

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**PECTINASE E NARINGINASE IMOBILIZADAS EM QUITOSANO E ALGINATO:
APLICAÇÃO NO CONTROLO DE QUALIDADE DE SUMOS**

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Carla Patrícia Mendes

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro e,
coorientada pelo Professor Doutor António José Infante Alfaia.

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**PECTINASE E NARINGINASE IMOBILIZADAS EM QUITOSANO E ALGINATO:
APLICAÇÃO NO CONTROLO DE QUALIDADE DE SUMOS**

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Carla Patrícia Mendes

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro e,
coorientada pelo Professor Doutor António José Infante Alfaia.

2016

Resumo

As pectinases são enzimas que degradam substâncias pécticas, e apresentam um papel de destaque na indústria dos sumos de fruta, na melhoria da qualidade do processo e do produto.

O sabor amargo, presente em alguns sumos de fruta, é uma característica indesejável, principalmente atribuída à naringina. A naringinase, é um complexo enzimático que expressa atividade em α -L-ramnosidase e β -D-glucosidase, e que converte a naringina na aglicona naringenina. A naringina e a naringenina, são compostos que demonstram atividade farmacológica e biológica, como ação anti-oxidante, anti-inflamatória e anti-cancerígena, revelando um grande potencial nas indústrias alimentar e farmacêutica. O objetivo deste trabalho prendeu-se, ao desenvolvimento de esferas com pectinase e naringinase imobilizadas, com a finalidade de melhorar as características e a qualidade dos sumos e à investigação da sua aplicabilidade na produção de sumos funcionais.

Neste estudo foram utilizadas as pectinases de *Aspergillus aculeatus* e naringinase do *Penicillium decumbens*. A análise quantitativa da atividade enzimática foi efetuada pelo método colorimétrico do ácido 2,4-dinitrosalicílico (DNS). A concentração de proteína foi determinada através do método de Bradford. As enzimas foram imobilizadas pelo método de inclusão, utilizando como suportes o quitosano e o alginato de cálcio.

Os ensaios de bioconversão foram realizados com as enzimas solúveis e nas matrizes de imobilização em estudo, com avaliação de vários parâmetros como, a concentração de enzima e substrato e a estabilidade operacional. Neste trabalho foi ainda avaliado o efeito da alta pressão nos sumos (laranja, limão, toranja, framboesa e amora) com a pectinase e naringinase imobilizadas. A atividade mais elevada foi alcançada com a pectinase encapsulada em quitosano co-reticulado com tripolifosfato de sódio (TPP).

Foi ainda realizada a comparação de atividade de sumo processado e sumo não processado em modelos *in vivo*.

A pectinase e a naringinase apresentaram alta atividade, demonstrando-se eficazes na clarificação do sumo e na redução do sabor amargo.

Palavras-chave: pectinase; naringinase; sumos de fruta; imobilização; alta pressão.

Abstract

Pectinases are enzymes that degrade pectic substances, has potential application in fruit juices to improve the quality of the process and the product. Bitterness, one problem in some fruit juices, is mainly accomplished by naringin. Naringinase, an enzyme complex expressing α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase activities, degrade naringin to its aglycone, naringenin, an healthy compound with biological and pharmacological activities, such as anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer, showing a high potential in the food and pharmaceutical industries.

The main goal of this work was to develop microencapsulated pectinase and naringinase in hydrogels in order to improve the characteristics and quality of juices and investigate their application in functional juices production. Pectinases from *Aspergillus aculeatus* and naringinase from *Penicillium decumbens* were tested. The quantitative analysis of enzyme activity was carried out by the 2,4-dinitrosalicylic acid (DNS) colorimetric method. The protein concentration was determined by the Bradfords's method. Enzymes were immobilized by the inclusion method, using the chitosan and alginate as supports. The bioconversion assays were performed with soluble and immobilized enymes in the studied matrices. To improve the bioprocess, pectinase and naringinase were tested immobilized in hydrogels approved by FDA, like chitosan and calcium alginate.

Several parameters were evaluated (substrates concentrations, enzymes concentrations and operational stability). The pressure effect in orange, lemon, grapefruit, raspberry and mulberry juices with immobilized pectinase and naringinase, was also investigated. Higher activity was attained with pectinase encapsulated in chitosan beads crosslinked with TPP. Was compared the biologic activity of (un)processed fruit juices in vivo models.

Pectinase and naringinase showed to be effective in clarifying juice and reducing bitterness presenting high activity.

Keywords: pectinase; naringinase; fruit juices; immobilization; high pressure.

Agradecimentos

As palavras de agradecimentos aqui deixadas nunca serão suficientes para transmitir todo o apoio recebido ao longo da realização deste mestrado.

À Professora Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro, pela orientação prestada, por todos os conhecimentos científicos que me transmitiu, por toda a ajuda, apoio, paciência e confiança em mim depositada, o meu profundo agradecimento.

Os meus agradecimentos ao Professor Doutor António Alfaia pelo apoio, ajuda e disponibilidade para a realização dos ensaios a alta pressão.

Agradeço à Professora Doutora Madalena Pimentel a colaboração na realização nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Agradeço a colaboração nos ensaios *in vivo* e na análise histopatológica à Professora Doutora Maria Eduardo Figueira, Professor Doutor João Rocha, Dra Rosa Direito, dos grupos de Investigação, *Pharmacological and Regulatory Sciences* e *Neuron-Glia Biology in Health and Disease*, do Instituto de Investigação do Medicamento, iMEd.ULisboa, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

A todos com quem me cruzei ao longo deste percurso, à minha família, amigos, colegas de mestrado e em especial ao meu marido e ao meu Dudas ...

Muito Muito Obrigada.

Lista de abreviaturas e siglas

As abreviaturas e siglas utilizadas ao longo do texto encontram-se por ordem alfabética, seguida da correspondente definição. As abreviaturas e siglas foram introduzidas e explicadas entre parênteses à medida que vão surgindo no texto. Estas foram mantidas de acordo como são reconhecidas internacionalmente, sendo incluída a tradução mais próxima para a língua portuguesa.

CAS- *Chemical Abstracts Service*

CCDR – *Central Composite Rotatable Design*- Design baseado num ponto central

DNS- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (nome IUPAC ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico)

EC- *Enzyme Commission*

FDA- *Food and Drug Administration*

GRAS- *Generally Recognized as Safe*

PG- Poligalacturonases

PME- Pectina metilesterase

PMG- Polimetilgalacturonase

POD- Peroxidase

PPO- Polifenoloxidase

rpm – Rotações por minuto

RSM – *Response Surface Methodology*- Metodologia de Superfícies de Resposta

R² -Coeficiente de determinação

R²_{aj} - Coeficiente de determinação ajustado

TNBS- Ácido sulfónico trinitrobenzeno

TPP- Tripolifosfato de sódio

Índice geral

Índice de figuras	x
Índice de tabelas.....	xvi
1 Introdução.....	1
1.1 Enzimas e a indústria de sumos de fruta	1
1.1.1 Pectinases.....	2
1.1.2 Naringinase	5
1.2 Cinética enzimática.....	8
1.3 Imobilização enzimática.....	10
1.3.1 Efeitos causados pela imobilização	10
1.3.1.1 Efeitos estéricos e conformacionais	10
1.3.1.2 Efeitos de difusão e transferência de massa	10
1.3.1.3 Efeitos de circunvizinhança.....	11
1.3.2 Métodos de imobilização enzimática	11
1.3.3 Suportes de imobilização enzimática.....	14
1.3.3.1 Quitosano	14
1.3.3.2 Alginato.....	16
1.4 Alta Pressão	17
1.4.1 Efeito da alta pressão nas proteínas.....	19
1.4.2 Efeito da alta pressão nas reações enzimáticas	20
1.4.3 Efeito da alta pressão sobre os microrganismos.....	20
1.4.4 Efeito da alta pressão nos compostos bioativos	21
1.4.5 Efeito da alta pressão nas características físico-químicas.....	21
2 Objetivos.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 Materiais e Métodos	23
3.1 Materiais.....	23
3.1.1 Substratos	23
3.1.1.1 Específicos.....	23
3.1.1.2 Sumos.....	23
3.1.2 Enzimas.....	23
3.1.3 Suportes de imobilização.....	23
3.1.4 Outros reagentes	23
3.1.5 Equipamento	24

3.1.6	Outros materiais	25
3.2	Métodos.....	26
3.2.1	Métodos analíticos.....	26
3.2.1.1	Método de determinação de açúcares redutores	26
3.2.1.2	Método Bradford	27
3.2.1.3	Determinação do pH	28
3.2.1.4	Determinação do ácido ascórbico (vitamina C)	28
3.2.1.5	Análise dos carotenóides	29
3.2.1.6	Determinação °Brix	29
3.2.2	Métodos experimentais.....	29
3.2.2.1	Preparação de sumos	29
3.2.2.2	Atividade enzimática	30
3.2.2.3	Metodologia de superfícies de resposta	30
3.2.2.4	Métodos de imobilização.....	32
3.2.2.4.1	Imobilização em quitosano	32
3.2.2.4.2	Imobilização em alginato	33
3.2.2.4.3	Imobilização em quitosano-alginato.....	33
3.2.2.5	Ensaio de bioconversão	33
3.2.2.5.1	Esferas de quitosano	33
3.2.2.5.2	Esferas de alginato.....	34
3.2.2.5.3	Esferas de quitosano-alginato	34
3.2.2.6	Estabilidade operacional	36
3.2.2.7	Ensaio a alta pressão.....	36
3.2.2.8	Análise microbiológica de sumos	37
3.2.2.8.1	Contagem de microorganismos totais a 30°C	38
3.2.2.9	Ensaio in vivo em modelo animal de colite	38
3.2.2.9.1	Animais.....	39
3.2.2.9.2	Grupos experimentais.....	39
3.2.2.9.3	Indução da colite	39
3.2.2.9.4	Análise histopatológica	40
4	Resultados e Discussão	41
4.1	Ensaio enzima livre - Pectinase	41
4.1.1	Efeito da concentração de substrato - Pectina.....	41
4.1.2	Efeito da concentração de enzima- Pectinase	42
4.1.3	RSM	44
4.1.3.1	Pectinase	44

4.1.3.2	Naringinase.....	48
4.2	Ensaio de imobilização	49
4.2.1	Quitossano	49
4.2.1.1	Pectinase	49
4.2.1.1.1	Estabilidade Operacional	51
4.2.1.2	Naringinase.....	52
4.2.2	Alginato	54
4.2.2.1	Pectinase	54
4.2.2.1.1	Estabilidade Operacional	54
4.2.2.2	Naringinase.....	56
4.2.2.2.1	Estabilidade Operacional	56
4.2.3	Quitossano – Alginato	57
4.2.3.1	Pectinase	57
4.2.3.1.1	Estabilidade Operacional	59
4.2.3.2	Naringinase.....	60
4.2.3.2.1	Estabilidade Operacional	63
4.2.3.3	Pectinase e naringinase	64
4.2.4	Comparação dos diferentes suportes de imobilização	66
4.2.4.1	Estabilidade Operacional	68
4.3	Sumos	70
4.3.1	Alta Pressão	70
4.3.2	Controlo de Qualidade.....	73
4.3.2.1	pH	73
4.3.2.2	Vitamina C	75
4.3.2.3	Análise carotenóides.....	75
4.3.2.4	° Brix	76
4.3.2.5	Análise microbiológica	77
4.3.3	Ensaio <i>in vivo</i> em modelo de colite	77
4.3.3.1	Análise histológica	81
5	Conclusões.....	83
6	Referências bibliográficas.....	84
7	Anexos	89

Índice de figuras

Figura 1-1: Estrutura linear da pectina. Adaptado de Uenojo et al. (2007)(4).....	2
Figura 1-2: Mecanismo de ação enzimática das pectinases numa molécula de pectina. PMGL: polimetilgalacturonato liase, PMG: polimetilgalacturonase, PMGE: polimetilgalacturonato esterase, PGL: poligalacturonato liase. PG: poligalacturonase. Adaptado de Uenojo <i>et al.</i> 2006 (4).	4
Figura 1-3: Hidrólise da naringina em prunina, ramnose, naringenina e glucose por ação da naringinase. Adaptado de Ribeiro, M. (2011) (13).	7
Figura 1-4: Efeito da concentração de substrato na velocidade de uma reação catalisada por uma enzima.	8
Figura 1-5: Esquema de métodos de imobilização de enzimas. Adaptado de Fernández-Fernández <i>et al.</i> (2013) (29).	11
Figura 1-6: Estrutura da (A) quitina, (B) celulose e (C) quitosano.	15
Figura 1-7: Estrutura do alginato.....	16
Figura 1-8: Esquema de sistema de alta pressão. (1) Vaso de alta pressão, (2) Tubo de aço, (3) Válvula, (4) Manómetro de pressão, (5) Bomba manual, (6) Sistema de fecho, (7) Célula de reação e (8) Banho termostático. Adaptado de Vila-Real et al (2007) (50).....	18
Figura 3-1: Curva de calibração linear do método DNS com soluções padrão de glucose.	27
Figura 3-2: Curva de calibração do método Bradford com soluções padrão de pectinase.	28
Figura 3-3: Preparação de esferas de quitosano.	33
Figura 3-4: Aparelho de alta pressão utilizado nos ensaios.	36
Figura 3-5: Bolsas de plástico seladas pelo calor, com sumo de framboesa (a), toranja (b) e limão (c) e esferas de quitosano e quitosano-alginato com pectinase e naringinase imobilizadas por inclusão.....	37
Figura 3-6: Sumo de laranja, toranja, limão, framboesa e amora com esferas de quitosano-alginato com pectinase e naringinase imobilizadas.	37
Figura 4-1: Ensaios com pectinase 200µL/mL com concentrações de substrato de 0,025 mg/mL a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	41
Figura 4-2: Representação da atividade da pectinase em função da concentração de pectina (pectinase a 200µL/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, a 45 °C e a 175 rpm).	42
Figura 4-3: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de diferentes concentrações de pectinase no substrato pectina (0,05 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	42

Figura 4-4: Efeito da concentração da pectinase na atividade hidrolítica da pectina (0,05 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5) a 45°C e 175 rpm.	43
Figura 4-5: Superfície de resposta ajustada à formação de açúcares redutores como função da concentração de pectinase e da concentração de pectina, a 45°C ao fim de 30 minutos.	45
Figura 4-6: Superfície de resposta ajustada à formação de açúcares redutores como função do tempo e da concentração de pectina, a 45°C.	46
Figura 4-7: Superfície de resposta ajustada à concentração de açúcares redutores como função da concentração de pectinase e do tempo, a 45°C.	47
Figura 4-8: Superfície de resposta ajustada à concentração de açúcares redutores como função da concentração de naringina e do tempo.	48
Figura 4-9: Esferas de quitosano a 1% (m/v) com pectinase imobilizada por inclusão.	49
Figura 4-10: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de diferentes concentrações de pectinase imobilizada por inclusão (2-16 µL/mL) em quitosano a 1% (m/v) no substrato pectina (0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	50
Figura 4-11: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de pectinase imobilizada por inclusão (16 µL/mL) em quitosano a 1% (m/v), substrato pectina (0,15 mg/mL-0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	50
Figura 4-12: Representação gráfica, ajustada por regressão exponencial, dos pontos experimentais obtidos nos ensaios de bioconversação, realizados a 45°C e 175 rpm, com pectinase imobilizada em quitosano (16 µL/mL) e várias concentrações de pectina.	51
Figura 4-13: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de pectinase imobilizada em quitosano 1% (m/v), em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: enzima a 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).	51
Figura 4-14: Atividade residual da pectinase imobilizada em quitosano (composição do meio reacional: enzima a 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).	52
Figura 4-15: Perfil de produção de açúcares redutores com esferas de naringinase imobilizada por inclusão em quitosano a 1% (m/v) com [Naringina] = 0,3 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	53
Figura 4-16: Atividade enzimática em função da concentração de naringinase imobilizada em quitosano, naringina 0,3 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm. A linha representa o ajuste aos pontos experimentais.	53
Figura 4-17: Perfil de produção de açúcares redutores da pectinase (16 µL/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas em alginato de cálcio 1%, em 0,6 mg/mL de pectina e 0,3 mg/mL de naringina.	54

Figura 4-18: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de pectinase imobilizada em alginato de cálcio, em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: [Pectinase] = 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,00).	55
Figura 4-19: Atividade residual da pectinase imobilizada em alginato (composição do meio reacional: enzima a 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).....	55
Figura 4-20: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de naringinase imobilizada em alginato de cálcio, em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: [Naringinase] = 18 mg/mL e naringina a 0,5 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,00).....	56
Figura 4-21: Atividade residual da naringinase imobilizada em alginato de cálcio (composição do meio reacional: enzima a 18 mg/mL e naringina a 0,5 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).	57
Figura 4-22: a) Esferas de quitosano-alginato com pectinase imobilizada por inclusão; b) Esferas de quitosano-alginato com pectinase e naringinase imobilizadas por inclusão.	57
Figura 4-23: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de pectinase imobilizada por inclusão em quitosano-alginato, no substrato pectina (0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	58
Figura 4-24: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de pectinase imobilizada por inclusão em quitosano-alginato (8 µL/mL), no substrato pectina (0,15- 0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	58
Figura 4-25: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de pectinase imobilizada em quitosano-alginato, em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: pectinase a 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,00).	59
Figura 4-26: Atividade residual da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (composição do meio reacional: enzima a 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).	60
Figura 4-27: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de naringinase imobilizada por inclusão em quitosano-alginato (18 mg/mL), no substrato naringina (0,1 - 0,5 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	61
Figura 4-28: Atividade enzimática da naringinase (18 mg/mL) imobilizada em quitosano-alginato em função da concentração de naringina, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm. A linha representa o ajuste aos pontos experimentais.	61
Figura 4-29: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de naringinase imobilizada por inclusão em quitosano-alginato, no substrato naringina (0,3 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	62

Figura 4-30: Atividade enzimática em função da concentração de naringinase imobilizada em quitosano-alginato, naringina 0,3 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm. A linha representa o ajuste aos pontos experimentais.	62
Figura 4-31: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de naringinase imobilizada em quitosano-alginato, em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: naringinase a 18 mg/mL e naringina a 0,5 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,00).	63
Figura 4-32: Atividade residual da naringinase (18 mg/mL) imobilizada em quitosano-alginato (composição do meio reacional: naringina a 0,5 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).....	64
Figura 4-33: Perfil de produção de açúcares com pectinase (8 µL/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas em quitosano- alginato nas mesmas esferas (na figura representado entre parênteses ()) e em esferas separadas, com diferentes composições de meio reacional, 175 rpm e a 45°C.	64
Figura 4-34: Perfil da produção de açúcares redutores com pectinase (16 µL/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas em quitosano-alginato, utilizando esferas separadas e esferas com as duas enzimas juntas (na figura representado entre parênteses ()), 175 rpm e a 45°C.....	65
Figura 4-35: Perfil da produção de açúcares redutores com pectinase (16 µL/mL) e naringinase (36mg/mL) imobilizadas em quitosano-alginato, utilizando esferas separadas e esferas com as duas enzimas juntas (na figura representado entre parênteses ()), com diferentes composições de meio reacional, 175 rpm e 45 °C.	66
Figura 4-36: Perfis de produção de açúcares redutores por ação de pectinase (16 µL/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas juntas por inclusão em quitosano-alginato (Q-A) e alginato de cálcio. (A), substrato pectina (0,6 mg/mL) e naringina (0,3 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	66
Figura 4-37: Perfis de produção de açúcares redutores por ação de pectinase (16 µL/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas por inclusão em quitosano-alginato (Q-A) e alginato de cálcio (A), sumo de framboesa, a 45°C e 175 rpm.	67
Figura 4-38: Perfis de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de pectinase (16 µL/mL) imobilizada por inclusão em quitosano (Q), quitosano-alginato (Q-A) e alginato de cálcio (A), substrato pectina (0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	67
Figura 4-39: Atividade residual da pectinase (16 µL/mL) imobilizada em quitosano, alginato de cálcio e quitosano-alginato (composição do meio reacional: pectina a 0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 175 rpm, a 45°C.	68
Figura 4-40: Atividade residual da naringinase (18 mg/mL) imobilizada em alginato de cálcio e quitosano-alginato (composição do meio reacional: pectina a 0,5 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 175 rpm, a 45°C.	69
Figura 4-41: Ensaios em sumo de laranja a diferentes pressões, com pectinase imobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase imobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P)...	70

Figura 4-42: Ensaio em sumo de toranja a diferentes pressões com pectinase imobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase imobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P)...	71
Figura 4-43: Ensaio em sumo de limão a diferentes pressões com pectinase imobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase imobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P)...	71
Figura 4-44: Ensaio em sumo de framboesa a diferentes pressões com pectinase imobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase imobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P)...	72
Figura 4-45: Ensaio em sumo de amora a diferentes pressões com pectinase imobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase imobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P)...	72
Figura 4-46: Análise do pH dos sumos de fruta dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	74
Figura 4-47: Concentração de ácido ascórbico (mg/mL) do sumo de laranja, limão e toranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	75
Figura 4-48: Percentagem de carotenóides do sumo de laranja, toranja e limão, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.....	76
Figura 4-49: ° Brix do sumo de laranja, toranja, limão, framboesa e amora dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	77
Figura 4-50: Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente (A: Grupo Sham; B: Grupo Etanol; C: Grupo TNBS + etanol; D: Grupo TNBS + sumo toranja; E: Grupo TNBS+ sumo toranja processado).	78
Figura 4-51: Efeito da administração do sumo de toranja e sumo processado no tamanho do intestino dos ratinhos relativamente aos restantes grupos (*p<0,001 vs Sham; #p<0,001 vs TNBS).	80
Figura 4-52: Efeito da administração do sumo de toranja e sumo processado no tamanho da lesão relativamente aos restantes grupos (*P<0,001 vs Sham; #P<0,001 vs TNBS).	81
Figura 4-53: Histologia do colón normal do rato.....	81
Figura 4-54: Histologia do cólon do rato na presença de colite (score 3).	82
Figura 4-55: Histologia do cólon do rato do grupo TNBS + sumo de toranja.	82

Figura 4-56: Histologia do cólon do rato grupo TNBS + sumo de toranja processado. 82

Índice de tabelas

Tabela 1-1: Classificação de enzimas pécticas.....	3
Tabela 1-2: Microorganismos utilizados na produção de naringinase.	6
Tabela 1-3: Caracterização dos métodos de imobilização. Adaptado de Hiteshi <i>et al.</i> (2013) (27).....	12
Tabela 3-1: Delineamento experimental para os ensaios com pectinase.....	31
Tabela 3-2: Delineamento experimental para os ensaios com naringinase.....	32
Tabela 3-3: Ensaios de bioconversão com a pectinase e a naringinase imobilizadas simultaneamente nas esferas de quitosano-alginato.....	35
Tabela 3-4: Ensaios de bioconversão com a pectinase e a naringinase imobilizadas em esferas separadas de quitosano-alginato.....	35
Tabela 3-5: Ensaios realizados para avaliação da estabilidade operacional.	36
Tabela 3-6: Caracterização dos grupos animais em estudo.....	39
Tabela 4-1: Efeito da concentração de pectinase, da concentração de pectina e do tempo na bioconversão da pectina em açúcares redutores.	44
Tabela 4-2: Atividade enzimática da pectinase imobilizada em quitosano 1% (m/v), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	49
Tabela 4-3: Atividade enzimática da naringinase imobilizada em quitosano 1% (m/v), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	52
Tabela 4-4: Atividade enzimática da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (m/v), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	59
Tabela 4-5: Atividade enzimática da naringinase imobilizada em quitosano-alginato, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.	63
Tabela 4-6: Observações morfológicas e funcionais no cólon limpo e aberto transversalmente logo após a colheita. ([#] P<0,05 vs Sham; *P<0,05 vs TNBS + EtOH 50%).....	79
Tabela 4-7: Classificação da gravidade da diarreia.....	80
Tabela 7-1: Valores de pH do sumo de laranja dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	89
Tabela 7-2: Valores de pH do sumo de toranja dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	89
Tabela 7-3: Valores de pH do sumo de limão dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	89

Tabela 7-4: Valores de pH do sumo de framboesa dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	90
Tabela 7-5: Valores de pH do sumo de framboesa dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	90
Tabela 7-6: Teor de ácido ascórbico (mg/mL) do sumo de laranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	90
Tabela 7-7: Teor de ácido ascórbico (mg/mL) do sumo de toranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	91
Tabela 7-8: Teor de ácido ascórbico (mg/mL) do sumo de limão, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	91
Tabela 7-9: Percentagem de carotenóides do sumo de laranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	91
Tabela 7-10: Percentagem de carotenóides do sumo de toranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	92
Tabela 7-11: Percentagem de carotenóides do sumo de limão, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	92
Tabela 7-12: °Brix do sumo de laranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões. ...	92
Tabela 7-13: °Brix do sumo de toranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.	93
Tabela 7-14: ° Brix do sumo de limão, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões. ...	93

Tabela 7-15: ° Brix do sumo de framboesa, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões. 93

Tabela 7-16: ° Brix do sumo de amora, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões. 94

1 Introdução

1.1 Enzimas e a indústria de sumos de fruta

A alimentação humana e animal é possivelmente a área onde o processamento, ancorado em substâncias biológicas, tem as raízes mais profundas (1). As enzimas são biomoléculas de estrutura proteica globular terciária ou quaternária, que regulam muitas transformações químicas (2). De modo genérico, todas as classes de enzimas têm aplicação na área alimentar, mas as hidrolases são possivelmente as predominantes (1). A utilização generalizada de enzimas no processamento alimentar pode ser facilmente compreendida, dada a sua elevada especificidade; capacidade de operarem em condições suaves de pH, temperatura e pressão; elevada atividade e biodegradabilidade (1).

A procura por sumos de frutas tem aumentado dia após dia, como resultado da preocupação crescente a nível da saúde e da qualidade de vida, por parte dos consumidores. O consumo de sumo de frutas tem sido associado a uma dieta saudável. Além do seu potencial nutricional, o sumo de frutas contém diferentes compostos que apresentam atividade biológica. Atualmente, o interesse em compostos fenólicos, reside na sua capacidade antioxidante, que funciona como proteção aos efeitos prejudiciais do stress oxidativo na saúde humana. A adição de enzimas promove a extração dos sumos de fruta, assim como a libertação aumentada de compostos fenólicos e outros compostos nutricionalmente importantes no sumo de fruta. A aparência do sumo é melhorada pela clarificação enzimática. A qualidade do sumo é melhorada em termos de viscosidade reduzida, diminuição da turbidez e melhoria da capacidade de filtração. Também podem ser usadas enzimas para diminuir o sabor amargo de sumos de frutas cítricas e na prevenção do escurecimento de sumos (3). O processamento de sumos de frutas cítricas apresenta como principal problema/ desafio o sabor amargo, com conseqüente repercussão a nível da aceitação por parte dos consumidores.

O sumo de frutas pode ser obtido por compressão mecânica ou por maceração de frutas frescas. O sumo de frutas é composto por água, sólidos solúveis (açúcares e ácidos orgânicos), compostos de aroma e sabor, vitaminas e minerais, substâncias pécnicas, pigmentos e em muito pequena quantidade proteínas e gorduras.

Os sumos de fruta apresentam diferentes graus de turbidez natural, de acordo com as propriedades físicas e químicas de cada fruta. A turbidez do sumo está relacionada com a presença de compostos insolúveis, fragmentos de células originários do tecido polposo e/ou componentes que não se encontram totalmente dissolvidos. Estes compostos insolúveis, responsáveis por características como o sabor, aroma e cor, podem variar em tamanho (de micro a fragmentos maiores).

Um dos maiores problemas na preparação de sumos é a turvação, devida principalmente à presença de pectinas. A turvação pode ser removida por despectinização enzimática.

As enzimas apresentam um grande potencial na indústria alimentar, e embora possam permanecer no produto final, não apresentam uma função, pelo que não são consideradas aditivos alimentares (3).

1.1.1 Pectinases

As pectinases foram das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sumos de frutas por volta de 1930.

São produzidas por plantas e por uma grande variedade de microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (2,4).

Os fungos filamentosos são os mais utilizados para a produção em escala industrial destas enzimas, dado que cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (4,5). O pH ideal das pectinases “secretadas” por fungos aproxima-se do valor de pH de muitos sumos de frutas, entre 3,0 a 5,5. Na maioria dos casos, o género *Aspergillus spp.* é o utilizado para a produção industrial, uma vez que é *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA).

Formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbonada (4).

As substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular (6). Ao contrário das proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, e sendo polissacáridos, as substâncias pécticas não possuem massa molecular definida, variando de 25 a 360 kDa. São um complexo coloidal de polissacáridos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturónico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster e parcial ou completamente neutralizados por uma ou mais bases (iões sódio, potássio ou amónio)(7).

As substâncias pécticas podem ser classificadas em protopectina, ácido pectínico, ácido péctico e pectina. O ácido pectínico, ácido péctico e a pectina são total ou parcialmente solúveis em água.

A protopectina é insolúvel em água e representa a maior parte da pectina das frutas não maduras. O ácido pectínico é um ácido galacturónico coloidal com poucos grupos metoxilo e o ácido péctico é um ácido galacturónico coloidal isento de grupos metoxilo. O termo geral pectina designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos carboxílicos metilados- em que pelo menos 75% dos grupos carboxílicos são metilados. Pode formar gel com açúcares e ácidos. A pectina é formada por uma estrutura central de monómeros de ácido galacturónico (Figura 1-1). Ramnose, galactose, arabinose e xilose podem ser encontrados nas cadeias laterais (4,8).

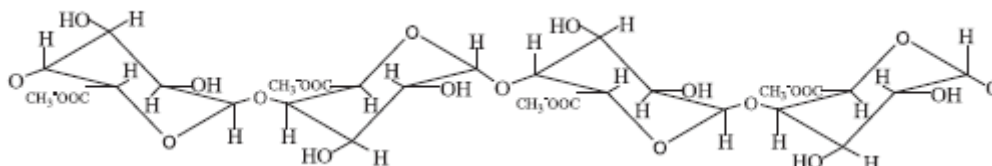


Figura 1-1: Estrutura linear da pectina. Adaptado de Uenojo et al. (2007)(4).

A classificação das enzimas pecticas é baseada de acordo com o substrato (pectina, ácido pectico ou protopectina), mecanismo de ação (transeliminção ou hidrólise) e sítios de clivagem (aleatória ou terminal).

Na Tabela 1-1 encontra-se apresentada a classificação das enzimas pecticas de acordo com a *Enzyme Commission* (EC).

Os três principais tipos de pectinases (Tabela 1-1) são a pectina esterase, as despolimerizantes e as protopectinases (3,9,10).

Tabela 1-1: Classificação de enzimas pecticas.

Tipo de pectinase	Nome	Sigla	Nome comum	Número EC
Desesterificante	Polimetilgalacturonase esterase	PMGE	Pectina esterase	3.1.1.11
Hidrolase	Endo poligalacturonase	Endo-PG	Poligalacturonase	3.2.1.15
	Exo poligalacturonase 1	Exo-PG 1	Poligalacturonase	3.2.1.67
	Exo poligalacturonase 2	Exo-PG 2	Poligalacturonase	3.2.1.82
	Endo polimetilgalacturonase	Endo- PMG	Pectina hidrolase	
	Exo polimetilgalacturonase	Exo-PMG	Pectina hidrolase	
Liase	Endo poligalacturonase liase	Endo-PGL	Pectato liase	4.2.2.2
	Exo poligalacturonase liase	Exo-PGL	Pectato liase	4.2.2.9
	Endo polimetilgalacturonato liase	Endo-PMGL	Pectina liase	4.2.2.10
	Exo polimetilgalacturonato liase	Exo-PMGL	Pectina liase	

Adaptado de Pastore et. al (2006) (4).

A pectina esterase catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, com formação de metanol e a conversão da pectina em pectato. Atua preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade de galacturonato não esterificado. Apresenta valores de pH ótimo de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50°C. Encontra-se presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sumos de frutas (4).

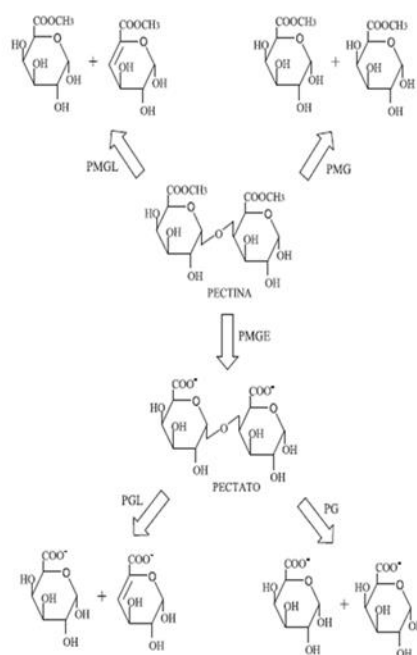


Figura 1-2: Mecanismo de ação enzimática das pectinases numa molécula de pectina. PMGL: polimetilgalacturonato liase, PMG: polimetilgalacturonase, PMGE: polimetilgalacturonato esterase, PGL: poligalacturonato liase. PG: poligalacturonase. Adaptado de Uenojo *et al.* 2006 (4).

As enzimas despolimerizantes envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α-1,4) e as liases (catalisam a β-eliminação).

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases (Figura 1-2). A polimetilgalacturonase (PMG) atua por clivagem das ligações glicosídicas α-1,4, podendo ser endo- ou exo-PMG.

As poligalacturonases (PG) hidrolisam α-1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturónico, podendo apresentar ação endo- (hidrólise aleatória) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido pécico. As poligalacturonases fúngicas são úteis pela elevada atividade enzimática, possuem pH ótimo de atividade na região levemente ácida e temperatura ótima entre 30 e 50°C.

As liases rompem ligações glicosídicas com formação de galacturonídeos, com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 da parte terminal não redutora do ácido galacturónico formado. Incluem as pectina liases e as pectato liases.

As pectina liases quebram as ligações por transeliminação do hidrogénio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato pectina. O pH ótimo é por volta dos 5,5 e temperatura ótima entre 40 e 50°C.

As pectato liases catalisam a clivagem de ligações α-1,4 de ácido pécico de modo endo-ou exo- por transeliminação. Tem um pH ótimo na região alcalina, entre 7,5 e 10, e temperatura ótima entre 40 e 50°C.

As protopectinases solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada. Não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação de pectina.

O potencial biotecnológico de enzimas pectinolíticas de microrganismos, tem atraído a atenção de vários investigadores, como catalisadores biológicos numa variedade de processos industriais (11).

As aplicações destas enzimas na indústria alimentar incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sumos de frutas, tratamento preliminar do sumo de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate e fermentação de chá e chocolate (4).

Apesar da pectina apresentar características importantes para a dieta alimentar, a presença em frutas é responsável por grandes perdas industriais, principalmente na extração de sumos, devido ao aumento da viscosidade durante o processo de prensagem, filtração e concentração (8).

O processo de extração de sumos inicia-se com a prensagem de frutas, o que acarreta um aumento de viscosidade e de partículas em suspensão, dificultando a extração e a filtração, principalmente em frutos ricos em pectina (8). O sumo natural é rico em partículas insolúveis, principalmente compostas por substâncias pécticas. Nestas partículas, o núcleo da proteína com uma carga de superfície positiva é revestido pela carga negativa das moléculas de pectina. Esta carga negativa faz com que ocorra repulsão entre as moléculas de pectina (5). As pectinases degradam a pectina e expõem parte da proteína carregada positivamente, com a consequente redução da repulsão eletrostática entre as moléculas de pectina.

As pectinases são adicionadas para facilitar a extração, a pigmentação, a clarificação do sumo e diminuir a viscosidade e turbidez (3,8,11).

Kashyap *et al.* (2001) (5) reportou que a produção de sumos de morango, framboesas e amora necessita de despectinização enzimática, dado que estas frutas apresentam um alto teor de pectinas.

1.1.2 Naringinase

A naringinase tem sido reportada na literatura desde 1938, inicialmente em isolados de sementes de aipo e mais tarde em folhas de toranja.

A naringinase é um complexo enzimático produzido por vários fungos e bactérias (Tabela 1-2). É um heterodímero de 168 kDa, formado por duas subunidades, a α -L-ramnosidase e a β -D-glucosidase (12). Este complexo enzimático é comercialmente atrativo devido às suas potenciais aplicações na indústria farmacêutica e alimentar. Destaca-se o seu principal interesse na biotransformação de esteróides e antibióticos, hidrólise de glicosídeos e na indústria de vinhos e sumos cítricos (13–15).

Tabela 1-2: Microorganismos utilizados na produção de naringinase.

Microorganismos	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	Kishi (1955)
<i>Rhamnus dahurica</i>	Suzuki (1962)
<i>Aspergillus niger</i>	Bram and Solomons (1965)
<i>Coniothyrium diplodiella</i>	Nomura 1965
<i>A. niger</i> NRRL 72-4	Mateles et al (1965)
<i>Cochiobolus miyabeanus</i>	Ito and Takiguchi (1970)
<i>Phanopsis citri</i>	Ito and Takiguchi (1970)
<i>Penicillium decumbens</i>	Fukumoto and Okado (1973)
<i>Aspergillus niger</i>	Olsons et al (1979)
<i>Penicillium sp. and Aspergillus niger</i>	Tsen and Tsai (1988)
<i>Penicillium decumbens</i>	Young et al (1989)
<i>Penicillium sp.</i>	Hoescht (1994)
<i>Rhizopus nigricans</i>	Shanmugam and Yadav 1995
<i>Penicillium decumbens</i> PTCC 5248	Norouzian et al (1999)
<i>Penicillium</i> DSM 6825	Puri and Banerjee (2000)
<i>Aspergillus terreus</i> CECT 2663	Soria et al (2004)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 1344	Puri and Karla (2005)
<i>Penicillium sp</i>	Puri et al (2005)
<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088	Busto et al (2007)
<i>Aspergillus niger</i> BCC 25166	Thammawat et al (2008)
<i>Penicillium decumbens</i>	Magario et al (2008)
<i>Penicillium decumbens</i>	Magario et al (2009)
<i>Penicillium decumbens</i>	Vila-Real et al (2007, 2010a, b,c), Pedro et al (2007), Ribeiro et al (2008), Ribeiro et al (2010)
<i>Staphylococcus xylosus</i> MAK2	Puri et al (2009)
<i>Aspergillus sojae</i>	Chang et al (2010)

Adaptado de Ribeiro, M. 2011 (13).

Alguns flavonóides, como a naringina, rutina, quercetina e hesperidina, que contém a α -ramnose e a β -glucose terminal, podem atuar como substratos da naringinase.

A naringina (4,5,7-trihidroxiflavonona-7-ramnoglicosídeo) é um flavonóide presente em diversas espécies vegetais. Na membrana da fruta, na fração solúvel em água, a naringina é o principal componente amargo (16).

A hidrólise da naringina pela α -L-ramnosidase resulta na formação de ramnose e prunina, que pode ser hidrolisada em glucose e naringenina pela β -D-glucosidase (Figura 1-3).

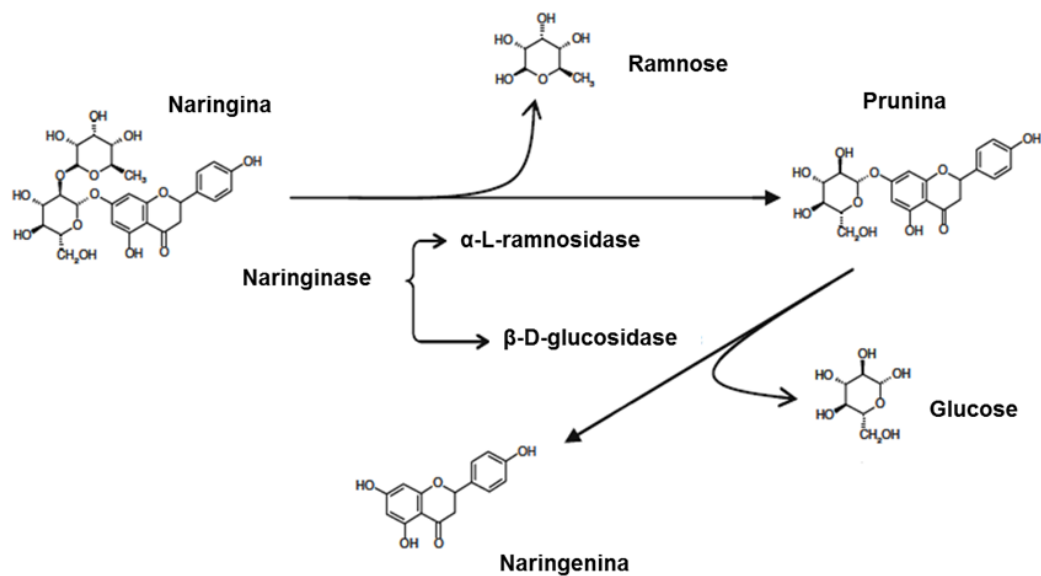


Figura 1-3: Hidrólise da naringina em prunina, ramnose, naringenina e glucose por ação da naringinase. Adaptado de Ribeiro, M. (2011) (13).

A naringinase tornou-se biotecnologicamente importante devido à sua função de diminuir o sabor amargo dos sumos de frutas cítricas - com a formação da naringenina (um derivado não amargo da naringina), mantendo a estabilidade do produto, as características organolépticas e as propriedades dos compostos antioxidantes (13,14,17).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse por compostos biológicos ativos, devido aos seus benefícios ao nível da saúde, particularmente, na proteção contra algumas doenças a nível cardiovascular, alguns tipos de cancro e doenças neurodegenerativas.

A naringina e a naringenina, são compostos com atividade farmacológica e biológica importante, devido aos seus efeitos anti-oxidantes, anti-inflamatórios e anti-cancerígenos (12,18). A naringenina também apresenta, atividade anti-mutagénica e neuroprotetora (13).

A comparação da atividade biológica do glicosídeo naringina e da aglicona naringenina, demonstrou a relação estrutura- atividade e a vantagem de desglicosilação de algumas moléculas de interesse farmacológico. As elevadas propriedades anti-inflamatórias da naringenina foram evidenciadas com a redução em 90% do edema de pata, quando comparado com uma redução de 40% obtida pela naringina. A diferença entre esta redução do edema de pata reflete as propriedades anti-inflamatórias do sumo tratado enzimaticamente (13).

1.2 Cinética enzimática

A velocidade das reações enzimáticas é geralmente modelada pela abordagem de Michaelis - Menten.

Em 1913, Michaelis e Menten propuseram um modelo de equilíbrio para reações enzimáticas envolvendo apenas um substrato, no qual a reação é considerada como um processo de duas etapas (19):



E, S, ES e P correspondem a enzima, substrato, complexo enzima-substrato e produto, respetivamente.

Na primeira etapa ocorre uma reação reversível, na qual o substrato liga-se à enzima formando um complexo intermediário, enzima-substrato, instável. A formação do complexo ES baseia-se numa interação muito fraca e, conseqüentemente, este passo é muito mais rápido do que o passo de formação do produto, que envolve mudanças químicas.

A segunda etapa é irreversível, havendo a dissociação deste complexo e formação do produto com libertação da enzima.

Surge então a equação de Michaelis-Menten, para reações enzimáticas com um único substrato no estado estacionário:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

v_{max} representa a velocidade máxima atingida pelo sistema para a concentração máxima de substrato (saturação) e K_M é a constante de afinidade que corresponde à concentração de substrato para a qual a velocidade da reacção corresponde a metade da v_{max} .

Este modelo permite prever o comportamento da velocidade da reação com a variação da concentração do substrato e pode ser representado pela Figura 1-4.

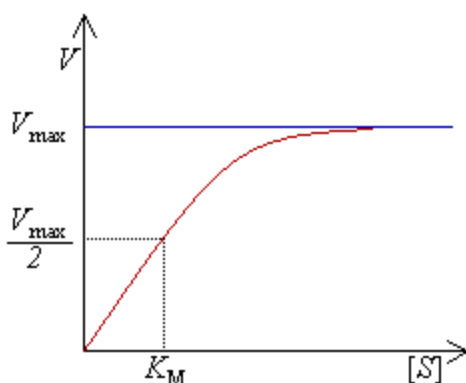


Figura 1-4: Efeito da concentração de substrato na velocidade de uma reação catalisada por uma enzima.

Os parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten (K_M e v_{max}) podem ser estimados por linearização da equação.

Os métodos mais utilizados de linearização são: Lineweaver-Burk, no qual os termos da equação de Michaelis-Menten são invertidos; Hanes-Woolf, em que a equação de Michaelis-Menten é invertida e multiplicada pela $[S]$ ou Eadie-Hofstee, no qual os termos da equação de Michaelis-Menten são invertidos, depois é realizada uma multiplicação cruzada entre os membros da equação, seguida da divisão dos termos da equação por $[S]$.

A constante de catálise (K_{cat}) ou o chamado *turnover number* de uma enzima é uma constante de velocidade de primeira ordem em unidades min^{-1} . Esta equivale ao número máximo de molécula de substrato, que são convertidas em produto, por unidade de tempo, por sítio catalítico, quando a enzima se encontra saturada com o substrato.

A eficiência cinética de uma enzima, relativamente a um substrato, é avaliada pela constante de especificidade, definida pela razão K_{cat}/K_M . Esta razão é uma constante de velocidade de segunda ordem, com unidades $\mu\text{M}/\text{min}$. A constante de especificidade dá-nos uma medida da rapidez, com que a enzima atua sobre um substrato em concentrações muito baixas. Assim, para a mesma concentração de enzima total, o seu valor permite comparar a eficiência cinética de enzimas diferentes ou, para a mesma enzima, a eficiência na catálise de substratos diferentes, quando estes estão na mesma concentração. O seu valor máximo é limitado pela velocidade de difusão do substrato até ao sítio catalítico da enzima.

Existe uma abordagem alternativa (20), para a equação de Michaelis-Menten clássica, que sugere que a velocidade inicial de hidrólise, v_0 , pode ser expressa como função da concentração inicial de enzima, $[E]_0$, ou seja:

$$v_0 = \frac{v_{emax} \cdot [E]_0}{K_e + [E]_0}$$

K_e - constante de meia saturação

Ortega *et al.* (2004) (21) descreveram uma cinética michaeliana para a atividade hidrolítica da poligalacturonase em diferentes preparações enzimáticas comerciais, com K_M de 0,043 a 0,220 mg mL^{-1} .

1.3 Imobilização enzimática

As enzimas apresentam importantes propriedades (elevada atividade, seletividade e especificidade), que as transformam num alvo de interesse industrial (22). A utilização de enzimas nesta área requer: a sua fácil recuperação da mistura de reação no final da operação; que a atividade catalítica permaneça estável durante longos períodos de tempo e aplicabilidade em processos contínuos (23).

Estes requisitos podem ser garantidos pela imobilização enzimática. Entende-se por enzima imobilizada, aquela que se encontra física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz, usualmente sólido, insolúvel em água e inerte, que não seja essencial para a sua atividade. De um modo geral, as enzimas imobilizadas apresentam uma melhor estabilidade térmica e de pH, são mais fáceis de separar e podem ser reutilizadas (23).

A imobilização de enzimas apresenta inúmeras vantagens em processamentos em larga escala, nomeadamente a possibilidade de reutilização do biocatalisador, a sua separação facilitada do meio reacional, a possibilidade de operar em modo contínuo, a prevenção da contaminação do produto processado, maior concentração de enzima, maior área superficial para a reação (24,25).

A utilização de enzimas imobilizadas permite a obtenção de produtos que são relativamente puros, um fator importante, especialmente na indústria farmacêutica e alimentar, onde a contaminação pode ter consequências graves a nível toxicológico, sensorial ou imunológico (26).

1.3.1 Efeitos causados pela imobilização

1.3.1.1 Efeitos estéricos e conformacionais

Quando a enzima é ligada ao suporte pode sofrer mudança na conformação, o que poderá afetar sua eficiência catalítica. Além disso, como o processo de interação enzima-suporte é quase sempre aleatório, poderá suceder que a região do sítio ativo se torne menos acessível ao substrato (impedimento estérico), o que acarreta, também, uma queda da eficiência catalítica.

1.3.1.2 Efeitos de difusão e transferência de massa

Quando a enzima é imobilizada num suporte sólido, o substrato deve difundir-se do seio da solução até ao sítio ativo da enzima. Assim, quando a velocidade de difusão do substrato é menor do que a velocidade de transformação pela enzima, a velocidade observada é mais baixa do que a esperada para uma dada concentração de enzima em solução, visto que nem todas as moléculas de enzima estarão em contato com o substrato, isto é, não se atinge a saturação.

Existem basicamente dois tipos de resistências difusionais:

a) Resistências difusionais externas: surgem devido ao fato de que o substrato deve ser transportado do seio da solução até a superfície de catálise, devendo, por conseguinte, atravessar uma camada líquida. É claro que a transformação do substrato somente ocorre após o mesmo ter alcançado a superfície do catalisador,

sendo que o consumo de substrato através da membrana líquida pode ser imaginado como resultado de um gradiente linear.

Estes efeitos podem ser minimizados, quer aumentando-se a agitação da suspensão, quer aumentando-se a velocidade de fluxo do substrato;

b) Resistências difusionais internas: surgem devido à movimentação do substrato no interior do meio catalítico poroso. Neste caso a difusão ocorre simultaneamente com a reação, o que provoca um comportamento não linear das variações dos gradientes de concentração do substrato no interior do sistema imobilizado.

1.3.1.3 Efeitos de circunvizinhança

É esperado que ao ligar-se a enzima a um suporte sólido inerte, ela ficará submetida a uma circunvizinhança algo diferente do que quando se encontrava solubilizada. Este fato poderá refletir-se sobre os valores dos parâmetros cinéticos (K_M e v_{max}).

Os efeitos da circunvizinhança, que dependem da natureza física e química do suporte, podem acarretar uma distribuição desigual do substrato, produto e cofatores entre a região vizinha ao sistema imobilizado e o resto da solução. Um exemplo desta influência é o caso das interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas entre o suporte e as espécies químicas de baixa massa molar, o que torna os parâmetros cinéticos dependentes da concentração das mesmas.

1.3.2 Métodos de imobilização enzimática

As enzimas podem ser imobilizadas por vários métodos (Figura 1-5), tais como ligação em superfície sólida (adsorção, ligação covalente, ligação iónica) confinamento, encapsulação e ligação cruzada ou reticulação (1,23,25,27,28).

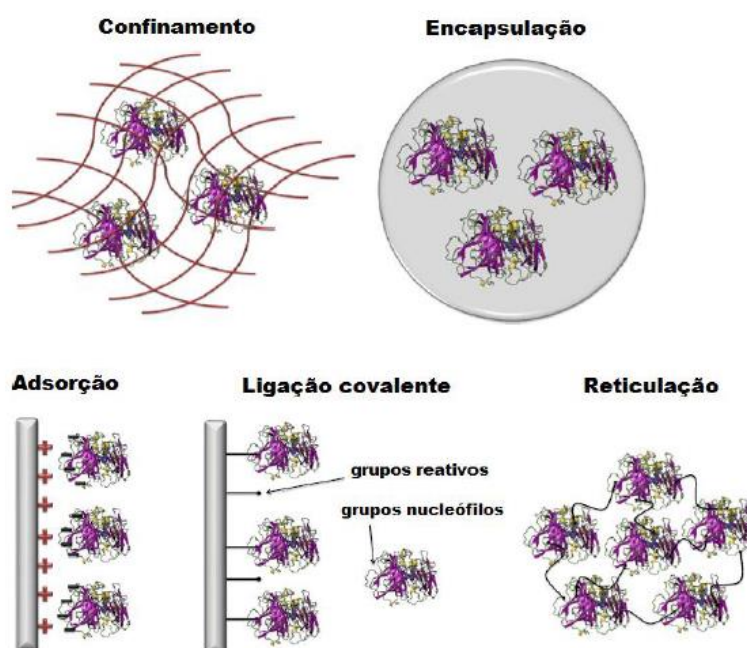


Figura 1-5: Esquema de métodos de imobilização de enzimas. Adaptado de Fernández-Fernández *et al.* (2013) (29).

A Tabela 1-3 apresenta a comparação das características dos diferentes métodos de imobilização.

Tabela 1-3: Caracterização dos métodos de imobilização. Adaptado de Hiteshi *et al.* (2013) (27).

Características	Ligação covalente	Ligação iónica	Adsorção	Reticulação	Aprisionamento
Preparação	Simples	Simples	Difícil	Intermédia	Intermédia/ Difícil
Custo	Baixo	Baixo	Elevado	Moderado	Baixo
Atividade	Elevada	Elevada	Baixa	Moderada/ Elevada	Elevada
Aplicabilidade	Baixa	Moderada	Moderada	Baixa	Moderada/ Elevada
Eficiência da imobilização	Baixa	Moderada	Elevada	Moderada	Moderada
Especificidade substrato	Não pode ser alterada	Não pode ser alterada	Pode ser alterada	Não pode ser alterada	Pode ser alterada
Recuperação	Possível	Possível	Impossível	Impossível	Impossível

Na imobilização por ligação em superfície sólida, a fixação da enzima num suporte, pode ocorrer através de vários tipos de interação como a adsorção física, a ligação iónica e a ligação covalente (1).

A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. O biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas), pontes de hidrogénio e ligações iónicas (30). As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada numa orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável. A grande desvantagem é a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iónica (31).

A ligação iónica é um método de imobilização que se baseia na atração da enzima pelo suporte sólido que contém resíduos para troca iónica (1).

A imobilização por ligação covalente consiste na fixação da enzima ao suporte através de ligações covalentes. A força desta ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima proporcionando uma grande rigidez na estrutura da mesma. Esta rigidez pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros (22).

Os protocolos para a imobilização covalente da enzima iniciam-se com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos. A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleófilos da enzima. Esta técnica apresenta como vantagens a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos e o evitar o fenómeno de dessorção (31).

A imobilização de enzimas por confinamento envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. À medida que ocorre a polimerização, a matriz polimérica vai se formando em torno da enzima, confinando-a dentro da sua estrutura. A vantagem de utilizar este método de imobilização é que o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando assim os efeitos de desnaturação por solventes orgânicos. Além disso, este é o método de imobilização mais fácil de proceder e pode ser empregado para imobilizar uma ampla variedade de enzimas, visto que o mesmo não promove alterações estruturais da enzima. Apresenta inconvenientes de limitações de transferência de massa e difusão dos substratos através da matriz (32).

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poli(acrilamida), gelatina, alginato, carragenano, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas numa única etapa. Porém existem algumas desvantagens que devem ser consideradas, como a possível inativação da enzima durante o processo de imobilização, a restrição de que o substrato tem de ser de baixa massa molecular, a elevada concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa.

A imobilização por ligação cruzada é um método que envolve o uso de agentes bifuncionais ou multifuncionais, em geral diaminas alifáticas ou glutaraldeído, que induzem a auto-reticulação das enzimas, com a formação de uma rede tridimensional de moléculas de enzima.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global da enzima, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada (33).

1.3.3 Suportes de imobilização enzimática

As enzimas podem ser imobilizadas em suportes naturais ou sintéticos. De acordo com a sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, podem ser porosos, não-porosos e de estrutura de gel (22,31).

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem uma elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. Contudo, é importante ter em conta o diâmetro dos poros do suporte, de modo que estes sejam suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato.

O inconveniente do uso dos suportes porosos, está relacionado com limitações difusionais, uma vez que o substrato além de se difundir do seio da solução para a superfície externa, deverá difundir-se também para o interior dos poros do suporte, no qual grande parte das moléculas do biocatalisador está situada. Todavia, a localização das enzimas no interior dos poros também lhes conferem uma proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional (22).

Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima na sua superfície externa, o que facilita a interação do biocatalisador com o substrato. No entanto, a reduzida área superficial apresentada por estes suportes é a sua mais notória desvantagem (22).

Os materiais orgânicos, em especial os polímeros, que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de enzimas.

Os polímeros naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, como baixo custo e fácil degradabilidade (31).

A escolha do suporte e/ou método depende da natureza da enzima, do substrato e da sua aplicação (26).

Na seleção do suporte de imobilização devem ser analisadas as suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção do suporte de imobilização são: área superficial, permeabilidade, solubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo (31,34).

Entre os diferentes suportes orgânicos naturais empregados na imobilização de enzimas destacam-se o quitosano e o alginato.

1.3.3.1 Quitosano

O quitosano (Figura 1-6 C) é um polissacárido natural, sendo considerado o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (Figura 1-6 B) (31,35).

O quitosano é produzido por desacetilação da quitina (Figura 1-6 A), encontrada na carapaça de crustáceos, no exoesqueleto de insectos e nas paredes celulares de fungos, por hidrólise alcalina a altas temperaturas.

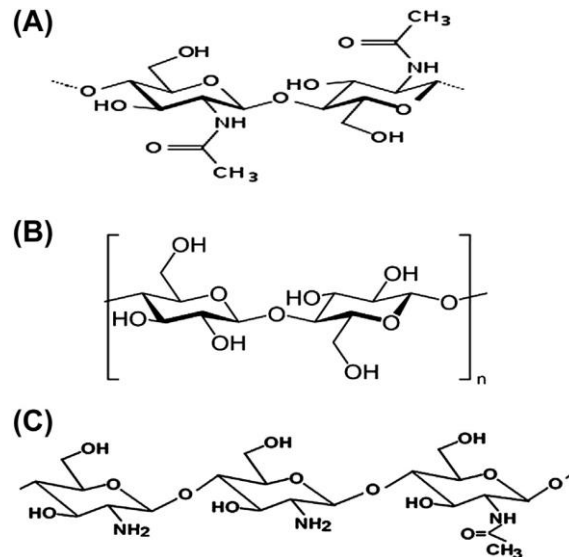


Figura 1-6: Estrutura da (A) quitina, (B) celulose e (C) quitosano.

Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiónico, com a protonação do grupo amino gerando o íon NH_3^+ (31,36).

A aplicação de quitosano como suporte de imobilização de enzimas deve-se às suas diferentes configurações geométricas e há presença de diferentes grupos funcionais, nomeadamente grupos amino e hidroxilo, que permitem a realização de múltiplas ligações com enzimas e a utilização de diferentes métodos de imobilização (31).

Os grupos amino tornam o quitosano um polieletrólito catiónico com um $\text{pK}_a \approx 6,5$. Esta basicidade confere propriedades singulares ao quitosano: solubilidade em meio ácido aquoso com $\text{pH} < 6,5$, e quando dissolvido possui elevada carga positiva nos grupos $-\text{NH}_3^+$, adere às superfícies carregadas negativamente, agrega-se com compostos polianiónicos e ocorre quelação com íões de metais pesados.

As excelentes propriedades gelificantes do quitosano são ocasionadas tanto pela sua solubilidade em soluções ácidas como pela sua capacidade da agregação com polianiões. A preparação de géis de quitosano é promovida pelo facto do quitosano se dissolver facilmente em soluções diluídas da maioria dos ácidos orgânicos, incluindo fórmico, acético, tartárico e cítrico, com formação de soluções viscosas que precipitam com o aumento do pH e através da formação de complexos ionotrópicos insolúveis em água com polieletrólitos aniónicos (36).

A inibição do crescimento de microorganismos é, também, uma propriedade do quitosano que tem sido relatada por vários investigadores (35).

1.3.3.2 Alginato

O alginato é um dos polímeros mais largamente utilizado em tecnologias de imobilização e microencapsulação. O alginato é um polissacárido, não tóxico, extraído de algas marinhas e é composto por cadeias alternadas de α -L- ácido gulurónico e β -D- ácido manurónico (Figura 1-7). Alginato é o termo normalmente utilizado para os sais do ácido algínico, mas também se pode referir a todos os seus derivados. O ácido algínico é um biopolímero que contém grupos carboxílicos capazes de formar complexos com iões metálicos. Uma propriedade importante do alginato é a habilidade de formar hidrogéis. Origina géis por ligação iónica a catiões polivalentes (37).

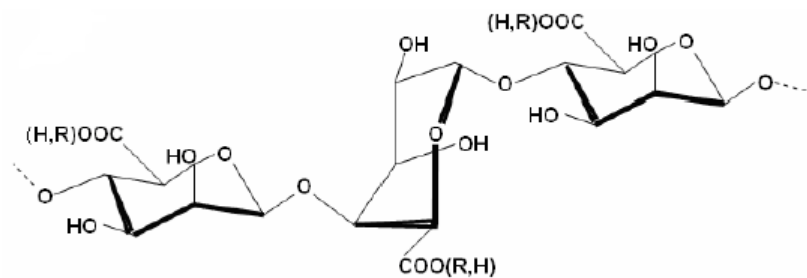


Figura 1-7: Estrutura do alginato.

Os suportes de alginato são geralmente produzidos por reticulação do grupo carboxilo do α -L- ácido gulurónico com uma solução do agente de reticulação catiónico, tal como cloreto de cálcio, cloreto de bário ou poli (L-lisina) (37).

As matrizes de alginato reticulado com iões Ca^{2+} são instáveis em ambiente fisiológico ou em soluções tampão com elevadas concentrações de iões fosfato e citrato, uma vez que podem extrair o cálcio do alginato, e conseqüente solubilização da matriz (37).

Buga *et al.* (2010) (38) estudaram as características físico-químicas da poligalacturonase do *Aspergillus niger* (SA6) por aprisionamento com alginato de cálcio.

Busto *et al.* (2006) (39) estudaram as propriedades de uma pectina liase imobilizada em alginato de sódio, para o tratamento de sumos de frutas.

1.4 Alta Pressão

O consumidor atual, tem manifestado uma crescente procura por produtos “fresh-like”, pouco processados e sem conservantes ou com um teor muito reduzido destes (40–42).

Na maioria dos métodos tradicionais de conservação, os alimentos são submetidos a altas temperaturas por um certo período de tempo, causando muitas vezes alterações indesejáveis nos produtos, como modificações de cor, sabor e perdas funcionais ou nutritivas (43,44).

Os métodos não-térmicos de processamento de alimentos (irradiação, pulso elétrico, alta pressão, microondas) têm conquistado interesse devido ao grande potencial que oferecem como processos alternativos ou complementares aos métodos tradicionais de conservação (40,43).

A Alta Pressão (acima de 100 MPa) é considerada um processo promissor, não térmico, capaz de inativar microrganismos patogénicos, bem como ativar e inativar enzimas, mantendo a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (44,45) e permitindo uma maior estabilidade na vida de prateleira dos alimentos (43,46). As características organolépticas dos alimentos são mantidas, uma vez que as ligações covalentes não são destruídas (46,47). A pressão altera distâncias interatómicas, atuando principalmente em interações fracas, em que a energia da ligação é dependente da distância, como as ligações de *Van der Waals*, forças electrostáticas, ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas das proteínas (48).

O tratamento a alta pressão causa a inativação de microrganismos e enzimas, enquanto deixa intactas moléculas pequenas, como a maioria das vitaminas e os compostos voláteis, que conferem sabor aos alimentos (43,46,49). Assim, a tecnologia de alta pressão tem a vantagem de causar a degradação mínima de sabor e de nutrientes quando comparada à pasteurização térmica tradicional.

O tratamento a alta pressão (também designado de alta pressão hidrostática ou ultra alta pressão) consiste em submeter alimentos líquidos ou sólidos, embalados ou não, a altas pressões, que podem variar de 100 a 800 -1000 MPa, com temperatura de 0°C a 100°C, durante poucos segundos a 20 – 30 minutos (40,45,49). Esta tecnologia pode ser aplicada com ou sem a combinação de altas temperaturas, possibilitando a sua utilização em alimentos termo-sensíveis (43).

Os sumos de frutas são produtos, em que a conservação através da tecnologia de alta pressão (Alta Pressão Hidrostática) apresenta vantagens, por serem produtos cujas características de sabor e frescura são degradadas quando submetidos a tratamento térmico. Desta forma, são esperadas perdas mínimas de nutrientes e vitaminas e alterações de sabor quase impercetíveis (43,45).

O produto tratado através de Alta Pressão tende a apresentar características nutritivas, funcionais e sensoriais mais próximas às do produto natural, quando comparado ao produto tratado termicamente, atendendo à vontade do consumidor moderno, que procura sumos cada vez mais similares aos sumos recém-extraídos (43).

O tratamento a alta pressão baseia-se em dois princípios gerais: o princípio de *Le Chatelier*, segundo o qual qualquer fenómeno (transição de fase, mudança de conformação molecular ou reação química) acompanhado por uma redução de volume é favorecido pelo aumento de pressão (e vice-versa). No caso de uma reação, a pressão alterará o equilíbrio na direção do sistema de menor volume; e o princípio isostático que indica que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea através do género alimentício. O processo de pressurização é, portanto, independente do volume e da forma da amostra, ao contrário do processo térmico (40,44).

Um sistema de alta pressão (Figura 1-8) consiste no vaso de alta pressão e no seu sistema de fecho, no sistema gerador de pressão, no dispositivo de controlo da temperatura e no sistema de manipulação do material.

Na tecnologia de alta pressão, a pressão pode ser gerada pelos métodos direto, indireto e térmico. No método direto, o meio transmissor de pressão contido na câmara é diretamente pressurizado por um pistão e gera pressão rapidamente. No entanto, restringe-se a equipamentos com pequeno volume, sendo indicado para laboratórios e plantas piloto.

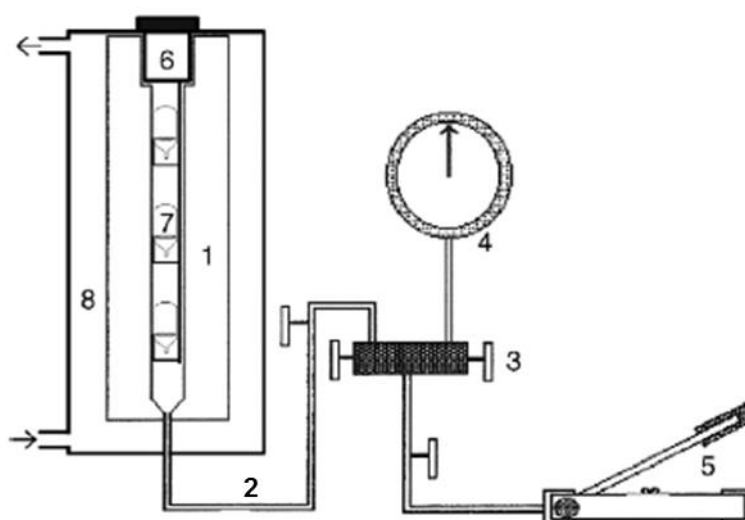


Figura 1-8: Esquema de sistema de alta pressão. (1) Vaso de alta pressão, (2) Tubo de aço, (3) Válvula, (4) Manómetro de pressão, (5) Bomba manual, (6) Sistema de fecho, (7) Célula de reação e (8) Banho termostático. Adaptado de Vila-Real et al (2007) (50).

No método indireto, utiliza-se intensificador de pressão para bombear o meio de transmissão de pressão do reservatório para dentro da câmara de pressão já fechada, sendo empregado a nível industrial, devido a sua maior capacidade de gerar pressão. No método térmico, emprega-se quando é necessário a associação de altas temperaturas ao processo de pressão, dado que a temperatura induz a expansão do meio de pressurização, gerando a pressão.

No tratamento por alta pressão, o produto é embalado em garrafas ou recipientes plásticos que são selados e colocados no interior do vaso de pressão. No final do processamento, o vaso é descomprimido, retira-se o produto tratado e o equipamento está pronto para começar novo ciclo (45).

1.4.1 Efeito da alta pressão nas proteínas

Os efeitos da alta pressão em proteínas estão principalmente relacionados à ruptura das ligações não covalentes dentro das moléculas de proteína. Tipos diferentes de interações contribuem na estabilização das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas. A pressão aplicada aos produtos causa o desdobramento das proteínas, e posterior agregação, levando à formação de gel, o que irá afetar a qualidade dos géneros alimentícios (51). As proteínas quando expostas a condições de alta temperatura, pH extremo, alta pressão, podem desnovelar-se e perderem parcialmente sua estrutura e ação. A Alta Pressão Hidrostática atua ao forçar a entrada de água no núcleo proteico, o que resulta na quebra das interações fracas e, conseqüentemente, no desnovelamento proteico (45)

Enzimas são proteínas em que a atividade biológica surge a partir de um sítio ativo, mantido pela conformação tridimensional da molécula. Pequenas alterações no sítio ativo podem levar a uma perda da atividade da enzima. A desnaturação proteica está associada a alterações conformacionais, que podem mudar a funcionalidade da enzima (como aumento ou perda da atividade biológica e mudanças na especificidade do substrato). A alta pressão afeta as enzimas alterando a sua conformação.

Relativamente a alterações no volume conformacional, pelo menos a baixas temperaturas, as ligações covalentes são pouco afetadas pela alta pressão e, conseqüentemente, a estrutura primária das proteínas permanece intacta durante o tratamento a alta pressão.

Contudo, quando expostas a pressões elevadas, ocorrem mudanças na estrutura secundária, o que ocasiona uma desnaturação irreversível.

Isto pode ser explicado pelo facto das pontes de hidrogénio, responsáveis pela estrutura helicoidal (secundária) dos peptídeos, serem favorecidas a baixas pressões e serem destruídas a pressões elevadas.

A ruptura de ligações iónicas também é afetada pelo aumento da pressão. O efeito da pressão sobre as interações hidrofóbicas é mais complexo, existindo estudos divergentes, uns apontam para efeitos de estabilização e outros sugerem desestabilização.

Alterações na estrutura terciária ocorrem a pressões superiores a 200 MPa, uma vez que as ligações iónicas e interações hidrofóbicas que mantêm a estrutura, são afetadas pelo aumento da pressão.

A estrutura quaternária, mantida por ligações não-covalentes, é afetada por uma pressão relativamente baixa (menor que 150 MPa).

Em geral, pressões acima de 300 MPa, à temperatura ambiente causam desnaturação proteica irreversível, enquanto pressões menores resultam em mudanças reversíveis na estrutura da proteína.

Os efeitos da alta pressão sobre enzimas podem ser divididos em duas classes. Na primeira, pressões relativamente baixas (≈ 100 MPa) têm mostrado ativação de algumas enzimas. Este efeito de estimulação foi apenas observado em enzimas monoméricas. Por outro lado, pressões muito maiores, geralmente induzem à inativação enzimática (43).

A inativação das enzimas por alta pressão é influenciada pelo pH, concentração de substrato, estrutura das subunidades da enzima e temperatura aplicada durante o processo. Este processo pode ser usado para inativar enzimas como a lipase, lipoxigenase, pectina metilesterase (PME), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), de forma a obter produtos com maior qualidade (52).

Diferentes combinações de temperatura e pressão, podem ser usadas para ativar ou inativar pectinases durante o processamento de forma a conseguir uma textura, que não é conseguida pelo processamento térmico (48).

Alguns investigadores reportaram efeitos de estabilização e ativação de enzimas. Segundo Fraeye *et al.* (2007) (53) a atividade ótima da pectinametilesterase do *Aspergillus aculeatus* é conseguida a 200 MPa a 45°C ou a 300 MPa a 50°C.

1.4.2 Efeito da alta pressão nas reações enzimáticas

Pedro *et al.* (2007) (54) estudaram o efeito da pressão numa reação enzimática com um biocatalisador imobilizado. Verificou-se um efeito positivo da pressão sobre a hidrólise da naringina pela naringinase imobilizada em micropartículas de alginato de cálcio confirmada pelo volume de ativação negativo. O uso da alta pressão também aumentou a estabilidade da naringinase imobilizada.

Ferreira *et al.* (2008) (24) avaliaram o efeito da alta pressão na hidrólise da naringina no sumo de toranja com naringinase imobilizada em esferas de alginato de cálcio. Verificou-se um efeito positivo da pressão na hidrólise da naringina pelo biocatalisador imobilizado em estudo.

Vila-Real *et al.* (2010) (55) verificaram o aumento da atividade e estabilidade das duas atividades (α -L-ramnosidase e β -D-glucosidase) da naringinase do *Penicillium decumbens*.

1.4.3 Efeito da alta pressão sobre os microrganismos

O efeito da alta pressão hidrostática sobre os microrganismos depende de vários fatores que estão relacionados com o próprio microrganismo, como a espécie, formato, tipo de coloração de *Gram*, fase de crescimento e idade da cultura. A morfologia das células dos microrganismos influencia a sensibilidade aos efeitos da pressão, sendo os bacilos mais sensíveis do que os cocos. As formas vegetativas dos eucariontes, tais como os fungos e leveduras, são inativadas por pressões entre 200 e 300 MPa (56).

A aplicação de alta pressão pode causar danos à fisiologia microbiana e sua viabilidade, danificando as células ou inativando-as. Assim, exercem efeito direto sobre a segurança dos alimentos, podendo prolongar a sua validade comercial. A germinação de esporos sob altas pressões depende da temperatura. Os esporos resistem à germinação próximo de 0°C, mesmo sob pressão de 1 000 MPa, enquanto sob temperatura moderada a germinação induzida por pressão pode ser obtida a 100 MPa. Quando germinados, podem ser destruídos a uma pressão de 600 MPa e temperatura entre 50 a 70°C.

Entretanto, estes efeitos não são consistentes, e uma combinação de alta pressão com aquecimento moderado pode ter efeito sinérgico ou antagónico no crescimento de microrganismos, na atividade enzimática e na reatividade química.

1.4.4 Efeito da alta pressão nos compostos bioativos

Relativamente à perda de compostos bioativos e atividade antioxidante, encontram-se descritos poucos trabalhos. O efeito da alta pressão sobre a estabilidade das vitaminas, é um dos estudos que desperta maior interesse entre os vários autores que tem avaliado este processo. Os investigadores utilizam a vitamina C. como um indicador de qualidade de frutas e vegetais, porque é um composto bioativo sensível que proporciona a indicação da perda de outras vitaminas e, por conseguinte, atua como um critério válido para outros componentes organoléticos ou nutricionais (44).

O processo de alta pressão associado a temperaturas moderadas pode contribuir para a manutenção do teor de vitaminas. No entanto, a combinação de pressão e temperaturas elevadas pode resultar na sua degradação ou perda. De modo geral, o ácido ascórbico é instável ao tratamento de alta pressão, combinado com temperaturas acima de 65°C, devido principalmente ao aquecimento adiabático, além da presença de oxigénio e matriz do alimento (57).

Bull et al. (2004) (58) não encontraram diferenças significativas no teor de vitamina C entre o sumo de laranja tratado a alta pressão (600 MPa/20 °C/1 min) e o sumo de laranja fresco.

1.4.5 Efeito da alta pressão nas características físico-químicas

As características físico-químicas são importantes devido ao seu impacto nos parâmetros de avaliação sensorial.

Existem vários estudos do efeito da alta pressão nas características físico-químicas de diferentes sumos de fruta. Bull *et al.* (2004) (58) não encontraram diferenças significativas de pH, °Brix e viscosidade entre o sumo de laranja tratado a alta pressão (600 MPa/20 °C/1 min) e o sumo de laranja fresco.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho compreendeu o desenvolvimento de esferas com pectinase e naringinase imobilizadas, com a finalidade de melhorar as características e a qualidade de sumos; e a investigação da sua aplicabilidade na produção de sumos funcionais.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos consistiram em: imobilizar a pectinase e a naringinase em diferentes suportes de imobilização (quitosano e alginato de cálcio); otimizar a atividade e estabilidade da pectinase e da naringinase imobilizadas de acordo com a concentração de substrato, concentração de enzimas e reutilizações; avaliar o efeito da alta pressão nos sumos (laranja, limão, toranja, framboesa e amora) com a pectinase e naringinase imobilizadas e comparar a atividade biológica de sumo processado e não processado em modelos de colite, *in vivo*.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Substratos

3.1.1.1 Específicos

A pectina (CAS n.9000-69-5) e a naringina (CAS n.10236-47-2) foram adquiridas à *Sigma-Aldrich*.

3.1.1.2 Sumos

Os substratos naturais utilizados foram sumo de laranja, sumo de limão, sumo de toranja, sumo de framboesa e sumo de amora. Os frutos para preparação destes sumos foram adquiridos no comércio local.

3.1.2 Enzimas

A enzima pectinase, produzida pelo fungo *Aspergillus aculeatus* (P2611- preparação enzimática que contém principalmente transeliminase, poligalacturonase e pectinesterase e pequenas quantidades de celulases e hemicelulases) e a enzima naringinase (CAS n. 9068-31-9), produzida pelo fungo *Penicillium decumbens* foram adquiridas à *Sigma-Aldrich*.

3.1.3 Suportes de imobilização

O quitosano (CAS n.9012-76-4), de peso molecular médio, foi adquirido à *Sigma-Aldrich* e o alginato de sódio (CAS n.9005-38-3), de algas castanhas, proveio da *Fluka/Biochemika*.

3.1.4 Outros reagentes

O ácido acético glacial 100% anidro (CAS n.64-19-7), cloreto de cálcio dihidratado (CAS n.10035-04-8), hidrogenocarbonato de sódio (CAS n.144-55-8), ácido metafosfórico (CAS n. 37267-86-0), L(+)- ácido ascórbico (CAS n. 50-81-7) , acetato de sódio trihidratado (CAS n.6131-90-4), ácido 3,5- dinitrosalicílico (CAS n. 609-99-4) e o hidróxido de sódio (CAS n. 1310-73-2) foram adquiridos à *Merck*.

O tripolifosfato de sódio (CAS n.7758-29-4) foi adquirido à *Alfa Aesar* e o L-(+)-ácido láctico proveio da *Fluka Analytical*. A D- glucose monohidratada (CAS n.14431-43-7) foi adquirida à *Sigma-Aldrich*.

O Sal de *La Rochelle* -tartarato duplo de sódio e potássio- (CAS n.6381-59-5) foi adquirido à *Scharlau Chemie* e o 2,6-diclorofenolindofenol (CAS n. 620-45-1) proveio da *Merck*.

O reagente de *Bradford Protein Assay* (CAS n.7664-38-2) foi adquirido à *Bio-Rad*.

O ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS) foi adquirido à *Sigma Chemical*. A cetamina (Imalgene® 1000) proveio da *Merial* e a xilazina (Rompun® 2%) proveio da *Bayer*.

3.1.5 Equipamento

Potenciómetro

A medição do pH de soluções foi realizada com um potenciómetro da *Metrohm*, modelo 744 pH Meter.

Balança

A pesagem de todos os reagentes utilizados, foi realizada com uma balança analítica *Mettler AE200*.

Incubadora de agitação orbital

Os ensaios de bioconversão das enzimas livres e das enzimas imobilizadas em esferas, foram realizados numa incubadora com agitação orbital, modelo *Agitorb 160E* da *Aralab*.

Espetrofluorímetro

No final de todos os ensaios de bioconversão das enzimas (pectinase e naringinase) com soluções de pectina, naringina e sumos, a concentração de açúcares redutores foi determinada em microplacas colocadas num espectrofluorímetro (*Anthos Zenyth 3100*), para leitura das absorvências.

Espetrofotómetro

A absorvência das amostras para análise dos carotenóides foi lida a um comprimento de onda de 450 nm contra um branco de água destilada, utilizando um espectralómetro *Hitachi U-2000 UV-VIS* (de feixe duplo e com uma gama de comprimento de onda que se situa entre os 220 e os 850 nm).

Alta Pressão

Os ensaios a alta pressão foram realizados num vaso de aço inoxidável imerso num banho de água termoestabilizada (*Julabo*, modelo HC/J18). O fluido de pressurização utilizado foi óleo hidráulico (*Enerpac HF 95 Y*) e a pressão requerida foi obtida com uma bomba manual de 400 MPa (*Enerpac*, modelo P228) e controlada utilizando uma pressão manométrica (*Budenberg Medidor Co. Limited*)

Bomba-seringa automática

As soluções de quitosano e alginato de sódio foram gotejadas, para obtenção de esferas com a enzima e/ou enzimas imobilizadas, recorrendo a uma bomba seringa automática da *New Era Pump Systems, Inc*

Refratómetro portátil

A determinação do °Brix foi realizada para amostras de sumos e sumos submetidos a alta pressão, utilizando um refratómetro portátil (*Instrutherm*).

Microscópio

O colón foi observado recorrendo a um microscópio (*Zeiss OPMI*).

3.1.6 Outros materiais

Agitador vai e vêm *Stuart SSL4*

Placa de aquecimento com agitação *Velp Scientifica*

Banho de água *memmert*

Microcentrifuga *Heraeus Biofuge Pico*

Vortex *Retsch Mixer*

Seringa de 10 mL *PIC Indolor*

Agulha *Terumo Neolus* de 0,6 mm

Micropipetas *Gilson* P1000, P200, P100 e P20

Eppendorfs de 1 mL

Microplacas *Nuclon™ Delta Surface* (96 poços)

Cuvete de plástico *Eppendorf*

Cuvete de vidro

Tubos de ensaio de vidro

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos analíticos

3.2.1.1 Método de determinação de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada através do método do ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS), definido por Miller (1959), adaptado à microescala (59). O ácido 3,5-dinitrosalicílico é um composto aromático que reage com açúcares redutores, em meio alcalino, com formação de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que absorve fortemente a luz, sendo possível, assim, estabelecer uma relação direta entre a medida colorimétrica e a quantidade de açúcares redutores presente. A reação resulta da oxidação do grupo carbonilo do açúcar redutor, a carboxilo.

Procedimento técnico

A concentração dos açúcares redutores foi determinada em microplacas (59) . A cada poço foi adicionado 85 μ L de reagente DNS e 85 μ L de amostra (ou padrão) a analisar. A microplaca foi coberta com uma tampa e recorrendo ao auxílio de um suporte metálico, aquecida a 100°C durante 5 minutos num banho de água. O conteúdo dos poços foi posteriormente transferido para uma nova microplaca, para leitura das absorvências em duplicado a 575 nm num espectrofluorímetro.

O reagente do método do DNS obteve-se através da dissolução de 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 100 mL de hidróxido de sódio 2N e 250 mL de água destilada, à temperatura ambiente. À mistura anterior adicionou-se 150 g de sal de *La Rochelle* e fez-se o volume para 500 mL com água destilada. O reagente foi armazenado em frasco de vidro âmbar, coberto com papel de alumínio, ao abrigo da luz.

Em todas as microplacas foram introduzidos controlos com soluções padrão de glucose a várias concentrações, isto é, foi realizada uma curva de calibração, para garantia da qualidade dos resultados obtidos e um branco com água ou tampão acetato de sódio 0,02 M pH 4,5.

Curva de calibração do método do DNS

Na Figura 3-1 é apresentada a curva de calibração linear do método de determinação de açúcares redutores utilizado no presente trabalho, efetuada com nove soluções padrão de glucose com concentrações entre 0,25 e 4 mM.

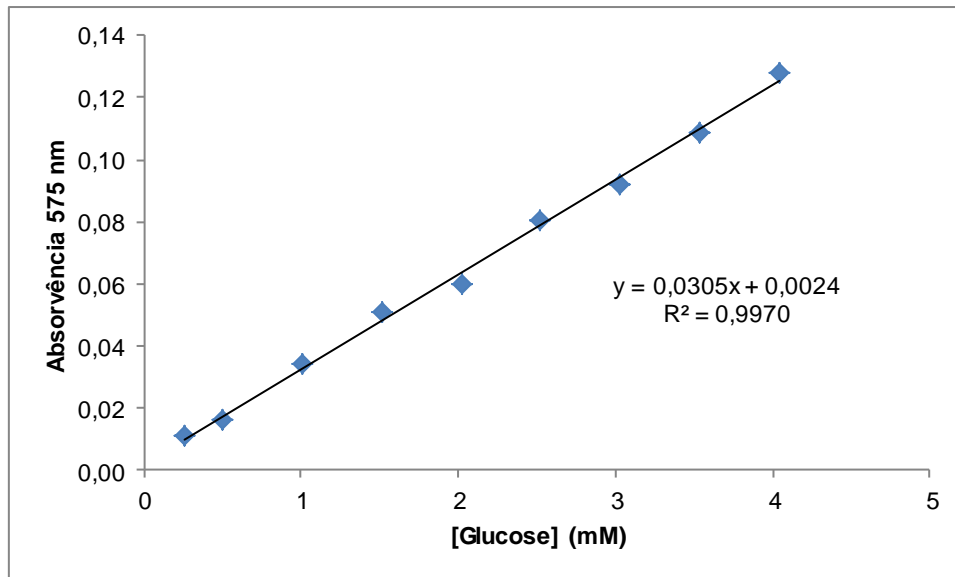


Figura 3-1: Curva de calibração linear do método DNS com soluções padrão de glicose.

3.2.1.2 Método Bradford

A concentração de pectinase, foi determinada através do método de Bradford. Este método baseia-se na formação de um complexo entre o corante azul brilhante de *Coomassie* presente numa solução ácida e as proteínas existentes em solução. Este complexo proteína-corante causa uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 para 595 nm.

Procedimento técnico

Em cada poço da microplaca colocou-se 50 μL de amostra (ou padrão), aos quais se adicionou 50 μL de reagente Bradford. A absorvência das amostras foi medida em triplicado a 595 nm, num espectralfluorímetro.

Curva de calibração do método Bradford com soluções padrão de pectinase

Para a realização da curva de calibração foram utilizadas soluções padrão de pectinase com concentrações entre 5 e 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Figura 3-2).

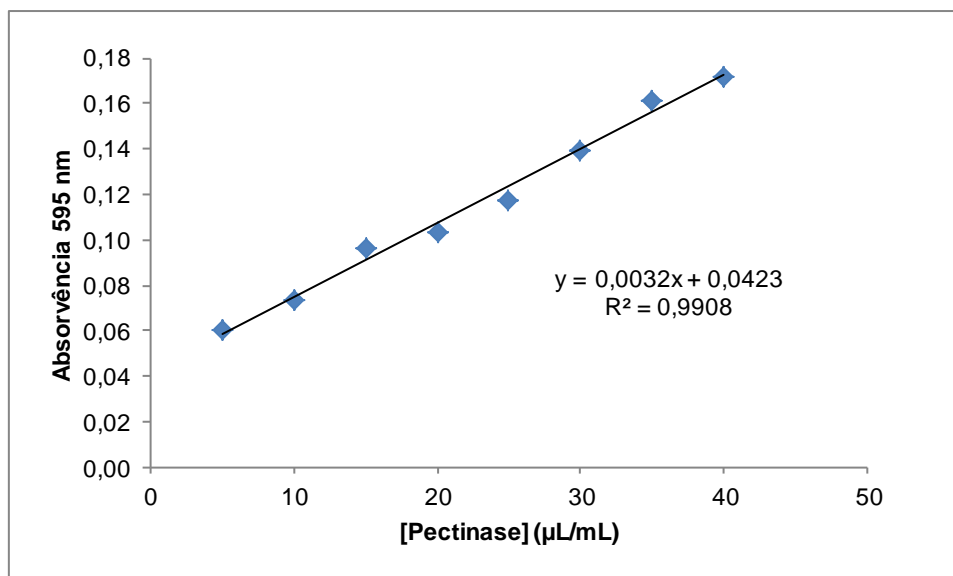


Figura 3-2: Curva de calibração do método Bradford com soluções padrão de pectinase.

3.2.1.3 Determinação do pH

Procedimento técnico

A determinação do pH em amostras de sumos submetidas a alta pressão foi efetuada num potenciómetro (*Metrohm 744*). A calibração do aparelho foi feita, antes de cada utilização, com soluções padrão de pH $7,00 \pm 0,02$ (25°C) e pH $4,00 \pm 0,02$ (25°C) da *Metrohm*. Seguidamente introduziu-se o valor da temperatura e lavou-se o microelétrodo de vidro com água destilada, procedendo-se depois à sua secagem. Depois colocou-se o microelétrodo em contacto com as amostras, para leitura dos valores de pH.

3.2.1.4 Determinação do ácido ascórbico (vitamina C)

A determinação analítica do teor de ácido ascórbico nas amostras de sumo foi baseada na titulação das amostras com uma solução corante padronizada de 2,6-diclorofenolindofenol.

Procedimento técnico

Os reagentes necessários para a realização deste método, o ácido metafosfórico a 3% e a solução de 2,6-diclorofenolindofenol foram preparados previamente. Para a preparação do ácido metafosfórico a 3%, dissolveram-se 16,30 g de ácido metafosfórico em 43,40 mL de ácido acético 100% glacial e 500 mL de água destilada. A preparação da solução de 2,6-diclorofenolindofenol fez-se por dissolução de 105 mg de bicarbonato de sódio em 375 mL de água destilada, dando origem a uma solução aquosa de bicarbonato de sódio à qual foram adicionadas 130 mg de 2,6-diclorofenolindofenol num volume de 500 mL de água destilada. Paralelamente foi preparada uma solução padrão de ácido ascórbico por dissolução de 10 mg de ácido ascórbico em 50 mL de solução de ácido metafosfórico a 3%.

Aferição e Padronização da solução de 2,6-diclorofenolindofenol

Dissolveram-se 2 mg de ácido ascórbico em 10 mL de ácido metafosfórico a 3%. Esta solução foi imediatamente utilizada para a padronização da solução de 2,6-diclorofenolindofenol devido à sua instabilidade. Seguidamente diluíram-se 5 mL da solução de ácido ascórbico em 5 mL de ácido metafosfórico a 3%. Titulou-se com a solução de corante até obtenção de cor rósea estável durante 15 minutos.

De modo a aferir a solução de 2,6-diclorofenolindofenol com uma solução padrão de ácido ascórbico transferiu-se 0,4 mL de solução padrão de ácido ascórbico para um balão de 10 mL e completou-se o volume com solução de ácido metafosfórico a 3%. Esta solução foi colocada num erlenmeyer de 25 mL e titulou-se com solução de 2,6-diclorofenolindofenol até ao aparecimento de uma coloração rósea estável pelo menos por 5 segundos. Depois realizou-se um ensaio em branco, titulando, para isso, 10 mL de solução de ácido metafosfórico.

Este procedimento foi realizado em triplicado e expressou-se a concentração da solução padrão de 2,6-diclorofenolindofenol em termos de mg equivalentes de ácido ascórbico.

O doseamento de ácido ascórbico nas amostras foi realizado da seguinte forma:

Centrifugou-se a amostra numa microcentrífuga e transferiu-se 500 µL de amostra (parte translúcida) para um balão de 5 mL e completou-se o volume com solução de ácido metafosfórico a 3%. Esta solução foi seguidamente titulada com uma solução de 2,6-diclorofenolindofenol até ao aparecimento de uma coloração rósea estável pelo menos por 5 segundos. No final, realizou-se um ensaio em branco titulando, 5 mL de solução de ácido metafosfórico a 3%.

3.2.1.5 *Análise dos carotenóides*

A absorvência das amostras foi determinada a um comprimento de onda de 450 nm contra um branco de água destilada, num espectrofotómetro.

3.2.1.6 *Determinação °Brix*

Homogeneizou-se a amostra, e colocou-se uma gota de amostra no vidro azul do refratómetro portátil (*Instrutherm*), sobre a qual se colocou a tampa de plástico. Seguidamente, apontou-se o refratómetro para uma fonte luminosa, de forma a conseguir visualizar uma linha, e registou-se a % Brix correspondente. Essa percentagem corresponde à concentração de açúcares presente na amostra.

3.2.2 Métodos experimentais

3.2.2.1 *Preparação de sumos*

As laranjas foram espremidas num espremedor elétrico para obtenção do sumo de laranja. O sumo de limão e toranja foram obtidos seguindo o procedimento do sumo de laranja.

As framboesas foram colocadas numa picadora obtendo-se uma polpa de framboesas. Esta polpa foi colocada num tamis e adicionou-se sobre esta, água (na proporção de 1 g de polpa para 1,2 mL de água), para obtenção do sumo de framboesa. O procedimento para obtenção do sumo de amora foi idêntico ao do sumo de framboesa, com alteração na quantidade de água (1g de polpa em 1,5 mL de água).

3.2.2.2 Atividade enzimática

Os ensaios com a enzima livre foram realizados a 45°C, num agitador orbital. Estes ensaios foram realizados com soluções padrão de pectina e naringina, obtidas por dissolução de pectina e naringina, respetivamente, numa solução tampão de acetato de sódio 0,02M, pH 4,5. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

3.2.2.3 Metodologia de superfícies de resposta

A Metodologia de Superfícies de Resposta (RSM) é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas, útil para a modelação e análise de aplicações onde a resposta de interesse é influenciada por variáveis (fatores) e o objetivo é otimizar essa resposta (60).

A abordagem experimental clássica, que consiste no estudo da variação de um fator mantendo os restantes constantes obrigava a grande número de ensaios, no presente estudo. Com base em estudos preliminares e tendo em conta os vários fatores intervenientes na bioconversão realizada com pectinase e naringinase, efetuou-se a modelação e otimização da bioconversão, em função das variáveis significativas no domínio experimental considerado, através da metodologia de superfícies de resposta.

A seleção de valores das três variáveis para o delineamento experimental foi desenvolvida através dos resultados dos testes preliminares, utilizando o programa *StatisticaTM* (versão 6, *Statsoft*, USA) (Tabela 3-1 e Tabela 3-2).

A significância dos resultados foi avaliada por análise de variância. Para cada efeito calculou-se os valores de p , como medida do nível de significância. De acordo com Haaland (1989) a interpretação dos níveis p , deve ser cuidadosa, já que estes valores, obtidos pela análise de variância, são por vezes uma aproximação grosseira do verdadeiro nível de significância. Este é função: do tamanho da amostra, do modelo utilizado, da região experimental e da presença de valores estranhos no conjunto de dados. Segundo o mesmo autor, é preferível aceitar níveis de significância superiores, isto é $p \leq 0,10$, do que correr o risco de rejeitar fatores importantes.

Foram ajustadas superfícies tridimensionais, descritas por equações polinomiais de 2ª ordem, aos valores de atividade enzimática e produção de açúcares redutores para o CCRD definido. Os coeficientes de 2ª ordem foram obtidos por análise de regressão. Os modelos desenvolvidos são equações matemáticas que permitem simular uma resposta.

O ajuste dos modelos foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2) e pelo coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Este coeficiente (R^2_{aj}) mostra como a variabilidade nos valores de resposta observada pode ser explicada pelos fatores ambientais e as suas interações.

Um maior R^2 , origina uma precisão na resposta elevada. Na prática, o R^2 deve ser pelo menos maior ou igual a 0,75; os valores superiores a 0,90 são considerados muito bons. O R^2_{aj} corrige o valor de R^2 tendo em conta o tamanho da amostra e o número de termos do modelo. Um modelo encontra-se ajustado se o valor de R^2_{aj} for elevado e semelhante ao de R^2 .

O programa *Statistica™* permite ajustar uma superfície aos pontos experimentais, em que a variável dependente (variável de resposta $-y$) é função das variáveis independentes (variável de decisão $-x$), acrescida do erro ε .

Tabela 3-1: Delineamento experimental para os ensaios com pectinase.

Pectina (mg/L)	Pectinase (%)	Tempo (min)
207	15	15
406	15	15
309	50	30
309	30	30
406	45	45
207	45	45
309	30	30
207	15	45
207	45	15
122	30	30
406	45	15
309	3,54	30
309	30	56,46
480	30	30
406	15	45
309	30	3,54

Tabela 3-2: Delineamento experimental para os ensaios com naringinase.

Naringina (mg/mL)	Naringinase (mg/mL)	Tempo
302	3,045	56,46
400	4,54	45
210	4,54	45
210	1,55	45
400	1,55	45
302	5,3	30
302	3,045	30
302	0,35	30
130	3,045	30
470	3,045	30
302	3,045	30
210	1,55	15
400	1,55	15
210	4,54	15
400	4,54	15
300	3,045	3,54

3.2.2.4 Métodos de imobilização

Para a imobilização das enzimas, pectinase e naringinase, foram usados três suportes: quitosano, alginato de cálcio e quitosano-alginato de cálcio.

3.2.2.4.1 Imobilização em quitosano

A metodologia de imobilização da pectinase e da naringinase em esferas de quitosano foi adaptada da técnica descrita por *Cho et al.* (61).

Para preparação de esferas de quitosano preparou-se 10 mL de uma solução de quitosano 1% (m/v) em ácido láctico 1% (v/v) e colocou-se em agitação a 80°C. Após arrefecimento, adicionou-se um volume de solução de enzima de forma a obter a concentração final desejada no meio reacional e procedeu-se à sua homogeneização.

A solução obtida foi gotejada (Figura 3-3) com o auxílio de uma bomba- seringa automática para 20 mL de uma solução de tripolifosfato de sódio 3%. As microesferas foram mantidas num agitador do tipo vaivém a 60 rpm, à temperatura ambiente, durante duas horas. As microesferas obtidas foram lavadas com água destilada, filtradas e secas com auxílio de papel de filtro.



Figura 3-3: Preparação de esferas de quitosano.

3.2.2.4.2 *Imobilização em alginato*

A imobilização da pectinase e da naringinase em esferas de alginato de cálcio foi realizada através da adição de um determinado volume/massa de enzima, a uma solução de alginato de sódio 1% (m/v) (obtida por dissolução do alginato em água desionizada) Esta solução foi gotejada sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,1M. A proporção utilizada foi de 1:2. As microesferas obtidas foram lavadas com água desionizada.

3.2.2.4.3 *Imobilização em quitosano-alginato*

Uma solução de alginato de sódio 1% (obtida com água desionizada) e à qual foi adicionada a enzima, foi gotejada numa solução de quitosano 1% (obtida por dissolução do quitosano numa solução de ácido láctico 1% a uma temperatura de 80°C com agitação) e de cloreto de cálcio 0,1M. A proporção utilizada foi de 1:2. As microesferas obtidas foram lavadas com água desionizada.

3.2.2.5 **Ensaio de bioconversão**

Nos ensaios de bioconversão foram recolhidas amostras do meio reacional do tempo 1 ao 150 minutos. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

3.2.2.5.1 *Esferas de quitosano*

Os ensaios de bioconversão com pectinase imobilizada em quitosano foram realizados a 45°C e a 175 rpm, em tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 4,5. Foram utilizadas cinco concentrações de pectinase imobilizada (2 µL/mL, 4 µL/mL, 8 µL/mL, 12 µL/mL e 16 µL/mL) e cinco concentrações de pectina (0,15 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,6 mg/mL).

Para os ensaios com a naringinase imobilizada em quitosano, foram utilizadas as condições descritas para a pectinase, com quatro concentrações de naringinase imobilizada (2 mg/mL, 6 mg/mL, 12 mg/mL e 18 mg/mL) e uma concentração de naringina (0,3 mg/mL).

A razão massa de esferas – volume de meio reacional utilizada foi de 1:4.

3.2.2.5.2 *Esferas de alginato*

Os ensaios de bioconversão com pectinase imobilizada em alginato foram realizados a 45°C e a 175 rpm, em tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 4,5, com uma concentração de pectinase imobilizada 16 µL/mL e uma concentração de pectina 0,6 mg/mL. Para o ensaio com a naringinase imobilizada em alginato, utilizou-se uma concentração de naringinase 18 mg/mL e uma concentração de naringina 0,5 mg/mL. A razão massa de esferas – volume de meio reacional para estes dois ensaios foi de 1:4.

Foram efetuados mais três ensaios em que a pectinase (16 µL/mL) e a naringinase (18 mg/mL) se encontravam imobilizadas nas mesmas esferas. Um ensaio com uma solução de pectina 0,6 mg/mL e naringina 0,3 mg/mL, outro ensaio com sumo de framboesa e outro ensaio com sumo de amora. A razão massa de esferas - volume de meio reacional utilizada foi de 1:8.

3.2.2.5.3 *Esferas de quitosano-alginato*

Os ensaios de bioconversão com pectinase imobilizada em quitosano-alginato foram realizados a 45°C e a 175 rpm, em tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 4,5. Foram utilizadas três concentrações de pectinase imobilizada (8 µL/mL, 12 µL/mL e 16 µL/mL) e cinco concentrações de pectina (0,15 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,6 mg/mL).

Para os ensaios com a naringinase imobilizada em quitosano-alginato, foram utilizadas as condições descritas para a pectinase, com quatro concentrações de naringinase imobilizada (2 mg/mL, 6 mg/mL, 12 mg/mL e 18 mg/mL) e cinco concentrações de naringina (0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL e 0,5 mg/mL).

Foram, também, realizados ensaios de bioconversão em que as duas enzimas foram imobilizadas juntas (ensaios descritos na Tabela 3-3) e ensaios em que foram utilizadas esferas em que as enzimas foram imobilizadas em separado, e no ensaio as esferas com pectinase imobilizada juntaram-se às esferas com naringinase imobilizada (ensaios descritos na Tabela 3-4).

Tabela 3-3: Ensaio de bioconversão com a pectinase e a naringinase imobilizadas simultaneamente nas esferas de quitosano-alginato.

Ensaio	[Pectinase] (μL/mL)	[Naringinase] (mg/mL)	Meio reacional	Razão massa de esferas: volume do meio reacional
1	8	18	Solução Pectina 0,6 mg/mL + Solução Naringina 0,3 mg/mL	1:8
2	16	18	Solução Pectina 0,6 mg/mL + Solução Naringina 0,3 mg/mL	1:8
3	16	18	Sumo limão	1:8
4	16	18	Sumo framboesa	1:8
5	16	18	Sumo Laranja	1:8
6	16	36	Solução Pectina 0,6 mg/mL + Solução Naringina 0,3 mg/mL	1:8
7	16	36	Solução Pectina 0,6 mg/mL + Solução Naringina 0,5 mg/mL	1:8
8	16	36	Solução Naringina 0,3 mg/mL	1:4

Tabela 3-4: Ensaio de bioconversão com a pectinase e a naringinase imobilizadas em esferas separadas de quitosano-alginato.

Ensaio	[Pectinase] (μL/mL)	[Naringinase] (mg/mL)	Meio reacional	Razão massa de esferas: volume do meio reacional
1	8	18	Solução Pectina 0,6 mg/mL + Solução Naringina 0,3 mg/mL	1:4
2	16	18	Solução Pectina 0,6 mg/mL + Solução Naringina 0,3 mg/mL	1:4
3	16	36	Solução Pectina 0,6 mg/mL + Solução Naringina 0,3 mg/mL	1:4
4	16	18	Sumo framboesa	1:4
5	8	18	Solução Pectina 0,6 mg/mL	1:4

3.2.2.6 Estabilidade operacional

A determinação experimental do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) (aquele em que a enzima ainda retém 50% da sua atividade inicial) foi utilizada para avaliação da estabilidade operacional. Este indicador foi estimado a partir da determinação das velocidades iniciais (atividade enzimática) de ensaios de bioconversão sucessivos em descontínuo. Para avaliar a estabilidade da pectinase e naringinase imobilizadas, as esferas foram reutilizadas seis vezes, em solução de pectina e naringina, respetivamente. Cada ensaio decorreu durante sessenta minutos. No final o meio de reação foi retirado, substituído por um novo meio e iniciou-se um novo ensaio.

Na Tabela 3-5 encontram-se apresentadas as condições dos ensaios de estabilidade da pectinase e da naringinase imobilizadas nos diferentes suportes de imobilização.

Tabela 3-5: Ensaios realizados para avaliação da estabilidade operacional.

Esferas	[Pectinase] ($\mu\text{L/mL}$)	[Naringinase] (mg/mL)	Meio reacional (mg/mL)	Razão massa de esferas:volume do meio reacional
Quitosano	16	-	Solução Pectina 0,6	1:4
Alginato de cálcio	16	-	Solução Pectina 0,6	1:4
Quitosano-alginato	16	-	Solução Pectina 0,6	1:4
Alginato de cálcio	-	18	Solução Naringina 0,5	1:4
Quitosano-alginato	-	18	Solução Naringina 0,5	1:4

3.2.2.7 Ensaios a alta pressão

Os ensaios de bioconversão a alta pressão foram adaptados da técnica descrita por Pedro *et al.* (2007) (54). Os ensaios foram realizados num recipiente de aço inoxidável imerso num banho de água termoestabilizado (Figura 3-4). A pressão e a temperatura foram mantidas constantes dentro de, respetivamente, ± 2 MPa e $\pm 0,1$ °C, relativamente à pressão e à temperatura alvo.



Figura 3-4: Aparelho de alta pressão utilizado nos ensaios.

As reações enzimáticas a alta pressão foram realizadas em sacos de plástico (Figura 3-5). A pressão foi aumentada de forma constante num período de 1-3 min, dependendo da pressão necessária. Posteriormente, a pressão foi diminuída dentro de um minuto e a reação foi interrompida imediatamente através da colocação das amostras em gelo.

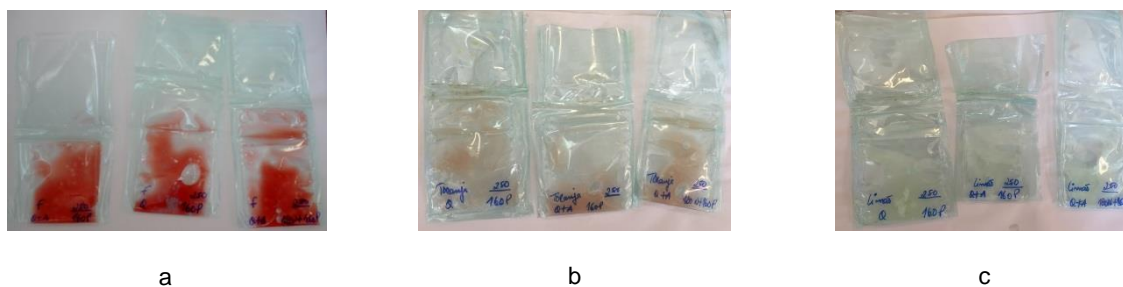


Figura 3-5: Bolsas de plástico seladas pelo calor, com sumo de framboesa (a), toranja (b) e limão (c) e esferas de quitosano e quitosano-alginato com pectinase e naringinase imobilizadas por inclusão.



Figura 3-6: Sumo de laranja, toranja, limão, framboesa e amora com esferas de quitosano-alginato com pectinase e naringinase imobilizadas.

Os ensaios de bioconversão a alta pressão foram realizados em sumo de laranja, toranja, limão, framboesa e amora com pectinase e naringinase imobilizadas em microesferas de quitosano-alginato (Figura 3-6), com pectinase imobilizada em microesferas de quitosano e com pectinase imobilizada em microesferas de quitosano-alginato, a diferentes pressões, 50,100,150 e 200 MPa, a 25°C, durante trinta minutos.

3.2.2.8 Análise microbiológica de sumos

Para verificar a ação antimicrobiana do quitosano e alginato de cálcio e o efeito da alta pressão nos sumos de laranja e toranja, foram realizados ensaios microbiológicos para a pesquisa de microrganismos totais a 30°C, baseados na ISO 4833-2.

3.2.2.8.1 Contagem de microorganismos totais a 30°C

As amostras utilizadas para a contagem de microorganismos a 30°C foram: sumo de laranja, sumo de toranja, sumo de laranja e sumo de toranja com esferas de quitosano-alginato e quitosano com pectinase e naringinase e só com pectinase imobilizadas por inclusão. Colocou-se um volume de 2 mL de sumo em contato com 0,25 g de esferas, com pectinase e naringinase imobilizadas, numa concentração de 16 µL/mL e 18 mg/mL, respetivamente. Os ensaios tiveram a duração de 30 minutos, a 25°C e a 100 MPa.

Foram preparadas duas diluições decimais, usando como diluente solução de água peptonada tamponada e como suspensão-mãe as amostras de sumo. A contagem de microorganismos a 30°C foi realizada em duplicado, com sementeira por espalhamento de 100 µL de cada diluição decimal no meio de cultura ágar, incubado a 30°C por 72 h.

Procedimento técnico

Na pesquisa de microorganismos totais, iniciou-se com preparação prévia dos diluentes (água peptonada tamponada) e meios de cultura de ágar segundo a ISO 11133. Em seguida prepararam-se as amostras apoiado na ISO 6887, ou seja, de cada frasco retirou-se 1 mL de amostra e transferiu-se para tubos de ensaio com 9 mL de diluente e a partir deste ponto, temos a solução mãe de cada amostra com a diluição 10^{-1} . Em seguida, de cada solução mãe retirou-se 1 mL e transferiu-se para novos tubos de ensaio com 9 mL de diluente- diluição 10^{-2} . A cada diluição realizada e antes de transferir o volume de amostra para placas, os tubos de ensaio foram sempre devidamente homogeneizados. Em seguida transferiu-se com uma pipeta esterilizada para as placas com o meio de cultura o volume de 1 mL de amostra e com um espalhador de vidro, espalhou-se de forma uniforme e o mais rápido possível pelo meio de ágar. Depois as placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 15 minutos e por fim e de acordo com ISO 7218, colocaram-se num incubador a 30°C durante 72h. Foram realizados duplicados de cada placa e todos os passos foram realizados em condições estéreis (62).

Os resultados são expressos pela contagem de colónias, devendo selecionar, se possível, as placas com menos de 300 colónias.

3.2.2.9 Ensaios *in vivo* em modelo animal de colite

(Os ensaios *in vivo* foram realizados em colaboração com o grupo de Investigação *Pharmacological and Regulatory Sciences*, do Instituto de Investigação do Medicamento, iMED.Ulisboa, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa)

O TNBS promove uma indução química da colite, por instilação intra-rectal, resultando em inflamação aguda com úlceras em animais de experiência. Este composto é considerado um hapteno, uma vez que presumivelmente se liga a proteínas endógenas na mucosa do cólon e induz uma resposta imunológica local através da ativação de macrófagos e células T. O TNBS foi diluído em etanol (EtOH), de modo a facilitar a disrupção da barreira mucosa (63).

3.2.2.9.1 Animais

Para os ensaios foram utilizados vinte ratinhos machos da estirpe CD-1, com 30-40 g de peso, 5-6 semanas de idade, alojados em gaiolas de polipropileno com acesso *ad libitum* a comida e água.

3.2.2.9.2 Grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados cinco grupos experimentais de ratinhos, submetidos à administração via intracolónica de diferentes preparações. Os animais, ratinhos, foram identificados, pesados e aleatoriamente divididos em cinco grupos, como descrito na Tabela 3-6.

Tabela 3-6: Caracterização dos grupos animais em estudo.

Grupo	Nº de animais (n)	Administração intracolónica	Tratamento oral
Sham (controlo negativo)	4	Soro fisiológico	Água desionizada
Etanol	4	EtOH 50%	Água desionizada
TNBS + etanol	8	TNBS + EtOH 50%	Água desionizada
TNBS + sumo de toranja	4	TNBS + EtOH 50%	Sumo de toranja
TNBS + sumo de toranja processado	3	TNBS + EtOH 50%	Sumo de toranja processado

3.2.2.9.3 Indução da colite

A colite foi induzida através da instilação de TNBS por via intracolónica em dose única como descrito por *Mateus et al.* (2013) (63). Antes do dia da indução, os ratinhos foram deixados em jejum (durante 24h). No dia da indução, após a anestesia dos animais por via intraperitoneal com cetamina 100 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg, foi administrado 2,5% de TNBS em 50% de etanol através de um cateter inserido 4 cm proximalmente ao ânus. Os animais foram mantidos em posição *Tredelenburg* durante um minuto para evitar o refluxo. Durante quatro dias, os animais receberam uma dose de sumo de toranja (grupo TNBS + sumo de toranja) e sumo de toranja processado (grupo TNBS + sumo de toranja processado), por via oral. Nos dias 4 e 7, retirou-se sangue por punção cardíaca e os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O abdómen foi aberto por uma incisão na linha média. O cólon foi removido, liberto dos tecidos adjacentes, aberto ao longo da borda antimesentérica e lavado com tampão fosfato salino. De seguida, foi observado por microscópio cirúrgico de bancada para avaliação das lesões. A consistência das fezes foi também avaliada após o sacrifício do animal.

3.2.2.9.4 *Análise histopatológica*

(A análise histopatológica foi realizada em colaboração com o grupo de investigação *Neuron-Glia Biology in Health and Disease*, do Instituto de Investigação do Medicamento, iMED.Ulisboa, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa)

As amostras de intestinos foram fixadas em 10 % de formalina tamponada neutra, processadas rotineiramente para inclusão em parafina, seccionados a 5 μ m, e coradas com hematoxilina e eosina. As características morfológicas do intestino do cólon foram avaliadas nas mesmas condições para todos estudados grupos (grupo TNBS, grupo etanol e sham grupo), de acordo com o número de dias após a indução e a localização das seções. Foi avaliado no dia 4 e 7, com três seções de cólon (proximal ao ceco, no meio do cólon distal e ao reto).

4 Resultados e Discussão

4.1 Ensaios enzima livre - Pectinase

4.1.1 Efeito da concentração de substrato - Pectina

Os ensaios de atividade foram realizados com uma concentração de pectinase de 200 μ L/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, e a 45 °C. Foram utilizadas concentrações de substrato entre 0,025 mg/mL e 0,6 mg/mL (Figura 4-1).

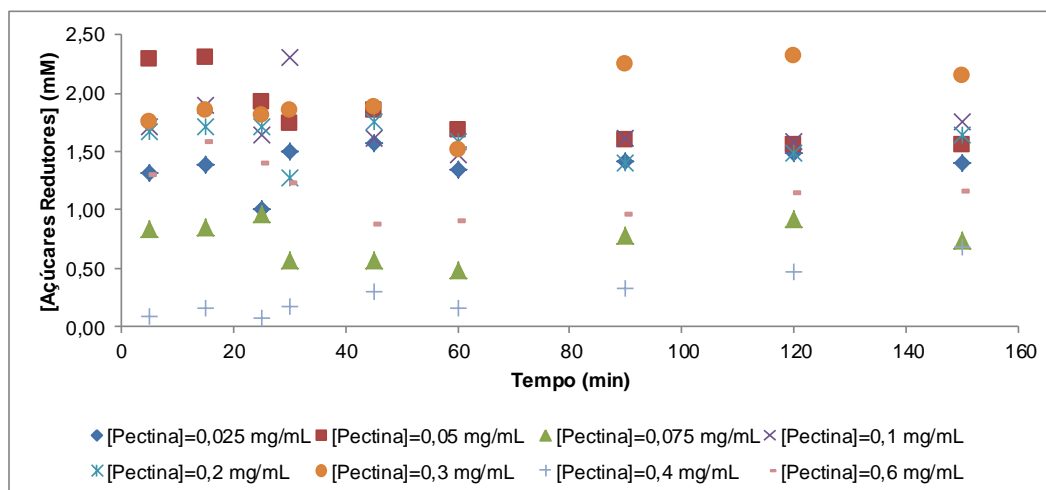


Figura 4-1: Ensaios com pectinase 200 μ L/mL com concentrações de substrato de 0,025 mg/mL a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Nos primeiros 15 minutos verifica-se um aumento da concentração de açúcares redutores. Após este tempo ocorre uma diminuição da concentração de açúcares redutores, possivelmente explicada pelo efeito inibição da enzima pelo produto formado (64).

A influência da concentração de pectina na atividade da pectinase (Figura 4-2) nas condições referidas foi avaliada com a determinação dos parâmetros cinéticos, K_M e v_{max} .

O aumento para o dobro da concentração de pectina (de 0,2 mg/mL para 0,4 mg/mL), resultou num aumento de 2,5 vezes na atividade da pectinase, respetivamente, de 3,28 μ M/min para 8,20 μ M/min.

Recorrendo ao suplemento *so/ver* do Microsoft Excel, os pontos experimentais obtidos nos ensaios de bioconversão, permitiram obter um gráfico que descreve os dados experimentais e a estimativa da v_{max} com um valor de 93,37 μ M/min e K_M com um valor de 3,61 mg/mL.

Saroglu *et al.* (2001) (30) determinaram um v_{max} de 0,0046 % (m/v)/s e um K_M 1,137% (m/v) para a pectinase livre.

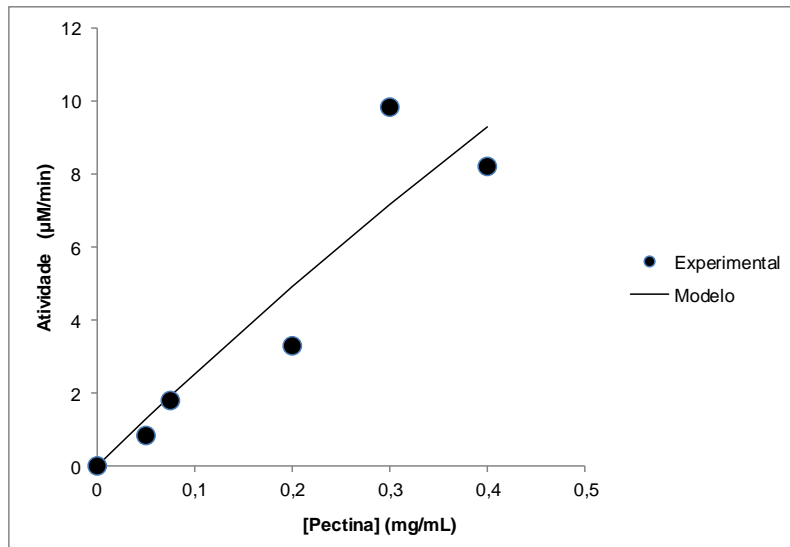


Figura 4-2: Representação da atividade da pectinase em função da concentração de pectina (pectinase a 200µL/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, a 45 °C e a 175 rpm).

4.1.2 Efeito da concentração de enzima- Pectinase

Os resultados da influência da concentração de biocatalisador na atividade enzimática são apresentados na Figura 4-3 e Figura 4-4.

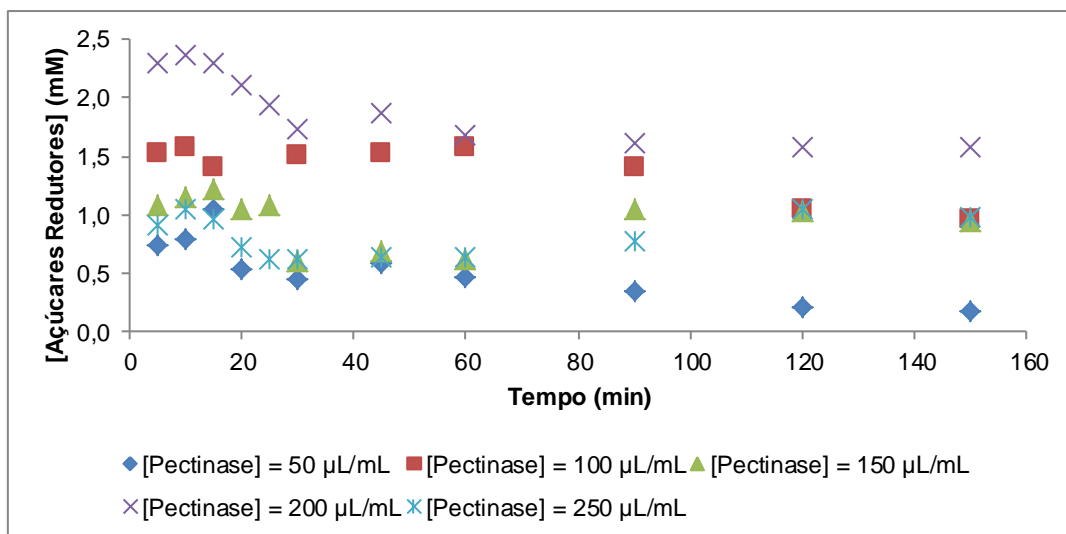


Figura 4-3: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de diferentes concentrações de pectinase no substrato pectina (0,05 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Verificou-se não haver diferença significativa na atividade hidrolítica para as concentrações de pectinase 50 µL/mL e 100 µL/mL. Para as concentrações de 150 µL/mL e 200 µL/mL verificou-se um aumento da atividade hidrolítica, respetivamente, 14,43 µM/min e 15,08 µM/min. Um valor de 25,9 µM/min foi obtido para o ensaio com uma concentração de pectinase 250 µL/mL.

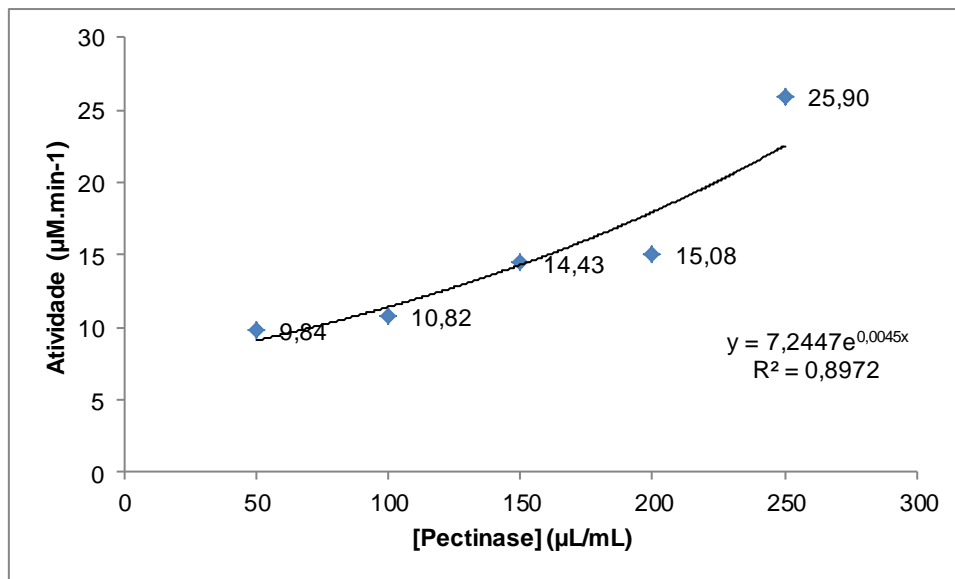


Figura 4-4: Efeito da concentração da pectinase na atividade hidrolítica da pectina (0,05 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5) a 45°C e 175 rpm.

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo exponencial, obtendo-se a equação apresentada na Figura 4-4. Observou-se um aumento exponencial da atividade com o aumento da concentração de pectinase.

4.1.3 RSM

4.1.3.1 Pectinase

A metodologia das superfícies de resposta (RSM) com um design baseado num ponto central (CCRD) foi realizada fazendo variar, em simultâneo, três variáveis independentes, concentração de pectinase, concentração de pectina e tempo. Foram efetuadas réplicas do ponto central e uma análise para os outros pontos, num total de 16 pontos, em 16 experiências. O efeito das três variáveis foi avaliado na bioconversão da pectina em açúcares redutores e ajustaram-se os resultados a uma função polinomial quadrática de segunda ordem. A concentração de açúcares redutores resultante da referida bioconversão foi determinada pelo método DNS. Inicialmente, os termos da equação polinomial quadrática gerada, foram analisados pelo teste de F (ANOVA), e foram avaliados os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Esses termos significativos estão identificados com o símbolo * na Tabela 4-1. Verifica-se que a concentração de pectinase (termo linear), a concentração de pectina (termo linear) e o tempo de reação (termo quadrático) têm efeitos significativos na bioconversão da pectina em açúcares redutores (Tabela 4-1).

Tabela 4-1: Efeito da concentração de pectinase, da concentração de pectina e do tempo na bioconversão da pectina em açúcares redutores.

Variável	[Açúcares redutores] (mM)
[Pectina] (termo linear)	0,0293*
[Pectina] (termo quadrático)	0,3478
[Pectinase] (termo linear)	0,0001*
[Pectinase] (termo quadrático)	0,7185
Tempo (termo linear)	0,2067
Tempo (termo quadrático)	0,0481*
[Pectina] x [Pectinase]	0,5205
[Pectina] x Tempo	0,8119
[Pectinase] x Tempo	0,7283

* $p < 0,05$

A concentração de açúcares redutores, como função da concentração de pectinase e da concentração de pectina, ao fim de 30 minutos, encontra-se representada na Figura 4-5. A avaliação do gráfico da superfície de resposta ajustada à formação de açúcares redutores permite identificar as regiões ótimas dentro da gama experimental. Verifica-se que se consegue uma atividade mais elevada ao selecionar concentrações de pectinase elevadas e concentrações de pectina superiores a 300 mg/L.

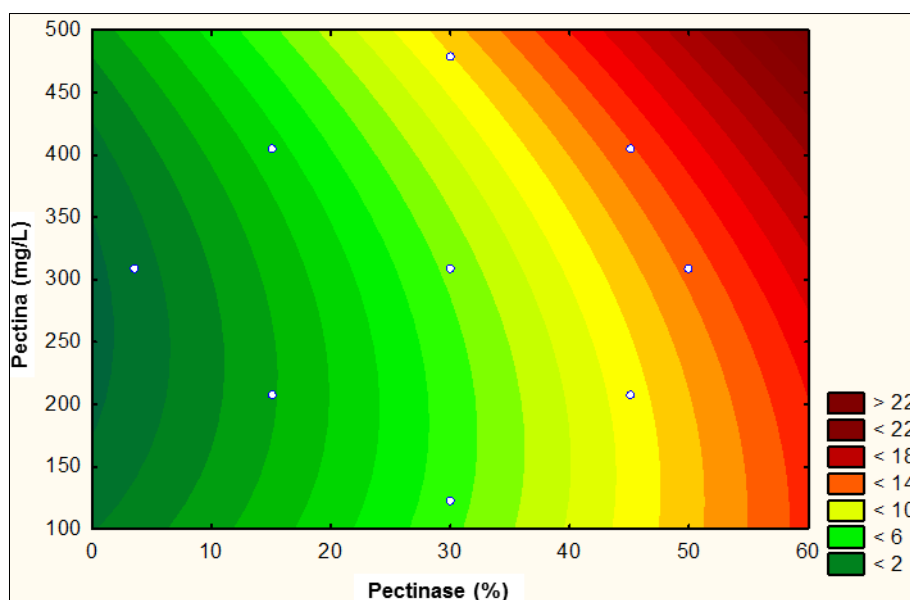
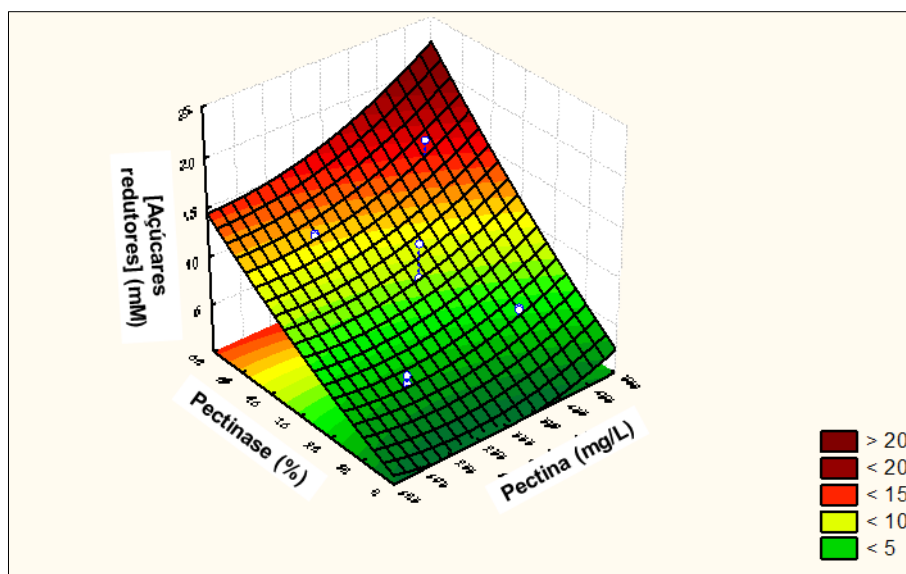


Figura 4-5: Superfície de resposta ajustada à formação de açúcares redutores como função da concentração de pectinase e da concentração de pectina, a 45°C ao fim de 30 minutos.

Relativamente ao efeito da concentração de pectina e do tempo na bioconversão de pectina (Figura 4-6), com pectinase a 30%, verifica-se que se a formação de açúcares redutores é favorecida a concentrações de pectina elevadas, logo nos primeiros minutos ou para tempo superior a 50 minutos.

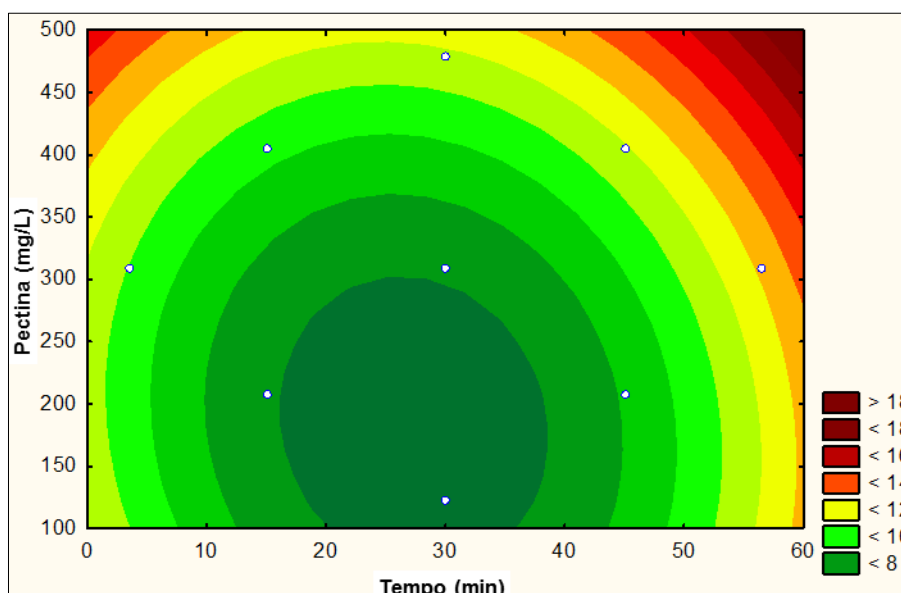
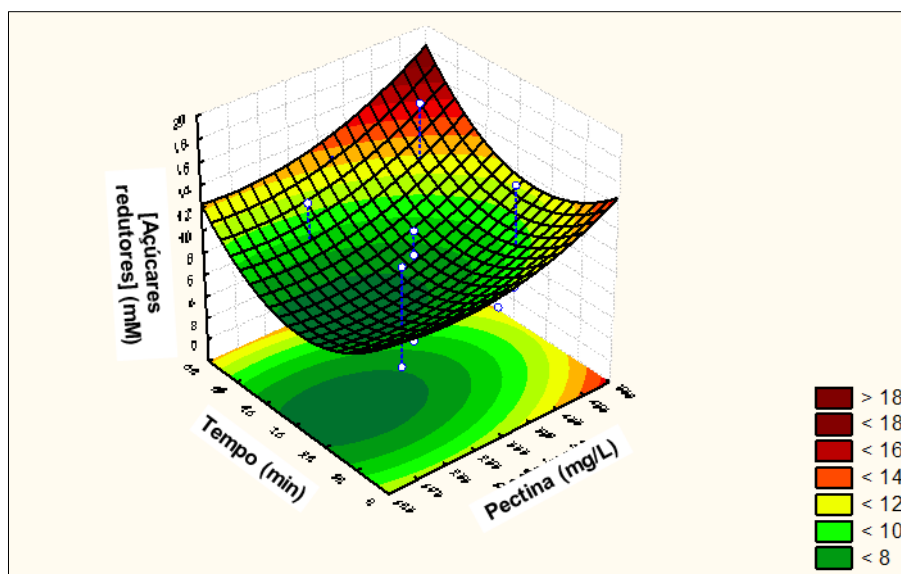


Figura 4-6: Superfície de resposta ajustada à formação de açúcares redutores como função do tempo e da concentração de pectina, a 45°C.

A avaliação da Figura 4-7, que relaciona a concentração de pectinase com o tempo, com pectina a 306 mg/L, indica que a formação de açúcares redutores é favorecida a concentrações mais elevadas de pectinase.

As superfícies de resposta traduzem-se por polinómios de segunda ordem, em função da concentração de pectinase, da concentração de pectina e do tempo. Na génese destes modelos consideraram-se os efeitos significativos ($p < 0,05$) e os que apresentaram um intervalo de confiança inferior ao efeito ou ao desvio padrão. Estes efeitos apesar de terem uma menor probabilidade de virem a ocorrer, os valores não são suficientemente baixos para que possam ser desprezados.

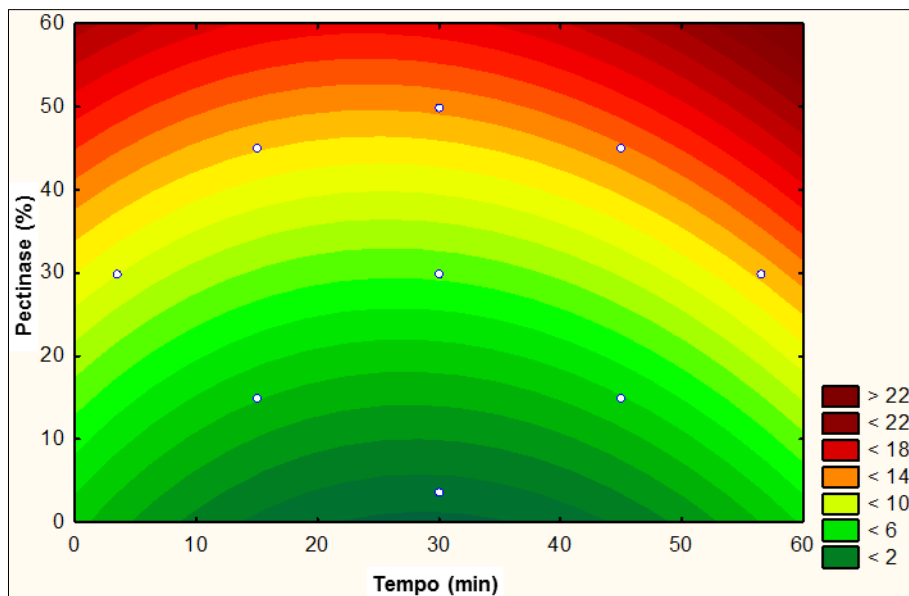
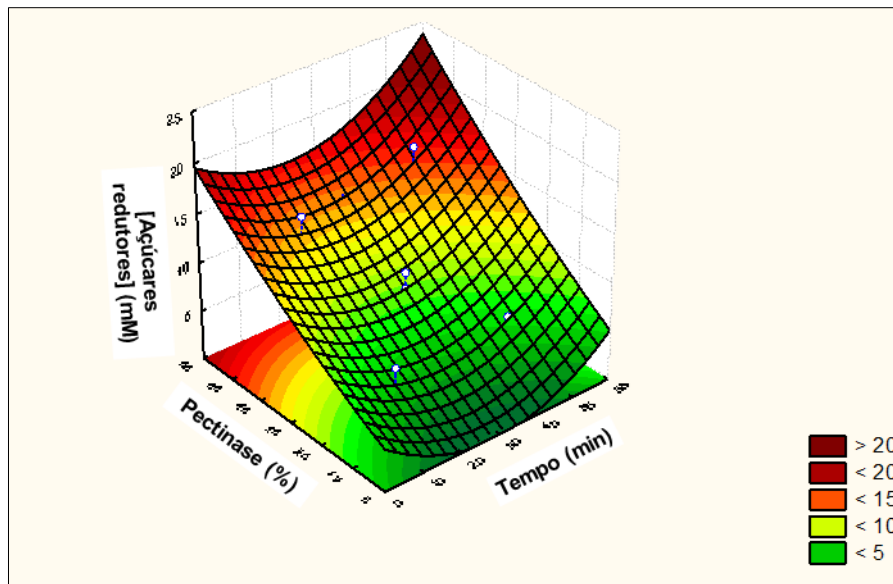


Figura 4-7: Superfície de resposta ajustada à concentração de açúcares redutores como função da concentração de pectinase e do tempo, a 45°C.

A função polinomial obtida para a descrição da superfície de resposta, da concentração de açúcares redutores em função da concentração de pectina e do tempo, apresentou elevados valores de R^2 e R^2_{aj} (R^2_{aj}), respectivamente de, 0,942 e 0,856, indicativo de um bom ajuste do modelo quadrático aos resultados experimentais.

4.1.3.2 Naringinase

A metodologia das superfícies de resposta com um CCRD foi realizada fazendo variar três variáveis independentes, concentração de naringina, concentração de naringinase e o tempo. Foram efetuadas réplicas do ponto central e uma análise para os outros pontos, num total de 16 pontos, em 16 experiências.

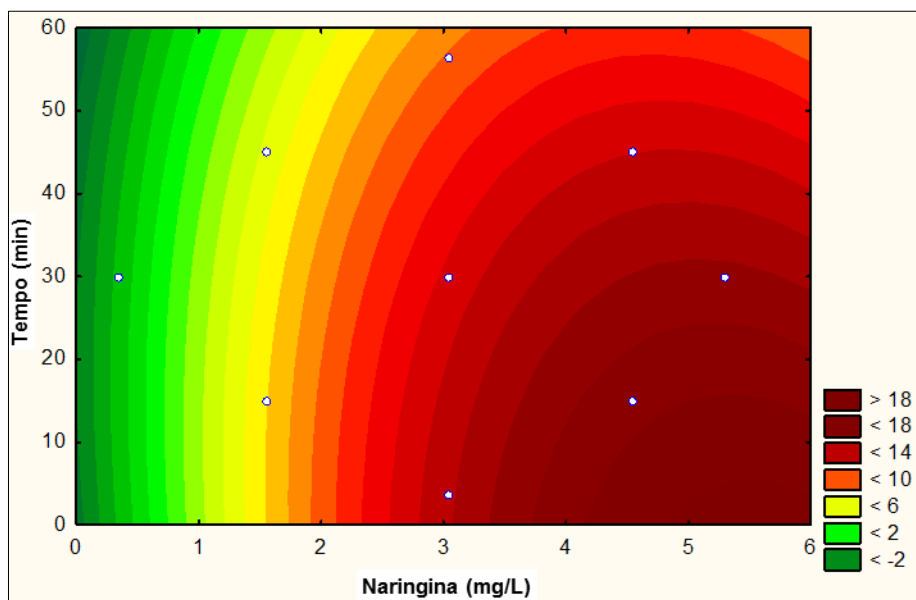
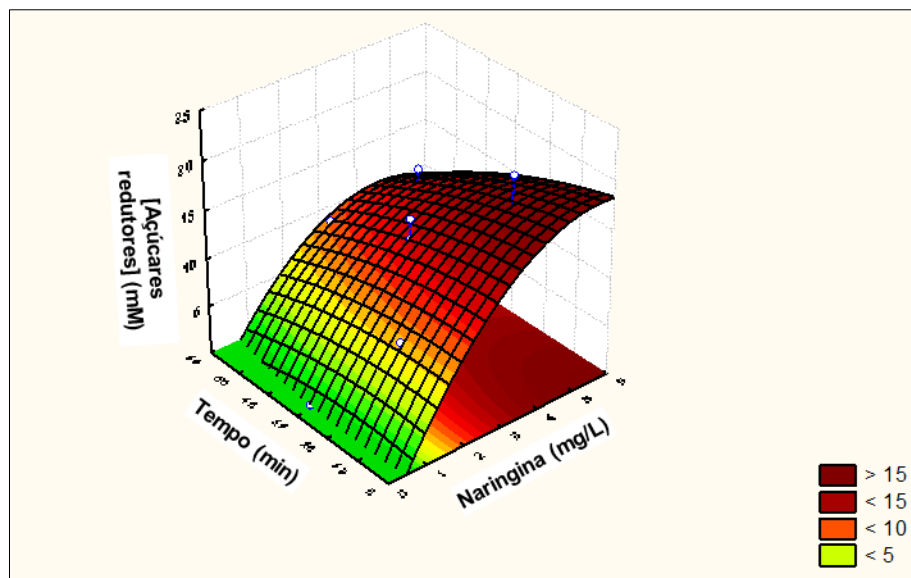


Figura 4-8: Superfície de resposta ajustada à concentração de açúcares redutores como função da concentração de naringina e do tempo.

A avaliação da Figura 4-8, que relaciona a concentração de naringina com o tempo, indica que a formação de açúcares redutores é favorecida a concentrações mais elevadas de naringina.

4.2 Ensaio de imobilização

4.2.1 Quitosano

4.2.1.1 Pectinase

Os ensaios de bioconversão com pectinase imobilizada em quitosano (Figura 4-9) foram realizados a 45°C e a 175 rpm, em tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 4,5.



Figura 4-9: Esferas de quitosano a 1% (m/v) com pectinase imobilizada por inclusão.

Os resultados dos ensaios de bioconversão encontram-se representados em termos de perfil de produção de açúcares redutores (mM), a partir de pectina (0,6 mg/mL) em função do tempo (minutos) na Figura 4-10, e em termos da atividade enzimática (em μM de açúcares redutores por minuto) na **Error! Reference source not found.**

Tabela 4-2: Atividade enzimática da pectinase imobilizada em quitosano 1% (m/v), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Pectinase ($\mu\text{L/mL}$) imobilizada em quitosano 1% (m/v)	2	4	8	12	16	16	16	16	16
Pectina (mg/ mL)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,15	0,3	0,4	0,5	0,6
Atividade enzimática ($\mu\text{M/min}$)	154,92	3,28	112,30	266,39	12,70	41,39	71,31	201,23	349,18

A duplicação de concentração de enzima (de 8 $\mu\text{L/mL}$ para 16 $\mu\text{L/mL}$), resultou num aumento de aproximadamente 3,5 vezes da atividade enzimática (de 112,30 $\mu\text{M/min}$ para 349,18 $\mu\text{M/min}$).

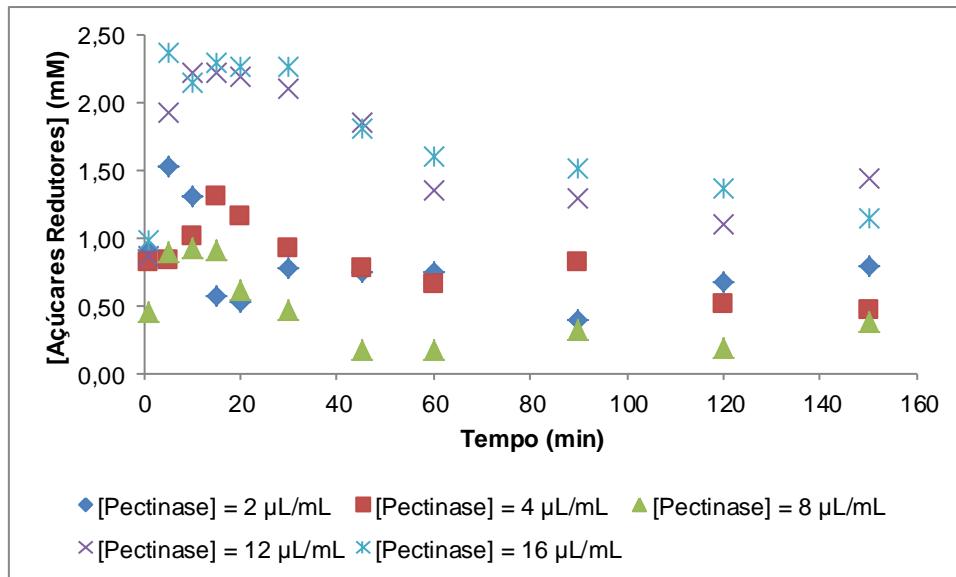


Figura 4-10: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de diferentes concentrações de pectinase imobilizada por inclusão (2-16 µL/mL) em quitosano a 1% (m/v) no substrato pectina (0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Na Figura 4-11 está representado o perfil de produção de açúcares redutores com a concentração de pectinase (16 µL/mL) no substrato pectina (0,15 mg/mL-0,6 mg/mL).

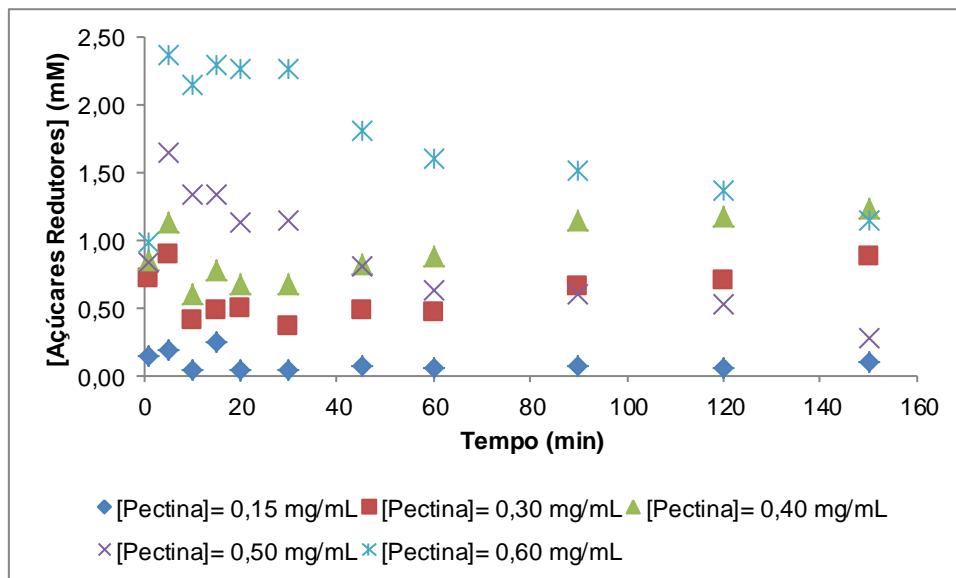


Figura 4-11: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de pectinase imobilizada por inclusão (16 µL/mL) em quitosano a 1% (m/v), substrato pectina (0,15 mg/mL-0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

A diminuição da concentração de açúcares redutores ao longo do tempo pode ser explicada pela inibição do produto formado como sugerido por Biz et al. (2014) (64).

Os resultados da influência da concentração de pectina na atividade enzimática são apresentados na Figura 4-12. Verificou-se um aumento exponencial da atividade com o aumento da concentração de pectina.

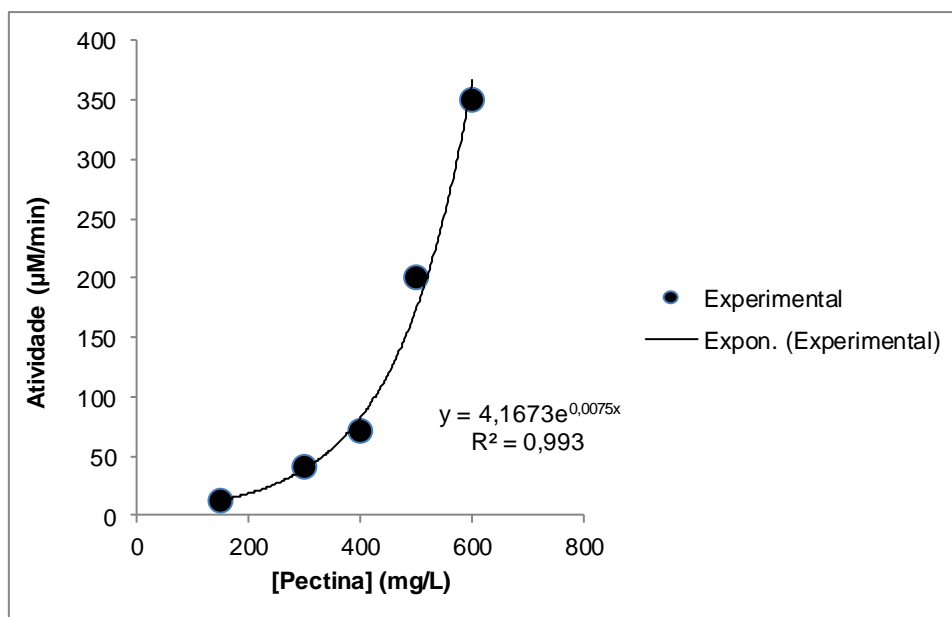


Figura 4-12: Representação gráfica, ajustada por regressão exponencial, dos pontos experimentais obtidos nos ensaios de bioconversação, realizados a 45°C e 175 rpm, com pectinase imobilizada em quitosano (16 µL/mL) e várias concentrações de pectina.

4.2.1.1.1 Estabilidade Operacional

A atividade hidrolítica da pectinase imobilizada em quitosano 1% (m/v) foi testada durante seis ensaios consecutivos, com duração de uma hora cada ensaio, a 45° C e 175 rpm (Figura 4-13).

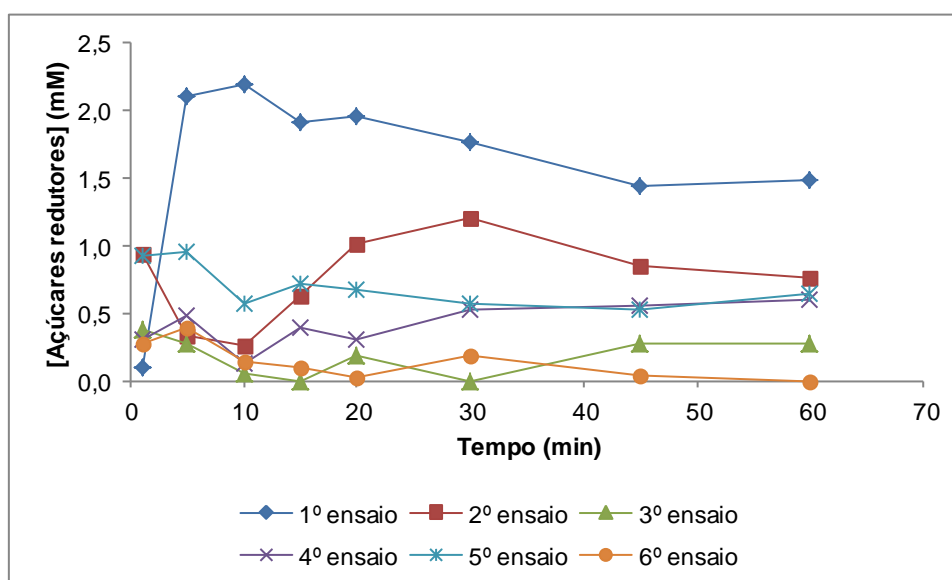


Figura 4-13: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de pectinase imobilizada em quitosano 1% (m/v), em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: enzima a 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).

A atividade residual da pectinase baixou para 52,20% no segundo ensaio e no terceiro ensaio para 9,91%, como se pode observar na Figura 4-14.

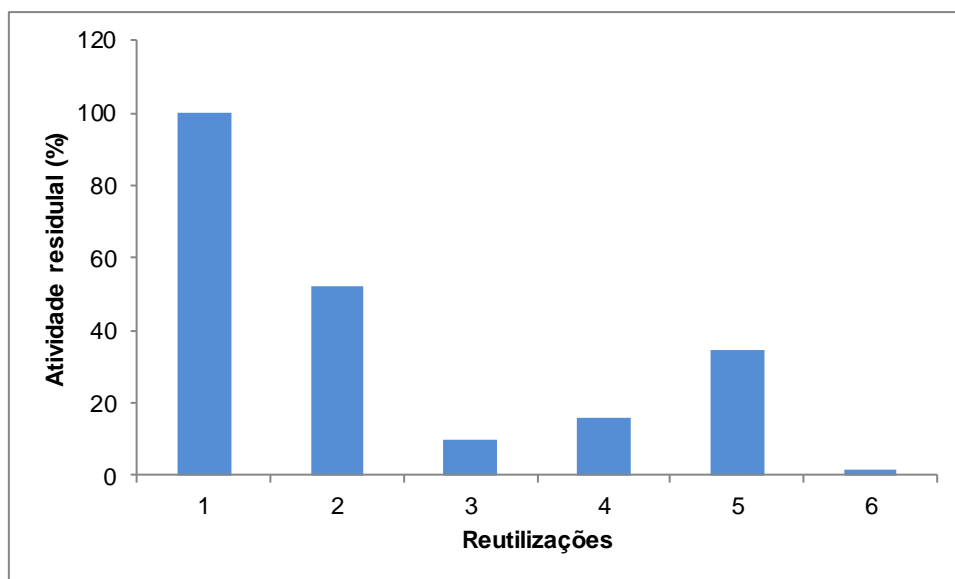


Figura 4-14: Atividade residual da pectinase imobilizada em quitosano (composição do meio reacional: enzima a 16 μ L/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).

4.2.1.2 Naringinase

Para os ensaios com a naringinase imobilizada em quitosano, foram utilizadas as condições descritas para a pectinase.

Os resultados dos ensaios com naringinase imobilizada em quitosano 1% (m/v) encontram-se representados na Figura 4-15 e resumidos na Tabela 4-3.

Tabela 4-3: Atividade enzimática da naringinase imobilizada em quitosano 1% (m/v), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Naringinase imobilizada (mg/mL) em quitosano a 1% (m/v)	Atividade enzimática (μ M/min)
2	6,39
6	9,18
12	25,08
18	32,46

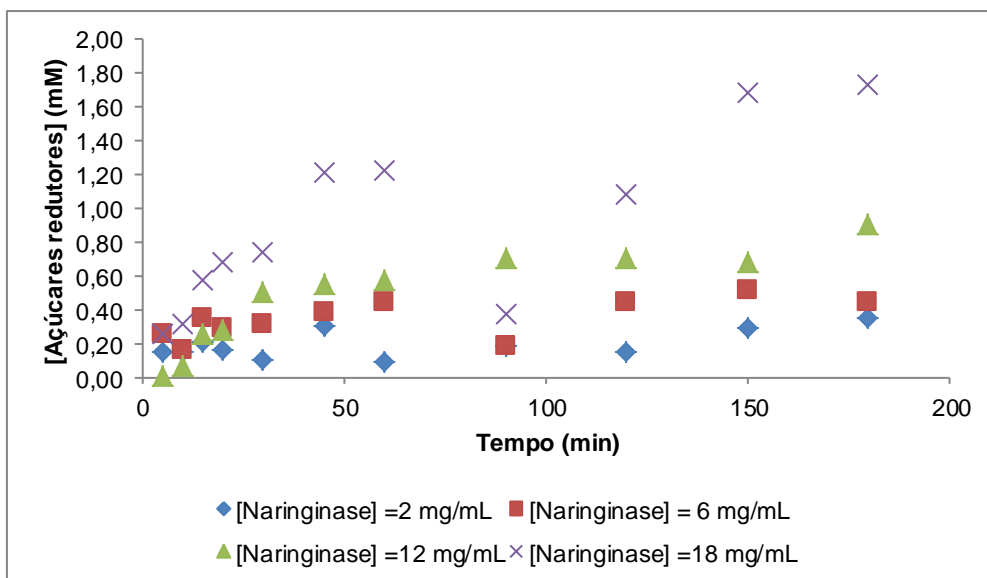


Figura 4-15: Perfil de produção de açúcares redutores com esferas de naringinase imobilizada por inclusão em quitosano a 1% (m/v) com [Naringina] = 0,3 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Com o aumento da concentração de naringinase, ocorreu o aumento da atividade enzimática (Figura 4-16).

Recorrendo ao suplemento *so/ver* do Microsoft Excel, os pontos experimentais obtidos nos ensaios de bioconversão, permitiram obter um gráfico que descreve os dados experimentais e a estimativa da v_{max} com um valor de 253,48 $\mu\text{M}/\text{min}$ e K_M com um valor de 119,89 mg/mL.

Vila Real *et al.* (2010) (59) referiu um K_M de 0,55 mM e v_{max} de 0,063 mM/min para naringinase livre a 30°C e pH 4.0, enquanto Pedro *et al.* (2007) (54) referiu valores de 0,303 mM e 0,042 mM/min para a naringinase imobilizada em alginato de cálcio.

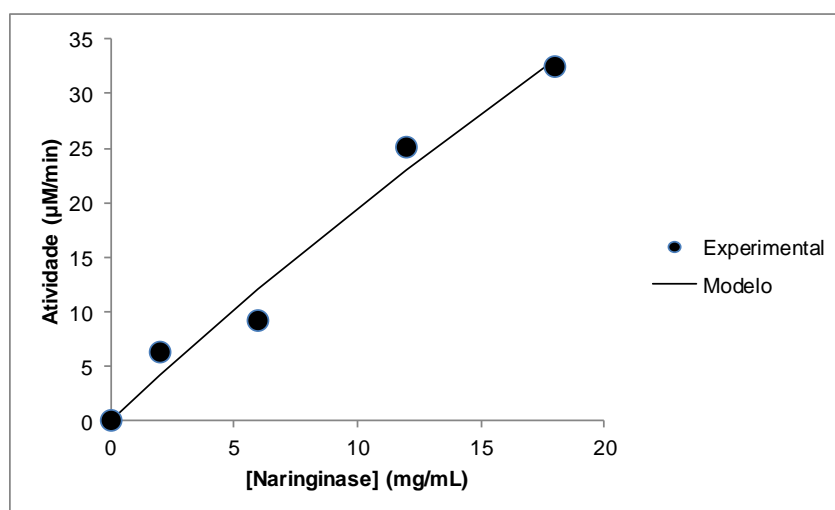


Figura 4-16: Atividade enzimática em função da concentração de naringinase imobilizada em quitosano, naringina 0,3 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm. A linha representa o ajuste aos pontos experimentais.

Após a realização dos ensaios descritos anteriormente, os ensaios com naringinase imobilizada em quitosano 1% (m/v) tiveram de ser suspensos, uma vez que se começou a obter uma massa quando se gotejava a suspensão de quitosano com naringinase na solução de tripolifosfato de sódio.

4.2.2 Alginato

Na Figura 4-17 encontra-se o perfil de açúcares redutores da pectinase e a naringinase imobilizadas juntas nas esferas de alginato de cálcio a 1%..

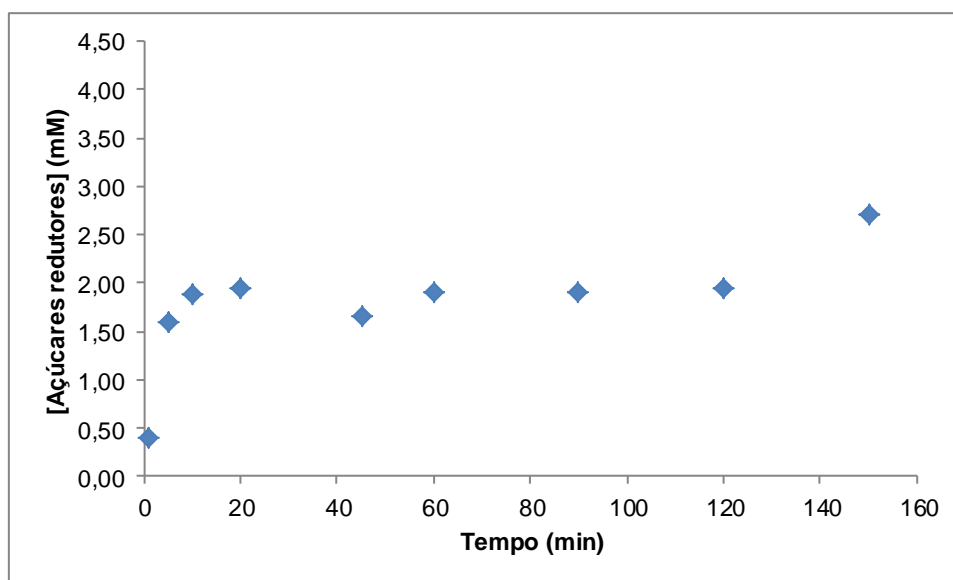


Figura 4-17: Perfil de produção de açúcares redutores da pectinase (16 $\mu\text{L/mL}$) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas em alginato de cálcio 1%, em 0,6 mg/mL de pectina e 0,3 mg/mL de naringina.

Nos primeiros 20 minutos atingiu-se uma concentração de açúcares redutores (≈ 2 mM), que se manteve ao longo do tempo de reação.

4.2.2.1 Pectinase

4.2.2.1.1 Estabilidade Operacional

A atividade hidrolítica da pectinase imobilizada em alginato de cálcio 1% (m/v) foi testada durante seis ensaios consecutivos, com duração de uma hora cada ensaio, a 45°C e 175 rpm (Figura 4-18).

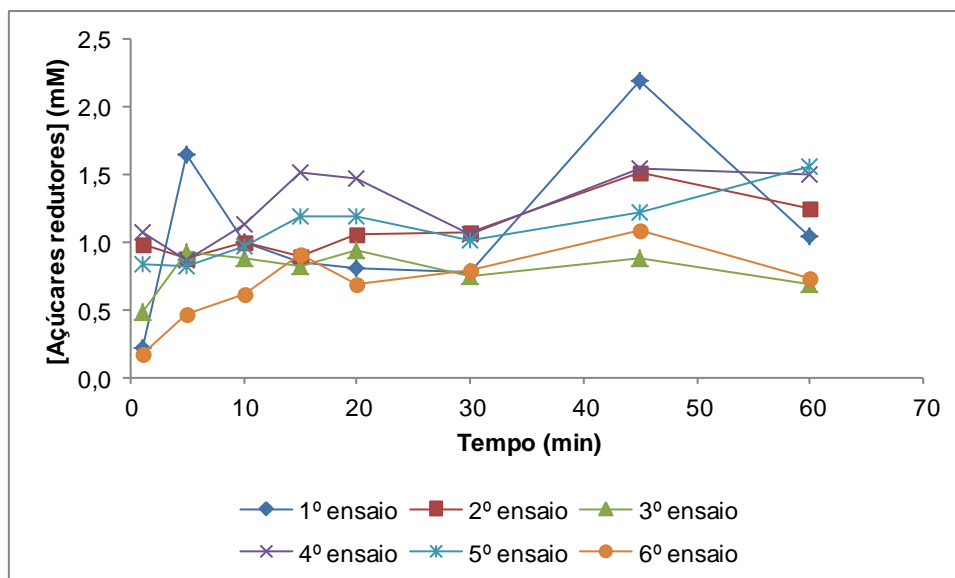


Figura 4-18: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de pectinase imobilizada em alginato de cálcio, em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: [Pectinase] = 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,00).

A atividade residual da pectinase (Figura 4-19) no segundo ensaio aumentou para 131,40% e no quarto ensaio 180,66%. O valor de atividade residual mais baixo foi obtido no sexto ensaio (112,30%). Este valor foi semelhante ao obtido no terceiro ensaio (115,23%).

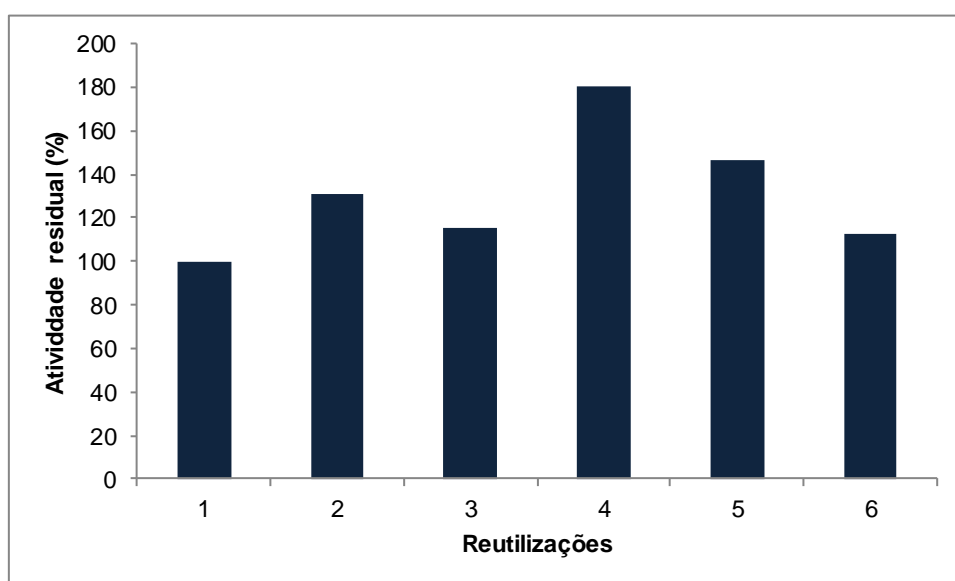


Figura 4-19: Atividade residual da pectinase imobilizada em alginato (composição do meio reacional: enzima a 16 µL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).

Buga *et al.* (2010) (38) imobilizou poligalacturonase de *Aspergillus niger* em alginato de cálcio e obteve uma redução de 34,56 e 14,81% da atividade inicial, na segunda e terceira reutilização, respetivamente.

Os resultados diferem, possivelmente devido ao facto, de termos utilizado uma mistura de pectinase com várias enzimas.

4.2.2.2 Naringinase

4.2.2.2.1 Estabilidade Operacional

A atividade hidrolítica da naringinase imobilizada em alginato de cálcio 1% (m/v) foi testada durante seis ensaios consecutivos, com duração de uma hora cada ensaio, a 45°C e 175 rpm (Figura 4-20).

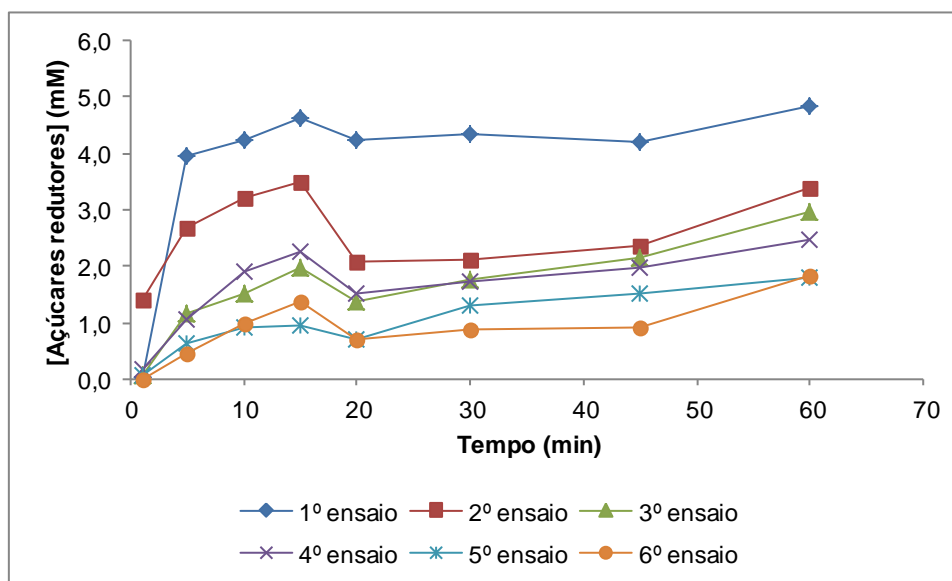


Figura 4-20: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de naringinase imobilizada em alginato de cálcio, em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: [Naringinase] = 18 mg/mL e naringina a 0,5 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,00).

De um modo geral, a atividade de uma enzima diminui exponencialmente ao longo do tempo, obedecendo a um modelo de 1ª ordem de desativação de enzimas. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) é aquele em que a enzima ainda retém 50% da sua atividade inicial. A partir do ajuste exponencial dos valores de atividade residual obtidos para os seis ensaios (Figura 4-21) foi possível calcular a constante de desativação (K_d), com um valor de 0,282, e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) com um valor estimado de 2,45 h.

Ribeiro *et al.* (2011) (12) reportou um tempo de meia vida de 4,5 h.

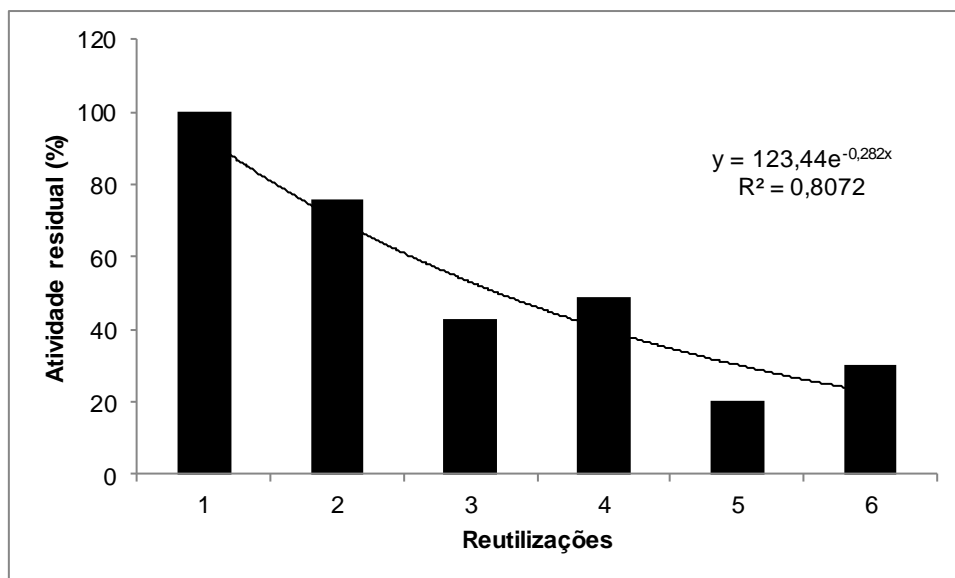


Figura 4-21: Atividade residual da naringinase imobilizada em alginato de cálcio (composição do meio reacional: enzima a 18 mg/mL e naringina a 0,5 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).

4.2.3 Quitosano – Alginato

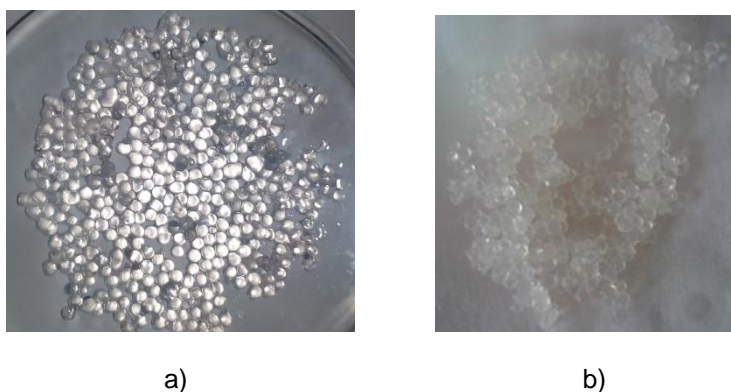


Figura 4-22: a) Esferas de quitosano-alginato com pectinase imobilizada por inclusão; b) Esferas de quitosano-alginato com pectinase e naringinase imobilizadas por inclusão.

4.2.3.1 Pectinase

Os ensaios de bioconversão com pectinase imobilizada em quitosano-alginato foram realizados a 45°C e a 175 rpm, em tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 4,5.

Os resultados dos ensaios de bioconversão encontram-se representados em termos de perfil de produção de açúcares redutores (mM), através da atividade da pectinase na pectina (0,6 mg/mL) em função do tempo (minutos) na Figura 4-23, e em termos da atividade enzimática (em μM de açúcares redutores por minuto) na Tabela 4-4.

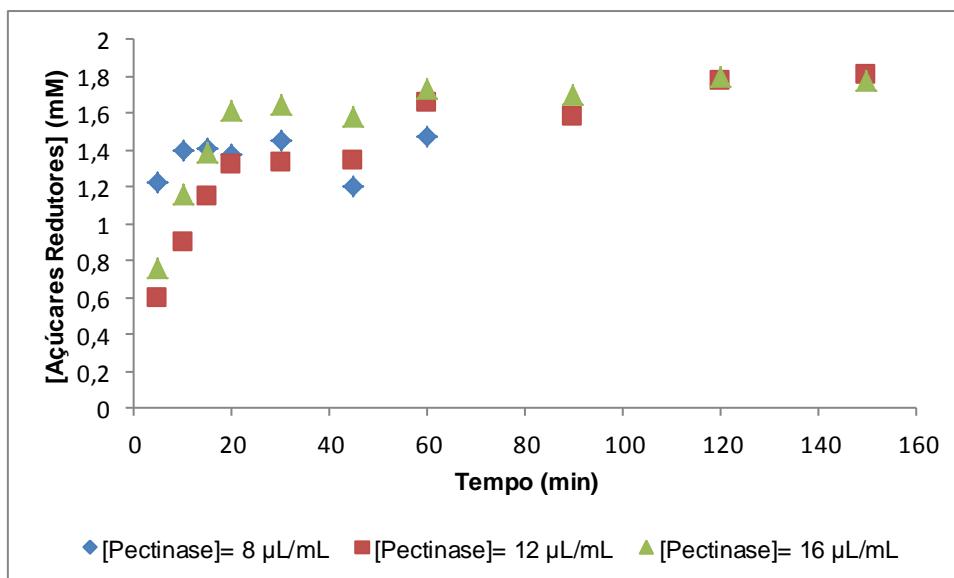


Figura 4-23: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de pectinase imobilizada por inclusão em quitosano-alginato, no substrato pectina (0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Na Figura 4-24 está representado o perfil de produção de açúcares redutores através da atividade hidrolítica da pectinase (8 µL/mL) no substrato pectina (0,15 mg/mL-0,6 mg/mL).

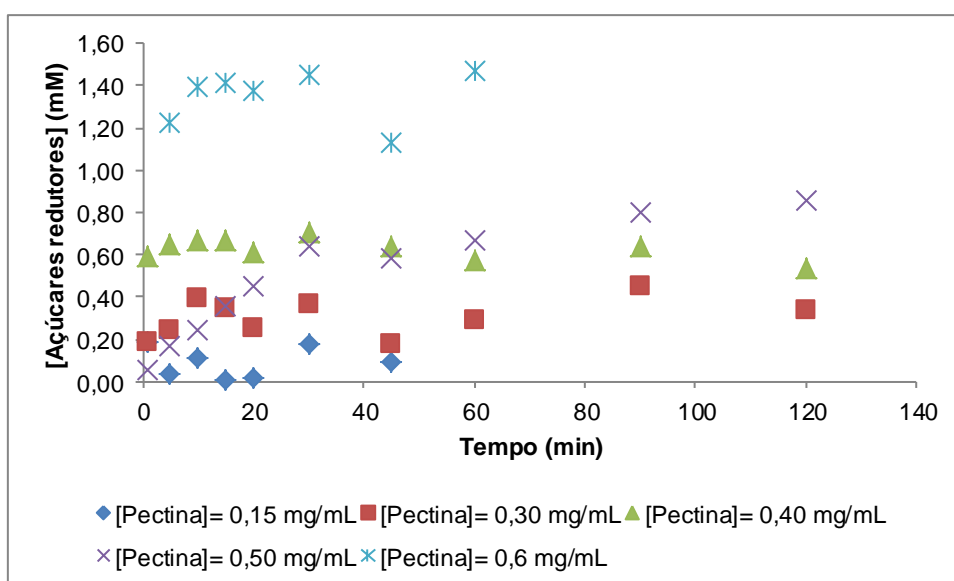


Figura 4-24: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de pectinase imobilizada por inclusão em quitosano-alginato (8 µL/mL), no substrato pectina (0,15- 0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

O aumento da concentração de pectinase e de pectina levou ao aumento de atividade enzimática.

Tabela 4-4: Atividade enzimática da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (m/v), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Pectinase (μL/mL) imobilizada em quitosano-alginato	12	16	8	8	8	8	8
Pectina (mg/mL)	0,6	0,6	0,15	0,3	0,4	0,5	0,6
Atividade enzimática (μM/min)	48,19	56,61	4,92	15,16	13,93	29,92	34,75

4.2.3.1.1 Estabilidade Operacional

A estabilidade operacional da enzima pectinase imobilizada em quitosano-alginato foi testada a 45°C. A enzima imobilizada foi sujeita a cinco reutilizações. Os resultados dos ensaios de estabilidade encontram-se resumidos na Figura 4-25 e Figura 4-26.

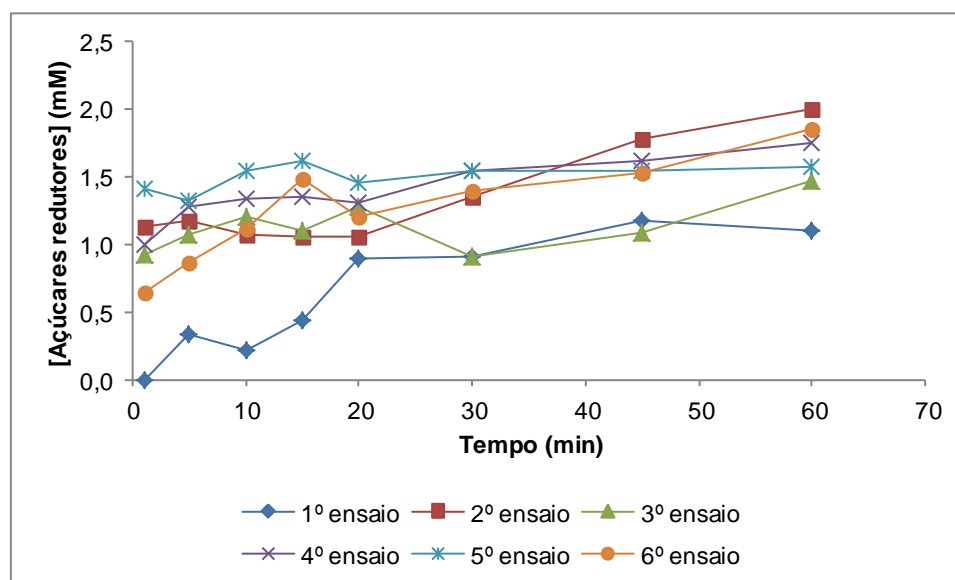


Figura 4-25: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de pectinase imobilizada em quitosano-alginato, em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: pectinase a 16 μL/mL e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,00).

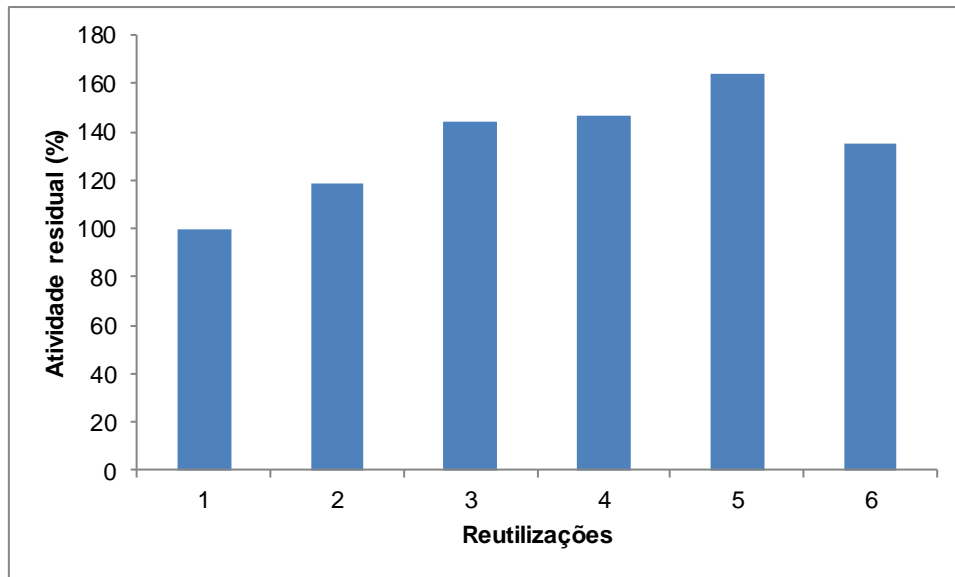


Figura 4-26: Atividade residual da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (composição do meio reacional: enzima a 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e pectina a 0,6 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).

A atividade residual para a pectinase imobilizada em quitosano-alginato aumentou até ao quinto ensaio, diminuindo no sexto ensaio, no entanto com o valor ainda superior a 100%.

4.2.3.2 Naringinase

Para os ensaios com a naringinase imobilizada em quitosano-alginato, foram utilizadas as condições descritas para a pectinase.

Os resultados dos ensaios com naringinase imobilizada em quitosano-alginato encontram-se representados na Figura 4-27, Figura 4-29 e resumidos na Tabela 4-5.

A atividade mais elevada foi obtida com $[\text{naringinase}] = 18 \text{ mg}/\text{mL}$ e $[\text{naringina}] = 0,5 \text{ mg}/\text{mL}$, obtendo-se um valor de 805,33 $\mu\text{M}/\text{min}$.

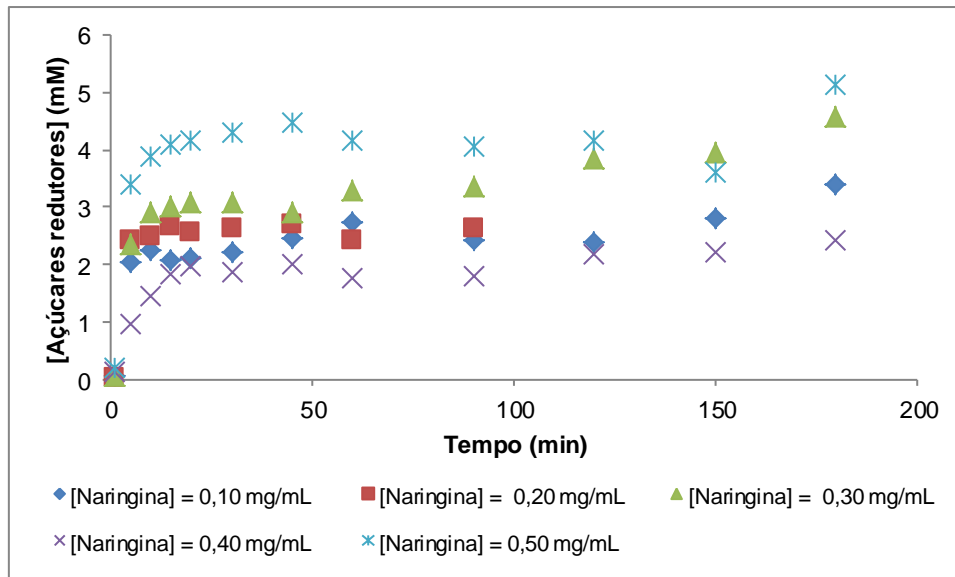


Figura 4-27: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de naringinase imobilizada por inclusão em quitosano-alginato (18 mg/mL), no substrato naringina (0,1 - 0,5 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

A influência da concentração de naringina na atividade da naringinase (Figura 4-28) nas condições referidas foi avaliada com a determinação dos parâmetros cinéticos, K_M (27,35 mg/L) e v_{max} (598,60 $\mu\text{M}/\text{min}$).

Vila Real *et al.* (2010) (59) referiu um K_M de 0,55 mM e v_{max} de 0,063 mM/min para naringinase livre a 30°C e pH 4.0, enquanto Pedro *et al.* (2007) (54) referiu valores de 0,303 mM e 0,042 mM/min para a naringinase imobilizada em alginato de cálcio.

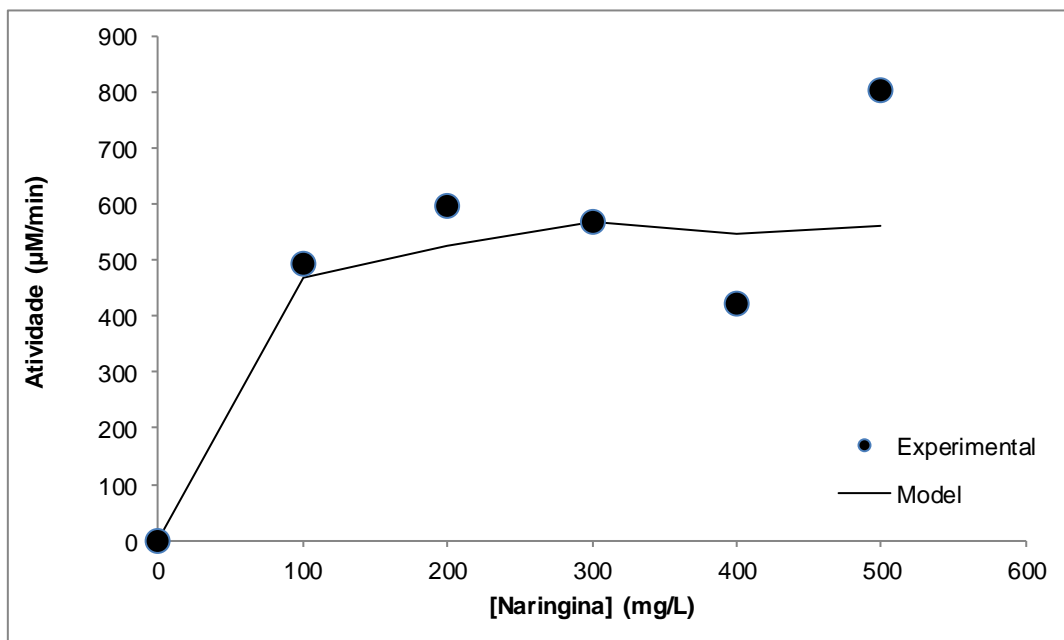


Figura 4-28: Atividade enzimática da naringinase (18 mg/mL) imobilizada em quitosano-alginato em função da concentração de naringina, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm. A linha representa o ajuste aos pontos experimentais.

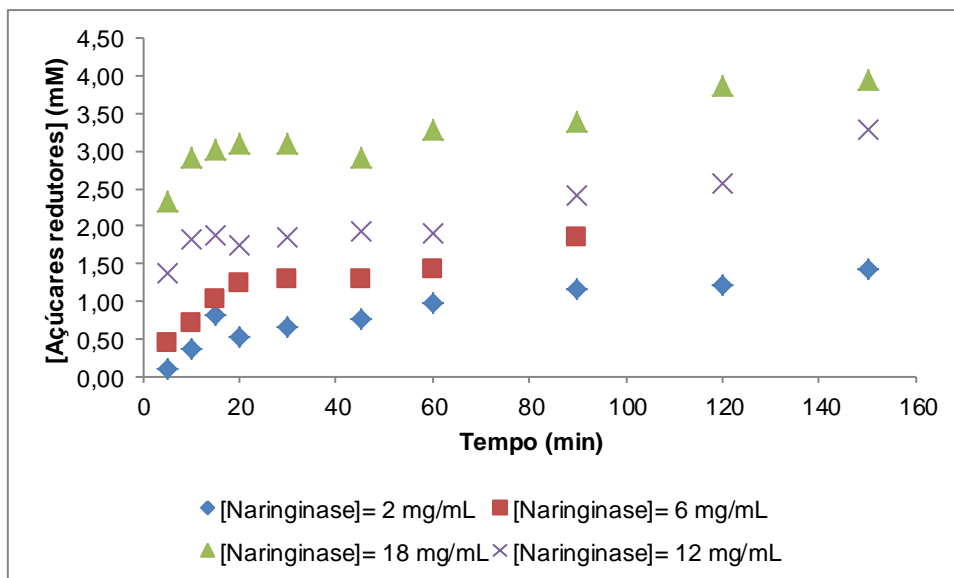


Figura 4-29: Perfil de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de naringinase imobilizada por inclusão em quitosano-alginato, no substrato naringina (0,3 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Recorrendo ao suplemento *so/ver* do Microsoft Excel, os pontos experimentais obtidos nos ensaios de bioconversão, permitiram obter um gráfico (Figura 4-30) que descreve os dados experimentais e a estimativa da v_{max} , com um valor de 151,77 $\mu\text{M}/\text{min}$ e K_M , com um valor de 6,88 mg/mL.

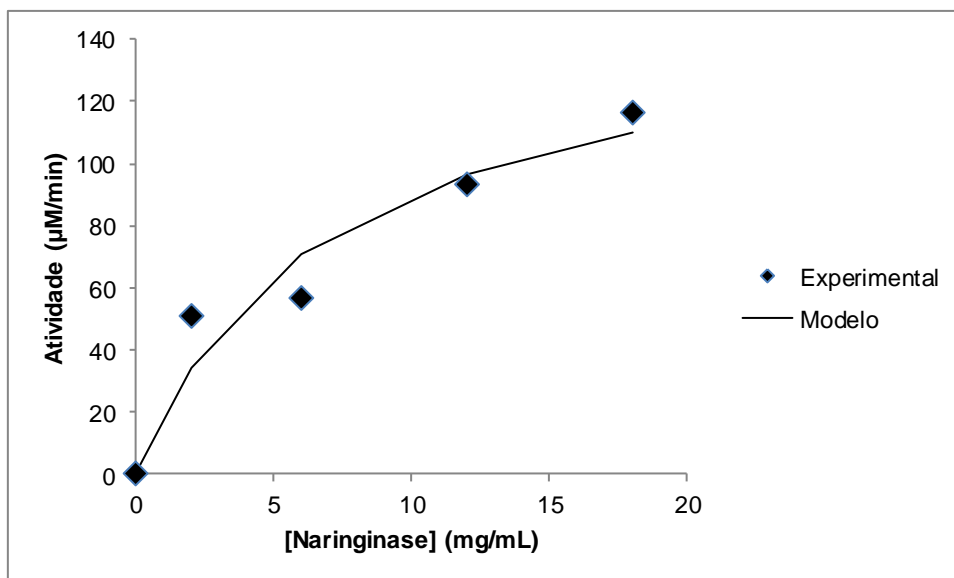


Figura 4-30: Atividade enzimática em função da concentração de naringinase imobilizada em quitosano-alginato, naringina 0,3 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm. A linha representa o ajuste aos pontos experimentais.

Tabela 4-5: Atividade enzimática da naringinase imobilizada em quitosano-alginato, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

Naringinase (mg/mL) imobilizada em quitosano-alginato 1%	2	6	18	12	18	18	18	18	18
Naringina (mg/mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Atividade enzimática (µM/min)	50,82	93,44	116,39	56,56	492,21	595,49	568,44	212,30	805,33

4.2.3.2.1 Estabilidade Operacional

A atividade hidrolítica da naringinase imobilizada em quitosano-alginato foi testada durante seis ensaios consecutivos, com duração de uma hora cada ensaio, a 45°C e 175 rpm (Figura 4-31).

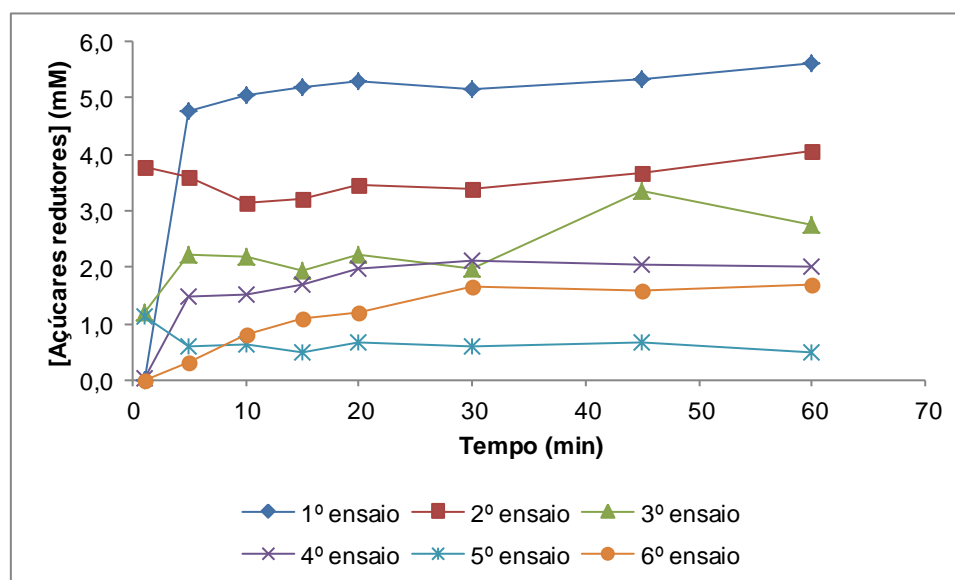


Figura 4-31: Perfil de produção de açúcares redutores das esferas de naringinase imobilizada em quitosano-alginato, em função do tempo, a 45°C e 175 rpm (composição do meio reacional: naringinase a 18 mg/mL e naringina a 0,5 mg/mL, em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,00).

A partir do ajuste exponencial dos valores de atividade residual obtidos para os seis ensaios (Figura 4-32) foi possível calcular a constante de desativação (K_d), com um valor de 0,357, e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) com um valor estimado de 1,94 h⁻¹.

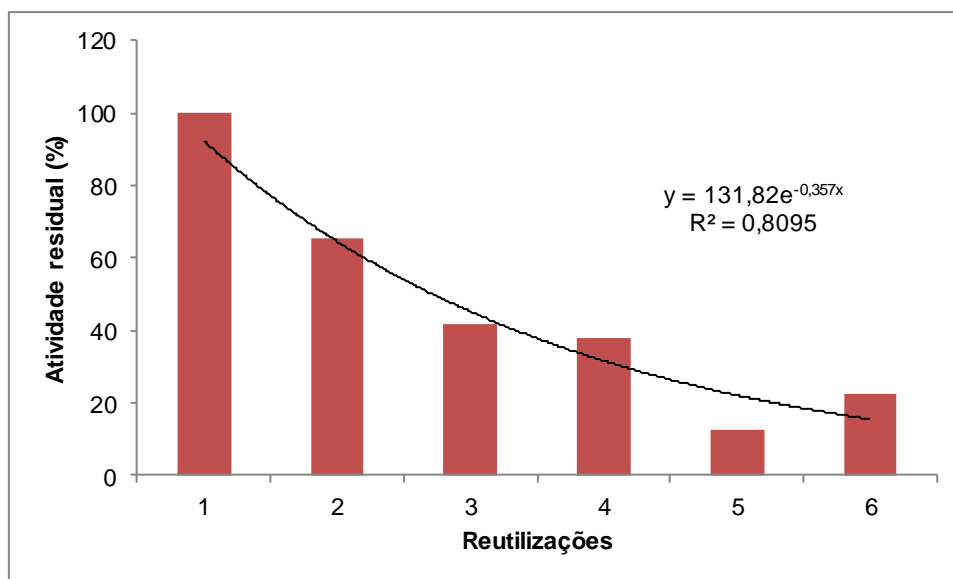


Figura 4-32: Atividade residual da naringinase (18 mg/mL) imobilizada em quitosano-alginato (composição do meio reacional: naringina a 0,5 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5).

4.2.3.3 Pectinase e naringinase

Os resultados que seguidamente serão apresentados pretendem demonstrar de que modo a utilização, de esferas com as duas enzimas (pectinase e naringinase) imobilizadas simultaneamente ou em esferas separadas, influencia a atividade enzimática.

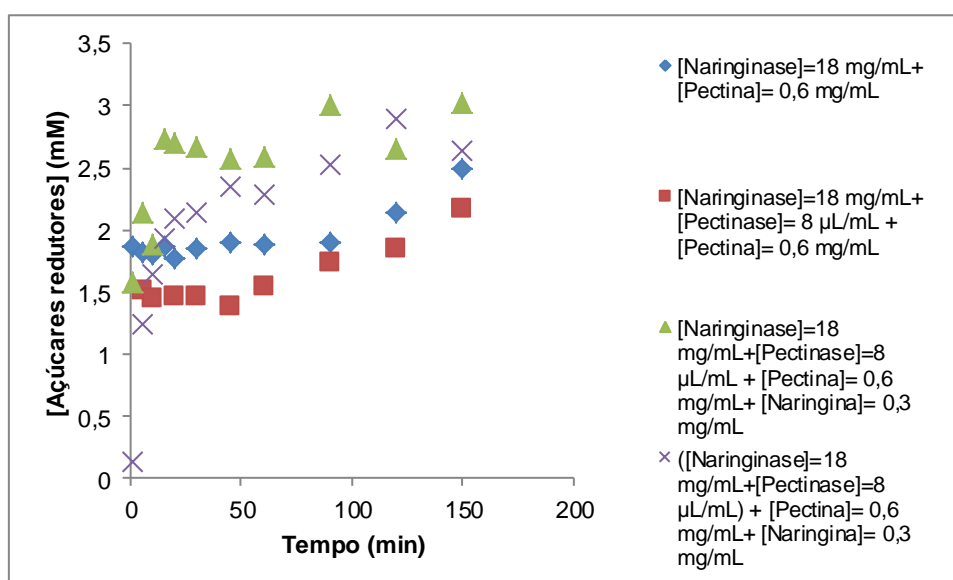


Figura 4-33: Perfil de produção de açúcares com pectinase (8 µL/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas em quitosano- alginato nas mesmas esferas (na figura representado entre parênteses ()) e em esferas separadas, com diferentes composições de meio reacional, 175 rpm e a 45°C.

Pela análise da Figura 4-33, verifica-se uma concentração de açúcares redutores nos primeiros minutos mais elevada no ensaio com esferas de pectinase e esferas de naringinase, imobilizadas em quitosano-alginato separadamente, utilizadas em simultâneo no mesmo ensaio de bioconversão, quando comparada com os valores obtidos para as duas enzimas imobilizadas nas mesmas esferas. A partir dos 50 minutos de reação a concentração de açúcares redutores fica muito próxima nos dois ensaios.

A concentração de açúcares redutores é muito semelhante no ensaio realizado só com esferas de naringinase imobilizada em quitosano-alginato e meio reacional pectina e no ensaio realizado com esferas separadas de pectinase e naringinase e meio reacional pectina e naringina. O ensaio só com esferas de naringinase e meio reacional pectina, origina valores superiores de açúcares redutores. Estes resultados podem sugerir uma inibição competitiva entre as duas enzimas em estudo, pelo substrato pectina.

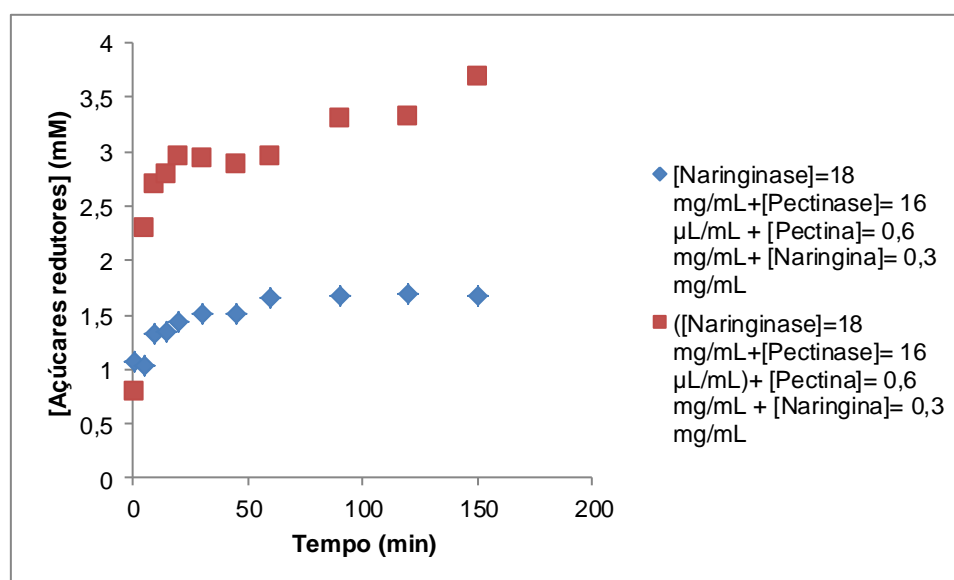


Figura 4-34: Perfil da produção de açúcares redutores com pectinase (16 µL/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas em quitosano-alginato, utilizando esferas separadas e esferas com as duas enzimas juntas (na figura representado entre parênteses ()), 175 rpm e a 45°C.

Para uma concentração de naringinase de 18 mg/mL e uma concentração de pectinase de 16 µL/mL, com a mesma composição do meio reacional (naringina 0,3 mg/mL e pectina 0,6 mg/mL), a concentração de açúcares redutores é muito superior no ensaio em que as enzimas foram imobilizadas nas mesmas esferas (Figura 4-34).

Os perfis de açúcares redutores obtidos para uma concentração de naringinase de 36 mg/mL e uma concentração de pectinase de 16 µL/mL e composição do meio reacional pectina 0,6 mg/mL e naringina 0,3 mg/mL (Figura 4-35), utilizando esferas separadas ou esferas com as duas enzimas imobilizadas, são muito semelhantes. A concentração de açúcares redutores obtidos ao longo do ensaio, é ligeiramente superior, quando foram utilizadas as duas enzimas imobilizadas em simultâneo.

A maior concentração de açúcares redutores foi obtida quando foi utilizada só naringina 300 mg/L no meio reacional.

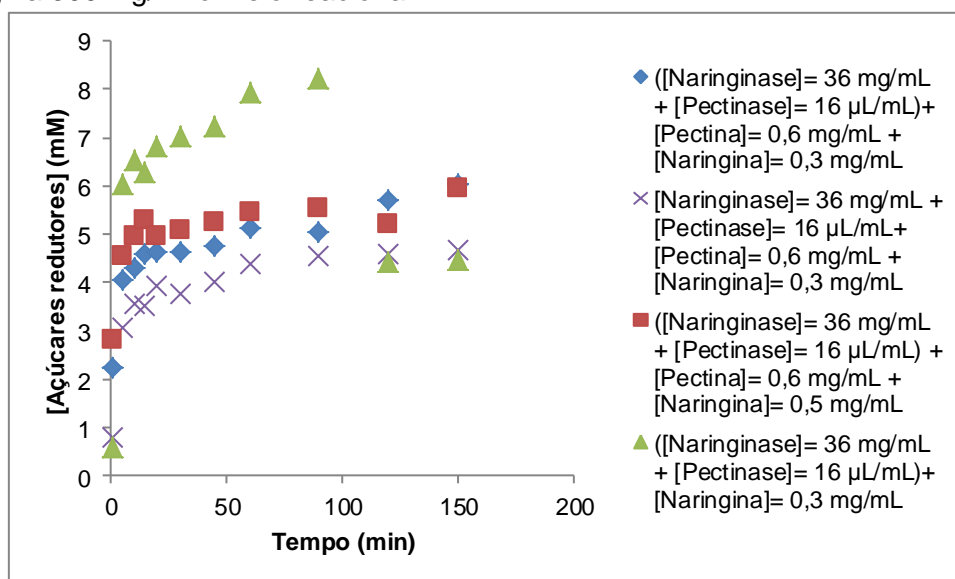


Figura 4-35: Perfil da produção de açúcares redutores com pectinase (16 µL/mL) e naringinase (36mg/mL) imobilizadas em quitosano-alginato, utilizando esferas separadas e esferas com as duas enzimas juntas (na figura representado entre parênteses ()), com diferentes composições de meio reacional, 175 rpm e 45 °C.

4.2.4 Comparação dos diferentes suportes de imobilização

Seguidamente encontram-se apresentados na Figura 4-36, Figura 4-37 e Figura 4-38, os resultados comparativos para as mesmas concentrações de enzimas e o mesmo meio reacional, variando a matriz de imobilização (quitosano, alginato de cálcio, quitosano-alginato).

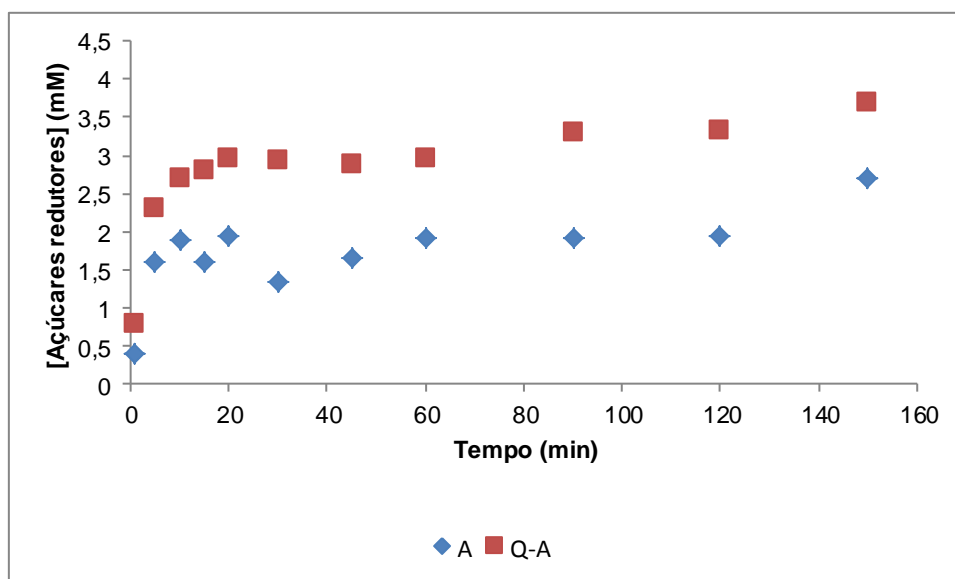


Figura 4-36: Perfis de produção de açúcares redutores por ação de pectinase (16 µL/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas juntas por inclusão em quitosano-alginato (Q-A) e alginato de cálcio. (A), substrato pectina (0,6 mg/mL) e naringina (0,3 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

As enzimas apresentaram um melhor desempenho quando imobilizadas em quitosano-alginato, meio reacional: pectina 0,6 mg/mL e naringina 0,3 mg/mL (Figura 4-36). O mesmo comportamento não se observou quando o meio reacional foi alterado para o sumo de framboesa, em que ocorreu um desempenho francamente melhor, para as enzimas imobilizadas em alginato de cálcio (Figura 4-37).

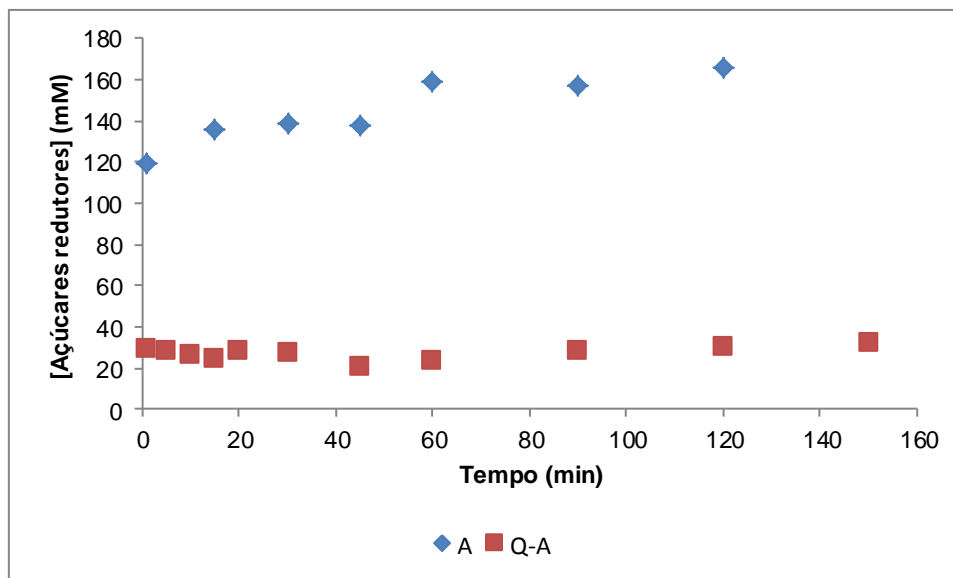


Figura 4-37: Perfis de produção de açúcares redutores por ação de pectinase (16 μ L/mL) e naringinase (18 mg/mL) imobilizadas por inclusão em quitosano-alginato (Q-A) e alginato de cálcio (A), sumo de framboesa, a 45°C e 175 rpm.

Quando se observa a Figura 4-38, verifica-se uma maior concentração de açúcares redutores, logo nos primeiros minutos da reacção, no ensaio com a pectinase imobilizada em quitosano. No ensaio com a pectinase imobilizada em quitosano-alginato, a concentração de açúcares redutores ficou em patamar a partir dos 20 minutos de reacção.

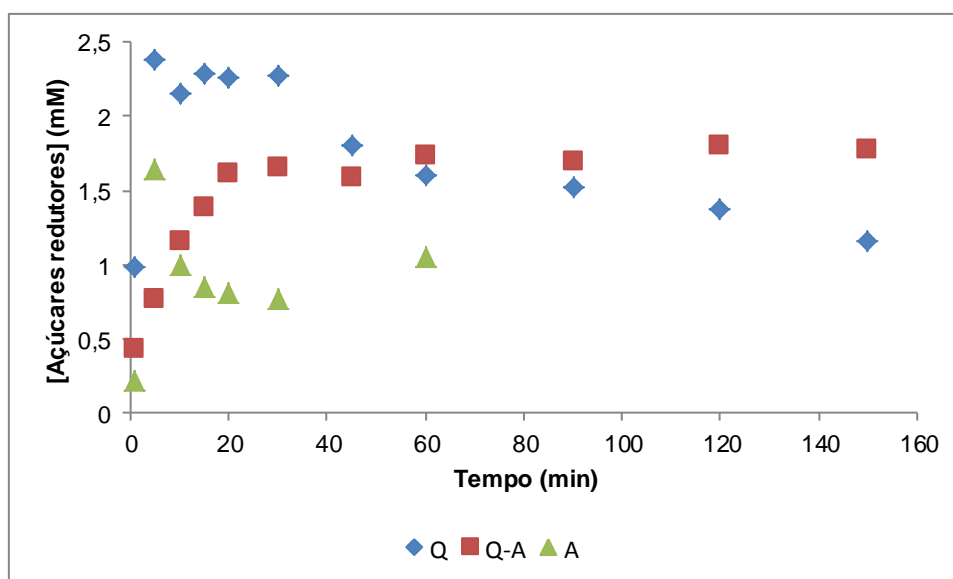


Figura 4-38: Perfis de produção de açúcares redutores por ação hidrolítica de pectinase (16 μ L/mL) imobilizada por inclusão em quitosano (Q), quitosano-alginato (Q-A) e alginato de cálcio (A), substrato pectina (0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 45°C e 175 rpm.

No ensaio com a pectinase imobilizada em quitosano ocorre uma formação rápida de açúcares redutores, e uma diminuição da concentração destes, logo a partir dos 5 minutos de reação.

Pela comparação do desempenho das enzimas nos três suportes de imobilização, pode concluir-se que a imobilização de pectinase em quitosano, permitiu obter um rápido início de reação, com a obtenção de uma concentração elevada de açúcares redutores, logo nos primeiros cinco minutos. Contudo a imobilização em quitosano-alginato apresentou um menor efeito inibitório na formação de açúcares redutores, cuja concentração aumentou até aos 20 minutos de reação, mantendo-se constante até aos 150 minutos.

4.2.4.1 Estabilidade Operacional

Os resultados que se apresentam em seguida sumarizam os ensaios realizados com esferas de quitosano, alginato de cálcio e quitosano-alginato contendo 16 $\mu\text{L/mL}$ de pectinase imobilizada, 175 rpm, a 45°C, com a duração de 60 minutos cada ensaio.

Pela análise da Figura 4-39, verifica-se que a pectinase apresentou uma atividade bastante significativa para as seis reutilizações, quando imobilizada em quitosano-alginato e alginato de cálcio.

Para a pectinase imobilizada em quitosano, o valor de atividade enzimática decresceu ao longo das reutilizações, logo na segunda reutilização, verificando-se não existir praticamente atividade na sexta reutilização.

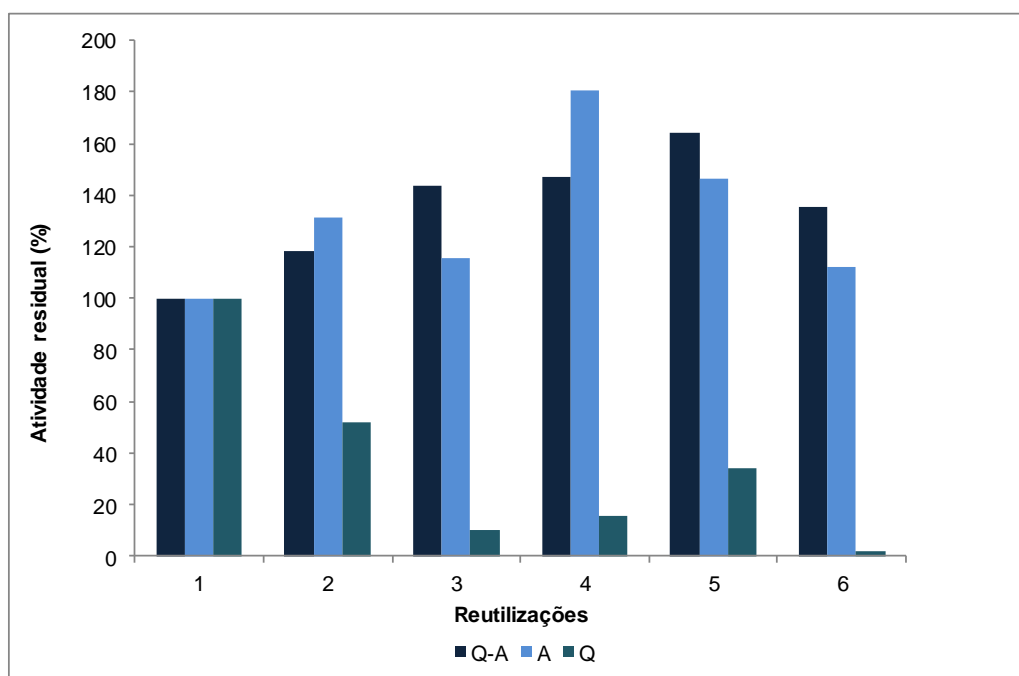


Figura 4-39: Atividade residual da pectinase (16 $\mu\text{L/mL}$) imobilizada em quitosano, alginato de cálcio e quitosano-alginato (composição do meio reacional: pectina a 0,6 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 175 rpm, a 45°C.

A Figura 4-40 corresponde aos ensaios realizados com esferas de alginato de cálcio e quitosano-alginato contendo 18 mg/mL de naringinase imobilizada, 175 rpm, a 45°C, com a duração de 60 minutos cada ensaio.

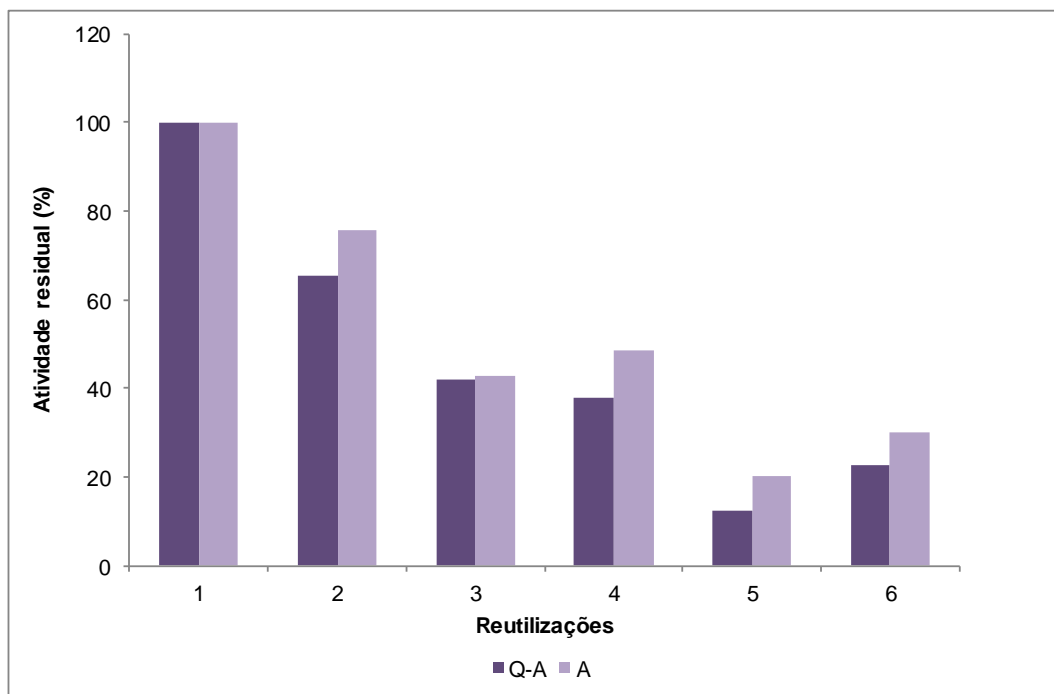


Figura 4-40: Atividade residual da naringinase (18 mg/mL) imobilizada em alginato de cálcio e quitosano-alginato (composição do meio reacional: pectina a 0,5 mg/mL), em tampão acetato de sódio, 0,02 M, pH 4,5, 175 rpm, a 45°C.

A redução da atividade para a naringinase imobilizada em alginato de cálcio (1%) e quitosano (1%) - alginato (1%) segue o modelo exponencial, com uma constante de desativação, respectivamente, de $0,282 \text{ h}^{-1}$ e $0,357 \text{ h}^{-1}$.

Pode concluir-se que em termos de estabilidade operacional, os suportes de imobilização alginato de cálcio e quitosano-alginato, são os que permitem um maior número de reutilizações, isto é, uma melhor estabilidade operacional. Os valores mais elevados foram obtidos com a enzima imobilizada em alginato de cálcio e quitosano-alginato.

4.3 Sumos

4.3.1 Alta Pressão

O efeito da pressão na atividade da pectinase e naringinase imobilizadas, nos sumos em estudo, foi averiguado para a pressão de 0,101 MPa, 50 MPa, 100 MPa, 150 MPa e 200 MPa.

De modo a averiguar o efeito da pressão na ação hidrolítica da pectinase e naringinase em sumos de fruta, foram efetuados vários ensaios de bioconversão com duração de 30 minutos, dos quais, abaixo se apresentam os resultados (Figura 4-41, Figura 4-42, Figura 4-43, Figura 4-44 e Figura 4-45).

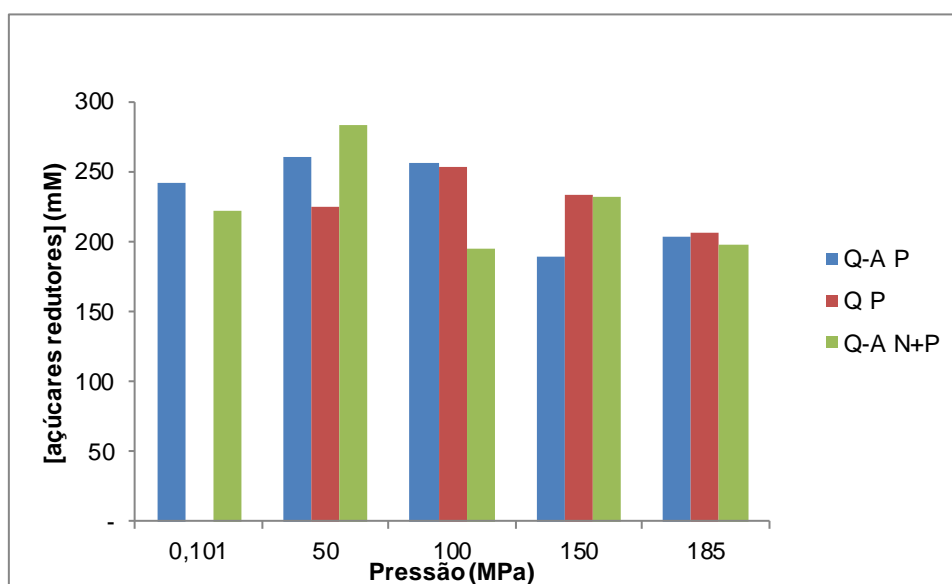


Figura 4-41: Ensaios em sumo de laranja a diferentes pressões, com pectinase imobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase imobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P).

A concentração de açúcares redutores obtida mais elevada nos ensaios com sumo de laranja foi no ensaio a 50 MPa, com a pectinase e naringinase imobilizadas em quitosano-alginato (Figura 4-41).

Nos ensaios realizados com sumo de toranja, com pectinase e naringinase imobilizadas em quitosano-alginato, a concentração de açúcares redutores foi mais elevada para as pressões de 50,100,150 e 185 MPa quando comparada com o valor obtido à pressão atmosférica (Figura 4-42).

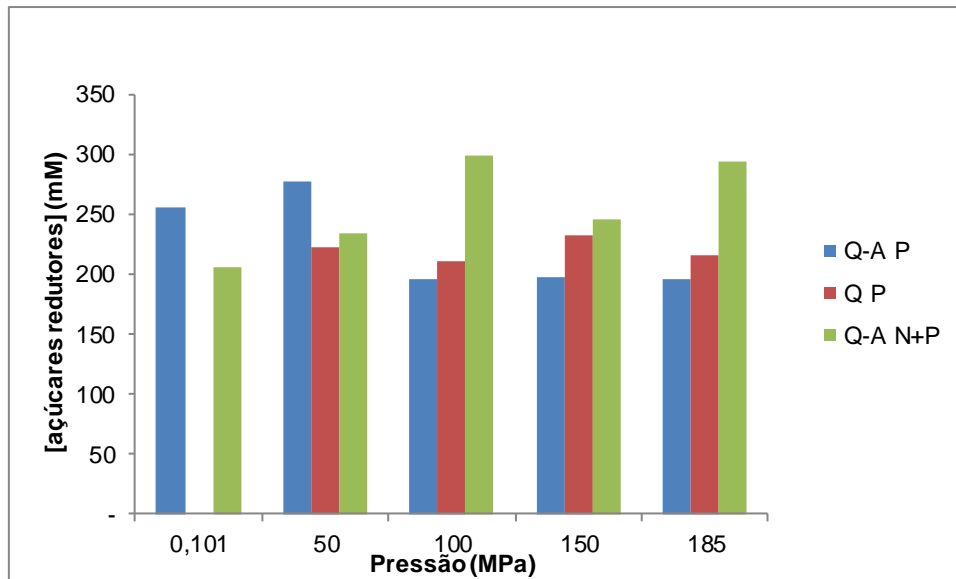


Figura 4-42: Ensaio em sumo de toranja a diferentes pressões com pectinase immobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase immobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P).

Ferreira *et al.* (2008) (24) reportaram a formação de três vezes mais açúcares redutores a 160 MPa do que à pressão atmosférica com a naringinase immobilizada em alginato de cálcio, no sumo de toranja a 37°C.

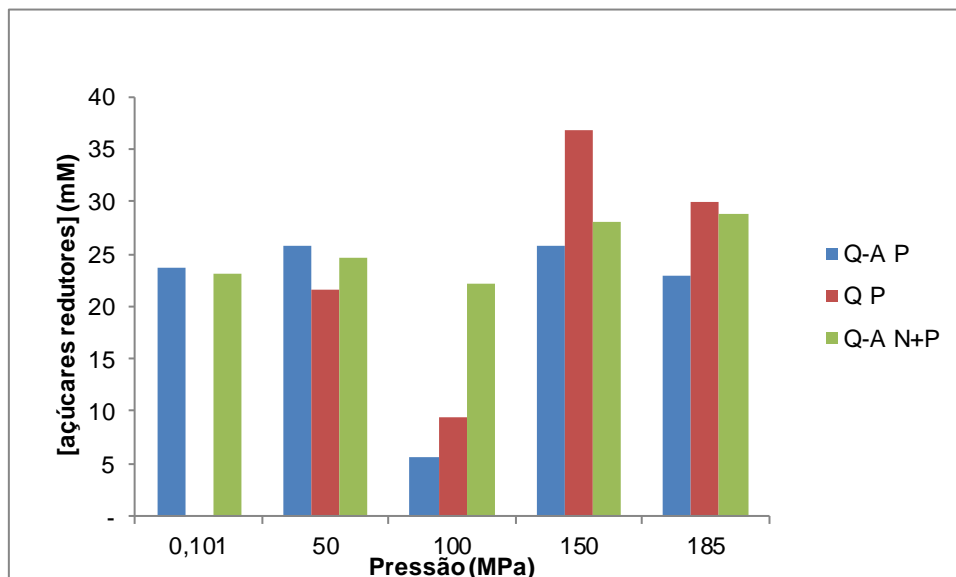


Figura 4-43: Ensaio em sumo de limão a diferentes pressões com pectinase immobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase immobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P).

No sumo de limão, os ensaios realizados a 150 e 185 MPa, foram os que obtiveram um melhor desempenho, destacando-se o ensaio com a pectinase imobilizada em quitosano (Figura 4-43).

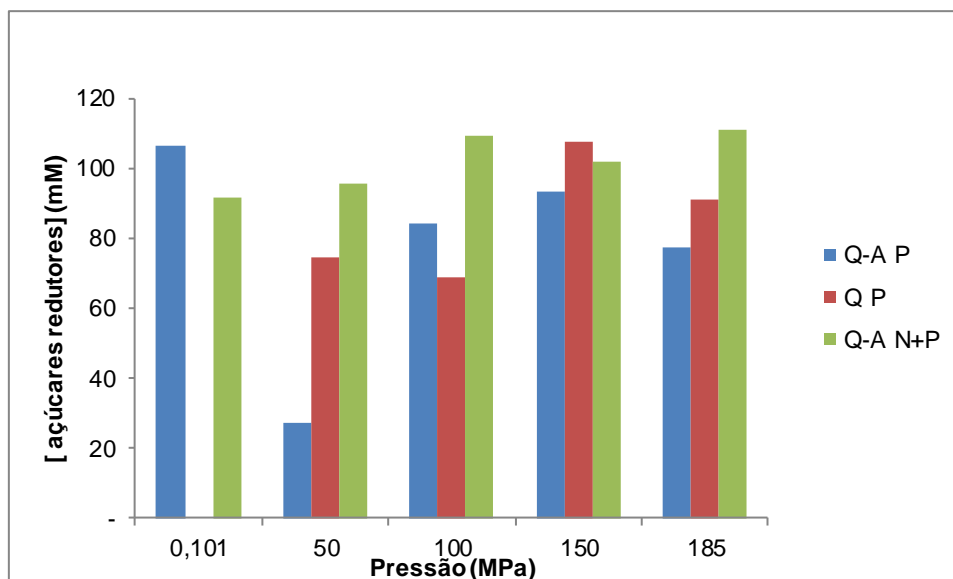


Figura 4-44: Ensaios em sumo de framboesa a diferentes pressões com pectinase imobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase imobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P).

Nos ensaios realizados com sumo de framboesa verifica-se uma maior concentração de açúcares redutores a 50,100, 150 e 185 MPa comparativamente à obtida a pressão atmosférica com pectinase e naringinase imobilizadas em quitosano-alginato. O valor mais elevado é atingido para a pressão de 185 MPa Figura 4-44.

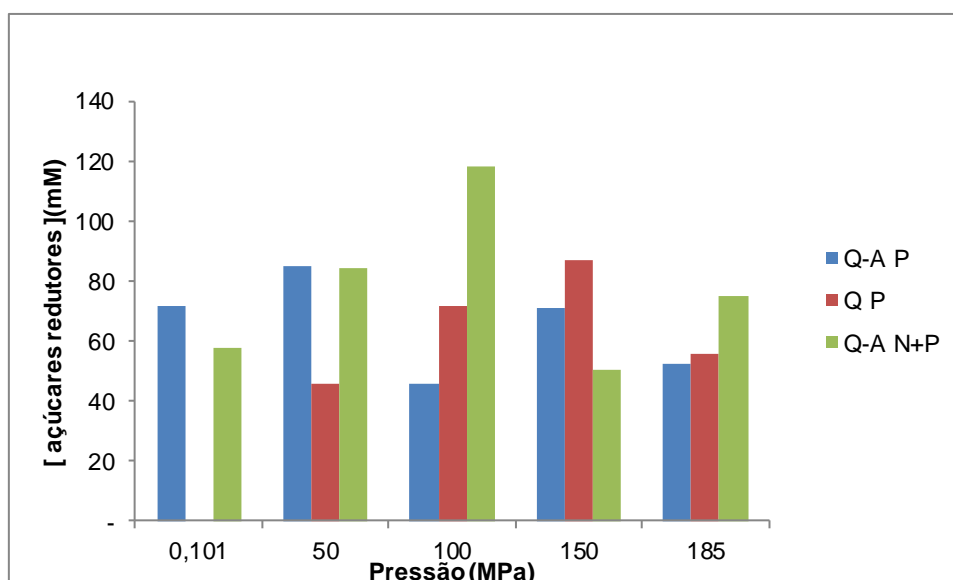


Figura 4-45: Ensaios em sumo de amora a diferentes pressões com pectinase imobilizada em esferas de quitosano (Q P) e quitosano-alginato (Q-A P) e com naringinase e pectinase imobilizadas em esferas de quitosano-alginato (Q-A N+P).

Nos ensaios com sumo de amora, a formação de açúcares redutores é maior a 100 MPa, com a pectinase e a naringinase imobilizadas em quitosano-alginato, praticamente o dobro que à pressão atmosférica (Figura 4-45).

4.3.2 Controlo de Qualidade

4.3.2.1 pH

Os resultados da determinação do pH, dos ensaios do estudo da atividade da pectinase e naringinase a 25°C, a uma pressão de 0,101 MPa (pressão atmosférica), 50 MPa, 100 MPa, 150 MPa e 200 MPa, com duração de 30 minutos, para os diferentes sumos em estudo apresentam-se na Figura 4-46 e Tabela 7-1, Tabela 7-2, Tabela 7-3, Tabela 7-4, Tabela 7-5 (em anexos).

O pH é superior em todos os sumos processados com esferas de pectinase imobilizadas em quitosano-alginato, para as pressões de 50,100,150 e 185 MPa, comparativamente aos sumos processados com esferas de pectinase imobilizadas em quitosano e com esferas de pectinase e naringinase imobilizadas em quitosano-alginato.

Bull *et al.* (2004) (58) reportou valores semelhantes de pH para sumo de laranja fresco e sumo de laranja processado a alta pressão (600MPa/20°C/1 min).

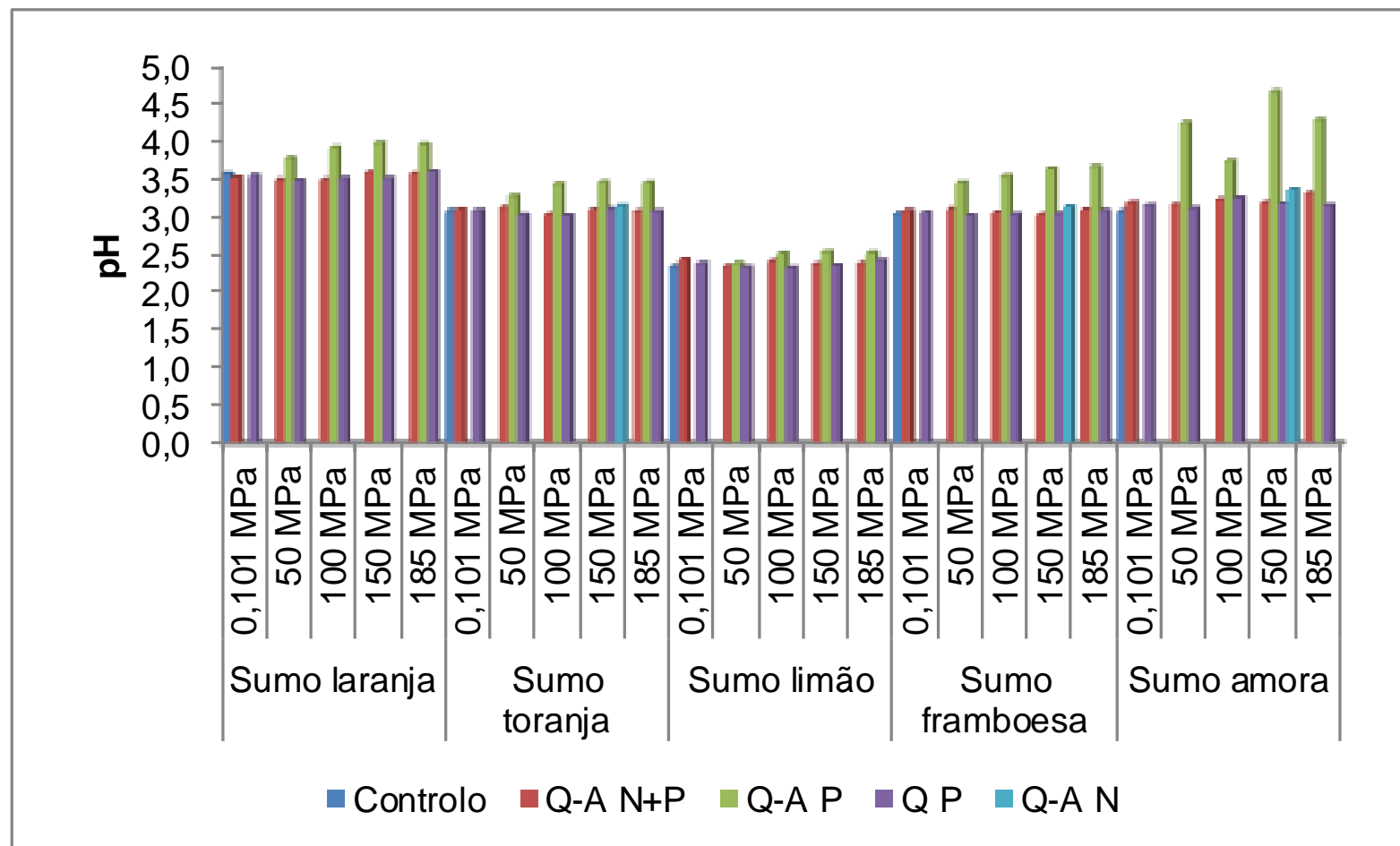


Figura 4-46: Análise do pH dos sumos de fruta dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

4.3.2.2 Vitamina C

Os resultados da determinação do ácido ascórbico, dos ensaios do estudo da atividade da pectinase e naringinase a 25°C, a uma pressão de 0,101 MPa, 50 MPa, 100 MPa, 150 MPa e 200 MPa, com duração de 30 minutos, para os diferentes sumos em estudo, apresentam-se na Figura 4-47 e Tabela 7-6, Tabela 7-7 e Tabela 7-8 (anexos).

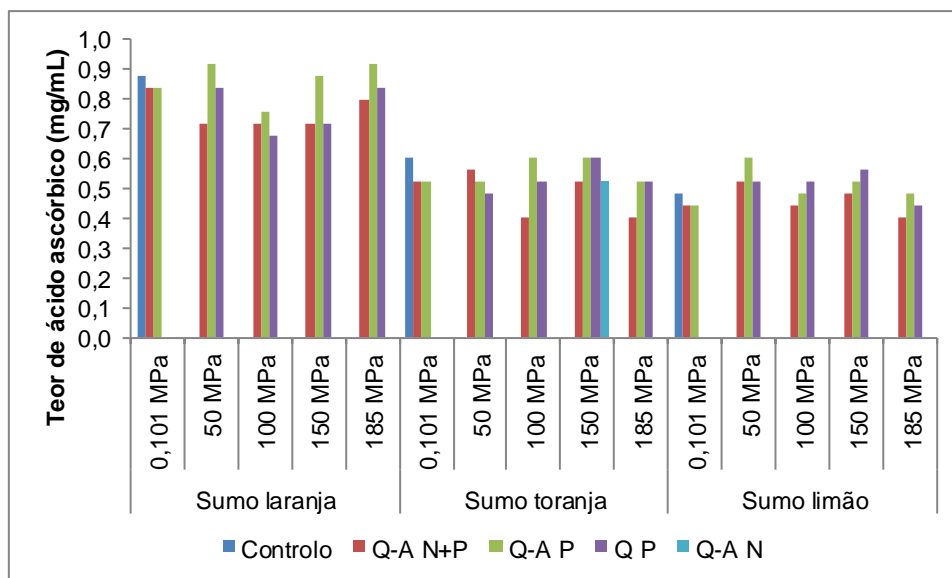


Figura 4-47: Concentração de ácido ascórbico (mg/mL) do sumo de laranja, limão e toranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

A concentração de ácido ascórbico não sofreu grandes alterações, com as diferentes pressões em estudo. As concentrações mais elevadas de ácido ascórbico são atingidas com a pectinase imobilizada em quitosano-alginato, independentemente da pressão utilizada.

4.3.2.3 Análise carotenóides

Os resultados da determinação de carotenóides, dos ensaios do estudo da atividade da pectinase e naringinase a 25°C, a uma pressão de 0,101 MPa, 50 MPa, 100 MPa, 150 MPa e 200 MPa, com duração de 30 minutos, para os diferentes sumos encontram-se resumidos na Figura 4-48 e na Tabela 7-9, Tabela 7-10 e Tabela 7-11 (anexos).

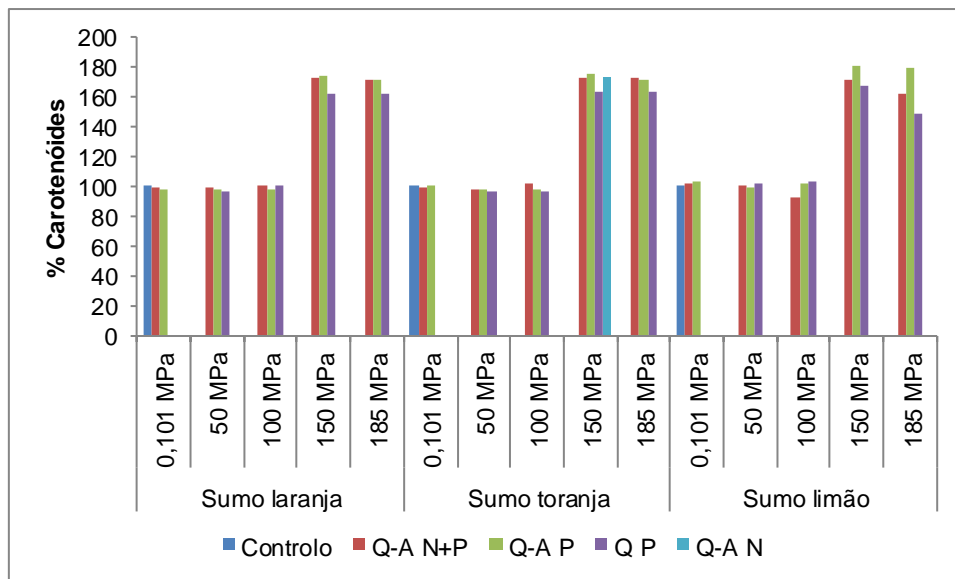


Figura 4-48: Percentagem de carotenóides do sumo de laranja, toranja e limão, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Para pressões mais elevadas (150 e 185 MPa), a percentagem de carotenóides aumentou. Segundo Oey *et al.* (2008) (57), este aumento pode estar associado ao facto das altas pressões promoverem maior extratibilidade ou descompartimentalização da matriz celular onde os carotenóides se encontram alojados.

4.3.2.4 °Brix

Os resultados da determinação do °Brix, dos ensaios do estudo da atividade da pectinase e naringinase a 25°C, a uma pressão de 0,101 MPa, 50 MPa, 100 MPa, 150 MPa e 200 MPa, com duração de 30 minutos, para os diferentes sumos encontram-se resumidos na Figura 4-49 e na Tabela 7-12, Tabela 7-13, Tabela 7-14, Tabela 7-15 e Tabela 7-16 (anexos).

Os valores de °Brix mantiveram-se praticamente inalterados com o aumento da pressão.

Bull *et al.* (2004) (58) reportou o mesmo valor de °Brix para sumo de laranja fresco e sumo de laranja processado a alta pressão (600MPa/20°C/1 min).

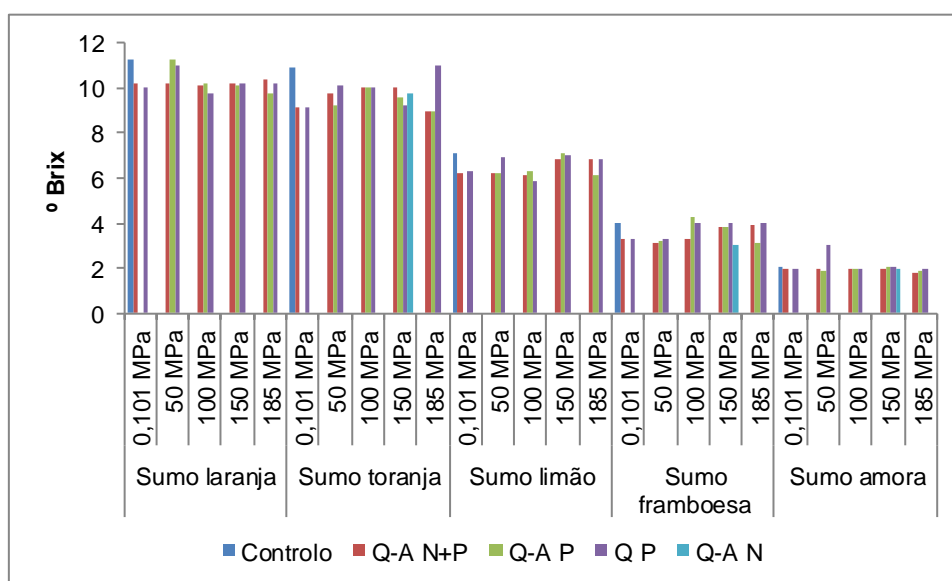


Figura 4-49: ° Brix do sumo de laranja, toranja, limão, framboesa e amora dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

4.3.2.5 Análise microbiológica

Relativamente aos ensaios realizados para verificação da ação antimicrobiana, verificou-se que em todas as amostras não se observaram bactérias na pesquisa de microrganismos totais, em qualquer uma das diluições. Nas amostras de sumo submetido a alta pressão não se observaram microrganismos. Face à ausência de contaminantes no sumo, os resultados parecem indicar a influência positiva do quitosano e alginato de cálcio e da pressão nessa redução.

4.3.3 Ensaio *in vivo* em modelo de colite

A ação anti-inflamatória foi determinada, a partir da indução da colite em ratinhos. Para tal, foram obtidas observações a microscópio cirúrgico (Figura 4-50) e morfológicas e funcionais (Tabela 4-6).



Figura 4-50: Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente (A: Grupo Sham; B: Grupo Etanol; C: Grupo TNBS + etanol; D: Grupo TNBS + sumo toranja; E: Grupo TNBS+ sumo toranja processado).

Através da observação da Figura 4-50 é visível que não existem alterações histológicas no grupo Sham, dado que este apresenta uma cor rosada, quase translúcida, tal como esperado, uma vez que este é o controlo negativo. O grupo etanol, à semelhança do grupo Sham, apresenta uma cor normal, sendo que pode observar-se um pequeno derrame. Tal facto confirma-nos que, apesar do etanol potenciar a ação do TNBS, as lesões ulcerativas são maioritariamente causadas por este último composto. A observação do cólon do grupo TNBS+Etanol demonstra que a administração de TNBS+Etanol 50% provocou inflamação dos tecidos, com necrose dos mesmos e lesões ulcerativas. Finalmente, os grupos TNBS+Sumo Toranja e TNBS+ Sumo Processado apresentaram uma melhoria relativamente ao grupo TNBS+Etanol, com diminuição acentuada da extensão e severidade das alterações morfológicas observadas.

Tabela 4-6: Observações morfológicas e funcionais no cólon limpo e aberto transversalmente logo após a colheita. ([#]P<0,05 vs Sham; *P<0,05 vs TNBS + EtOH 50%).

	Tamanho intestino	Tamanho lesão	Presença / Consistência de diarreia
Sham	14,5 ± 0,082	0	0
EtOH 50%	14,1 ± 0,2	0	0
TNBS + EtOH 50%	11,8 ± 0,19 [#]	3,60 ± 0,14 [#]	3 [#]
TNBS + Sumo Toranja	15,0 ± 0,707*	0,125 ± 0,125*	0,25 ± 0,25*
TNBS + Sumo Processado	14,0 ± 0,154*	0,70 ± 0,33*	0,33 ± 0,33*

A análise da Através da observação da Figura 4-50 é visível que não existem alterações histológicas no grupo Sham, dado que este apresenta uma cor rosada, quase translúcida, tal como esperado, uma vez que este é o controlo negativo. O grupo etanol, à semelhança do grupo Sham, apresenta uma cor normal, sendo que pode observar-se um pequeno derrame. Tal facto confirma-nos que, apesar do etanol potenciar a ação do TNBS, as lesões ulcerativas são maioritariamente causadas por este último composto. A observação do cólon do grupo TNBS+Etanol demonstra que a administração de TNBS+Etanol 50% provocou inflamação dos tecidos, com necrose dos mesmos e lesões ulcerativas. Finalmente, os grupos TNBS+Sumo Toranja e TNBS+ Sumo Processado apresentaram uma melhoria relativamente ao grupo TNBS+Etanol, com diminuição acentuada da extensão e severidade das alterações morfológicas observadas.

Tabela 4-6 confirma as alterações morfológicas do cólon dos ratinhos do grupo TNBS+Etanol, dado que foram observadas diferenças significativas (P<0,05) entre este e o grupo Sham, nomeadamente lesões de 3,6 ± 0,14 cm e uma diminuição do tamanho do intestino de 14,5 ± 0,082 cm para 11,8 ± 0,19 cm. Além das alterações morfológicas, foram também observadas alterações funcionais, nomeadamente a consistência das fezes dos ratinhos, que foi classificada com o score apresentado na Tabela 4-7. As fezes dos grupos Sham e Etanol apresentaram uma consistência normal (0), enquanto que as fezes do grupo TNBS+Etanol apresentaram uma consistência aquosa (3), significativamente diferente (P<0,05) do grupo Sham. Nos grupos TNBS+ Sumo Toranja e TNBS+ Sumo Toranja Processado observaram-se fezes com uma consistência entre o normal e o ligeiramente mucoso (0,25 e 0,33 respetivamente), com diferenças estatisticamente significativas (P<0,05) relativamente ao grupo TNBS+Etanol.

Tabela 4-7: Classificação da gravidade da diarreia.

Score	Consistência das fezes
0	Normal (pellets duros)
1	Ligeiramente mucosa
2	Mole
3	Aquosa

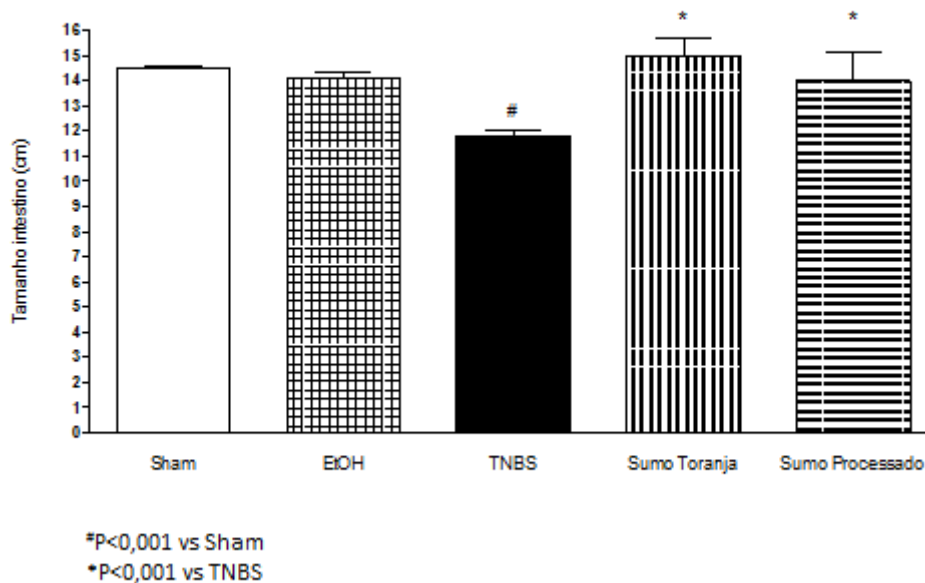


Figura 4-51: Efeito da administração do sumo de toranja e sumo processado no tamanho do intestino dos ratinhos relativamente aos restantes grupos (*p<0,001 vs Sham; #p<0,001 vs TNBS).

Na Figura 4-51 é possível visualizar-se as diferenças entre o tamanho do intestino dos diferentes grupos e na Figura 4-52 observar as diferenças entre o tamanho das lesões nos diferentes grupos. Observando os resultados obtidos para o grupo TNBS+Sumo Toranja, é visível que existem diferenças significativas entre este e o grupo TNBS+Etanol ($P<0,05$), com uma diminuição do tamanho das lesões para $0,125 \pm 0,125$ cm, assim como uma menor diminuição do tamanho do intestino ($15 \pm 0,707$ cm). Para o grupo TNBS + Sumo Toranja Processado também ocorre uma diminuição do tamanho da lesão ($0,7 \pm 0,33$ cm), contudo esta diminuição é inferior à obtida para o grupo TNBS+ Sumo Toranja.

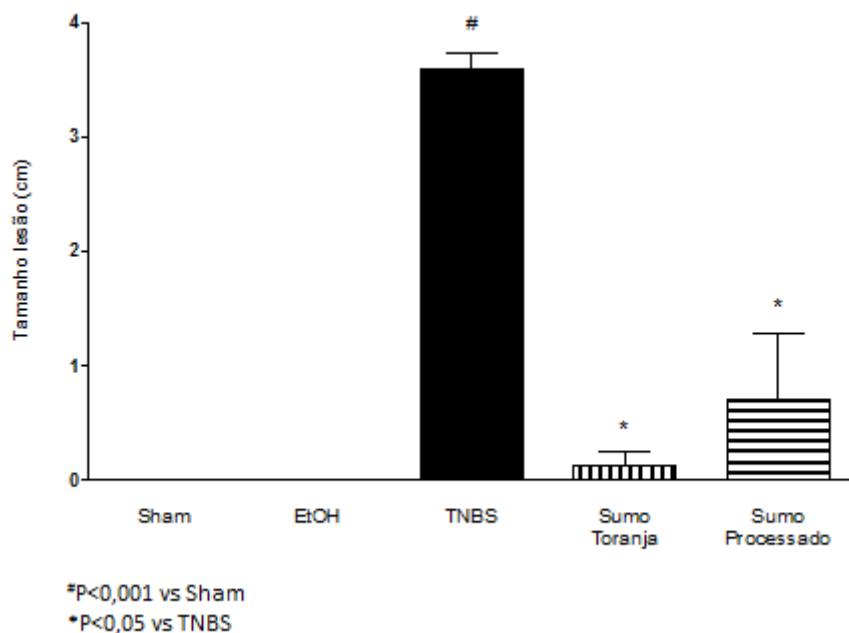


Figura 4-52: Efeito da administração do sumo de toranja e sumo processado no tamanho da lesão relativamente aos restantes grupos (*P<0,001 vs Sham; #P<0,001 vs TNBS).

4.3.3.1 Análise histológica

Na Figura 4-53 apresenta-se um cólon normal, sem lesões. A mucosa é de espessura uniforme e as criptas são retas. Não há nenhuma infiltração celular, edema ou exsudado.

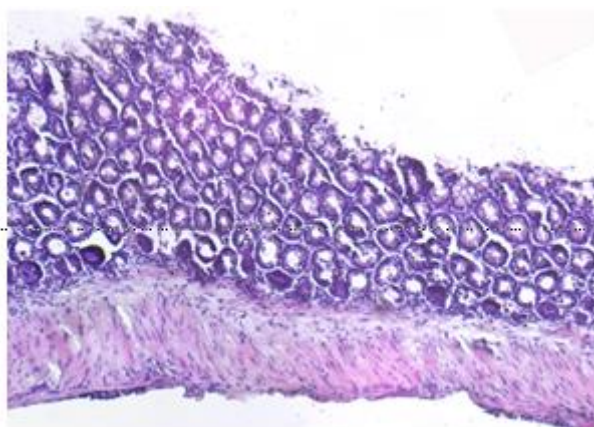


Figura 4-53: Histologia do cólon normal do rato.

A avaliação da gravidade da colite foi baseada em dois parâmetros principais: (a) danos epiteliais e (b) infiltração. Na Figura 4-54, apresenta-se um cólon com ulceração muito grave (áreas castanhas). Grande parte da mucosa é fina, com perda de criptas e marcadamente aumentou a infiltração de neutrófilos (seta preta).

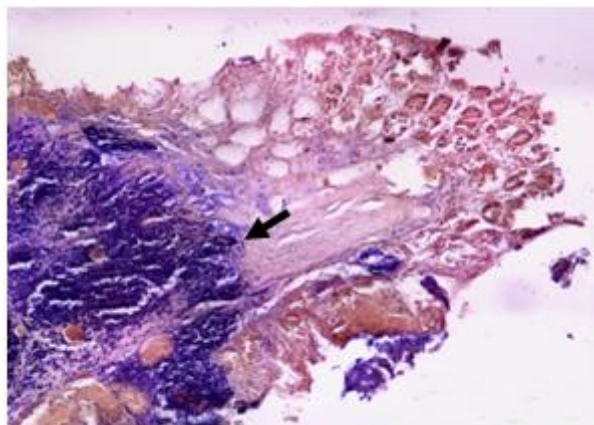


Figura 4-54: Histologia do cólon do rato na presença de colite (score 3).

O cólon do grupo TNBS + sumo de toranja e do grupo TNBS + sumo de toranja processado apresentou-se um cólon normal, sem lesões (Figura 4-55 e Figura 4-56). A mucosa é de espessura uniforme e as criptas são retas. Não há nenhuma infiltração celular, edema ou exsudado.

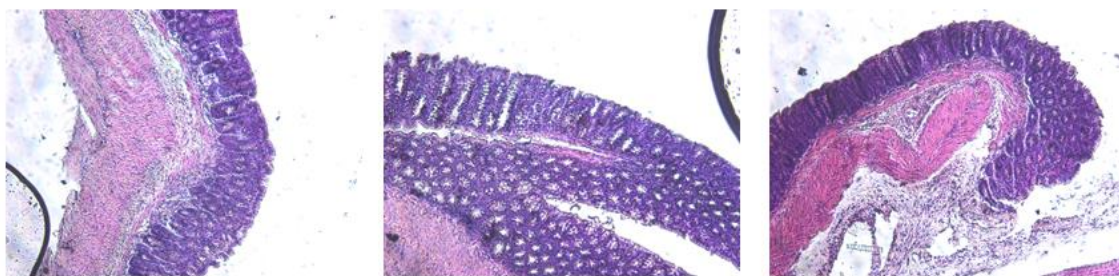


Figura 4-55: Histologia do cólon do rato do grupo TNBS + sumo de toranja.

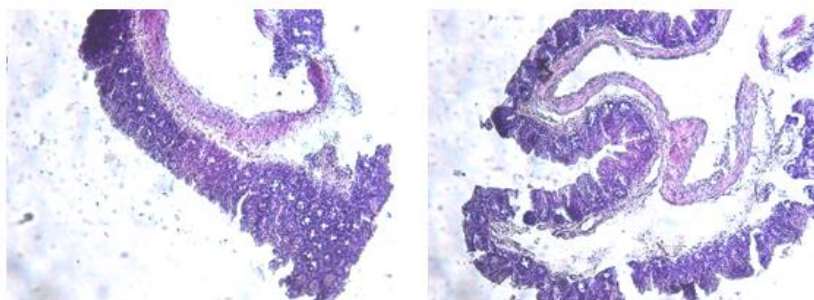


Figura 4-56: Histologia do cólon do rato grupo TNBS + sumo de toranja processado.

5 Conclusões

Neste trabalho, a pectinase e naringinase imobilizadas em esferas apresentaram alta atividade, permitindo a hidrólise da pectina e naringina, respetivamente. Foi evidenciado o potencial de imobilização conjunta da pectinase e da naringinase.

Os parâmetros cinéticos estimados para a pectinase livre foram v_{max} de 93,37 $\mu\text{M}/\text{min}$ e K_M de 3,61 mg/mL.

A atividade mais elevada para a pectinase, foi obtida quando esta se encontrava imobilizada em quitosano (349,18 $\mu\text{M}/\text{min}$). Contudo a imobilização da pectinase em quitosano, demonstrou não permitir um grande número de reutilizações, atingindo 52,2 % de atividade logo na segunda reutilização.

A naringinase imobilizada em alginato de cálcio e em quitosano-alginato, alcançou uma atividade de, respetivamente, 984 $\mu\text{M}/\text{min}$ e de 805 $\mu\text{M}/\text{min}$.

A imobilização conjunta de pectinase e naringinase apresentou um melhor desempenho quando imobilizadas em quitosano-alginato, comparativamente à imobilização em alginato de cálcio.

O efeito da pressão na atividade da pectinase e naringinase imobilizadas, nos sumos em estudo, foi averiguado para a pressão de 0,101 MPa, 50 MPa, 100 MPa, 150 MPa e 200 MPa. Em alguns ensaios obteve-se uma concentração de açúcares redutores mais elevada, do que a obtida à pressão atmosférica. Os resultados não foram conclusivos, tornando-se num ponto de desenvolvimento em trabalhos futuros, a realização de mais ensaios de sumos de fruta a alta pressão com a pectinase e naringinase imobilizadas.

A concentração de ácido ascórbico e o ° Brix não sofreram alterações significativas, com as diferentes pressões em estudo.

Nos ensaios realizados para verificação da ação antimicrobiana, verificou-se a ausência de contaminantes no sumo, sugerindo a influência positiva do quitosano e alginato de cálcio e da pressão nessa redução.

Nos ensaios *in vivo*, verificaram-se diferenças significativas entre o grupo TNBS+Sumo Toranja e o grupo TNBS+Etanol ($P < 0,05$), com uma diminuição do tamanho das lesões para $0,125 \pm 0,125$ cm, assim como uma menor diminuição do tamanho do intestino ($15 \pm 0,707$ cm). No grupo TNBS + Sumo Toranja Processado também ocorreu uma diminuição do tamanho da lesão ($0,7 \pm 0,33$ cm).

A investigação das propriedades da pectinase e da naringinase e a sua aplicação na área alimentar é uma vasta área de interesse a nível biotecnológico, uma vez que permite, a obtenção de produtos com valor nutricional acrescentado.

Os métodos de imobilização utilizados neste trabalho são simples, eficazes e com um baixo custo, apresentando um potencial elevado de aplicação a nível industrial no controlo de qualidade de sumos de frutas.

6 Referências bibliográficas

1. Fernandes P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Res.* 2010;2010:1–19.
2. Sharma N, Rathore M SM. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Rev Env Sci Biotechnol.* 2012;16:89–95.
3. Kumar S. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. *Pelagia Res Libr.* 2015;6(6):114–24.
4. Uenojo M, Pastore GM. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Quim Nova.* 2007;30(2):388–94.
5. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresour Technol.* 2001;77(3):215–27.
6. Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic Enzymes. *Open Biotechnol J.* 2009;3(1):9–18.
7. Tapre AR, Jain RK. Pectinases: enzymes for fruit processing industry. *Int Food Res J.* 2014;21(2):447–53.
8. Berger M. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Cad pedagógico.* 2014;130–9.
9. Sieiro C, García-Fraga B, López-Seijas J, Silva AF Da, Villa TG, García-Fraga B, et al. Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. *Food Ind.* 2012;201–18.
10. Souza RL a. De, Oliveira LDSC, Silva FLH Da, Amorim BC. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Rev Bras Eng Agrícola e Ambient.* 2010;14(9):987–92.
11. Pasha KM, Anuradha P, Subbarao D. Applications of pectinases in industrial sector: biotechnological applications of microbial pectinases. *Int J Pure Applied Sci Technol.* 2013;16(1):89–95.
12. Ribeiro MHL, Rabaça M. Cross-linked enzyme aggregates of naringinase: novel biocatalysts for naringin hydrolysis. *Enzyme Res.* 2011;2011:851272.
13. Ribeiro MH. Naringinases: occurrence, characteristics, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(6):1883–95.
14. Puri M, Banerjee A, Banerjee UC. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochem.* 2005;40(1):195–201.
15. Ortiz-vázquez E. Naringinase production from filamentous fungi using grapefruit rind in solid state fermentation. 2010;4(19):1964–9.

16. Puri M, Marwaha SS, Kothari RM, Kennedy JF. Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotech approaches for debittering. *Crit Rev Biotechnol.* 1996;16(2):145–55.
17. Radhakrishnan I, Sampath S, T SK. Isolation and characterization of enzyme naringinase from *Aspergillus flavus*. *Int J Adv Biotechnol Res.* 2013;4(2):208–12.
18. Amaro M, Rocha J, Vila-Real H, Figueira M, Mota-Filipe H, Sepodes B, et al. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Res Int.* Elsevier Ltd; 2009;42(8):1010–7.
19. Marangoni AG. *Enzyme kinetics: a modern approach.* John Wiley & Sons; 2002.
20. Carrillo F, Lis MJ, Colom X, López-Mesas M, Valldeperas J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: kinetic study. *Process Biochem.* 2005;40(10):3360–4.
21. Ortega N, De Diego S, Perez-Mateos M, Busto MD. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chem.* 2004;88(2):209–17.
22. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(6):1451–63.
23. Ramirez H, Briones A, Úbeda J, Arevalo M. Immobilization of pectinase by adsorption on an alginate-coated chitin support. *Biotech Apl.* 2013;30:101-104.
24. Ferreira L, Afonso C, Vila-Real H. Evaluation of the effect of high pressure on naringin hydrolysis in grapefruit juice with naringinase immobilised in calcium alginate beads. *Food Technol.* 2008;9862(2):146–50.
25. Contesini FJ, Figueira J, Kawaguti HY, Fernandes PC, Carvalho P, Nascimento M, et al. Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. *Int J Mol Sci.* 2013;14(1):1335–69.
26. Saad; S.M.M; Foda; F.F.A.; Abdel-Aleem; I.M. and Gama El-Deen; M.S. Frahat Foda Ali Foda. Kinetic parameters of immobilized pectinase enzyme. *Annals of Agric. Sci., Moshtohor.* 2012; 50(2):173-184.
27. Hiteshi K, Chauhan S, Gupta R. Immobilization of microbial pectinases: a review. *CIBTech J Biotechnol.* 2013;2(4):37–52.
28. Missau J, Scheid AJ, Foletto EL, Jahn SL, Mazutti MA, Kuhn RC. Immobilization of commercial inulinase on alginate–chitosan beads. *Sustain Chem Process.* 2014;2(1):13.
29. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv.* Elsevier Inc.; 2013;31(8):1808–25.
30. Sařoglu K, Demir N, Acar J, Mutlu M. Use of commercial pectinase in the fruit juice industry, Part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. *J Food Eng.* 2001;47(4):271–4.

31. Mendes AA, De Oliveira PC, De Castro HF, Giordano RDLC. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quim Nova*. 2011;34(5):831–40.
32. Dean B, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett*. 2009;31:1639–50.
33. Illanes A, Cauerrhff A, Wilson L, Castro GR. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour Technol*. 2012;115:48–57.
34. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2012;1–9.
35. Elgadir MA, Uddin MS, Ferdosh S, Adam A, Chowdhury AJK, Sarker MZI. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *J Food Drug Anal*. Elsevier Ltd; 2015;23(4):619–29.
36. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme Microb Technol*. 2004;35(2-3):126–39.
37. Taqieddin E, Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*. 2004;25(10):1937–45.
38. Buga ML, Ibrahim S, Nok AJ. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6). *African J Biotechnol*. 2010;9(52):8934–43.
39. Busto MD, García-Tramontín KE, Ortega N, Perez-Mateos M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. *Bioresour Technol*. 2006;97(13):1477–83.
40. Butz P, Tauscher B. Emerging technologies: Chemical aspects. *Food Res Int*. 2002;35(2-3):279–84.
41. Tomlin BD, Jones SE, Reyes-De-Corcuera JI. High hydrostatic pressure protection of a pectinase cocktail against thermal inactivation. *J Food Eng*. 2013;116(3):674–80.
42. Rodrigues F, Rodrigues L, Mendonça C, Sales E. Alta pressão hidrostática na conservação de alimentos: um enfoque para o processamento de sucos. 2014;01(2):32–40.
43. Campos P, Dosualdo GL, Cristianini M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. *Brazilian J Food Technol*. 2003;6(2):351–7.
44. Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid goods during storage: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2012;11(3):307–22.
45. Meneses T. *Acta Tecnológica*. 2013;2:30–5.
46. Butz P, García AF, Lindauer R, Dieterich S, Bognar A, Tauscher B. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *J Food Eng*. 2003;56(February):233–6.

47. Engmann NF, Ma Y, Ying X, Qing Y. Investigating the effect of high hydrostatic pressure processing on anthocyanins composition of mulberry (*Morus moraceae*) Juice. Czech J Food Sci. 2013;31(1):72–80.
48. Aghamohammadi B, Morshedi A, Akbarian M, Akbarian A, Hadidi M, Moayedi F. Effect of high pressure processing of food characteristics: a review of quality aspect. Int J Biosci. 2014;4(10):193–205.
49. Kadam PS, Jadhav BA, Salve RV, Machewad GM. Review on the high pressure technology (HPT) for food preservation. J Food Process Technol. 2011;03(01):1–5.
50. Vila Real HJ, Alfaia AJ, Calado ART, Ribeiro MHL. High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion. Food Chem. 2007;102(3):565–70.
51. Christiansen KF, Krekling T, Kohler A, Vegarud G, Langsrud T, Egelanddal B. Microstructure and sensory properties of high pressure processed dressings stabilized by different whey proteins. Food Hydrocoll. 2006;20(5):650–62.
52. Buckow, R.; Heinz V. High pressure processing - a database of kinetic information. Chemistry Engineering Technology.; 2008. 1081-1095.
53. Fraeye I, Duvetter T, Verlent I, Ndaka Sila D, Hendrickx M, Van Loey A. Comparison of enzymatic de-esterification of strawberry and apple pectin at elevated pressure by fungal pectinmethylesterase. Innov Food Sci Emerg Technol. 2007;8(1):93–101.
54. Pedro HAL, Alfaia AJ, Marques J, Vila-Real HJ, Calado A, Ribeiro MHL. Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-pressure. Enzyme Microb Technol. 2007;40(3):442–6.
55. Vila-Real H, Alfaia AJ, Phillips RS, Calado AR, Ribeiro MHL. Pressure-enhanced activity and stability of α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase activities expressed by naringinase. J Mol Catal B Enzym. 2010;65(1-4):102–9.
56. San Martin-Gonzalez, M.F.; barbosa-Cánovas, G.V.; Swanson BG. Food processing by high hydrostatic pressure. Crit Rewies Food Sci Nutr. 2002;42(6):627–45.
57. Oey I, Van der Plancken I, Van Loey A, Hendrickx M. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? Trends Food Sci Technol. 2008;19(6):300–8.
58. Bull MK, Zerdin K, Howe E, Goicoechea D, Paramanandhan P, Stockman R, et al. The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. Innov Food Sci Emerg Technol. 2004;5(2):135–49.
59. Nunes MAP, Vila-Real H, Fernandes PCB, Ribeiro MHL. Immobilization of naringinase in PVA-alginate matrix using an innovative technique. Appl Biochem Biotechnol. 2010;160(7):2129–47.
60. Marques J, Vila-Real HJ, Alfaia AJ, Ribeiro MHL. Modelling of the high pressure-temperature effects on naringin hydrolysis based on response surface methodology. Food Chem. 2007;105(2):504–10.

61. Cho AR, Chun YG, Kim BK, Park DJ. Preparation of chitosan-TPP microspheres as resveratrol Carriers. J Food Sci. 2014;79(4):E568–76. A
62. Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique. (2013). ISO 4833-2 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms.
63. Mateus V, Faisca P. Development of TNBS-induced colitis: animal model to test new pharmacological approaches. Acta Farm Port. 2013;2(2):3–9.
64. Biz A, Farias FC, Motter FA, De Paula DH, Richard P, Krieger N, et al. Pectinase activity determination: an early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works! PLoS One. 2014;9(10).

7 Anexos

Tabela 7-1: Valores de pH do sumo de laranja dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Laranja	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	3,59	-	-	-	-
Q-A P	3,54	3,51	3,51	3,61	3,59
Q P	-	3,8	3,94	4,00	3,98
Q-A N+P	3,57	3,50	3,53	3,53	3,62

Tabela 7-2: Valores de pH do sumo de toranja dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Toranja	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	3,10	-	-	-	-
Q-A P	3,11	3,14	3,05	3,11	3,09
Q P	-	3,30	3,45	3,48	3,47
Q-A N+P	3,10	3,04	3,03	3,12	3,09
Q-A N	-	-	-	3,16	-

Tabela 7-3: Valores de pH do sumo de limão dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Limão	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	2,36	-	-	-	-
Q-A P	2,45	2,36	2,43	2,39	2,40
Q P	-	2,40	2,53	2,55	2,54
Q-A N+P	2,40	2,35	2,34	2,37	2,44

Tabela 7-4: Valores de pH do sumo de framboesa dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Framboesa	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	3,06	-	-	-	-
Q-A P	3,10	3,12	3,07	3,05	3,11
Q P	-	3,47	3,56	3,66	3,69
Q-A N+P	3,07	3,03	3,05	3,06	3,10
Q-A N	-	-	-	3,15	-

Tabela 7-5: Valores de pH do sumo de framboesa dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Amora	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	3,09	-	-	-	-
Q-A P	3,21	3,18	3,25	3,21	3,34
Q P	-	4,27	3,76	4,69	4,31
Q-A N+P	3,17	3,13	3,27	3,19	3,17
Q-A N	-	-	-	3,38	-

Tabela 7-6: Teor de ácido ascórbico (mg/mL) do sumo de laranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Laranja	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	0,88	-	-	-	-
Q-A P	0,84	0,72	0,72	0,72	0,8
Q P	0,84	0,92	0,76	0,88	0,92
Q-A N+P	-	0,84	0,68	0,72	0,84

Tabela 7-7: Teor de ácido ascórbico (mg/mL) do sumo de toranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Toranja	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	0,6	-	-	-	-
Q-A P	0,52	0,56	0,4	0,52	0,4
Q P	0,52	0,52	0,6	0,6	0,52
Q-A N+P	-	0,48	0,52	0,6	0,52
Q-A N	-	-	-	0,52	-

Tabela 7-8: Teor de ácido ascórbico (mg/mL) do sumo de limão, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Limão	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	0,48	-	-	-	-
Q-A P	0,44	0,52	0,44	0,48	0,4
Q P	0,44	0,6	0,48	0,52	0,48
Q-A N+P	-	0,52	0,52	0,56	0,44

Tabela 7-9: Percentagem de carotenóides do sumo de laranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Laranja	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	100,00	-	-	-	-
Q-A P	99,28	99,28	100,72	173,01	171,08
Q P	97,59	97,35	97,59	174,22	171,33
Q-A N+P	-	96,14	100,48	162,17	161,45

Tabela 7-10: Percentagem de carotenóides do sumo de toranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Toranja	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	100,00	-	-	-	-
Q-A P	99,76	98,05	101,46	173,17	172,44
Q P	100,00	97,32	98,05	175,12	171,71
Q-A N+P	-	96,34	96,83	163,17	162,93
Q-A N	-	-	-	172,68	-

Tabela 7-11: Percentagem de carotenóides do sumo de limão, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Limão	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	100,00	-	-	-	-
Q-A P	101,80	100,77	92,80	171,98	161,70
Q P	103,08	99,23	101,54	180,46	178,92
Q-A N+P	-	102,31	103,86	167,10	148,07

Tabela 7-12: °Brix do sumo de laranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Laranja	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	11,3	-	-	-	-
Q-A P	10,2	10,2	10,1	10,2	10,4
Q P	-	11,3	10,2	10,1	9,8
Q-A N+P	10	11	9,8	10,2	10,2

Tabela 7-13: °Brix do sumo de toranja, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Toranja	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	10,9	-	-	-	-
Q-A P	9,1	9,8	10	10	9
Q P	-	9,2	10	9,6	9
Q-A N+P	9,1	10,1	10	9,2	11
Q-A N	-	-	-	9,8	-

Tabela 7-14: ° Brix do sumo de limão, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Limão	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	7,1	-	-	-	-
Q-A P	6,2	6,2	6,1	6,8	6,8
Q P	-	6,2	6,3	7,1	6,1
Q-A N+P	6,3	6,9	5,9	7	6,8

Tabela 7-15: ° Brix do sumo de framboesa, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Framboesa	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	4	-	-	-	-
Q-A P	3,3	3,1	3,3	3,8	3,9
Q P	-	3,2	4,3	3,8	3,1
Q-A N+P	3,3	3,3	4,0	4	4,0
Q-A N	-	-	-	3	-

Tabela 7-16: ° Brix do sumo de amora, dos ensaios do estudo da pectinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A P) e em quitosano (Q P), da naringinase imobilizada em quitosano-alginato (Q-A N) e da pectinase (P) e naringinase (N) imobilizadas em quitosano-alginato (Q-A N+P), a 25°C, a diferentes pressões.

Sumo Amora	0,101 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa	185 MPa
Controlo	2,1	-	-	-	-
Q-A P	2	2	2	2	1,8
Q P	-	1,9	2	2,1	1,9
Q-A N+P	2	3	2	2,1	2,0
Q-A N	-	-	-	2	-