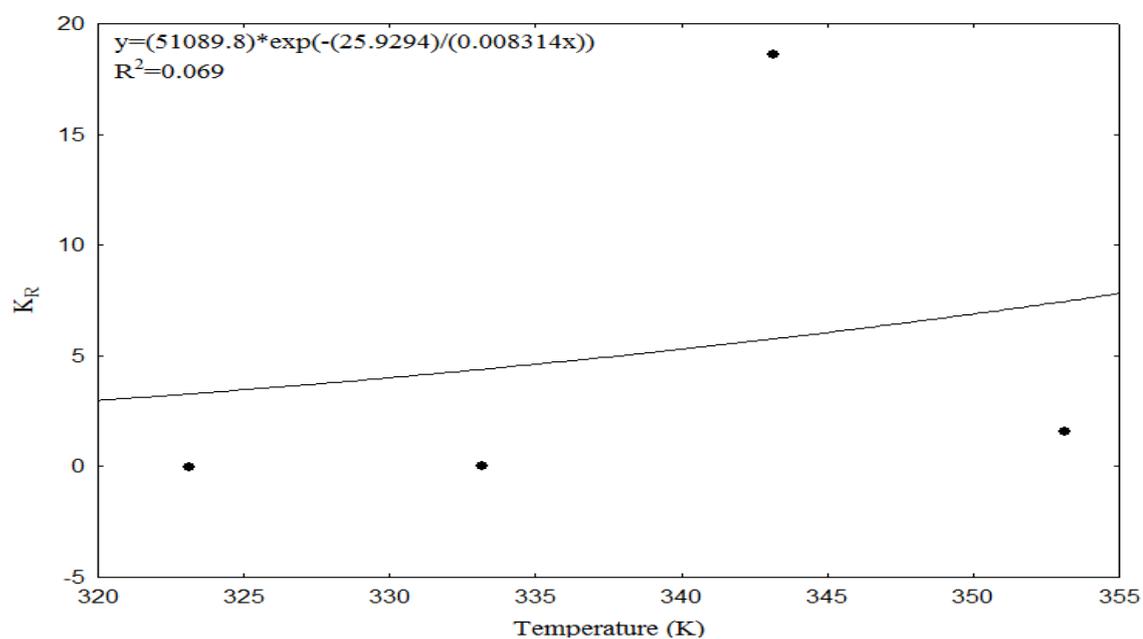
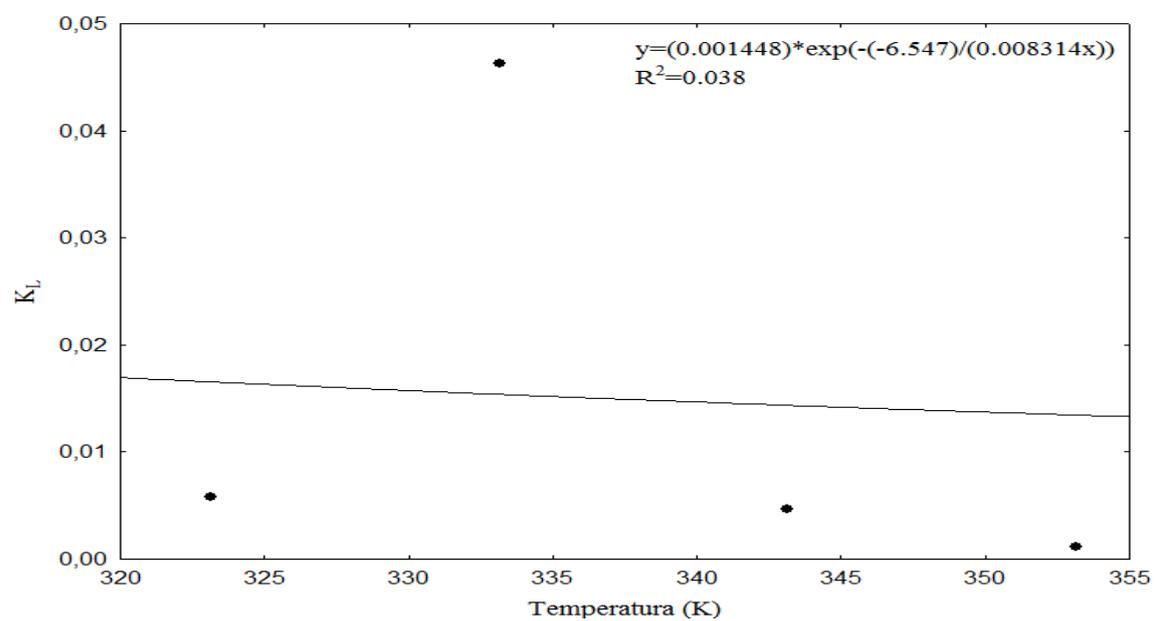
APÊNDICE H - Regressão não linear do modelo cinético de Michaelis-Mentem a partir dos dados de atividade pectinolítica da pectinase liofilizada com relação à concentração de pectina cítrica.



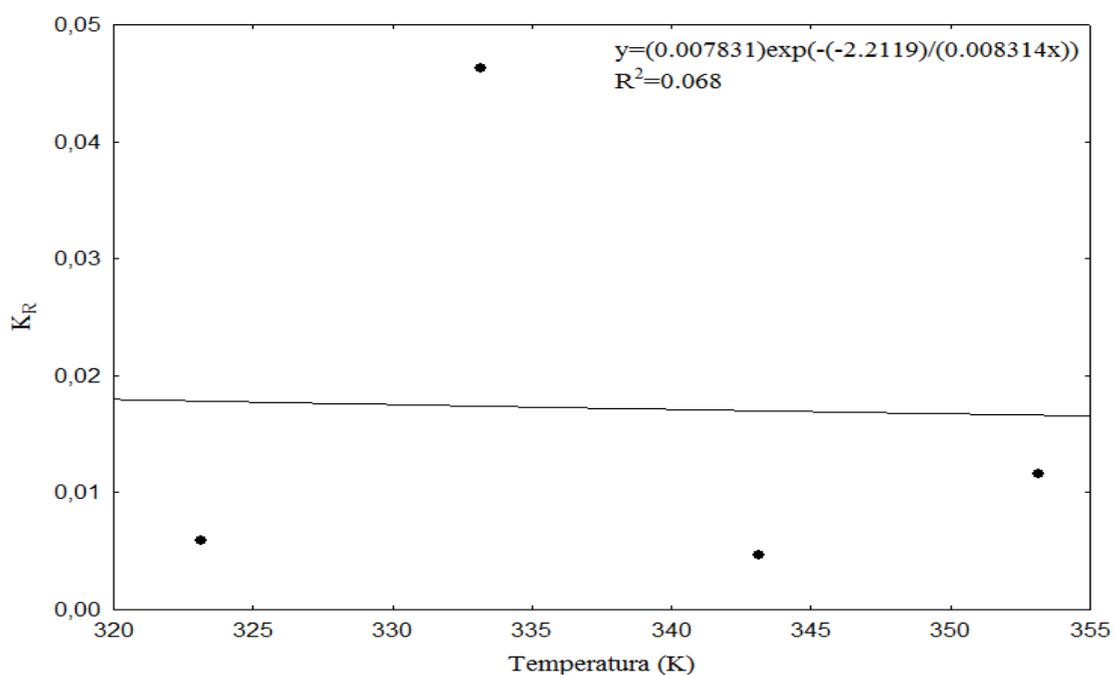
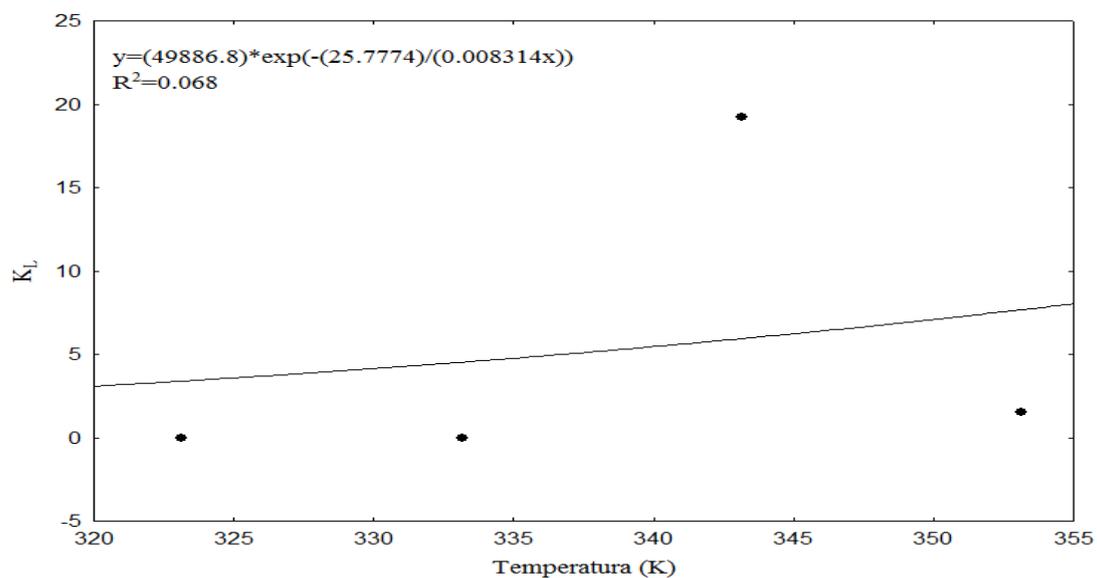
APÊNDICE I - Regressão não linear do modelo cinético de Michaelis-Mentem a partir dos dados de atividade pectinolítica da pectinase imobilizada em ERPU com relação à concentração de pectina cítrica.



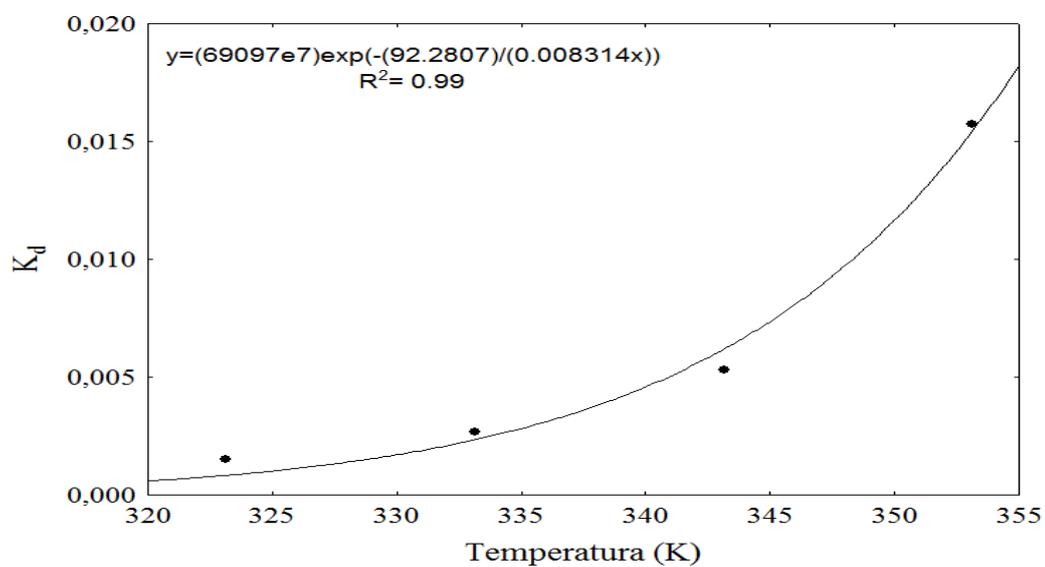
APÊNDICE J - Ajuste à equação de Arrhenius das constantes K_L e K_R da pectinase imobilizada em ERPU obtidas pelo modelo de MPO.



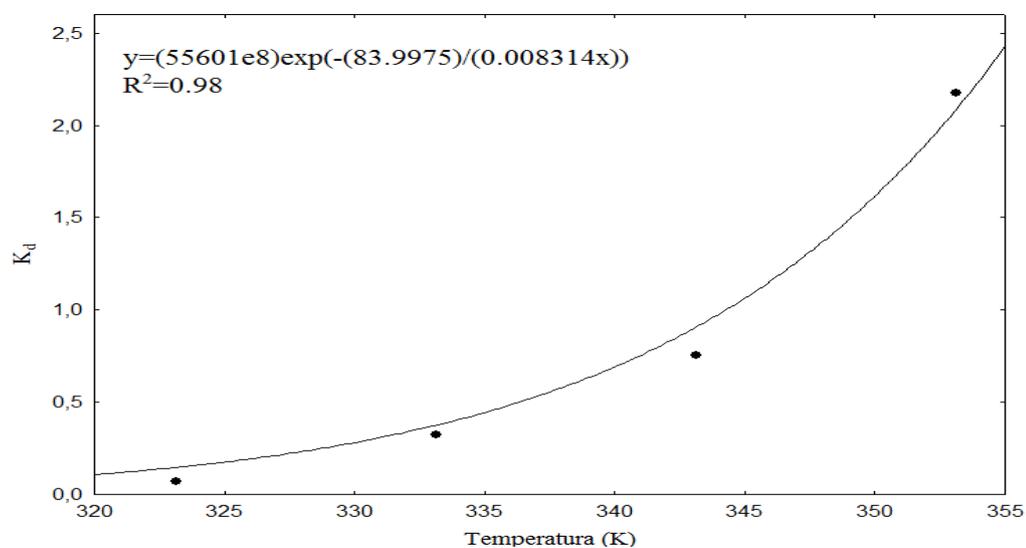
APÊNDICE K - Ajuste à equação de Arrhenius das constantes K_L e K_R da pectinase imobilizada em ERPU obtidas pelo modelo de DF.



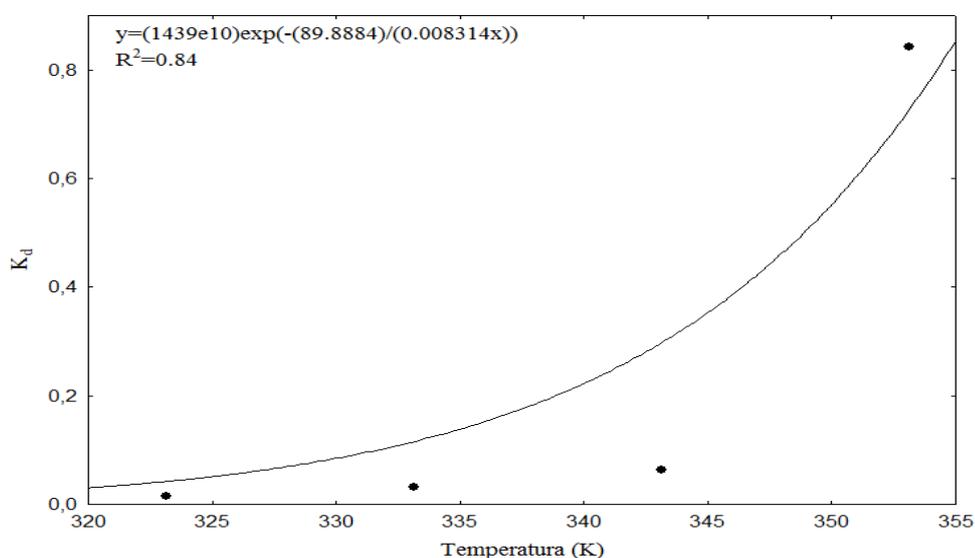
APÊNDICE L – Regressão não linear ao modelo de Arrhenius das constantes de velocidades de inativação K_d da pectinase immobilizada em ERPU.



APÊNDICE M - Regressão não linear ao modelo de Arrhenius das constantes de velocidades de inativação K_d da líquida.



APÊNDICE N - Regressão não linear ao modelo de Arrhenius das constantes de velocidades de inativação K_d da liofilizada.



APÊNDICE O - Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo DCCR 2^3 para a porcentagem de clarificação do suco de goiaba usando a pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma líquida.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(10)	p
Média	92,85353	1,945639	47,72393	0,000000
Temperatura (L)	2,90154	1,217038	2,38410	0,038343
Tempo (L)	5,82995	1,217038	4,79028	0,000734
Tempo (Q)	-2,92862	1,281385	-2,28551	0,045359
[E](L)	5,89542	1,217038	4,84407	0,000677
[E](Q)	-3,05681	1,281385	-2,38555	0,038248
T x t	-3,80487	1,589435	-2,39385	0,037710

APÊNDICE P - Análise de variância para a porcentagem de clarificação do suco de goiaba usando a pectinase comercial Rohapect® DA6L líquida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calculado}
Regressão	1348,458	6	224,7429427	11,12
Resíduo	202,104	10	20,21043345	
Total	1550,562	16		

$R = 0,93$; $F_{\text{tab},0,95; 6; 10} = 3,21$

APÊNDICE Q - Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo DCCR 2³ para a redução da turbidez do suco de goiaba usando a pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma líquida.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(12)	p
Média	93,95414	1,636611	57,40773	0,000000
Tempo (L)	6,46799	1,345355	4,80765	0,000428
Tempo (Q)	-4,28878	1,379373	-3,10922	0,009034
[E](L)	3,35955	1,345355	2,49714	0,028062
T x t	-4,14411	1,757015	-2,35861	0,036143

APÊNDICE R - Análise de variância para a redução da turbidez do suco de goiaba usando a pectinase comercial Rohapect® DA6L líquida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calculado}
Regressão	1100,971	4	275,2427289	11,14
Resíduo	296,362	12	24,6968025	
Total	1397,333	16		

R= 0,89; F_{tab,0,95; 4;12}= 3,26

APÊNDICE S - Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p do planejamento fatorial completo DCCR 2³ para a redução da viscosidade do suco de goiaba usando a pectinase comercial Rohapect® DA6L na forma líquida.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(14)	p
Média	54,51957	0,163882	332,6759	0,000000
Temperatura (L)	0,71858	0,134717	5,3340	0,000105
Temperatura (Q)	-0,34582	0,138123	-2,5037	0,025285

APÊNDICE T - Análise de variância para a viscosidade do suco de goiaba usando a pectinase comercial Rohapect® DA6L líquida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calculado}
Regressão	8,598	2	4,298923531	17,36
Resíduo	3,46689	14	0,247634814	
Total	12,06473	16		

R= 0,84; F_{tab,0,95; 2;14}= 3,73