

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

SAMANTHA LEMKE GONZALEZ

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINA METILESTERASE EM
PECTINASES INDUSTRIAIS E A ATIVIDADE RESIDUAL EXÓGENA NO SUCO
DE MANGA**

PONTA GROSSA

2009

SAMANTHA LEMKE GONZALEZ

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINA METILESTERASE EM
PECTINASES INDUSTRIAIS E A ATIVIDADE RESIDUAL EXÓGENA NO SUCO
DE MANGA**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Neiva Deliberali Rosso

Co-orientadora : Prof^a Dr^a Eliana Beleski Borba
Carneiro

PONTA GROSSA

2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

G643d Gonzalez, Samantha Lemke
 Determinação da atividade da pectina metilesterase em pectinases industriais e a atividade residual exógena no suco da manga. / Samantha Lemke Gonzalez. Ponta Grossa, 2009.
 93f.
 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientadora: Profa. Dra. Neiva Deliberali Rosso
 Co-orientador : Profa. Dra. Eliana Beleski Borba Carneiro

 1. Pectina. 2. Pectina metilesterase. 3. Atividade residual.
 4. Potenciometria. 5. Espectroscopia Uv-Vis. 6. Suco de manga.
 I. Rosso, Neiva Deliberali . II. Carneiro, Eliana Beleski Borba. III. T

CDD: 547.782

TERMO DE APROVAÇÃO

SAMANTHA LEMKE GONZALEZ

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINA METILESTERASE EM PECTINASES INDUSTRIAIS E A ATIVIDADE RESIDUAL EXÓGENA NO SUCO DE MANGA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª Neiva Deliberali Rosso
UEPG/PR

Prof^ª Dr^ª Margarida Masami Yamaguchi
UTFPR/PR

Prof^ª Dr^ª Mareci Mendes de Almeida
UEPG/PR

Prof^º Dr^º Gilvan Wosiacki
UEPG/PR

Ponta Grossa, 06 de fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

*A minha mãe, Dorni, aos meus irmãos, Alberto
e Jordana, e minha madrinha, Nilsa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela família que me deu, pelas oportunidades que me ofereceu, pelas pessoas que colocou no meu caminho, por estar sempre me concedendo graças e me dar a força necessária nos momentos difíceis, especialmente quando achei que não conseguiria terminar este trabalho. Graças a Ele posso considerar-me uma pessoa privilegiada.

Agradeço à minha mãe, Dorni Lemke, meu porto seguro, pelo seu constante apoio, amor e dedicação; aos meus irmãos Alberto e Jordana, por sua compreensão, carinho e afeto; à minha madrinha, Nilsa Lemke, minha segunda mãe, por sempre me apoiar e me amar. O que posso dizer-lhes é: “Amo muito vocês. Tenho muita sorte por tê-los na minha vida”.

Agradeço à Professora Doutora Neiva Deliberali Rosso, pelo seu incentivo, orientação competente e relevantes ensinamentos que me proporcionou no decorrer desta pesquisa. Agradeço-lhe, também, pelo seu exemplo de profissionalismo, dedicação, disponibilidade e amizade.

Agradeço à Professora Doutora Eliana Beleski Borba Carneiro, pelo seu apoio e pelas importantes sugestões apresentadas, que contribuíram significativamente para a elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Professor Doutor Gilvan e à Professora Doutora Mareci, pelas análises críticas do trabalho e pelas suas sugestões enriquecedoras.

Agradeço ao Professor Doutor Paulo Borba Carneiro, pela ajuda na elaboração deste trabalho e também por sua amizade.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade de realizar meu sonho, o Mestrado.

Agradeço a Coordenação, ao corpo docente e colegas do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Agradeço aos estagiários - Cíntia, Diokely, Tiago, Eliane, Gabriele e Mayra - pela valiosa ajuda que me propiciaram durante a realização dos experimentos.

Agradeço aos amigos que conquistei no mestrado - Edenes, Ricardo, Alessandra, Francieli, Cíntia, Carol e Carmen - pela sua ajuda, carinho e conselhos. Nossas histórias serão sempre lembradas.

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As pectinases, um grupo de enzimas que degradam substâncias pécicas e rompem ligações glicosídicas, são produzidas por fungos filamentosos, leveduras e bactérias, mas encontram-se também em plantas em geral e em frutas, em particular. Na indústria de sucos as enzimas pectinolíticas são adicionadas para aumentar o rendimento do processo, diminuir a viscosidade e reduzir o tempo de filtração. A pectina metilesterase, PME, hidrolisa os grupos metil éster, formando grupos carboxílicos na cadeia da pectina, produzindo metanol e H_3O^+ . Portanto, é fundamental o seu conhecimento, a fim de controlar a eficiência do tratamento. O objetivo deste trabalho foi determinar as condições ótimas da atividade da PME presente em preparações industriais, propor um procedimento potenciométrico para determinação da atividade da enzima e comparar os dados com os obtidos por potenciometria tradicional e Uv-Vis, avaliar a eficiência do método proposto na determinação da atividade residual da PME exógena no suco de manga. A atividade da PME nas três amostras comerciais, Pectinex 100L Plus, Panzym Univers e Panzym Clears, foi determinada por potenciometria, espectroscopia Uv-Vis, com o indicador azul de bromofenol, e pela ação do álcool oxidase com acetil acetona. A reação consistiu de $5,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ de pectina de maçã, $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ de cloreto de sódio e $50 \text{ }\mu\text{L}$ de enzima pectinolítica comercial para um volume de 30 mL . Em todos os experimentos a desmetoxilação enzimática mostrou uma cinética de primeira ordem, com maior atividade em pH 4,0 a 4,5 e $45 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo que a inativação completa ocorreu a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min , nas três preparações industriais. A inativação térmica da PME das preparações Pectinex 100L Plus e da Panzym Clears ocorreu sob mesmas condições, quando a atividade foi medida pelos procedimentos de $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ ou de $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$. A atividade da PME nas preparações industriais a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 4,5, determinada por espectroscopia Uv-Vis com o indicador azul de bromofenol, apresentou boa correlação com a atividade determinada pelos procedimentos por potenciometria. A estabilidade do indicador em solução com a pectina permite a sua utilização para determinar a atividade da PME em amostras nas quais o pH ótimo localiza-se na faixa ácida. A liberação do metanol medida pela álcool oxidase, seguida da reação com a acetil acetona para determinar o formaldeído, mostrou boa concordância com os resultados dos procedimentos de medida de atividade enzimática utilizados neste trabalho. A inativação da PME residual em suco de manga ocorreu na temperatura de $75 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min de exposição no procedimento $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ e durante 10 min de exposição pelo procedimento $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$. A atividade residual da PME a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por $10, 20$ e 30 min de exposição em presença do suco foi maior do que no controle, indicando o seu efeito protetor. O procedimento da $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$ apresenta boa correlação com os demais métodos, com a vantagem de medidas precisas e diretas da $[\text{H}^+]$, dispensando uma série de reagentes e materiais de custos elevados.

Palavras Chaves: Pectina. Pectina metilesterase. Atividade residual. Potenciometria. Espectroscopia Uv-Vis. Suco de manga.

ABSTRACT

Pectinases, a group of enzymes that degrade pectic substances and break glycosidic linkages, are produced by fungi, yeasts and bacteria, but are also in plants in general and fruit in particular. In the juice industry the pectinolytic enzymes are added to increase the efficiency of the process, decrease the viscosity and reduce the time of filtration. The pectin methylesterase, PME, hydrolyzes the methyl ester groups, forming carboxyl groups in pectin chain, releasing methanol and H_3O^+ . Therefore, its knowledge is vital in order to control the effectiveness of the treatment. The purpose of this study was to determine the optimum conditions of the activity of the pectin methylesterase in industry preparations, proposing a potentiometric procedure for determining the PME activity and compare the data with those obtained by traditional potentiometry and Uv-Vis, evaluate the efficacy of this method in determining the residual activity exogenous of PME in mango juice. The activity of PME in the three commercial samples, Pectinex 100L Plus, Panzym Univers and Panzym Clears, was determined by potentiometry, Uv-Vis spectroscopy, with the bromophenol blue indicator, and the action of alcohol oxidase with acetyl acetone. The reaction consisted of 5.00 mg.mL^{-1} apple pectin, 0.100 mol.L^{-1} sodium chloride and $50 \text{ }\mu\text{L}$ commercial pectinolytic enzyme for a volume of 30 mL . In all experiments the enzyme deesterification showed first-order kinetics, with increased activity at pH 4.0 to 4.5 and $45 \text{ }^\circ\text{C}$, whereas the complete inactivation occurred at $75 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 minutes, in the three industrial preparations. The thermal inactivation of the PME of Pectinex 100L Plus and Panzym Clears preparations occurred under the same conditions, when the activity was measured by the procedures of $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{time}}$ or of $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{time}}$. The activity of PME in industrial preparations at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and pH 4.5, determined by UV-Vis spectroscopy with bromophenol blue indicator, showed good correlation with the activity determined by the procedures by potentiometry. The stability of the indicator in the pectin solution allows its use to determine the PME activity in samples in which the optimum pH is located in acid band. The release of methanol as measured by alcohol oxidase, followed by the reaction with acetyl acetone to determine the formaldehyde, showed good agreement with the results of the enzyme activity measuring procedures used in this research. The inactivation of residual PME in mango juice occurred at $75 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 minutes of exposure in the procedure $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{time}}$ and 10 minutes of exposure during the procedure $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{time}}$. The residual activity of PME in $70 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10, 20 and 30 minutes of exposure in the presence of juice was higher than in the control, indicating its protective effect. The procedure of $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{time}}$ shows good correlation with other methods, with the advantage of precise and direct measures of $[\text{H}^+]$, excusing a series of reagents and high costs materials.

Key words: Pectin. Methylesterase pectin. Residual activity. Potentiometry. Uv-Vis spectroscopy. Mango juice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura esquemática da pectina	16
Figura 2 - Estrutura química da cadeia de pectina	17
Figura 3 - Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina: Polimetilgalacturonato liase, PMGL, polimetilgalacturonase, PMG, pectina metilesterase, PME, poligalacturonato liase, PGL , e poligalacturonase, PG.....	20
Figura 4 - Local indicado onde a PME atua nas substâncias pécicas	30
Figura 5 - Mangas do cultivar Tommy atkins utilizadas na preparação do suco.....	49
Figura 6 - Suco de manga, antes (a) e após (b) a centrifugação	50
Figura 7 - Influência do pH na atividade da PME, Panzym Univers, a 45°C	52
Figura 8 - Influência da temperatura na atividade da PME, Panzym Univers, pH 4,0	53
Figura 9 - Estabilidade térmica da pectinase, Panzym Univers, em 5 mg.mL ⁻¹ de pectina de maçã, pH igual a 4,0, temperatura 45°C e 0,100 mol.l ⁻¹ de NaCl.....	54
Figura 10 - Influência do pH na atividade da PME, Panzym Clears, a 45°C	55
Figura 11 - Influência da temperatura na atividade da PME, Panzym Clears, a pH 4,0	56
Figura 12 - Estabilidade térmica da pectinase, Panzym Clears, em 5 mg.mL ⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, temperatura 45°C e 0,100 mol.L ⁻¹ de NaCl	57
Figura 13 - Influência do pH na atividade da PME, Pectinex 100L Plus, a 45°C	58
Figura 14 - Influência da temperatura na atividade da PME, Pectinex 100L Plus, a pH igual 4,0	59

Figura 15 - Estabilidade térmica da pectinase, Pectinex 100L Plus, em 5 mg.mL ⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, a 45°C e 0,100 mol.l ⁻¹ de NaCl.....	60
Figura 16 - Gráfico de Arrhenius do efeito da temperatura na atividade da PME de, Panzym Clears	61
Figura 17 - Cinética da reação da PME, Pectinex 100L Plus, com 5mg.L ⁻¹ de pectina, a 25°C e pH 4,5.....	64
Figura 18 - Atividade residual da PME, Pectinex 100L Plus, em 5 mg.mL ⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, temperatura 45°C e 0,100 mol.L ⁻¹ de NaCl, por ΔpH..	67
Figura 19 - Atividade residual da PME na Panzym Clears, em 5 mg.mL ⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, temperatura 45°C, 0,100 mol.L ⁻¹ de NaCl por ΔpH.....	68
Figura 20 - Estabilidade do azul de bromofenol em diferentes valores de pH.	69
Figura 21 - Comportamento do azul de bromofenol em diferentes concentrações de ácido D – galacturônico	71
Figura 22 - Curva padrão do ácido D-galacturônico a temperatura de 25°C	72
Figura 23 - Variação da concentração de H ⁺ em mol produzido na reação em função do tempo em seg	74
Figura 24 - Curva padrão do metanol com a álcool oxidase e o reagente Purpald a 25°C e pH 4,5	78
Figura 25 - Curva padrão do metanol com a álcool oxidase com a acetil acetona a 25°C e pH 4,5	79
Figura 26 - Atividade residual da PME exógena no suco de manga, em 5 mg.ml ⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, temperatura 45°C e 0,100 mol.l ⁻¹ de NaCl, ΔV _{NaOH}	82
Figura 27 - Atividade residual da PME exógena, Pectinex 100L Plus, no suco de manga em 5 mg.ml ⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, a 45°C e 0,100 mol.L ⁻¹ de NaCl, ΔpH.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conversão do pH em concentração hidrogeniônica, $[H^+]$, em função do tempo e a variação da concentração hidrogeniônica, $\Delta[H^+]$, que corresponde a cada intervalo de tempo na determinação da atividade da PME, Pectinex 100L Plus, a 25°C e pH 4,5	64
Tabela 2 - Atividade da PME, nas três amostras industriais, pelo procedimento ΔpH e ΔV_{NaOH} a 25°C e pH 4,5	65
Tabela 3 - Absorbâncias, A, variação da A, ΔA , em 592 nm em função do tempo da reação e a variação da concentração de $[H^+]$ que corresponde a cada intervalo de tempo	73
Tabela 4 - Atividade em $mmol.s^{-1}$ da PME por Uv-Vis com os dois indicadores a pH 4,5 a 25 °C	76
Tabela 5 - Comparação das Atividades da PME obtidas nos diferentes métodos a 25°C e pH igual 4,5	77
Tabela 6 - Atividade da PME de uma amostra industrial de pectinase, Pectinex 100L Plus, por diferentes métodos nas condições de 25° e pH 4,5	81
Tabela 7 - Atividade residual da PME exógena no suco de manga a diferentes temperaturas e tempos de exposição pelos procedimentos da $\Delta V_{NaOH} / \Delta t_{tempo}$ e $\Delta pH / \Delta t_{tempo}$, expressa em $10^{-3} \times mmol.s^{-1}$	84

LISTA DE SIGLAS

A	Absorbância
A	Procedimento $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$
B	Procedimento $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$
CG	Cromatografia gasosa
E.C.	Comissão de Enzima
FPE	Pectina metilesterase de <i>Aspergillus niger</i>
FPG	Poligalacturonase de <i>Aspergillus niger</i>
HGA	Homogalacturonana
HIPEF	Pulso elétricos de alta intensidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MBTH	N-metilbenzotiozolinona-2-hidrazona
PG	Poligalacturonase
PGL	Poligalacturonato liase
PME	Pectina metilesterase
PMG	Polimetilgalacturonase
PMGL	Polimetilgalacturonato liase
PPE	Pectina metilesterase do tomate
pH ₀	pH inicial
pH _f	pH final
RGI	Ramnogalacturonana I
RGII	Ramnogalacturonana II
Uv-Vis	Ultravioleta-Visível
XGA	Xilogalacturonana
[H ⁺] ₀	Concentração hidrogeniônica em ausência da enzima
[H ⁺] _f	Concentração hidrogeniônica após a ação da enzima
[MeOH]	Concentração de metanol
ΔA	Variação da absorbância
ΔpH	Variação de pH
$\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$	Variação de pH pela variação do tempo de reação
ΔV_{NaOH}	Variação de volume de NaOH
$\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$	Variação do volume de NaOH pela variação do tempo de reação
$\Delta [\text{H}^+]$	Variação da concentração hidrogeniônica
$\Delta [\text{MeOH}]$	Variação da concentração de metanol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 PECTINA	15
2.2 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	19
2.2.1 Pectinases de Frutas e Vegetais	21
2.2.2 Pectinases Industriais	25
2.2.3 Aplicações das Pectinases	28
2.3 PECTINA METILESTERASE	29
2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAR A ATIVIDADE DA PECTINA METILESTERASE	30
2.4.1 Potenciometria	30
2.4.2 Espectrometria de Absorção Molecular no Ultravioleta-Visível	31
2.4.2.1 Determinação de Ácido	31
2.4.2.2 Determinação de Metanol	32
2.5 MÉTODOS DE INATIVAÇÃO DA PME	35
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAIS	41
4.1.1 Substrato	41
4.1.2 Eletrólito Suporte	41
4.1.3 Solvente	41
4.1.4 Preparações Enzimáticas Industriais	41
4.1.5 Titulante	41
4.1.6 Indicadores	42
4.1.7 Ácido D - galacturônico	42
4.1.8 Soluções Tampão	42
4.1.9 Álcool Oxidase	42
4.1.10 Metanol	43
4.1.11 Purpald	43

4.1.12 Acetil Acetona.....	43
4.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PME	43
4.2.1 Potenciometria.....	43
4.2.1.1 Atividade da PME por Variação de Volume de NaOH	43
4.2.1.2 Atividade da PME por Variação de pH.....	45
4.2.2 Espectroscopia Ultravioleta-Vísivel.....	45
4.2.3 Determinação do Metanol com Álcool Oxidase	46
4.2.3.1 Purpald.....	47
4.2.3.2 Acetil Acetona.....	48
4.5 Determinação da Atividade Residual da PME Exógena no Suco de Manga.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO, TEMPERATURA ÓTIMA E ATIVIDADE RESIDUAL DA PANZYM UNIVERS, PANZYM CLEARS E PECTINEX 100L PLUS.....	52
5.2 ENERGIA DE ATIVAÇÃO PARA A PME NAS TRÊS AMOSTRAS DE PECTINASES.....	61
5.3 ATIVIDADE DA PME PELO PROCEDIMENTO DA VARIAÇÃO DE pH	62
5.4 ATIVIDADE DA PME POR UV-VIS.....	69
5.4.1 Estabilidade do Azul de Bromofenol a Diferentes pH.....	69
5.4.2 Curva Padrão do Ácido D-Galacturônico com o Azul de Bromofenol.....	70
5.4.3 Determinação da Atividade da PME Por Uv-Vis	72
5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PME, NA AMOSTRA DA PECTINEX 100L PLUS, PELA QUANTIFICAÇÃO DO METANOL	77
5.5.1 Purplad.....	77
5.5.2 Acetil Acetona.....	79
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE RESIDUAL DA PME EXÓGENA NO SUCO DE MANGA PELOS PROCEDIMENTOS ΔV_{NaOH} E ΔpH	81
6 CONCLUSÕES	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

O mercado de sucos vem crescendo com o passar dos anos e isso se deve, sobretudo, ao consumidor, pois ele procura comodidade, mas também requer um produto de qualidade que tenha as características da fruta *in natura*. Para atender a essas exigências as indústrias vêm aprimorando as etapas de processamento, a fim de obter produtos padronizados e de qualidade. Segundo a Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO), o Brasil ocupou o terceiro lugar na produção mundial de frutas em 2004 e como consequência a indústria tem ofertado ao consumidor sucos, geléias, compotas, entre outros produtos. O Brasil é o maior exportador mundial de suco concentrado de laranja, e esse crescimento deve-se ao aprimoramento de técnicas de plantio, de processamento, transporte e logística.

Nos sucos de frutas, a turbidez, consistência e aparência estão relacionadas às substâncias pécticas, que aumentam a viscosidade do suco, dificultando as operações de filtração e concentração. Para melhorar a qualidade do processo são utilizadas enzimas pectinolíticas (poligalacturonase, pectina metilesterase e pectina liase) na extração e clarificação de sucos. As enzimas são adicionadas para degradar a pectina e outros componentes de alto peso molecular, resultando no aumento do rendimento, diminuição da viscosidade e redução do tempo de filtração do processo.

Entre as pectinases, encontra-se a pectina metilesterase, que hidrolisa os grupos metil éster da pectina formando metanol e produzindo ácido mono e poligalacturônico. Para a indústria de sucos a ação da pectina metilesterase no suco é indesejável, porque altera a turbidez do produto, devido ao fato de o ácido mono e poligalacturônico reagem com os íons cálcio do meio provocando a precipitação sob a forma de pectatos, o que promove uma clarificação espontânea. Assim, faz-se necessário a inativação da pectina metilesterase, que pode ser realizada através de tratamento térmico, aumento da pressão ou por pulsos elétricos

(BAYINDIRH et al., 2006; MARTÍNEZ, FORTUNY, BELLOSO, 2006; ZHANG et al., 2006; SAMPEDRO, RODRIGO, HENDRICKESE, 2008; WILINSKA et al., 2008). Contudo, é preciso que as características dos sucos *in natura* sejam preservadas ao máximo.

Os métodos utilizados para determinar a atividade enzimática da PME são a titulometria e a espectroscopia Ultravioleta-Vísivel. Com relação à titulometria, a atividade da enzima é proporcional à velocidade inicial de consumo de base, hidróxido de sódio, pela variação do tempo ($\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$). A determinação da atividade enzimática por esse método tem certas limitações, porque pequenas adições de base podem causar aumentos significativos do pH, além de associar o ajuste do pH ao tempo real da reação sem considerar o período de estabilização do pH. Ou seja, torna-se quase impossível manter o pH constante no sistema, visto que a enzima atua rapidamente nos primeiros minutos da reação.

Por essa razão, estudos para aprimorar o método da titulometria contribuirão para obtenção de resultados mais precisos para a comunidade científica e tornará menos dispendioso o trabalho nas indústrias. No presente trabalho propõe-se um procedimento potenciométrico alternativo para determinar a atividade da pectina metilesterase, bem como acompanhar a inativação da PME exógena em sucos de manga.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PECTINA

Substâncias pécticas compreendem heteropolissacarídeos ácidos complexos que apresentam alto peso molecular, 25 a 360 kDa. Estão presentes na maioria dos tecidos vegetais, principalmente em frutos maduros. A sua abundância relativa e detalhes estruturais diferem entre tipos de células e espécies. São encontradas como componente principal na lamela média entre as células na forma de pectato de cálcio e de magnésio (JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005).

A Sociedade Americana de Química (ALKORTA et al., 1998) classificou substâncias pécticas em quatro tipos principais: protopectina, ácido péctico, ácido pectínico e pectina. A **protopectina** é definida como substância péctica insolúvel em água e presente em tecidos intactos, que submetida a uma hidrólise limitada produz pectina ou ácido pectínico. **Ácido péctico** é um polímero solúvel de galacturanas que contém quantidades negligenciáveis de grupos metoxil, sais ácidos ou normais que são chamados de pectatos. **Ácido pectínico** é a cadeia poligalacturana que contém maior que zero e menor que 75% de unidades galacturonato metoxiladas, sais ácidos ou normais de ácidos pectínicos, denominados de pectinatos. **Pectina**, galacturonato polimetilado, é o material polimérico em que pelo menos 75% dos grupos carboxil das unidades galacturonato são esterificados com metanol; ela confere rigidez ao tecido quando está ligada à celulose da parede celular.

Segundo Fu e Rao (1999 e 2001), a pectina é classificada de acordo com o grau de esterificação, que é a proporção de grupos carboxil esterificados com metanol na cadeia galacturônica, em alto grau de metoxilação e baixo grau de metoxilação. A pectina com alto grau de metoxilação contém mais de 50% dos grupos carboxil na forma de metil éster. Já a

pectina com baixo grau de metoxilação apresenta menos de 50% dos grupos carboxil na forma de metil éster.

De acordo com McNeil et al. (1984) e Scheller et al. (2007), a pectina consiste de um grupo de polissacarídeos ácidos, com estrutura complexa, e pode ser classificada em homogalacturonana (HGA), ramnogalacturonana I (RGI), ramnogalacturonana II (RGII) e xilogalacturonana (XGA). Aparentemente, esses polímeros são covalentemente ligados uns aos outros. Dados de pesquisa disponíveis mostram um modelo esquemático para a pectina como o representado na Figura 1.

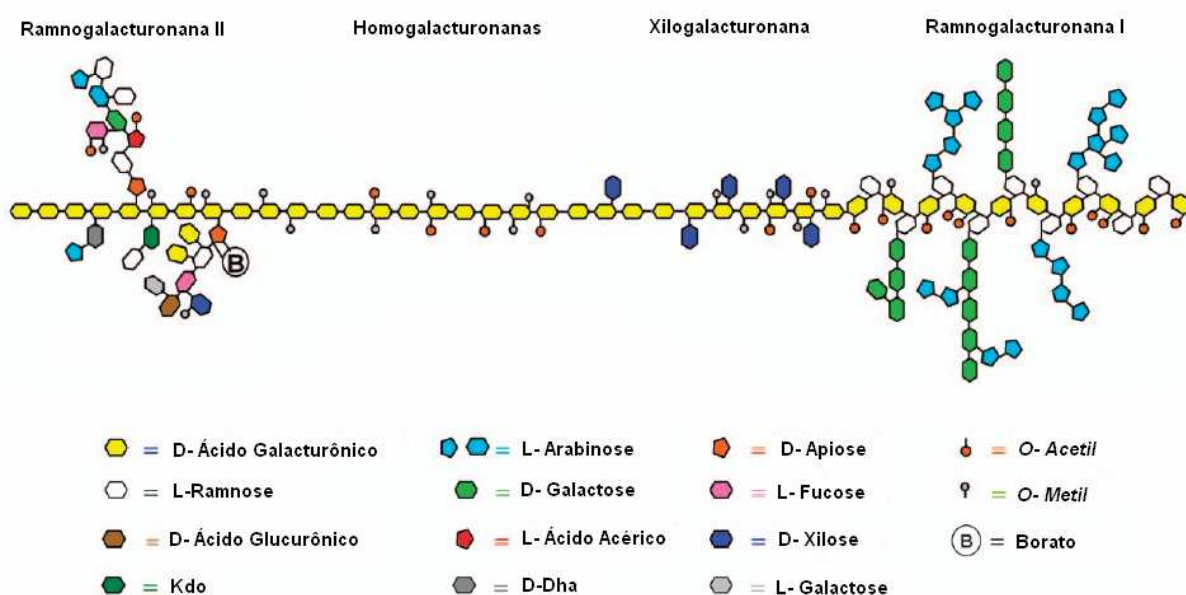


Figura 1 – Estrutura esquemática da pectina.
Fonte: SCHELLER et al., 2007.

Quimicamente a molécula de pectina, Figura 2, consiste de uma estrutura em cadeia com unidades de ácido D-galacturônico ligadas α (1 $\rightarrow$ 4), contendo regiões ricas em L-ramnose, estes são pontos de ramificação para cadeias laterais de arabinose, galactose e xilose (WHITAKER, 1994; ALKORTA et al., 1998). Os grupos carboxil do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metoxil, e parcialmente ou completamente

neutralizados por íons sódio e potássio. Alguns dos grupos hidroxil sobre os C₂ e C₃ podem ser acetilados.

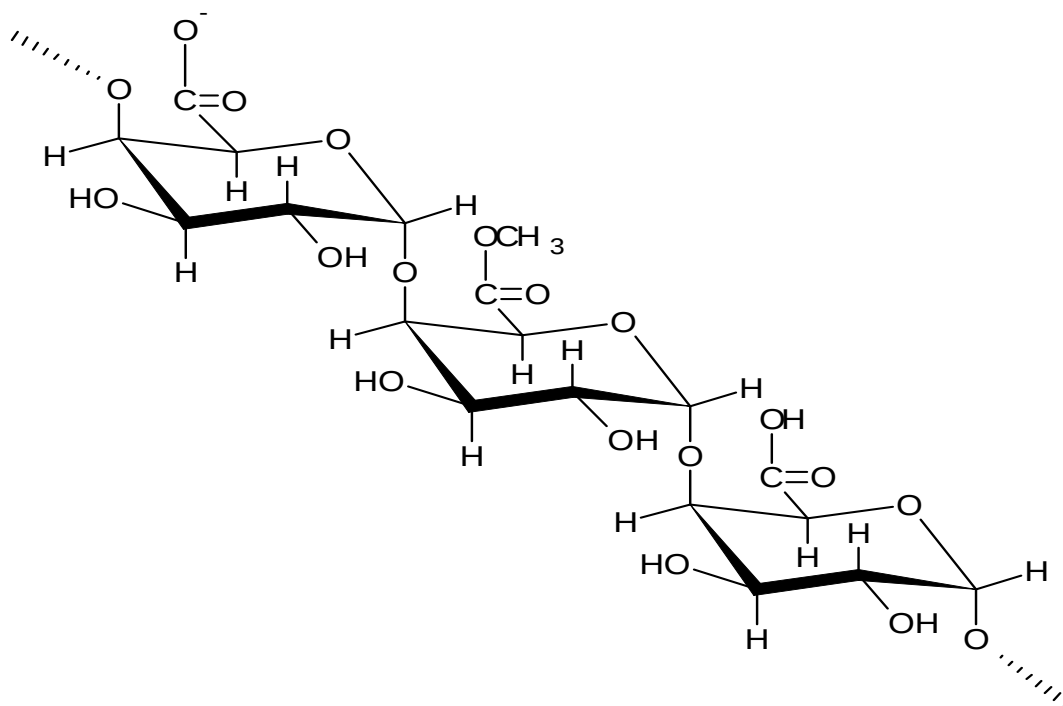


Figura 2 – Estrutura química da cadeia de pectina.
Fonte: HOURDET, MULLER, 1991.

Scheller et al. (2007) e McNeil et al. (1984) relataram que a região HGA é formada predominantemente por unidades de α -D-ácidos galacturônicos com ligação 1 $\rightarrow$ 4. Esse polímero forma géis rígidos e insolúveis na presença de cálcio. Na região RGI, a cadeia principal contém unidades repetidas de $\rightarrow$ 2) α L-Rha-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GalA-(1 $\rightarrow$. Metade das unidades de ramnose são substituídas em O-4 por cadeias laterais de monossacarídeos, apresentando principalmente galactose e ramnose. Mas ainda podem encontrar-se fucose, ácido glucurônico ou seu derivado 4-O-Me como extremidades não redutoras. A fração de RGII é formada por polissacarídeos complexos que contêm altas proporções de ramnose e açúcares raros como 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose, apinose e ácido acérico. A cadeia principal é composta por unidades de α -D-ácidos galacturônicos em ligações (1 $\rightarrow$ 4). A região

xilogalacturonana , XGA, apresenta a cadeia principal composta por unidades de ácido D-galacturônico ligadas α (1 $\rightarrow$ 4) e contendo cadeia lateral de xilose.

O grau de esterificação da pectina tem influência nas propriedades de geleificação. Segundo Rolin (1993), Fu e Rao (1999 e 2001), pectina com alto grau de esterificação forma gel em pH em torno de 3 e em presença de açúcar. Em pH baixo os grupos carboxilatos são protonados, não carregados, mas hidratados. A função do açúcar consiste em competir com as moléculas de água de hidratação da pectina, expondo áreas hidrofóbicas, nas quais ocorre a união entre os grupos metil éster de diferentes moléculas através de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, promovendo a geleificação. A pectina de baixo grau de esterificação forma gel na presença de íons cálcio, numa ampla faixa de pH, com ou sem açúcar.

Pectina com alto teor de metoxilação pode ser tratada com reagentes alcalinos ou com enzimas, como a PME, cuja função consiste em desmetoxilar a cadeia galacturônica para produzir pectina com baixo teor de metoxilação (RIBEIRO, SERAVALLI, 2004). De Assis et al. (2004) estudaram as condições de produção de pectina de baixo teor de metoxilação usando pectina metilesterase (PME) de acerola livre e imobilizada em gelatina. Observaram que quando a enzima estava livre, as condições ótimas foram baixa concentração de NaCl, 0,1mol.L⁻¹, temperatura relativamente alta, 55 °C, e pH básico, 9. Já quando a enzima encontrava-se imobilizada em gelatina a 40 °C, as condições ótimas foram concentração de NaCl 0,151mol.L⁻¹ e igual valor de pH.

Kurita, Fujiwara e Yamazaki (2008) estudaram o efeito da adição de ácido cítrico na extração de pectina da casca da laranja a diferentes pH e temperatura. A pectina isolada apresentou um baixo grau de esterificação, 8,4%, elevado peso molecular e alto conteúdo de açúcares neutros. A extração da pectina com ácido cítrico em pH neutro mostrou um aumento significativo na viscosidade, quando comparada com uma pectina de controle. Os autores observaram que a atividade da PME foi inibida com o aumento da concentração de ácido

cítrico e que a pectina resultante atingiu as exigências industriais de geleificação e estabilização.

2.2 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Segundo Jayani, Saxena e Gupta (2005), as enzimas pectinolíticas ou pectinases podem ser divididas em três grandes grupos: protopectinases, depolimerases e esterases. As protopectinases degradam a protopectina insolúvel e produzem pectina solúvel. As depolimerases catalisam a hidrólise da ligação glicosídica α (1 $\rightarrow$ 4) de ácidos D-galacturônicos das substâncias pécticas. As esterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxil éster.

As enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como fungos, leveduras e bactérias, degradam substâncias pécticas (Figura 3). No grupo das esterases, encontra-se a pectina metilesterase, PME, que catalisa a hidrólise da ligação C-O nos grupos metoxil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato.

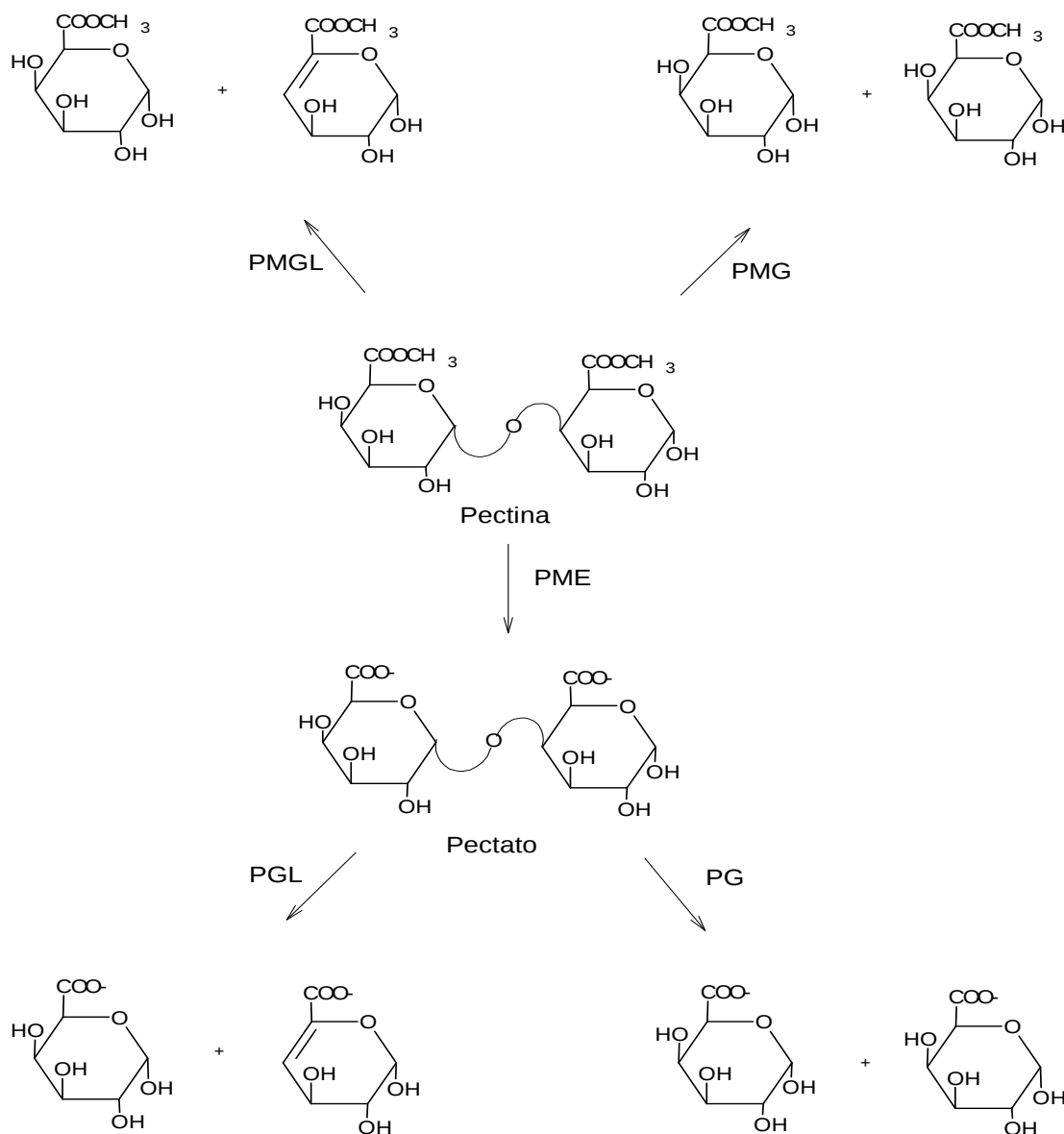


Figura 3 – Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina: Polimetilgalacturonato liase, PMGL, polimetilgalacturonase, PMG, pectina metilesterase, PME, poligalacturonato liase, PGL, e poligalacturonase, PG.

Fonte: UENOJO, PASTORE, 2007.

As pectinases são utilizadas no processamento de sucos e bebidas de frutas, favorecem a clarificação e facilitam a filtração, resultando num maior rendimento do processo (ALKORTA et al., 1998). Segundo Whitaker (1994), as substâncias pécticas são degradadas pela ação das enzimas, resultando no amolecimento de frutas e vegetais. No processamento de frutas, se essas enzimas não forem devidamente inativadas, alteram a turbidez e favorecem a

produção de pequenas quantidades de metanol, composto tóxico que deixa o produto com sabor desagradável.

2.2.1 Pectinases de Frutas e Vegetais

A mudança na textura e consistência de frutos e vegetais no período de amadurecimento é consequência da ação de enzimas pectinolíticas. Há uma conversão da protopectina, substância insolúvel em água, encontrada em frutos verdes, para pectina solúvel, pela ação de protopectinase. A firmeza da polpa da fruta está ligada às substâncias pécticas que compõem a parede celular; na fase de crescimento do fruto, a protopectina mantém forte coesão celular. Segundo Burns e Pressey (1987), o Ca^{2+} tem papel relevante na ação da PME sobre as pectinas. Durante o amadurecimento do fruto, a atividade da PME resulta no aparecimento de grupos carboxílicos com carga negativa, COO^- , reduzindo o grau de esterificação e aumentando a densidade de cargas negativas ao longo da cadeia de pectina. Assim a afinidade por ligação com o Ca^{2+} é aumentada, e essa ligação é considerada de natureza cooperativa, pois impede a ação da PG e, conseqüentemente, mantém a estrutura da parede celular. Quando ambas – a poligalacturonase (PG) e pectina metilesterase (PME) - atuam, promovem a degradação da pectina, modificam a textura do fruto e, em consequência disso, ocorre um amaciamento da polpa da fruta (KLUGE et al., 2002).

A textura de tomates é uma característica importante para a qualidade do fruto, devido à tolerância ao transporte e manuseio durante a colheita e comercialização. Estudos sugerem que a mudança da textura no fruto está associada à alteração das características dos polissacarídeos que compõem a parede celular. Resende et al. (2004) monitoraram a atividade da PME e PG em frutos de tomates em diferentes estádios de maturação e correlacionaram com a mudança na textura, pectina e licopeno. Os tomates foram colhidos no estágio verde-

maduro, acondicionados em um local com umidade relativa de 85-90% e mantidos em temperatura ambiente de 20 ± 2 °C. Os pesquisadores determinaram a atividade enzimática retirando amostras em estádios diferentes de maturação, verde-maduro, “de vez”, maduro e vermelho-maduro. Observaram que os cultivares que se sobressaíram com melhores características para o consumo ao natural apresentaram menor atividade das enzimas PME e PG. Segundo os pesquisadores, isto se deve a uma redução na despolimerização e solubilização das pectinas resultando em maior textura. Também verificaram elevada atividade tanto para a PME como para a PG, em frutos no estágio “de vez”.

Antunes, Gonçalves e Trevevisan (2006) avaliaram a atividade enzimática da poligalacturonase e da PME em frutos de amoreiras-pretas (*Rubus spp.*) mantidas sob diferentes ambientes e períodos de armazenamento. Observaram que a atividade da PME aumentou com o aumento do período de armazenamento, independentemente da cultivar e do meio de conservação, enquanto que a atividade da PG decresceu com o aumento do período de armazenamento.

Laratta et al. (1995) purificaram três isoformas de PME a partir do tomate, as quais foram validadas termicamente em pH 4,5. As curvas de inativação térmica das três isoformas mostraram comportamento exponencial na faixa de temperatura entre 70 a 90 °C. Os resultados demonstraram uma cinética de inativação térmica diferente para as três isoformas da PME. Dessas, duas formas apresentaram comportamento similar e foram mais resistentes a altas temperaturas, representando 70% da atividade total da PME. De Sio et al. (1995) estudaram o comportamento da PME em cinco cultivares de tomate, tanto em sucos como em produtos de tomate. A inativação térmica dessa enzima foi avaliada na faixa de temperatura de 73 – 88 °C. Os diferentes cultivares examinados mostraram uma diferença significativa na atividade da PME e variações na termoresistência.

Laats et al. (1997) verificaram a presença da PME na vagem do feijão verde (*Phaseolus vulgaris* L.), que pode influenciar a textura após esterilização comercial. Duas frações de PME foram parcialmente purificadas, da vagem e da casca, com massa molecular 45 e 29 kDa, respectivamente.

Segundo Assis, Lima e De Faria Oliveira (2000), a PME extraída da acerola mostrou alta estabilidade quando tratada por 100 min a 50 °C, pois perdeu apenas 10% de sua atividade, sendo necessário 110 min a 98 °C para sua completa inativação. A partir disso, os autores concluem que sucos de acerola apresentam temperatura e tempo de inativação mais elevados, quando comparados com as condições de desnaturação dessa enzima em citros.

Granada, Vendrucolo e Treptow (2001) estudaram o processamento do suco de amora-preta de diferentes cultivares como a Tupi, Guarani e Brazos. Extraíram o suco por prensagem a frio com e sem adição de enzimas pectinolíticas. Observaram que a utilização de enzimas, na extração do suco, proporcionou um aumento de 52% no rendimento. Na sequência analisaram o suco clarificado quanto às características químicas e sensoriais. O cultivar Brazos foi estável a ação das enzimas e o suco não alterou suas características. Já no cultivar Tupi, as enzimas alteraram parâmetros químicos e influenciaram nas características sensoriais. No teste de preferência, o suco de amora-preta do cultivar Tupi se destacou em relação ao cultivar Guarani, com 64% de preferência dos consumidores.

Ly-Nguyen et al. (2002) extraíram e purificaram a PME de morangos, observaram que o pH ótimo foi na faixa de 6,9 e 7,0 e a temperatura ótima ficou entre 59 e 60 °C. Verificaram que a PME do morango – a qual contribui com 12% da atividade enzimática total – foi termoestável e que a taxa de inativação aumentou com o aumento da temperatura.

A turbidez em sucos cítricos confere a eles características importantes, como a cor e “flavour”, sendo a pectina um componente principal e essencial na estabilização do suco. Estudos (INGALLINERA et al., 2005) que compararam a atividade total da PME em espécies

diferentes de laranjas, mostraram que a presença de PME reduziu características peculiares em sucos de laranjas, como a coloração e a turbidez. Os pesquisadores determinaram também a estabilidade da enzima em vários tempos de tratamento térmico e em diferentes temperaturas. Observaram que o tratamento a 85 °C por 3 min não comprometeu a estabilidade das antocianinas, mas foi eficaz para inativação da enzima e eliminação parcial dos microrganismos. Segundo Croak et al. (2006), a estabilização do suco pode ser prejudicada na presença de enzimas ativas, PME. A pectina forma complexos de pectato de cálcio e provoca a precipitação das partículas. Os pesquisadores estudaram as mudanças ocorridas no tamanho das partículas do suco de laranja após adição de pectinases e PME. Observaram que as partículas não alteraram de tamanho após a adição de pectinase, mas ocorreu uma agregação das partículas em poucos minutos após adição de PME no suco de laranja em pH natural de 3,8. Observaram também que a quantidade de enzima adicionada afetou a cinética de agregação e verificaram que em pH 6,0 foi necessária uma grande quantidade de enzima para obter o mesmo efeito, enquanto que em pH baixo 2,5 ocorreu rapidamente a agregação de partículas de tamanho maior.

Carbonell et al. (2006) determinaram a atividade da PME em sucos de laranja recém preparados e processados de três variedades diferentes. Segundo os autores, os resultados mostraram que a atividade da PME para os sucos de laranja da variedade Valencia-late e Clementine foi semelhante; já para cultivar Ortanique a atividade da PME foi duas vezes maior que as anteriores. O tratamento térmico brando, a 70 °C durante 30 s ou 74 °C em 10 s, foi suficiente para reduzir a atividade da PME no suco de laranja da variedade Clementine com nível residual abaixo do máximo, de 10 %, para tempo de prateleira de sucos refrigerados.

Sila et al. (2007) extraíram e purificaram a PME a partir da cenoura (*Daucus carota* var. Nerac), estudaram o efeito da pressão e da temperatura na atividade da enzima purificada

bem como em pequenos fragmentos de cenoura. Observaram que sob pressão atmosférica o pH ótimo da PME na cenoura foi de 8,0 a 22,5 °C; a inativação ocorreu acima de 50 °C, contudo mostrou uma notável resistência à pressão de 600 MPa, especialmente a temperaturas menores que 40 °C. Constataram também que a atividade foi altamente dependente da temperatura e da pressão aplicada; a atividade ótima para o sistema modelo e em fragmentos de cenoura foi a 50 °C sob pressão de 300-500 MPa.

2.2.2 Pectinases Industriais

As pectinases são encontradas em plantas, bactérias e fungos. A PME presente em plantas e bactérias tem pH ótimo que varia entre 6 e 8. Já na produzida por alguns fungos, o pH ótimo encontra-se entre 4 e 6. Essa enzima foi identificada em muitas frutas como maçã, banana, limão, laranja, uva, cereja, manga, mamão, pêra, tomate, entre outras (BENEN, VAN ALEBEEK, VORAGEM, 2003).

Pectinases industriais são amplamente utilizadas pelas indústrias de sucos e bebidas de frutas, por isso estudos para elucidar as condições de ação e inativação destas são questões frequentes de pesquisa nesta área. Ceci e Lozano (1998) estudaram métodos para determinar a atividade da poligalacturonase, PME e pectina liase em amostras industriais de enzimas, Röhaphect D5S e Pectinol. Investigaram também a estabilidade térmica e a influência do pH nessas amostras, e observaram que o pH ótimo para PME foi de 4,6.

Mutlu et al. (1999) estudaram os parâmetros cinéticos de uma pectinase comercial, Pectinex Ultra SP-L, acompanharam a mudança na viscosidade de uma solução de pectina pela ação da enzima e determinaram a atividade da PME em pH 3,5 a 35 °C. A energia de ativação da reação catalisada pela pectinase comercial foi de 9,316 Kcal. mol⁻¹.

A manga pode ser processada na forma de néctar, suco e várias bebidas puras ou com outras frutas. Ollé et al. (2000) estudaram o efeito de polissacarídeos de fungos, que continham enzimas pectinolíticas, no purê de manga madura, por 2 h a 50 °C. Observaram que ocorreu uma diminuição na viscosidade do purê, e que esta se deve à hidrólise e ao aumento de ácido galacturônico, arabinose e ramnose. O teste de precipitação com etanol, após 30 min de tratamento, foi negativo no soro, o que indicou uma rápida degradação das substâncias pécticas. Segundo Kashyap et al. (2001), um néctar típico de manga contém de 20-30% de purê, pH em torno de 3,5 e acidez titulável de 0,2-0,3%. Enzimas exógenas foram usadas para aumentar a concentração do néctar da manga ou para produzir suco límpido e concentrado. A adição de pectinases favoreceu a degradação da polpa de manga nas etapas de processamento, resultando em um aumento do rendimento ao redor de 80% de suco total de manga presente na fruta.

Sartoglu et al. (2001) pesquisaram as condições para imobilização de uma amostra de pectinase comercial, Pectinex Ultra SP-L, sobre uma resina de troca aniônica macroporosa, St-DVB. A imobilização foi realizada com partículas de resina por adsorção eletrostática. Os autores compararam os valores das constantes de Michaelis-Menten, K_m e a velocidade máxima, V_{max} , da enzima imobilizada e da forma livre a partir da redução da viscosidade de uma solução de pectina a pH 4,5 e a 35 °C. Observaram que os valores para esses parâmetros foram superiores no sistema em que a enzima encontrava-se imobilizada sob a resina.

Na extração do suco de laranja também são utilizadas as pectinases industriais (KASHYAP et al., 2001), porque proporcionam um aumento na extração de açúcares e substâncias solúveis, aumentam o rendimento e diminuem a viscosidade do suco. Com o tratamento enzimático ocorre a degradação parcial da pectina insolúvel e com isso o produto torna-se estável. As pectinases devem apresentar pequenas concentrações de PME, baixa atividade, para evitar a clarificação do suco. Em sucos não-clarificados, como o de laranja, o

tratamento térmico é uma etapa para a inativação da PME, a qual mantém a turbidez estável. O congelamento do produto também faz com que a enzima permaneça na sua forma inativa.

Duvetter et al. (2005) estudaram a cinética de inativação da PME de *Aspergillus aculeatus* purificada. A reação de inativação foi na faixa de temperatura de 46-56 °C e seguiu uma cinética de primeira ordem. Observaram que a adição de CaCl₂ (50 mM ou 1,0 M) na reação não influenciou os parâmetros de inativação térmica. Verificaram também que a PME foi estável a pressão, a 25 °C e que não ocorreu decréscimo na atividade após pressurização a 700 MPa por 1 h. Concluíram também que a pressão e a temperatura exibem efeitos antagônicos na estabilidade da PME e que a enzima de *A. aculeatus* não foi suscetível à inibição pelo inibidor PME purificado do kiwi.

Pectinases industriais são produzidas por cepas microbiologicamente seguras a partir de *Aspergillus* sp., consistem de uma mistura de várias enzimas distintas bioquimicamente e compõem um líquido âmbar prontamente miscível em água. Grassin et al. (2005) estudaram a composição das pectinases industriais que são utilizadas na maceração de maçã. Verificaram que a composição da amostra depende da cepa de *Aspergillus* sp. utilizada na preparação enzimática, das condições de fermentação e dos métodos empregados na recuperação e purificação da enzima. Constataram que existe uma diversidade enzimática nos produtos nomeados como “pectinases”, em que predominam a concentração de PME e a poligalacturonase.

Nikolic´ e Mojovic (2007) estudaram a ação da poligalacturonase de *Aspergillus niger* (FPG), pectina metilesterase de *Aspergillus niger* (FPE) e pectina metilesterase do tomate (PPE) na hidrólise da pectina de maçã da variedade Budimka (*Pyrus malus* L.). Conduziram a reação por ação individual e combinada das enzimas FPG, FPE e PPE, verificaram que os valores de pH ótimos foram de 4,5, 3,5 e 6,5 e temperatura ótima de 40, 45 e na faixa de 40-

45 °C, respectivamente. Observaram que a enzima FPE apresentou maior eficiência na hidrólise da pectina quando comparada com a PPE.

Fraeye et al. (2007) extraíram e purificaram a pectina de morango, que foi caracterizada e comparada com a massa molar, grau de esterificação e composição de açúcar com a pectina de maçã. Ambas as pectinas foram tratadas com PME de *Aspergillus aculeatus* para determinar a velocidade de desesterificação a pressões de 0,1 até 500 MPa e temperaturas de 20 - 60 °C. Observaram que a atividade ótima da PME de *A. aculeatus* foi a pressões de 200 - 300 MPa, na temperatura de 45-55 °C.

2.2.3 Aplicações das Pectinases

As pectinases podem ser utilizadas nas indústrias de sucos, vinhos, na recuperação de óleos essenciais, extração de óleos vegetais, em alimentos funcionais, no melhoramento para extração de amido de mandioca, fermentação de café e chá, na indústria têxtil, indústria de papel e celulose e em indústria de rações animais (UENOJO e PASTORE, 2007).

Segundo Colagrande, Silva e Fumi (1994), nos últimos 20 anos houve um notável desenvolvimento na tecnologia de fabricação de vinhos, o que contribui para a melhoria de sua qualidade. A adição de pectinases na primeira fase de produção de vinho, na maceração, aumenta a liberação de antocianinas, extração de aroma, diminui o tempo de maceração e aumenta o volume de suco, melhorando o rendimento. Já a adição após a fermentação resulta num aumento do fluxo de suco na filtração, auxilia na clarificação e confere estabilidade ao vinho.

Na indústria de óleos, as enzimas promovem a degradação da parede celular permitindo a extração do óleo, tradicionalmente realizado com hexano, em meio aquoso. Quando são utilizadas no processo de maceração para obtenção de óleo de oliva extravirgem,

proporcionam um aumento na quantidade de agentes anti-oxidantes e de vitamina E. Também reduzem a indução ao ranço, aumentam o rendimento de extração, melhoram o fracionamento na centrifugação e reduzem o teor de umidade no óleo (KASHYAP et al., 2001; UENOJO, PASTORE, 2007).

As enzimas pectinolíticas melhoram a extração de amido de mandioca devido à diminuição do conteúdo de fibras. As fibras mantêm os grânulos de amido próximos e presos em uma rede fibrosa; mas com o rompimento acabam expondo e liberando o amido. Na indústria de café e chá, as enzimas são adicionadas para acelerar a fermentação e favorecer a remoção da camada de mucilagem do grão. Em rações animais aumentam a absorção e liberação de nutrientes que estão bloqueados pelas fibras (JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005).

Na indústria de sucos e bebidas de frutas, as características como consistência, turbidez e aparência se devem às substâncias pécticas, contudo dificultam o processo de filtração e concentração. A adição de enzimas pectinolíticas promove a degradação dessas substâncias e conseqüentemente reduz a viscosidade, aumenta o rendimento nas etapas de processamento, diminui o tempo de filtração em até 50% e o produto final apresenta uma aparência cristalina (UENOJO, PASTORE, 2007).

2.3 PECTINA METILESTERASE

A pectina metilesterase, E.C. 3.1.1.11, hidrolisa os grupos metil éster, formando grupos carboxílicos na cadeia da pectina, produzindo metanol e H_3O^+ (BENEN, VAN ALEBEEK, VORAGEM, 2003; JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005). A Figura 4 representa o local onde ocorre a ação da PME no substrato, a liberação de ácido pode ser monitorada por medidas de titulometria e espectroscopia Uv-Vis. Já a liberação de metanol pode ser

determinada por HPLC ou por reação de oxidação, com agentes oxidantes como o permanganato de potássio ou com a enzima álcool oxidase. A reação de oxidação do metanol produz formaldeído, metanal, que pode ser detectado reagindo com acetil acetona que forma o composto 3,5-diacetil-1,4-dihidro-2,6-dimetilpiridina. Este absorve em 412 nm e pode ser monitorado por Uv-Vis.

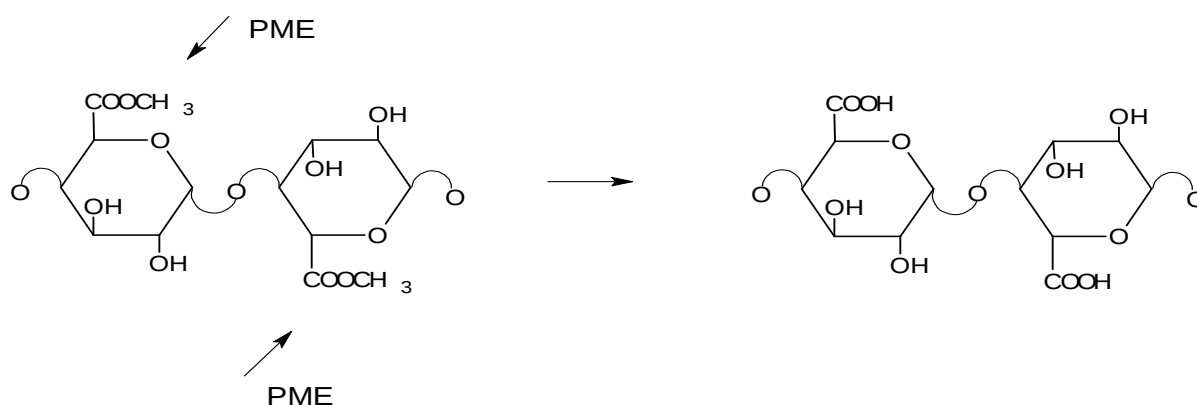


Figura 4 – Local indicado onde a PME atua nas substâncias pécicas.
Fonte: JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005.

2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAR A ATIVIDADE DA PECTINA METILESTERASE

2.4.1 Potenciometria

A potenciometria é uma análise baseada em medidas elétricas, que ocorre devido à diferença de potencial elétrico (E) de uma reação em eletrodo. O potencial (E) pode ser medido pela combinação de dois eletrodos, sendo um de medida e outro de referência. A medida de pH é feita por diferença do potencial medido na solução e do potencial do eletrodo de referência, cujo valor é conhecido. Esse sistema é sensível aos íons H^+ e em soluções diluídas ($10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) a atividade iônica medida é equivalente à concentração de hidrogeniônica $[H^+]$ (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

A pectina metilesterase atua no substrato, pectina, catalisando a hidrólise da ligação C-O nos grupos metil éster, formando metanol e convertendo pectina em pectato. Na formação do pectato ocorre um decréscimo do pH, indicando a liberação de H^+ . Para a hidrólise de cada mmol de grupo éster ocorre a liberação de um mmol de H^+ . Assim, a reação pode ser acompanhada por um sistema potenciométrico devidamente calibrado, segundo Martell e Motekaitis (1992).

2.4.2 Espectrometria de Absorção Molecular no Ultravioleta-Visível

A espectroscopia na região do Uv-Vís mede a absorção molecular de um composto. O valor de energia absorvida é quantizado e conduz a passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado. O resultado é um gráfico de comprimentos de onda em função da intensidade de absorção. Compostos que apresentam elétrons π , σ e não ligante, n, são capazes de absorver radiação eletromagnética porque possuem elétrons que podem ser excitados a níveis de energia mais altos (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

2.4.2.1 Determinação de Ácido

A reação da pectina metilesterase com o substrato pectina pode também ser acompanhada por espectroscopia na região do Uv-Vís, na presença de um indicador adequado ao pH da reação. Na reação de hidrólise do grupo metil éster da pectina ocorre a formação de H^+ ; este se associa à molécula do indicador causando um decréscimo na concentração do indicador deprotonado e, com isso, uma diminuição da absorbância (ZOCCA et al., 2007).

Existem alguns estudos (HAGERMAN E AUSTIN, 1986; ALONSO, RODRIGUES e CANET, 1996; CANET et al., 2005) em que o indicador utilizado para determinação da atividade da PME, extraída de frutas ou vegetais, com pH ótimo de 7,5, foi o azul de bromotimol. A reação foi monitorada no comprimento de onda de 620 nm à temperatura constante, e a velocidade da reação foi estimada por $(-\Delta_{\text{abs}620} \cdot \Delta t^{-1})$, a partir da tangente da parte linear da curva. O ensaio foi calibrado com uma curva padrão do ácido galacturônico. Segundo Hagerman e Austin (1986), a sensibilidade do método foi de 0,020 μmol de ácido produzido por min, e a precisão de 12% relativa ao desvio padrão. Já segundo Valariño et al. (1993); Ceci e Lozano (1998), a atividade da PME pode ser determinada espectroscopicamente com o indicador verde de bromocresol a pH 5,1 ou 4,5. O decréscimo da absorbância foi acompanhado em 617 nm.

2.4.2.2 Determinação de Metanol

O metanol é um produto tóxico para o ser humano, sendo um componente indesejável na produção de bebidas alcoólicas e sucos em geral. Quando sucos ou bebidas são indevidamente armazenados, pode ocorrer a formação de metanol. Assim, faz-se necessária uma redestilação para a eliminação desse metanol. Contudo, esse processo provoca mudanças nas características aromáticas e no sabor, visto que, além do metanol, substâncias voláteis são eliminadas. O metanol produzido na reação de hidrólise da pectina pela ação da PME habitualmente é determinado por métodos como cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, cromatografia gasosa, CG e espectroscopia. Os métodos de HPLC e CG requerem colunas e detectores específicos, as análises tornam-se dispendiosas.

Wood e Siddiqui (1971) utilizaram a espectroscopia para determinação de metanol; essa metodologia foi sensível na faixa de 2-40 μg . A reação consistiu na oxidação do metanol

com permanganato de potássio e produziu formaldeído. O KMnO_4 em excesso na reação se tornou um interferente, foi reduzido com arsenito de sódio. Na sequência, o formaldeído reagiu com 2,4-pentanodiona, dissolvida em solução de acetato de amônio e ácido acético, e produziu 3,5-diacetil-1,4-dihidro-2,6-dimetilpiridina, que absorveu em 412 nm. Segundo os pesquisadores, esse procedimento pode ser utilizado para monitorar a atividade da PME e determinar o conteúdo de grupos metil éster na pectina. Os autores compararam o valor determinado com os dados de uma curva padrão, construída a partir de quantidades conhecidas de metanol na reação.

Klavons e Bennett (1986) mostraram que o metanol pode ser detectado através da oxidação do produto pela ação da álcool oxidase produzindo formaldeído, metanal. Na sequência, o aldeído reagiu com a 2,4-pentanodiona, em solução tampão acetato de amônio e ácido acético. O produto foi detectado espectroscopicamente em 412 nm. Segundo os autores, a sensibilidade do ensaio foi de $1\text{-}20\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de metanol. O método é rápido, seletivo e versátil.

Mangos e Haas (1997) testaram o método espectroscópico para determinação da atividade na reação da PME com a pectina. O metanol liberado na reação foi oxidado com álcool oxidase, formando formaldeído e peróxido de hidrogênio. Este foi quantificado com peroxidase e o cromóforo ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenztiazoline-6-sulfônico). Ambas as reações apresentaram o mesmo pH ótimo, o metanol foi quantificado diretamente no tempo real de ação da PME. Segundo os autores, o método é confiável e sensível, capaz de detectar um mínimo de atividade da PME $0,0625\text{ U}$ ($1\text{ U} = 1\text{ }\mu\text{M}$ de metanol liberado por minuto).

Revilla e González-SanJosé (1998) determinaram o conteúdo de metanol produzido durante a etapa de fermentação de uvas vermelhas (*Vitis vinifera*), em presença de preparações industriais de enzimas pectinolíticas, para produção de vinho. A partir dos estudos verificaram que existe uma relação entre a liberação de metanol e a degradação da

pectina. Observaram que o tratamento enzimático aumenta o conteúdo de metanol em um dia de fermentação, quando comparado com amostras fermentadas em ausência de enzima.

Um estudo de Anthon e Barrett (2004) comparou três reagentes colorimétricos na determinação de metanol com álcool oxidase e verificou a aplicação do ensaio para reações de desmetoxilação da pectina com a PME. A álcool oxidase oxidou o metanol a formaldeído e este foi detectado pela reação com os reagentes de Nasch (acetil acetona), Purpald (4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol) e N-metilbenzotiozolinona-2-hidrazona, MBTH. Os autores observaram que a combinação da álcool oxidase com o reagente de Nasch foi específica para metanol versus etanol, mas tem a mais baixa sensibilidade entre os reagentes testados. A reação com Purpald aumenta a sensibilidade em três vezes e ainda assim mantém uma alta seletividade, 59 vezes mais para metanol versus etanol. Com a utilização de MBTH a sensibilidade aumentou ainda mais, mas diminuiu a seletividade em relação ao metanol.

Zocca et al. (2007) monitoraram a atividade da PME em polpa de uva durante o armazenamento, a fim de identificar a liberação de metanol. A atividade enzimática foi detectada durante um período de tempo de armazenamento pelos métodos espectroscópico e electroforético. Os resultados mostraram que a atividade da PME pode ser detectada em polpa de uva e que esta evoluiu durante a estocagem. Observaram também que as leveduras não contribuíram para a produção de PME ou para a hidrólise da pectina com liberação de metanol.

Dinu et al. (2007) purificaram e caracterizaram cinco enzimas pectinolíticas produzidas a partir de *Aspergillus niger* MIUG16. A atividade da PME foi determinada monitorando a liberação de metanol em solução tampão acetato a pH 4,2 e foi expressa em µg de metanol liberado por min e por mL de solução enzimática. A temperatura ótima foi de 40 °C e o pH ótimo 4,2 - 4,4, e a atividade específica U/mg em presença de pectina 90% metilada foi de 626,1 u/mg a pH 4,2 a 40 °C.

2.5 MÉTODOS DE INATIVAÇÃO DA PME

Fayyaz et al. (1995a) determinaram os parâmetros cinéticos da PME purificada a partir de papaia e verificaram que a atividade da enzima depende da concentração de NaCl, pH e temperatura. Os resultados mostraram que a atividade ótima foi de 0,25 M de NaCl, o pH ótimo foi de 8,0 e a temperatura ótima de 65 °C. Observaram também que a atividade da enzima foi inibida quando o ácido poligalacturônico foi adicionado na reação. Outro estudo de Fayyaz et al. (1995b) mostrou que a PME isolada de papaia perdeu menos que cinco por cento de sua atividade, quando armazenada sob condições apropriadas durante um ano a 4 °C. Os autores concluíram que a enzima foi mais estável ao calor em pH 7,4 que em pH 4; após aquecimento a 60 °C por 5 minutos, a atividade da PME foi de 65,6 e 82% em pH 4,0 e 7,5, respectivamente. Observaram que a completa inativação ocorreu na temperatura de 70 e 75 °C por 5 minutos em pH 4,0 e 7,5, respectivamente.

Alonso, Rodrigues e Canet (1996) isolaram e purificaram quatro isoformas diferentes de PME da cereja doce (*Prunus avium L.*). Observaram que essas enzimas possuíam pontos isoeletrônicos distintos e que o pH ótimo e estabilidade térmica diferiam entre si. Também observaram que cátions como cálcio e sódio ativavam as diferentes isoformas e que o ácido D-galacturônico inibia essas isoformas de PME.

Alta pressão pode destruir bactérias e inativar enzimas que afetam a qualidade dos alimentos. A magnitude da pressão necessária para inativar as enzimas depende da natureza e da fonte da enzima. O efeito da alta pressão nas enzimas afeta as pontes de hidrogênio e rompe a configuração tridimensional da molécula de proteína. Por variação de pressão e tempo, Riahi e Ramaswamy (2003) avaliaram a cinética de inativação da PME em sucos de maçã tratados com enzimas exógenas. O estudo mostrou que a pressão pelo tempo possui um efeito significativo na inativação da PME e os pesquisadores verificaram que a PME de

laranja foi mais sensível quando comparada com fontes microbianas. Observaram uma redução significativa da atividade da PME no suco quando tratado a 400 MPa por 25 min, chegando a níveis de inativação desejados para a PME.

Segundo Lacroix, Fliss e Makhlouf (2005), o efeito da alta pressão em ausência de aquecimento reduz em 20% a atividade da PME. Os autores observaram também que a combinação da alta pressão com aquecimento de 50 °C por 10 min reduz consideravelmente a atividade da PME. Verificaram que o aumento da estabilidade na opalescência do suco durante a estocagem deve-se ao efeito sinérgico entre o tratamento a alta pressão, baixo pH e temperatura branda. Castro et al. (2006) estudaram o efeito da combinação da pressão com temperatura na atividade da PME extraída e purificada da *Capsicum annuum*. Observaram que a atividade máxima da PME em pH 5,5 foi à pressão de 200 MPa e a 55 °C.

Bayindirh et al. (2006) estudaram a inativação de microrganismos patogênicos e de enzimas, por alta pressão e temperatura branda, em sucos de maçã, laranja, damasco e cereja. Observaram que a atividade residual da PME no suco de laranja, após tratamento a 450 MPa e a 50 °C por 30 min foi de 7%. Já a atividade residual na mesma pressão, a 40 °C durante 60 min, foi de 12%. Verificaram que a inativação enzimática é um processo irreversível, pois a enzima não pode ser reativada. Segundo os autores, o processamento com alta pressão constitui uma tecnologia efetiva para inativar enzimas em sucos de frutas. Altas pressões podem ser combinadas com temperaturas brandas, menores que 50 °C, para acelerar o processo de inativação.

O tratamento térmico não inativa completamente a PME presente em sucos de laranjas, e isso se deve a uma das isoformas que é termo-resistente, entre as doze isoformas encontradas. A isoforma termo-resistente, PME, provoca a clarificação espontânea do suco e a liberação de metanol. Collet et al. (2005) estudaram o comportamento de inativação da PME no suco fresco de laranja pêra (*Citrus Sinensis (L) Osbeck*). Constataram que o tratamento por

20 segundos a 87,5 °C foi suficiente para uma alta inativação enzimática. Sentadreu et al. (2005) avaliaram a atividade residual da PME e o sabor após tratamento térmico do suco de laranja, mandarine e híbridos. Observaram que não ocorreram alterações no sabor do suco nas amostras tratadas em temperaturas de 70 a 90 °C por 10 segundos; já a 95 °C notaram uma redução do sabor natural. A atividade residual da PME foi de 20% nas amostras tratadas a 70° C por 20 segundos, e quando a temperatura foi elevada para 80 °C por 10 segundos, a atividade residual diminuiu para 15%. A redução drástica na atividade da PME ocorreu a 85 °C por 10 segundos, quando o valor de atividade caiu para 3%. Os resultados sensoriais e a atividade residual revelaram que o tratamento a 85 °C por 10 segundos foi considerado adequado, visto que não alterou o sabor do suco e reduziu sensivelmente a atividade residual.

Segundo Tribess e Tadini (2006), o suco de laranja apresenta isoformas de PME com diferentes atividades e resistência térmica, estas são mais estáveis ao calor que bactérias e leveduras. No tratamento térmico de sucos, a completa inativação depende de parâmetros como tempo/temperatura. Os autores constataram que no tratamento por 20 segundos a pH 3,6 e 3,7 nas temperaturas de 85,0 e 87,5 °C respectivamente, a enzima sofreu uma alta e rápida inativação. Verificaram também que o suco manteve suas características sensoriais e nutricionais.

Para o suco de laranja faz-se necessário o tratamento térmico a fim de destruir cepas de microrganismos e inativar enzimas, porém esse processo provoca mudanças de cor, sabor e valor nutricional em sucos. Segundo Martínez, Fortuny e Belloso (2006), a aplicação de pulsos elétricos é uma tecnologia que poderá substituir o tratamento térmico. Os autores estudaram o efeito na qualidade de sucos de laranja tratados com pulsos elétricos de alta intensidade, HIPEF. Determinaram à vida-de-prateleira do suco através de análises microbiológicas, enzimática, e propriedades químicas e físicas. O procedimento com HIPEF assegurou estabilidade ao suco durante 56 dias sob refrigeração a 4 °C e a vitamina C

permaneceu estável no suco durante o tempo de armazenamento. O processo de inativação por pulsos elétricos alcançou 81,6%, enquanto que o tratamento térmico atingiu 100% de inativação da PME. O suco tratado por HIPEF preservou a cor e não provocou mudanças significativas no valor de pH, acidez e °Brix, em comparação com o pasteurizado. Zhang et al. (2006) observaram o efeito da aplicação de pulsos elétricos na estabilidade das enzimas peroxidase e PME. Os resultados mostraram que os pulsos elétricos inativaram ambas as enzimas, e que o efeito de inativação aumentou com o aumento da força elétrica aplicada e o número de pulsos. O estudo de fluorescência de ambas as enzimas mostrou que a intensidade também alterou após tratamento com pulsos elétricos, e isso indicou mudanças na conformação da estrutura molecular das enzimas.

Leite et al. (2006) extraíram e purificaram parcialmente a PME da goiaba (*Psidium guajava* L.). O gel isolado mostrou isoenzimas PME com diferentes valores de massa molar. Analisaram duas amostras de isoformas, o pH ótimo da enzima para cada amostra foi de 8,5 e a temperatura ótima ficou na faixa de 75 a 85 °C. Observaram também que essas isoformas da PME foram termoestáveis nas temperaturas de 50 até 125 °C. A alta estabilidade térmica e a significativa atividade da PME mostraram que ocorreu ação catalítica contínua durante o armazenamento da polpa. Tal fato explicou porque a indústria alimentícia adiciona mais pectina na obtenção do doce de goiaba: isso se deve à diminuição do grau de esterificação.

Vivar-Vera et al. (2007) avaliaram a estabilidade térmica e o comportamento cinético da PME extraída de *Crataegus pubescens*. Determinaram os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$), utilizaram pectina comercial de citros e *Crataegus pubescens* como substrato, investigaram a influência dos parâmetros concentração de NaCl, pH e temperatura na atividade da enzima. A PME apresentou grande afinidade pela pectina de *Crataegus pubescens* comparada com a pectina de citros, a atividade máxima da enzima foi verificada nas condições de 0,4 mol.L⁻¹ NaCl, pH 7,5 e 55 °C. Observaram também que após o

tratamento térmico a 60 °C por 25 min, a enzima ainda apresentou 50% de atividade. A completa inativação ocorreu a 80 °C por 10 min.

Sampedro, Rodrigo e Hendrickese (2008) determinaram a cinética de inativação da PME por tratamento em condições combinadas de alta pressão e temperatura em bebida de suco de laranja com leite. Observaram que para uma completa inativação foi necessário um tratamento a 90 °C, por um minuto ou a 700 MPa a 55 °C por dois minutos. Wilinska et al. (2008) estudaram a estabilidade e a cinética de inativação da PME de *Aspergillus niger* exógena em suco de frutas, maçã e blueberries, no intervalo de temperatura de 52-66 °C. Observaram que a atividade da enzima diminuiu com o aumento da temperatura e que a composição do suco causou uma considerável diferença na susceptibilidade enzimática para o tratamento térmico. Verificaram que a inativação da PME exógena segue uma cinética de primeira ordem, com aproximadamente o mesmo valor da energia de ativação de 300 kJ.mol⁻¹ para cada suco estudado.

Plaza et al. (2008) estudaram a influência do pH, força iônica e presença de sais e polióis na estabilidade térmica da PME de *Aspergillus aculeatus* recombinantes. Observaram que a PME foi termoestável a 50 °C em presença de NaCl a pH 5,0. A adição de NaCl aumentou a estabilidade térmica em pH 5,0 e 7,5, enquanto que a adição de CaCl₂ não influenciou na estabilidade térmica da enzima. Constataram também, que os polióis apresentaram maior efeito protetor para a enzima que os açúcares e também que o pH e a força iônica foram parâmetros importantes na estabilidade enzimática. Esse estudo mostrou a importância das condições do meio na estabilidade térmica de PME de *Aspergillus aculeatus* recombinantes. Segundo os autores, tais conhecimentos são essenciais para otimizar a utilização de enzimas exógenas no processamento térmico de frutas e vegetais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as condições ótimas da pectina metilesterase em amostras de pectinases industriais, propondo um procedimento potenciométrico para determinação da atividade da pectina metilesterase e comparando os dados com os obtidos por potenciometria tradicional e Uv-Vis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as condições ótimas de pH e temperatura em amostras de enzimas pectinolíticas industriais por titulometria convencional.
- Quantificar a atividade residual PME através da potenciometria pelos procedimentos da variação de volume de base pelo tempo e pelo procedimento proposto da variação de pH pelo tempo.
- Determinar a atividade das enzimas pectinolíticas industriais por espectroscopia Ultravioleta-Visível através dos indicadores azul de bromofenol e verde de bromocresol.
- Monitorar a formação de metanol pela ação da álcool oxidase e detectar o produto com os reagentes acetil acetona e Purpald.
- Avaliar a eficiência do método proposto na determinação da atividade residual da PME exógena no suco de manga natural e comparar com o método tradicional.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substrato

Pectina de maçã de alto grau de metoxilação da Herbstreith & Fox, 5 mg.mL⁻¹.

4.1.2 Eletrólito Suporte

O cloreto de sódio da Merck com 99,99% de pureza foi utilizado com eletrólito suporte para manter a força iônica em 0,100 mol.L⁻¹ nos sistemas reacionais.

4.1.3 Solvente

Água destilada e deionizada foi utilizada como solvente para todas as atividades experimentais.

4.1.4 Preparações Enzimáticas Industriais

Pectinex 100L Plus, Panzym Univers e Panzym Clears foram cedidas pela Novozymes. Estas preparações enzimáticas consistiam de uma mistura de enzimas pectinolíticas, com predominância de poligalacturonase e pectinaliase, produzidas por fermentação submersa de *Aspergillus* sp. Todas as amostras encontravam-se dentro do prazo de validade.

4.1.5 Titulante

A solução de hidróxido de sódio, NaOH, foi preparada por diluição de uma ampola Dilut-it (Merck) com água deionizada e padronizada com biftalato ácido de potássio (Reagen) tendo como indicador a fenolftaleína.

4.1.6 Indicadores

Os indicadores utilizados para detectar a produção de H^+ durante a reação foram o azul de bromofenol (Reagen) e o verde de bromocresol (Reagen), que apresentam os pontos de viragem de cor pH 3,0 a 4,6 e 3,8 a 5,4 respectivamente. Os indicadores foram preparados em solução alcoólica 0,01% para o azul de bromofenol e 0,1 % para o verde de bromo cresol.

4.1.7 Ácido D - galacturônico

Uma solução de ácido D - galacturônico (Sigma) com 98% de pureza - foi preparada na concentração de $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Este reagente foi utilizado para obtenção da curva padrão com os indicadores azul de bromofenol e verde de bromocresol.

4.1.8 Soluções Tampão

As soluções tampão foram preparadas para quantificar o metanol liberado na reação da PME com a pectina. A solução tampão pH igual a 7,15 foi preparada com hidrogenofosfato de sódio e dihidrogenofosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck). Uma solução tampão pH igual a 4,35 foi preparada com acetato de amônio e ácido acético $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Merck). Ambas as soluções foram armazenadas sob refrigeração.

4.1.9 Álcool Oxidase

Esta enzima foi utilizada para converter metanol em formaldeído, obtida da Sigma, produzida por *Pichia pastoris*, diluída em água deionizada para concentração de $0,1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e armazenada sob refrigeração.

4.1.10 Metanol

Foi utilizado metanol da Reagen com 99,8% de pureza para obter as curvas padrão; com os reagentes Purpald e acetil acetona, as quantidades utilizadas foram 0-100 μL .

4.1.11 Purpald

O reagente 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol, Purpald, foi adquirido da Sigma, utilizado para quantificar o metanol. Uma solução 5 mg.mL^{-1} de Purpald em 0,5 mol.L^{-1} de NaOH foi preparada e utilizada logo em seguida.

4.1.12 Acetil Acetona

Uma solução de acetil acetona, Reagen, 0,02 mol.L^{-1} foi preparada com acetato de amônio 2,0 mol.L^{-1} (Merck) e ácido acético 0,05 mol.L^{-1} e armazenada sob refrigeração.

4.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PME

4.2.1 Potenciometria

4.2.1.1 Atividade da PME por Variação de Volume de NaOH

A atividade da pectina metilesterase foi determinada por titulometria, a qual consiste em quantificar os grupos carboxílicos livres que são formados pela ação da enzima. O sistema experimental constituiu de uma cela de vidro de parede dupla acoplada a um banho termoestatizado (Microquímica, MQBTC 99-20) com precisão de $\pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$, e de um pHmetro Micronal, modelo B474 equipado com um eletrodo combinado (Ingold), diariamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (Merck). Os experimentos foram realizados com adição controlada de hidróxido de sódio isento de CO_2 , 0,01 mol.L^{-1} , com uma microbureta digital (Denver Instrument –Titrator 280), precisão de 0,01 mL. A reação consistiu de 0,150 g de pectina de maçã, 5,00 mg.mL^{-1} (Herbstreith & Fox, de alto grau de metoxilação),

0,100 mol.L⁻¹ de cloreto de sódio e o volume completado para 30 mL com água ultra-pura. Após solubilização dos componentes adicionava-se 0,05 mL de enzima pectinolítica comercial. A temperatura e o pH foram mantidos constantes e o tempo da reação foi devidamente controlado em relação ao consumo de base para manter o pH constante. Segundo Fachin (2002), a atividade da pectina metilesterase é proporcional à velocidade inicial de consumo de NaOH pelo tempo ($\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$) e pode ser expressa em unidades, U, sendo que uma unidade de enzima corresponde a um μmol de ácido carboxílico produzido por minuto. Neste trabalho a unidade utilizada para expressar a atividade da PME foi mmol de ácido carboxílico produzido por segundo.

Foi verificada a influência do pH e da temperatura na atividade das pectinases industriais Pectinex 100L Puls, Panzym Univers e Panzym Clears. O efeito do pH na atividade da enzima foi determinado nos valores de 3,0; 3,5; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0 e 5,5, mantendo-se constante a temperatura da reação, $45 \pm 0,1$ °C. O efeito da temperatura na reação de desmetoxilação foi verificado, nos valores de 25 - 35 - 45 - 55 - 65 - 75 °C, mantendo-se o pH constante, 4,0. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Para todos os experimentos a atividade obtida das médias foi representada na forma de gráfico.

Os experimentos para determinar a atividade residual da PME nas amostras industriais da Pectinex 100L Plus, Panzym Univers e Panzym Clears foram conduzidos nas temperaturas de 45; 50; 55; 60; 65; 70 e 75 °C por 10, 20 e 30 min de exposição a cada temperatura. As amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno devidamente vedados e submetidas ao tratamento térmico, em seguida adicionava-se 50 μL de enzima na cela de reação. Esta consistia de 5 mg.mL⁻¹ de pectina, 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl para um volume total de 30 mL; a reação foi conduzida na temperatura de 45 °C e o pH igual a 4,00.

4.2.1.2 Atividade da PME por Variação de pH

A atividade da PME de três amostras industriais de pectinases também foi determinada acompanhando-se a variação do pH pelo tempo ($\Delta\text{pH}/\Delta t_{\text{tempo}}$), visto que a ação da PME sobre o substrato pectina produz íons H^+ e metanol. Os íons H^+ podem ser quantificados diretamente com um sistema contendo eletrodo combinado, previamente calibrado, acoplado a um pHmetro. Utilizou-se o sistema e condições descritas acima, no item 4.2.1.1.

Através da variação do pH foi determinada a atividade das pectinases industriais Pectinex 100L Plus, Panzym Univers e Panzym Clears na temperatura de 25 °C e pH igual 4,5. Foi também determinada a atividade residual nas temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75 °C durante 10, 20 e 30 min de exposição da PME nas amostras da Pectinex 100L Plus e Panzym Clears.

4.2.2 Espectroscopia Ultravioleta-Vísivel

De acordo com Zocca et al. (2007), a atividade da pectina metilesterase pode ser determinada por espectroscopia na região do Uv-Vis. Para tanto necessita-se de um indicador adequado, que possua o ponto de viragem de cor de acordo com o pH da reação em estudo. O sistema reacional foi como descrito no item 4.2.1.1: o pH foi ajustado em 4,5 com NaOH 1,00 mol.L⁻¹, adicionou-se 150 µL do indicador azul de bromofenol, a temperatura mantida foi constante a 25 °C. Alíquotas de 3 mL da solução reacional foram transferidas para uma cubeta de quartzo, com caminho ótico de 1 cm. Adicionou-se então 5 µL de pectinase comercial, homogeneizando a solução. A cinética da reação foi acompanhada no comprimento de onda de 592 nm a cada 30 s durante 30 min com um espectrofotômetro

MultiSpec-1501 da Shimadzu. O mesmo procedimento foi realizado com o indicador verde de bromocresol, a reação foi monitorada em 617 nm. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Para determinação da atividade da PME foram construídas duas curvas padrão com o ácido D-galacturônico em ambos os indicadores. A partir de uma solução $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido fizeram-se as diluições, em balões volumétricos, que variaram de $0,30 - 1,30 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$: adicionou-se 25 μL do indicador em estudo e completou-se o volume para 5,00 mL. Em seguida fizeram-se as leituras da absorbância máxima nos comprimentos de onda referentes a cada indicador. O gráfico da curva padrão de ácido D-galacturônico foi construído a partir da concentração de ácido em função da absorbância.

Para determinar a atividade da PME utilizou-se a curva padrão de ácido D-galacturônico, a qual informou a concentração exata de ácido. Assim, a partir da concentração desse ácido pelo tempo, determinou-se a atividade da PME. Através de tal método foi determinada a atividade da PME de três amostras industriais: Pectinex 100L Plus, Panzym Univers e Panzym Clears em pH 4,5 e 25 °C.

4.2.3 Determinação do Metanol com Álcool Oxidase

A atividade da PME pode ser determinada monitorando a liberação de metanol produzido na hidrólise da pectina pela ação da enzima. Nesse método o metanol é oxidado a formaldeído, pela ação da álcool oxidase; este reage com Purpald ou acetil acetona resultando em compostos que absorvem na região do visível. Segundo Jacobsen e Dickinson (1974), o produto da reação do Purpald com o formaldeído é 6-mercaptop-s-triazol-(4,3-b)-s-tetrazina com absorbância máxima em 550 nm; já o produto da reação da acetil acetona com o

formaldeído é o 3,5-diacetil-1,4-dihidro-2,6-dimetilpiridina que absorve em 412 nm (NASH, 1953).

4.2.3.1 Purpald

O sistema reacional para quantificar o metanol foi o mesmo relatado no item 4.2.1.1, utilizando-se a temperatura constante de 25 °C e pH 4,5. Após a adição de 50 µL de PME no sistema reacional, o pH foi mantido constante com NaOH, 0,0488 mol.L⁻¹. A cada 2 min de reação retirava-se uma alíquota de 1,0 mL de solução de pectina desmetoxilada, que em seguida era acondicionada em um banho de gelo para cessar a reação da PME sob o substrato. A reação foi acompanhada durante 20 min.

Uma alíquota 200 µL da solução de pectina desmetoxilada, para determinação de metanol, foi adicionada em um tubo de ensaio com 180 µL de solução tampão de fostato pH 7,15. Adicionou-se 20 µL de álcool oxidase diluída 0,1 U.µL⁻¹ e 600 µL de água deionizada, o tubo de ensaio foi vedado e a solução foi vigorosamente agitada e colocada em um banho a 30 °C por 15 min. Ao final desse período adicionou-se 400 µL de solução de Purpald, agitou-se vigorosamente para oxigenação da amostra e colocou-se novamente no banho a 30 °C por 30 min. Em seguida adicionou-se 600 µL de água ultra-pura para completar um volume de 2,0 mL e então fez-se a leitura em 550 nm com o espectrofotômetro previamente calibrado.

Construiu-se uma curva padrão com metanol substituindo-se a solução de pectina desmetoxilada por volumes conhecidos de metanol, 0-100 µL. A partir da curva padrão do metanol calculou-se a concentração deste produzido na reação da pectina com a PME. Foi obtido um gráfico da concentração de metanol em função do tempo, para determinar a atividade da PME.

4.2.3.2 Acetil Acetona

O sistema reacional para quantificar o metanol foi o mesmo relatado no item 4.2.1.1 e as condições para a reação da pectina com a PME foram às mesmas que as utilizadas no item 4.2.3.1.

Para determinação do metanol na amostra de pectina desmetoxilada foram adicionados em um tubo de ensaio 180 μL de solução tampão acetato pH 4,5, 200 μL de solução de pectina desmetoxilada, 20 μL de álcool oxidase diluída e 600 μL de água deionizada, agitando-se vigorosamente a solução. Vedou-se o tubo de ensaio e colocou-se o mesmo em um banho a 30 °C por 10 min, em seguida adicionou-se 400 μL de solução de acetil acetona, agitou-se e colocou-se em um banho a 60 °C por 15 min. Completou-se o volume para 2 mL com água ultra-pura e realizou-se a leitura em 412 nm no espectrofotômetro previamente calibrado.

Uma curva padrão foi construída, substituindo-se a solução de pectina desmetoxilada por volumes conhecidos de metanol, 0-100 μL . A partir da curva padrão e das absorbâncias da reação da pectina desmetoxilada calculou-se a concentração de metanol produzido a cada intervalo de tempo. A atividade da PME foi obtida a partir de um gráfico da concentração do metanol em função do tempo.

4.2.4 Determinação da Atividade Residual da PME Exógena no Suco de Manga

As mangas do cultivar Tommy atkins foram adquiridas em mercados locais da cidade de Ponta Grossa, PR, Brasil. As frutas utilizadas na preparação do suco, Figura 5, foram selecionadas pela coloração e firmeza. O tamanho ficou entre 9,5 - 11,7cm de comprimento e 8,6 - 10,3 cm de largura, e os pesos variaram de 394 - 614g.



Figura 5 – Mangas do cultivar Tommy atkins utilizadas na preparação do suco.

O suco foi obtido com extrator da Britania Turbo Juicer Primer e em seguida passou por uma centrifugação, para separação de sólidos suspensos, com uma centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810R, a 4 °C e 3.220 g por 15 minutos. A Figura 6 a e b mostra o suco de manga antes e após a centrifugação. Observa-se que o suco antes da centrifugação possuiu grande quantidade de sólidos suspensos, que se depositaram no fundo do frasco durante a centrifugação. Em seguida os sólidos foram removidos, o suco foi acondicionado em frascos de 30 mL e armazenado em freezer a -22 °C.

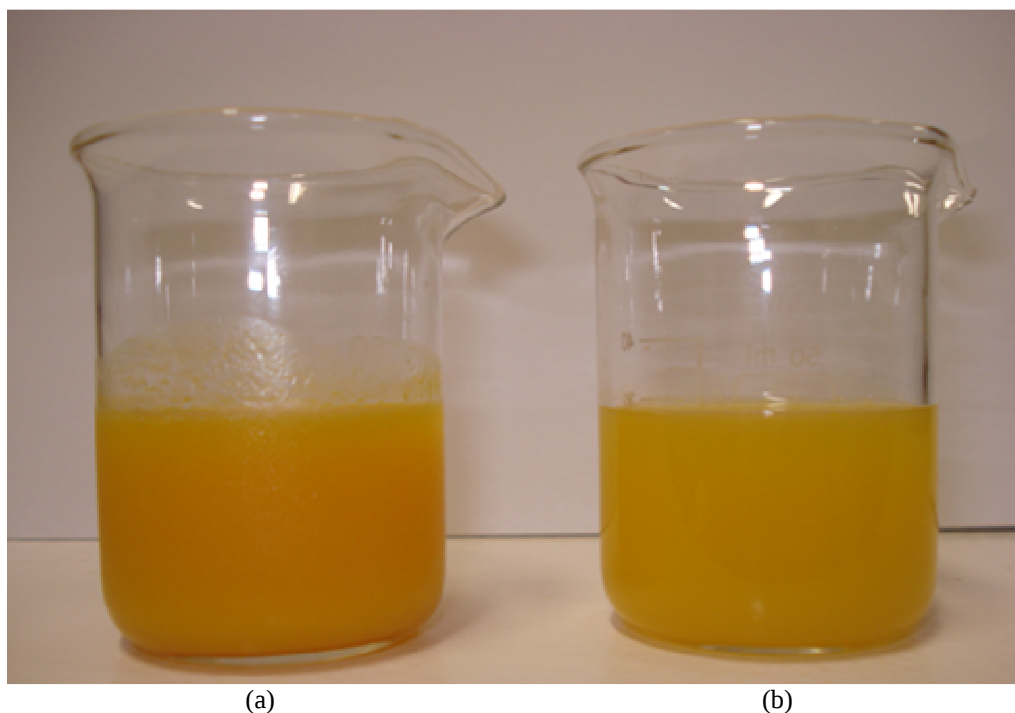


Figura 6 – Suco de manga, antes (a) e após (b) a centrifugação.

Para o tratamento térmico, o suco foi descongelado completamente em temperatura ambiente e pré-aquecido na temperatura equivalente ao tratamento. Em um tubo de ensaio adicionou-se 10 mL de suco pré-aquecido e 50 μ L de amostra comercial de pectinase, Pectinex 100L Plus. O tubo de ensaio foi então vedado e submetido nas temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75 °C por 10, 20 e 30 min. Após esse período a atividade residual da PME foi determinada.

O sistema reacional para determinar a atividade residual da PME exógena no suco de manga foi aquele utilizado para a determinação da atividade da PME no item 4.2.1.1. Após o tratamento térmico do suco mediu-se o valor do pH, para ajustar o pH do sistema reacional que continha o substrato. Esse passo foi necessário para obter informações mais precisas e minimizar erros. Após ajustar o pH, adicionou-se o suco ao sistema reacional e utilizaram-se os dois procedimentos da variação de volume de NaOH e da variação do pH para determinar a atividade residual da PME exógena no suco de manga. A reação foi acompanhada durante 10

min, mas para o cálculo da atividade utilizaram-se somente os primeiros minutos da reação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO, TEMPERATURA ÓTIMA E ATIVIDADE RESIDUAL DA PME NAS AMOSTRAS INDUSTRIAIS PANZYM UNIVERS, PANZYM CLEARS E PECTINEX 100L PLUS

A Figura 7 representa a influência do pH na atividade da PME, na pectinase Panzym Univers. Observa-se que com o aumento do pH ocorre um aumento na atividade até atingir um máximo a pH 4,25; quando o pH decresce a atividade também diminui. Assim o pH ótimo para Panzym Univers é 4,25 e esse valor está de acordo com o relatado por Duvetter et al. (2005), Dinu et al. (2007) e Wilinska et al. (2008) para amostras de pectinases industriais obtidas a partir de *Aspergillus aculeatus* e *A. niger*.

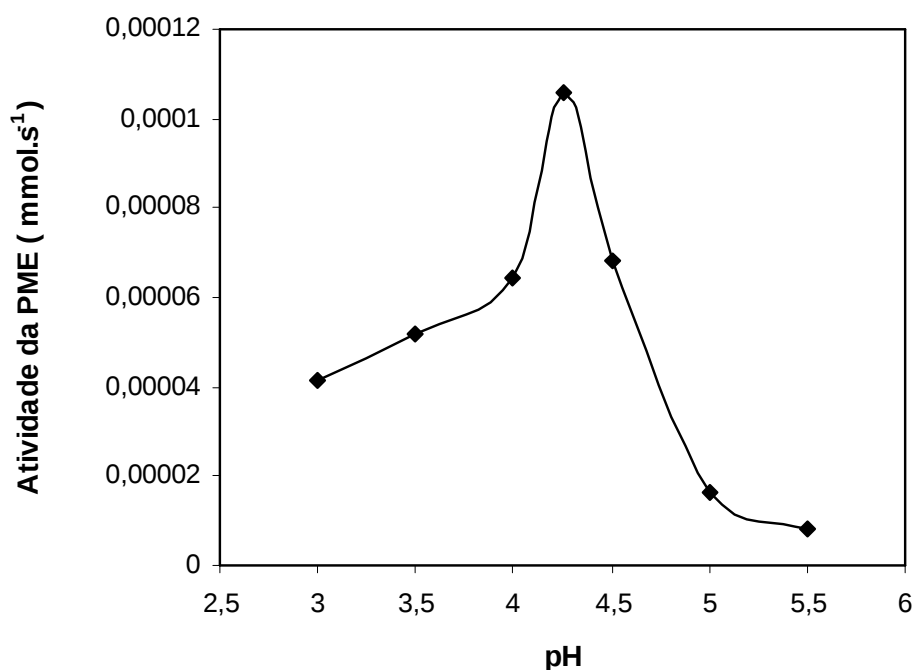


Figura 7 - Influência do pH na atividade da PME, Panzym Univers, a 45 °C.

A Figura 8 mostra a influência da temperatura na atividade da PME, na pectinase Panzym Univers; verifica-se que a temperatura influencia na atividade. A velocidade de

desesterificação aumenta a partir de 25 °C até o máximo a 45 °C e decresce a temperaturas superiores a 45 °C. Este valor está de acordo com a temperatura ótima determinada por Nikolic'e Mojovic (2007) para a PME de amostras de pectinases extraídas de *Aspergillus niger*.

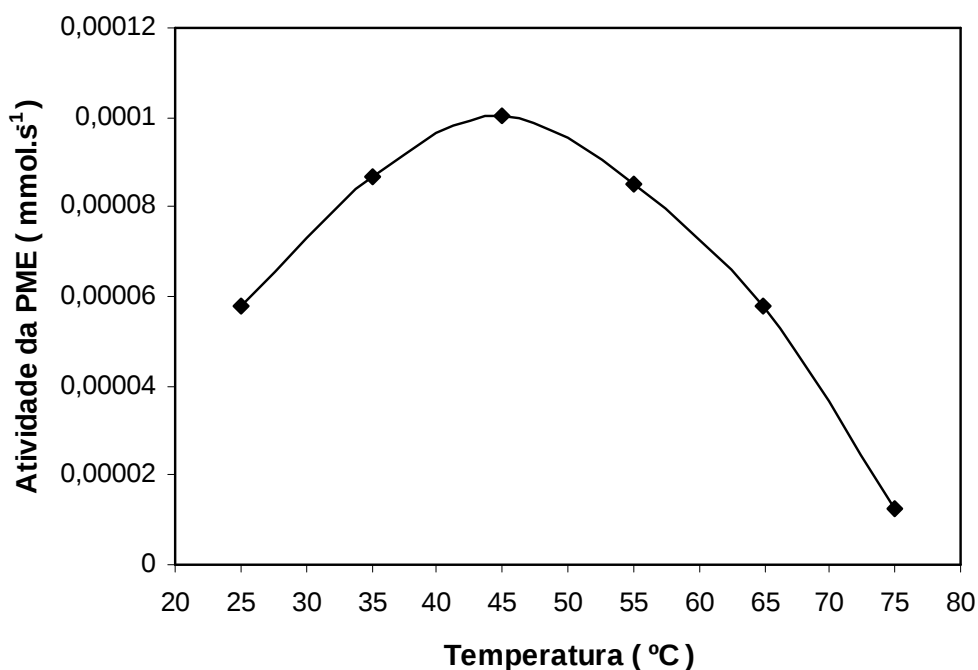


Figura 8 - Influência da temperatura na atividade da PME, Panzym Univers, pH 4,0.

A Figura 9 mostra a inativação térmica da PME, Panzym Univers, em diferentes temperaturas e tempos de exposição. Com o aumento da temperatura e tempo de exposição, observa-se que a atividade residual diminui gradativamente, até ocorrer a inativação completa da PME. Com o tratamento na temperatura de 45 °C e tempos de exposição de 10, 20 e 30 min, a atividade da PME permaneceu em torno de 90%. Com o aumento da temperatura para 50 °C e nos tempos de exposição de 10, 20 e 30 min, observa-se que houve uma diminuição na atividade residual, que atingiu valores de 86,2%, 79,3% e 62,06%, respectivamente. Com o tratamento a 55 °C por 10 min a atividade atingiu valores de 62,06%; por 20 min, de 55,17%; e em 30 min, de 44,82%. Já no tratamento a 60 °C houve uma pequena queda na atividade

nos três tempos estudados e a atividade residual permaneceu em torno de 50%. Com a exposição da PME na temperatura de 70 °C a atividade residual caiu para 20,69% e permaneceu constante nos três tempos de exposição, enquanto que no tratamento a 75 °C observa-se a inativação completa da enzima.

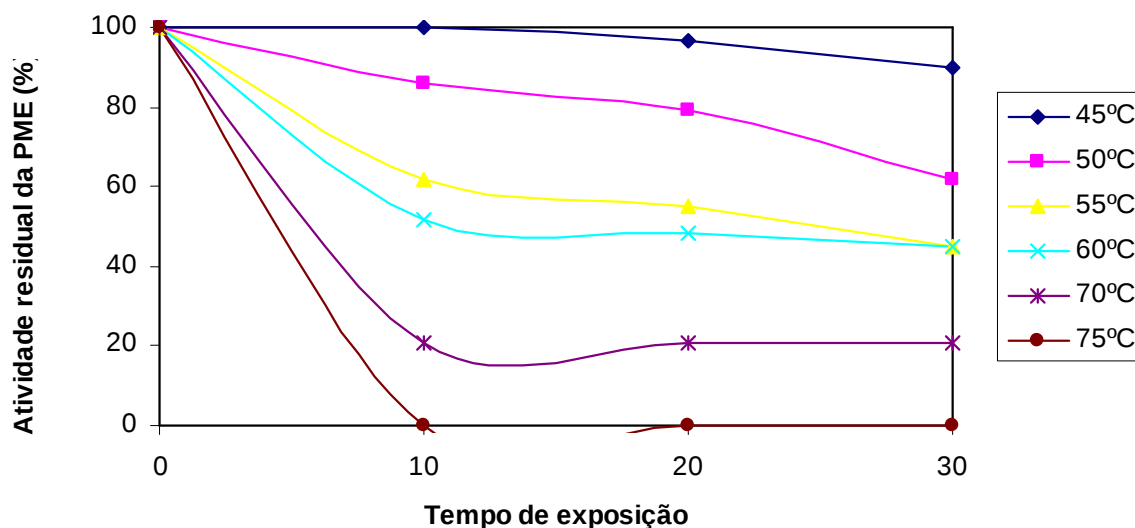


Figura 9 - Estabilidade térmica da pectinase, Panzym Univers, em 5 mg.mL⁻¹ de pectina de maçã, pH igual a 4,0, temperatura 45 °C e 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl.

A Figura 10 representa a influência do pH na atividade da PME de uma amostra comercial de pectinase, Panzym Clears, mantendo a temperatura constante de 45 °C. Observa-se que o pH ótimo da Panzym Clears foi de 4,0, valor em que ocorreu um máximo da atividade da PME. Verifica-se que o pH influenciou na atividade da enzima, porque em valores acima ou abaixo de pH 4,0 houve uma queda na atividade da enzima.

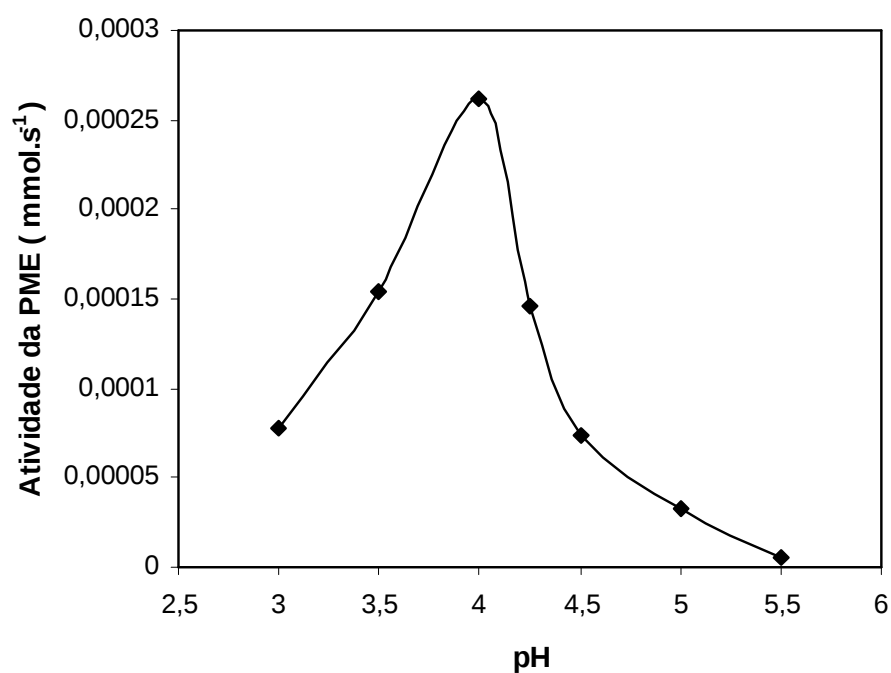


Figura 10 - Influência do pH na atividade da PME, Panzym Clears, a 45 °C.

A Figura 11 mostra a influência da temperatura na atividade da PME, Panzym Clears, mantendo constante o pH igual a 4,0. Pode-se observar que a temperatura ótima foi de 45 °C e que nesse valor a atividade da PME foi máxima. À temperatura superior ou inferior de 45 °C, a atividade da PME foi menor. Essa temperatura ótima está de acordo com a verificada por Nikolic´e Mojovic (2007), relativa à PME de uma amostra comercial de pectinase produzida por *Aspergillus niger*.

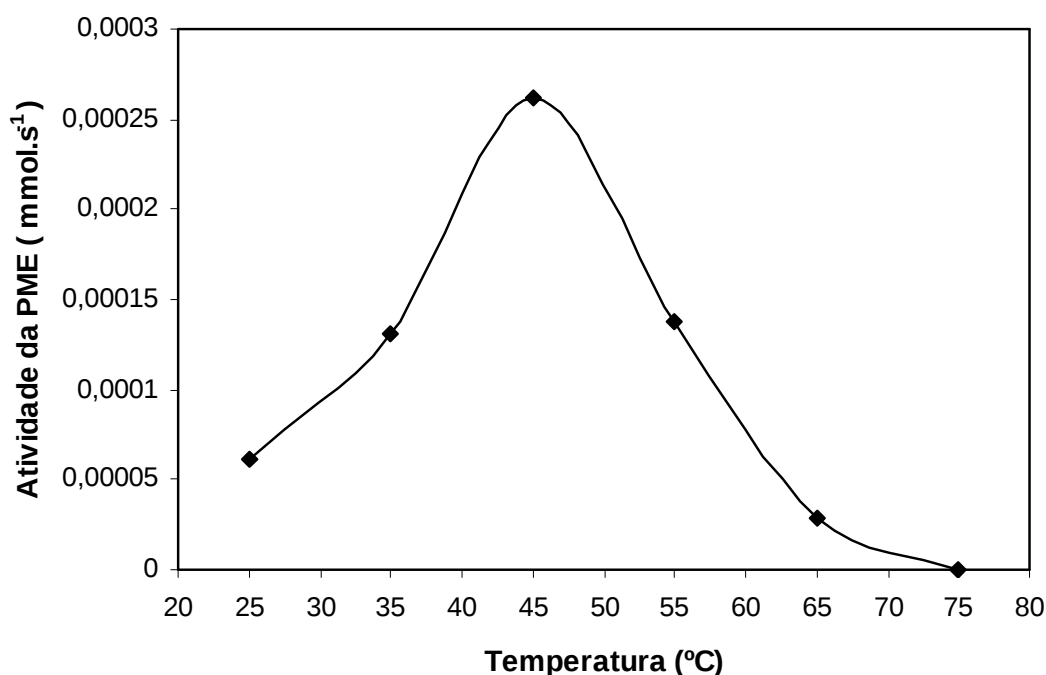


Figura 11 - Influência da temperatura na atividade da PME, Panzyim Clears, a pH 4,0.

A Figura 12 mostra a estabilidade térmica de uma amostra comercial de pectinases, Panzyim Clears. Com o tratamento térmico a 45 °C por 10, 20 e 30 min, a atividade da PME permanece máxima. Quando a temperatura foi elevada para 50 °C por 10 e 20 min, a atividade residual caiu para 77,33%; e por 30 min de exposição, a atividade residual foi de 71,34%. Já para o tratamento a 55 °C por 10, 20 e 30 min a atividade residual foi de 72,48, 69,06 e 56,22%, respectivamente. A atividade residual da PME na temperatura de 60 °C atingiu 67,27% para 10 min de exposição, 57,07% para 20 min de exposição e 50,79% para 30 min. Com o aumento da temperatura para 65 °C, a atividade residual foi de 59,92% para 10 min, 48,92% para 20 min e 41,09% para 30 min. Na temperatura de 70 °C ocorreu a maior queda da atividade: já nos primeiros 10 min de exposição, a atividade residual ficou em 20,21%. Também se verificou que nos tempos de 20 e 30 min os valores da atividade residual caíram para 14,26 e 7,13%, respectivamente. A completa inativação ocorreu na temperatura de 75 °C, já nos primeiros 10 min de exposição da PME. Observou-se que com o aumento da

temperatura, mantendo-se constante o tempo de exposição da enzima, a atividade residual diminui até a inativação completa da PME.

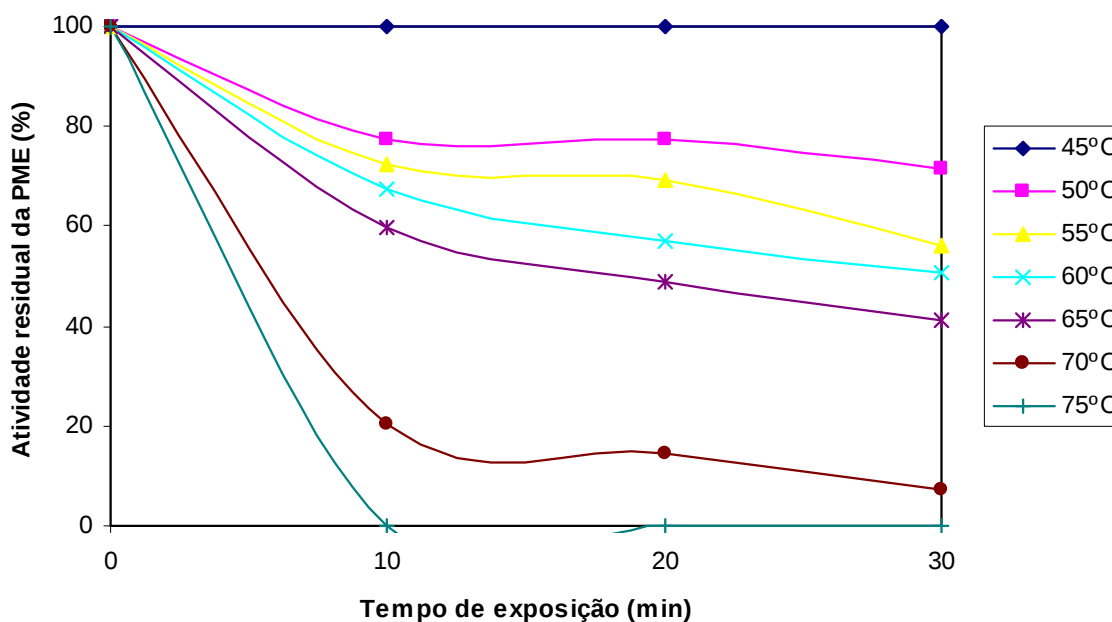


Figura 12 - Estabilidade térmica da pectinase, Panzym Clears, em 5 mg.mL⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, temperatura 45 °C e 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl.

A Figura 13 mostra a influência do pH na atividade da PME de uma amostra comercial de pectinase, Pectinex 100L Plus, à temperatura constante de 45 °C. Observa-se que a atividade máxima da PME foi a pH igual a 4,0 e que a valores inferiores ou superiores a esse, a atividade da PME decresce. Tal informação está de acordo com os dados relatados por Duvetter et al. (2005) e Dinu et al. (2007) para amostras de pectinases industriais obtidas a partir de *Aspergillus aculeatu* e *A. niger*.

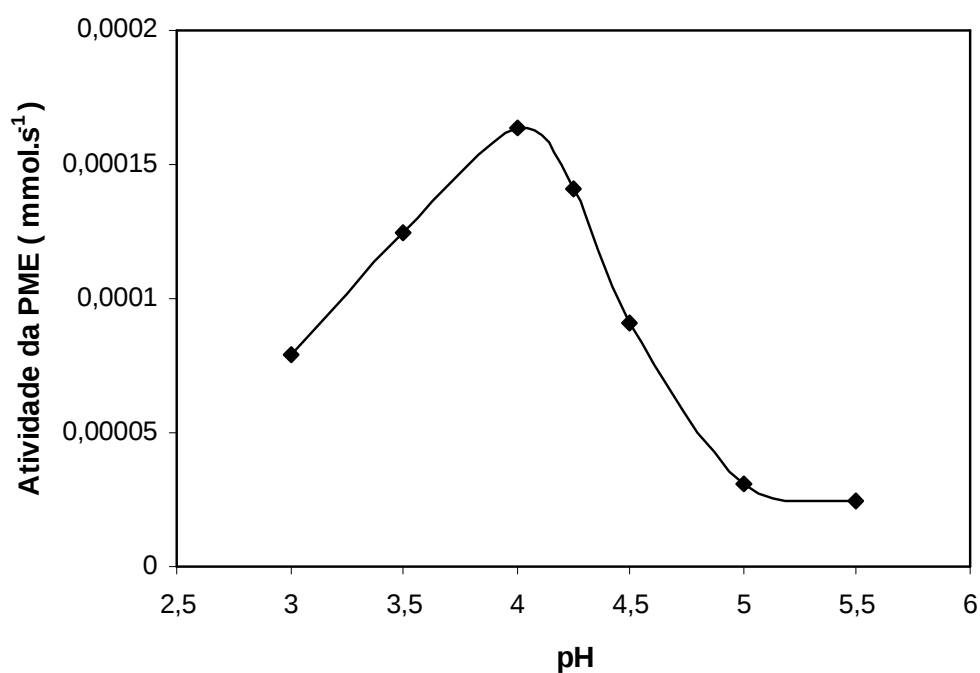


Figura 13 - Influência do pH na atividade da PME, Pectinex 100L Plus, a 45 °C.

A Figura 14 mostra a influência da temperatura na atividade da PME de uma amostra comercial de pectinase, Pectinex 100L Plus em pH igual a 4,0. Verificou-se que a atividade máxima da PME foi a 45 °C e que a temperaturas inferiores ou superiores a esse valor a atividade da PME decresce. Essa temperatura ótima está de acordo com aquela determinada por Fraeye et al. (2007).

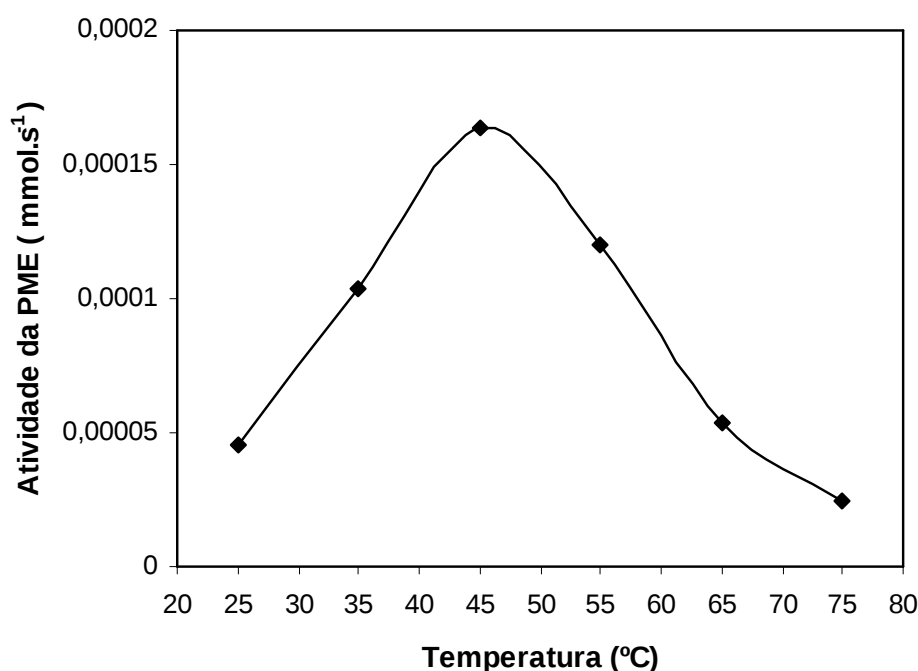


Figura 14 - Influência da temperatura na atividade da PME, Pectinex 100L Plus, a pH igual 4,0.

A Figura 15 mostra a estabilidade térmica de uma amostra comercial de pectinase, Pectinex 100L Plus. Verifica-se que com o aumento da temperatura ocorre a inativação da PME. Observa-se que com o tratamento a 45 °C, em tempos de exposição de 10, 20 e 30 min, a atividade da PME é máxima, 100%. Esta é, portanto, a temperatura ótima para ação da enzima. Quando a temperatura para inativação da PME foi elevada para 50 °C, as atividades residuais permaneceram altas: 94,75% para o tempo de 10 min, 92,26% para 20 min e 89,77% para 30 min de exposição enzimática. Com o tratamento a 55 °C a atividade residual ficou em torno de 84% nos três tempos de exposição enzimática. Já para o tratamento a 60 °C e nos tempos de 10, 20 e 30 min de exposição, a atividade residual ficou entre 79,79 – 69,82%. Na temperatura de 65 °C observa-se que a atividade residual ainda é alta: 67,33% para o tempo de exposição de 10 min, 62,34% em 20 min e 30 min de exposição. Para o tratamento a 70 °C verifica-se uma queda acentuada na atividade residual da PME: em 10 min de exposição a atividade residual foi de 29,92%, em 20 min foi de 14,96%; e em 30 min caiu para 9,97%. Já

na temperatura de 75 °C a atividade residual da PME caiu para 2,49% em 10 min de exposição e a partir de 20 min de exposição ocorreu a inativação completa da PME.

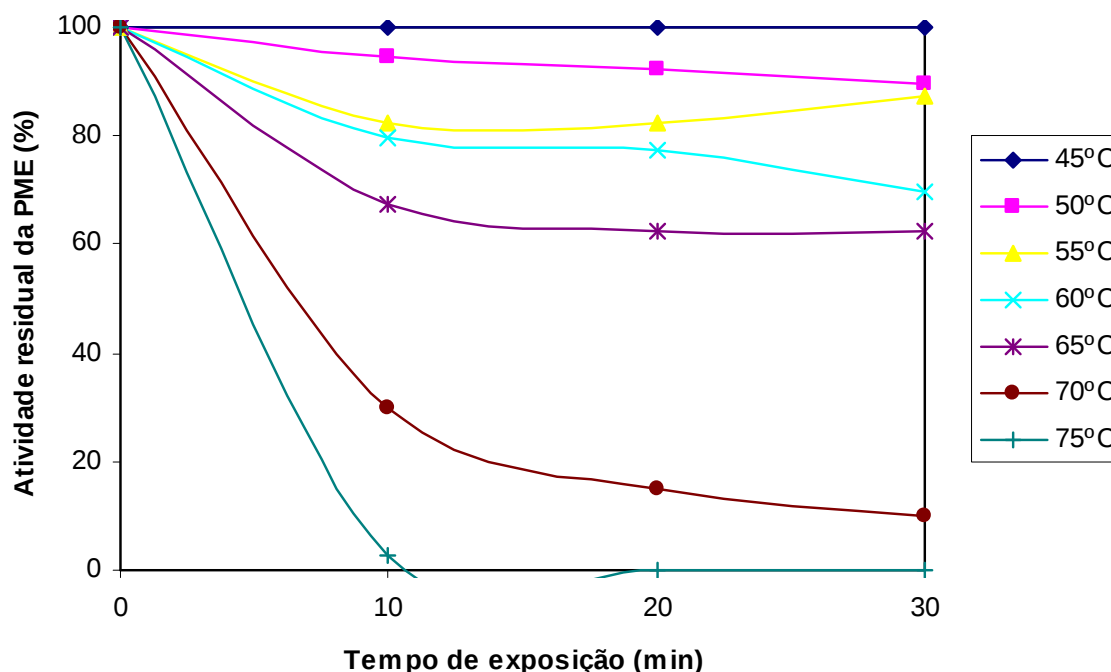


Figura 15 - Estabilidade térmica da pectinase, Pectinex 100L Plus, em 5 mg.mL⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, a 45 °C e 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl.

A partir do estudo das três amostras industriais observou-se que a atividade da pectinase Panzym Clears foi de $2,62 \times 10^{-4}$ mmol.s⁻¹; da Pectinex 100L Plus foi de $1,64 \times 10^{-4}$ mmol.s⁻¹; e da Panzym Univers foi de $1,06 \times 10^{-4}$ mmol.s⁻¹. A amostra comercial de pectinase que apresentou maior concentração de PME em relação às outras duas amostras foi a Panzym Clears. Para as três amostras a temperatura ótima de atuação da PME foi 45 °C e os valores de pH ótimo permaneceram entre 4,0 e 4,25. Esses valores de pH ótimo mostram que a PME produzida por *Aspergillus* sp. atua em condições ácidas, fato esse que está de acordo com o que foi relatado na literatura por Ceci e Lozano (1997), Duvetter et al. (2005), Dinu et al. (2007) e Wilinska et al. (2008). A partir do tratamento térmico das amostras industriais de PME, observou-se que a inativação completa da PME ocorreu a 75 °C por 10 min de exposição enzimática.

5.2 ENERGIA DE ATIVAÇÃO PARA A PME NAS TRÊS AMOSTRAS DE PECTINASES

A energia de ativação pode ser considerada a quantidade de energia necessária para que a molécula de substrato alcance o estado ativado no sistema reacional. A molécula de substrato absorve primeiramente a energia, tornando-se ativada, em seguida converte-se em produto. A energia de ativação da reação enzimática pode ser calculada pela equação de Arrhenius e através de um gráfico do Ln da atividade da PME em função do recíproco da temperatura absoluta, em K, Figura 16, para a PME na Panzym Clears.

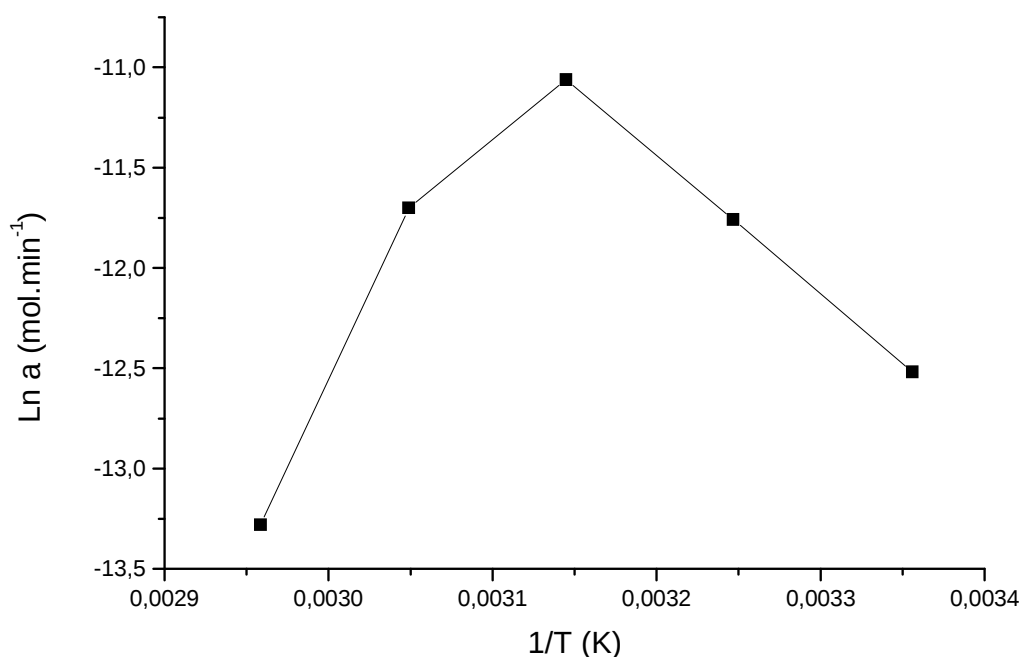


Figura 16 – Gráfico de Arrhenius do efeito da temperatura na atividade da PME de, Panzym Clears.

Para o cálculo das energias de ativação da PME nas amostras de pectinases Panzym Univers, Pectinex 100L Plus e Panzym Clears foram feitos gráficos do Ln da atividade em função do recíproco da temperatura. As temperaturas utilizadas foram aquelas em que a atividade da PME aumenta até atingir um valor máximo na temperatura ótima. As energias de

ativação da Panzym Univers, Pectinex 100L Plus e Panzym Clears, obtidas através dos dados, foram 21,54, 54,73 e 57,35 KJ.mol⁻¹, respectivamente. Um valor elevado para a energia de ativação significa que a velocidade da reação aumenta rapidamente com um aumento na temperatura; a pectinase que apresentou maior energia de ativação foi a Panzym Clears. Os valores para a energia de ativação das amostras estudadas condizem com os relatados na literatura. Sarioğlu et al. (2001) e Mutlu et al. (1999) determinaram a energia de ativação da PME de uma amostra comercial, Pectinex Ultra SP-L: o valor determinado por esses pesquisadores foi 39,00 KJ.mol⁻¹.

5.3 ATIVIDADE DA PME PELO PROCEDIMENTO DA VARIAÇÃO DE pH

Na reação da PME com a pectina ocorre a hidrólise do grupo ester com produção de um mol de metanol e um mol de íons H⁺, os quais podem ser quantificados por um sistema potenciométrico devidamente calibrado. Foi assim determinada a atividade da PME nas três amostras industriais de pectinases a 25 °C com pH inicial de 4,5. A reação foi acompanhada durante 10 min, registrando-se o valor de pH pelo tempo. Observou-se um decréscimo acentuado do pH, nos primeiros minutos da reação, à medida que a PME atuava no substrato. Para o cálculo da atividade utilizaram-se as variações de pH nos primeiros min da reação, Equação 1.

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_f - \text{pH}_0 \quad (1)$$

pH₀ : pH inicial, ausência da enzima

pH_f : pH final após adição da enzima, a cada intervalo de tempo da reação.

A partir do pH do sistema tem-se diretamente a concentração hidrogeniônica da reação, Equação 2.

$$\text{pH} = - \log [\text{H}^+] \quad (2)$$

Logo, tem-se que a concentração de H^+ , Equação 3.

$$[\text{H}^+] = 10^{(-\text{pH})} \quad (3)$$

Para o cálculo da atividade da PME utilizou-se a variação da concentração hidrogeniônica $\Delta[\text{H}^+]$, Equação 4.

$$\Delta[\text{H}^+] = [\text{H}^+]_f - [\text{H}^+]_0 \quad (4)$$

$[\text{H}^+]_0$: concentração hidrogeniônica em ausência da enzima

$[\text{H}^+]_f$: concentração hidrogeniônica após a ação da enzima, a cada período de tempo na reação.

Os valores de pH final e inicial foram convertidos em concentração hidrogeniônica, e substituídos na Equação (4) para obter a $\Delta[\text{H}^+]$ a cada intervalo de tempo da reação, Tabela 1. A reação obedece a uma cinética de primeira ordem e a atividade da PME é o próprio coeficiente angular da reta.

Tabela 1- Conversão do pH em concentração hidrogeniônica, $[H^+]$, em função do tempo e a variação da concentração hidrogeniônica, $\Delta[H^+]$, que corresponde a cada intervalo de tempo na determinação da atividade da PME, Pectinex 100L Plus, a 25 °C e pH 4,5.

Tempo (s)	pH	$[H^+]$ (mol)	$\Delta[H^+]$ (mol)
0	4,50	$3,162 \times 10^{-5}$	
60	4,28	$5,248 \times 10^{-5}$	$2,086 \times 10^{-5}$
120	4,19	$6,456 \times 10^{-5}$	$1,208 \times 10^{-5}$
180	4,15	$7,079 \times 10^{-5}$	$6,229 \times 10^{-6}$

A Figura 17 mostra o comportamento da reação em função da $\Delta[H^+]$ (mol); em função do tempo (s), observou-se que a reação segue uma cinética de primeira ordem .

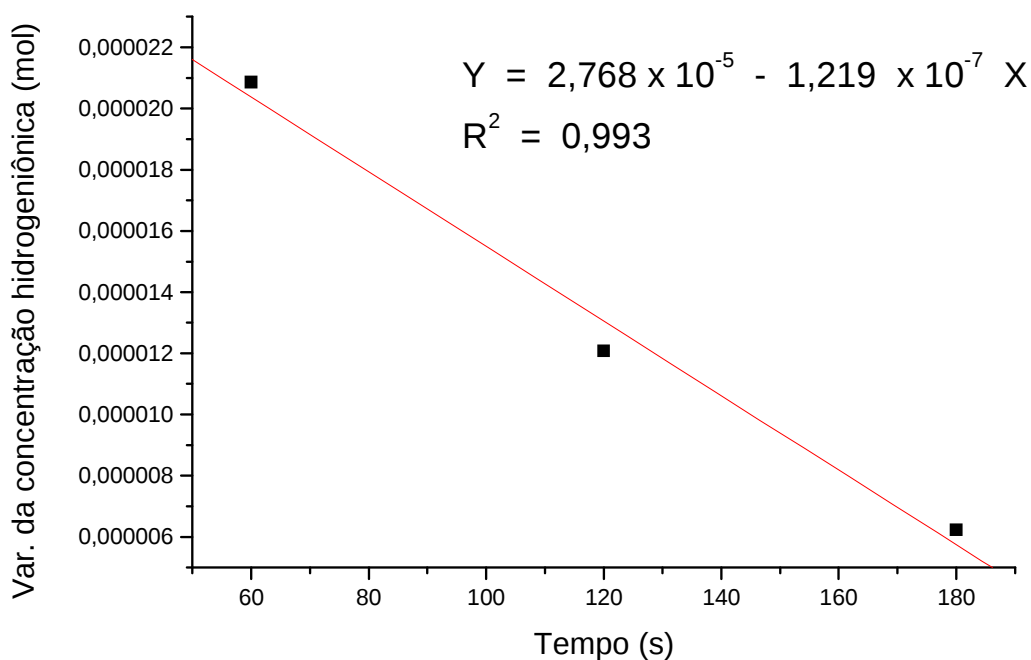


Figura 17 – Cinética da reação da PME, Pectinex 100L Plus, com 5 mg.L⁻¹ de pectina, a 25 °C e pH 4,5.

A partir da Figura 17 observa-se uma resposta linear, Equação 5, entre a variação da concentração hidrogeniônica em função do tempo. A atividade da PME na amostra comercial, Pectinex 100L Plus, foi o próprio coeficiente angular, ou seja, $1,219 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}$.

$$\Delta[\text{H}^+] = 2,768 \times 10^{-5} - 1,219 \times 10^{-7} \times t(\text{s}) \quad (5)$$

Todos os experimentos, para a determinação da atividade da PME, foram feitos em duplicata, o valor de atividade do segundo experimento foi $1,095 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}$, a média entre as atividades foi de $1,157 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}$ ou $1,157 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$ para a PME na amostra da Pectinex 100L Plus, a 25 °C e pH 4,5.

A Tabela 2 mostra a atividade da PME, nas três amostras industriais, pelo procedimento ΔpH e ΔV_{NaOH} a 25 °C e pH 4,5. Observa-se uma boa concordância entre os valores de atividade da PME determinados pelos procedimentos de ΔV_{NaOH} e ΔpH . Os valores da atividade determinados em ambos os procedimentos mostram que a pectinase Panzym Clears apresentou maior atividade entre as três preparações estudadas. Logo, essa pectinase apresenta maior concentração de PME.

Tabela 2 – Atividade da PME, nas três amostras industriais, pelo procedimento ΔpH e ΔV_{NaOH} a 25 °C e pH 4,5.

Amostra comercial de pectinase	Atividade da PME (mmol.s^{-1})	
	ΔpH	ΔV_{NaOH}
Panzym Clears	$1,291 \times 10^{-4}$	$1,080 \times 10^{-4}$
Pectinex 100L Plus	$1,157 \times 10^{-4}$	$0,941 \times 10^{-4}$
Panzym Univers	$0,904 \times 10^{-4}$	$0,881 \times 10^{-4}$

Através do procedimento da variação do pH determinou-se também a atividade residual da PME, em duas amostras de pectinases industriais, a Pectinex 100L Plus e a Panzym Clears.

Os dados da atividade residual da PME na Pectinex 100L Plus encontram-se na Figura 18. Verifica-se que com o tratamento térmico a 45 °C, no período de 10, 20 e 30 min, a atividade permaneceu com o valor máximo. Isso se deve ao fato de que a PME encontra-se na sua temperatura ótima. Com o tratamento a 50 °C por 10 min de exposição, a atividade residual atingiu 85,04%; com 20 min de exposição a atividade permaneceu em 84,57%; e com 30 min a atividade residual alcançou 76,66%. Já no tratamento a 55 °C e 10, 20 e 30 min de exposição, a atividade residual permaneceu entre 83,46 – 75,12%. No tratamento a 60 °C observou-se a atividade de 68,13% para 10 min, 61,44% para 20 min e 59,31% para 30 min. Com o aumento da temperatura de tratamento para 65 °C, a atividade residual permaneceu acima de 50% no mesmo período de tempo. Quando a PME foi submetida ao tratamento a 70 °C, observou-se uma queda acentuada na atividade residual, alcançando valores de 34,69% para 10 min, 12,57% para 20 min e 6,81% para 30 min. A inativação completa da PME ocorreu a 75 °C por 20 min. Constatou-se, portanto, que a temperatura e o tempo de exposição influenciam na atividade residual da PME.

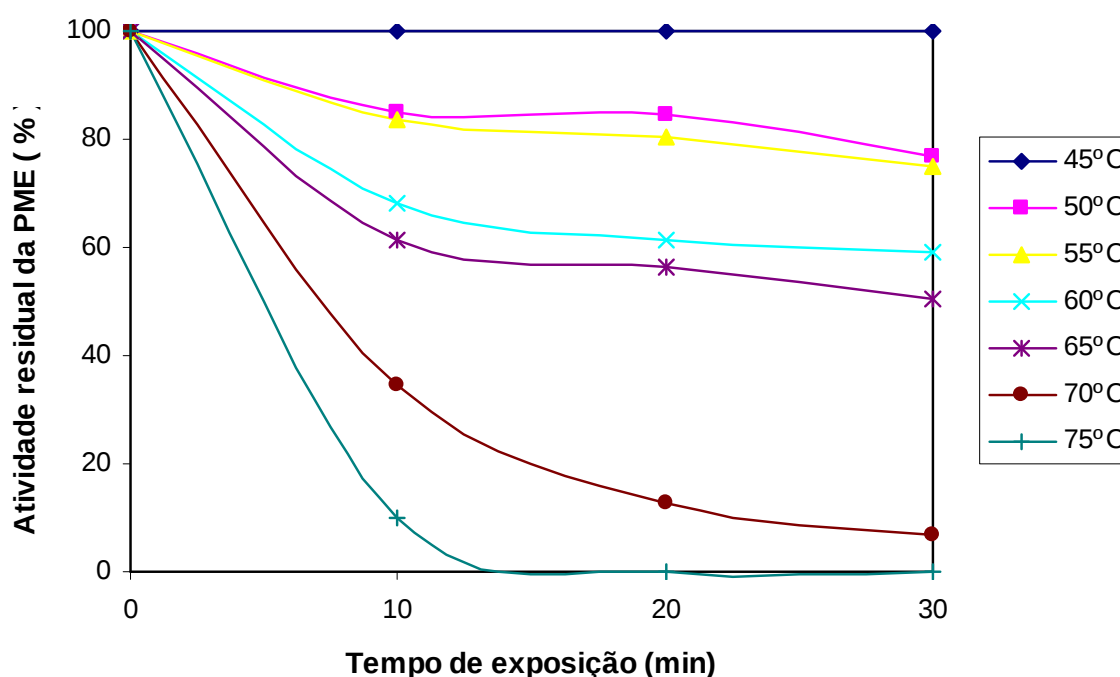


Figura 18 – Atividade residual da PME, Pectinex 100L Plus, em 5 mg.mL⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, temperatura 45 °C e 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl, por ΔpH.

Comparando-se o tratamento térmico da PME, Pectinex 100L Plus, realizado com procedimento da variação de volume de NaOH (Figura 15) com o procedimento da variação de pH (Figura 18), observa-se um comportamento semelhante, ou seja, com o aumento da temperatura e o tempo de exposição da enzima ocorre a inativação da PME. Na determinação da atividade residual da PME pelos dois métodos, verifica-se que no tratamento a 45 °C por 10, 20 e 30 min a atividade manteve-se no valor máximo e a inativação completa ocorreu a 75 °C por 20 min.

A Figura 19 mostra estabilidade térmica da PME na pectinase Panzym Clears. Observa-se que no tratamento a 45 °C por 10, 20 e 30 min de exposição, a atividade da PME permanece no valor máximo. A temperatura ótima de atuação da PME na amostra Panzym Clears foi 45 °C, por isso não ocorreu inativação da enzima nessa temperatura. Para o tratamento a 50 °C por 10, 20 e 30 min de exposição, a atividade residual, permaneceu elevada, em torno de 90%. Com o aumento da temperatura para 55 °C e no mesmo período de

tempo verificou-se a atividade de 79,58% para 10 min e 79,15% para 20 e 30 min. Para tratamento a 60 °C observou-se uma queda acentuada, com valores de atividade de 39,64, 35,68 e 22,82% para 10, 20 e 30 min, respectivamente. No tratamento a 70 °C e 10 min de exposição, a atividade residual permaneceu em 28,15% e manteve-se constante em 19,25% nos períodos de 20 e 30 min. A inativação completa da PME na amostra comercial Panzym Clears ocorreu a 75 °C por 10 min.

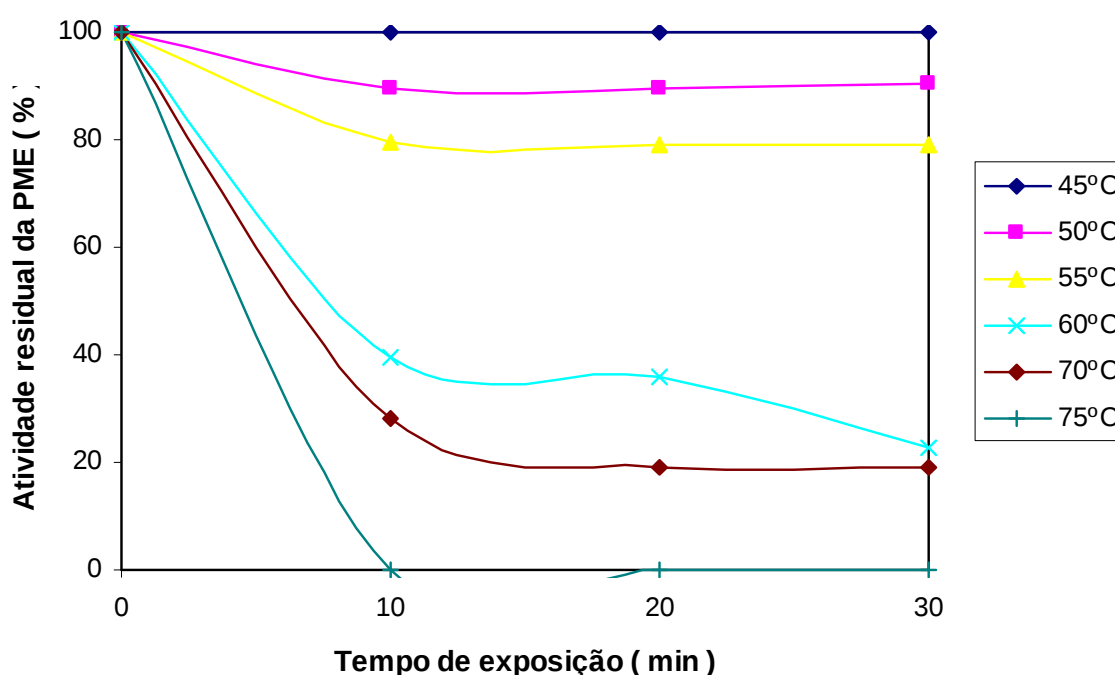


Figura 19 – Atividade residual da PME na Panzym Clears, em 5 mg.mL⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, temperatura 45 °C, 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl por Δ pH.

Os valores da atividade residual, encontrados através dos procedimentos da variação de volume de NaOH e variação de pH, foram semelhantes. Com o aumento da temperatura e tempo de exposição da PME ocorreu uma queda na atividade. A partir das Figuras 12 e 19 observa-se que a inativação completa da PME na amostra Panzym Clears ocorreu a 75 °C por 10 min de exposição. Assim, pode-se afirmar que através do procedimento da variação do pH obtiveram-se informações quantitativas de confiabilidade comparáveis ao procedimento

tradicional, potenciometria através da variação de volume de NaOH, para determinação da atividade da PME.

5.4 ATIVIDADE DA PME POR UV-VIS

5.4.1 Estabilidade do Azul de Bromofenol a Diferentes pH

A Figura 20 mostra o comportamento do azul de bromofenol em diferentes valores de pH; a faixa estudada foi de 3,7 a 5,0. Observa-se que com o aumento do pH ocorre um aumento na absorbância com máximo em 592 nm, e verifica-se que a banda não sofre deslocamento. Como este indicador mostrou boa estabilidade na faixa de pH estudado e apresenta ponto de viragem entre 3,0 e 4,6 próximos ao pH ótimo da PME, o mesmo foi utilizado para determinar a atividade da enzima.

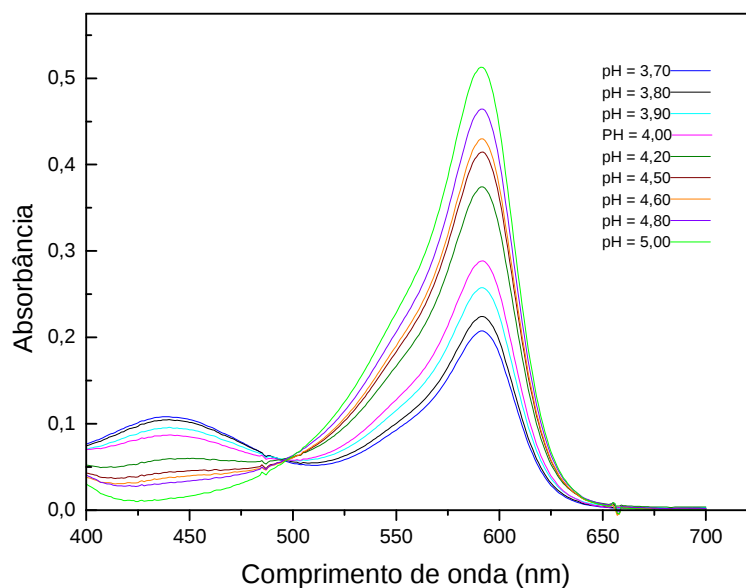


Figura 20 – Estabilidade do azul de bromofenol em diferentes valores de pH.

Na reação da PME com a pectina a 25 °C e pH igual a 4,5, ocorre uma queda do pH devido à formação de H^+ . Como este se combina com o indicador, aumenta a concentração da espécie protonada e decresce a concentração da espécie deprotonada, promovendo um decréscimo proporcional na banda de absorção em 592 nm.

Um estudo de Hagerman e Austin (1986) relata a determinação da atividade da PME pelo indicador azul de bromotimol. O ponto de viragem desse indicador está entre 6,0 – 7,6, e a absorbância máxima em 620 nm. O azul de bromotimol é adequado para determinação de ácido produzido em reações em que o pH ótimo da enzima estiver entre a faixa de viragem do indicador. Deve-se também considerar que, além da hidrólise enzimática, em pH acima de 7,0 poderá ocorrer a hidrólise da pectina pelo efeito do pH. Segundo Fayyaz et al. (1995a), uma reação conduzida a pH 8,0 para determinar a atividade da PME não é segura devido à ocorrência da autohidrólise da pectina em condições alcalinas. Considerando esses fatores, o azul de bromotimol não pode ser utilizado para determinar a atividade da PME em amostras de pectinases industriais em que o pH ótimo localiza-se entre 4,0-4,5.

5.4.2 Curva Padrão do Ácido D-Galacturônico com o Azul de Bromofenol

A Figura 21 mostra o comportamento do azul de bromofenol em diferentes concentrações de ácido D-galacturônico. Verifica-se que à medida que a concentração de ácido aumenta, a absorbância em 592 nm diminui proporcionalmente.

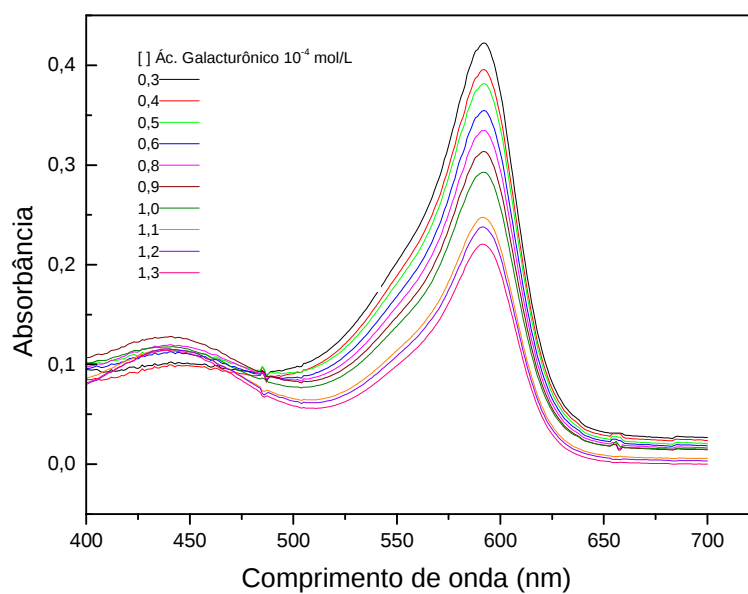


Figura 21 – Comportamento do azul de bromofenol em diferentes concentrações de ácido D - galacturônico.

A partir dos dados de absorbância em diferentes concentrações de ácidos D-galacturônicos construiu-se uma curva padrão que está representada na Figura 22. Observou-se uma boa resposta linear entre a absorbância e a concentração de ácido.

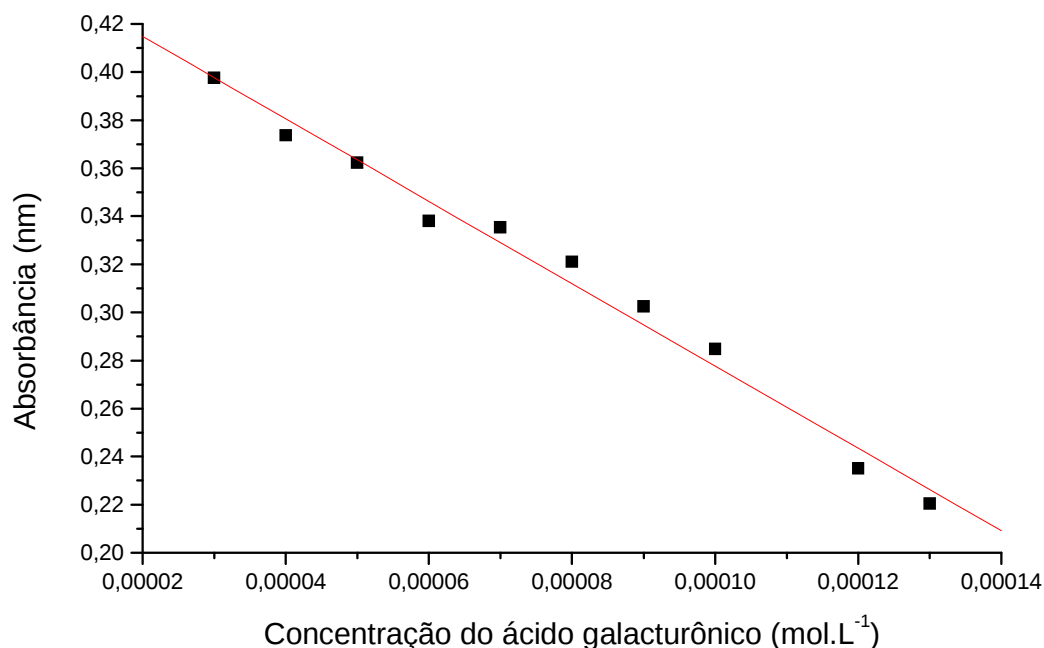


Figura 22 – Curva padrão do ácido D-galacturônico a temperatura de 25 °C.

O coeficiente de correlação da reta foi 0,99245, a Equação 6 representa a variação da absorbância em 592 nm e a $[H^+]$ na reação em pH 4,5, igual ao coeficiente linear menos o coeficiente angular vezes a concentração do ácido. Esta concentração será determinada durante a reação da pectina com a PME sob condições adequadas.

$$\Delta A_{592, \text{pH } 4,5} = 0,44903 - 1713,311 \times [H^+] \quad (6)$$

5.4.3 Determinação da Atividade da PME por Uv-Vis

Através do método Uv-Vis foi determinada a atividade da PME de três amostras industriais de pectinases Pectinex 100L Plus, Panzym Univers e Panzym Clears em pH 4,5 e a 25 °C. Para determinar a atividade da PME utilizou-se a curva padrão de ácido D-

galacturônico, a qual informou as concentrações exatas de ácido. Assim, a partir da variação da concentração de ácido pela variação do tempo determinou-se a atividade da PME.

A reação da pectina em presença de PME produz íons H^+ , protonando o indicador azul de bromofenol e, conseqüentemente, diminuindo a absorbância em 592 nm nos respectivos tempos de reação. A partir da absorbância pelo tempo calculou-se a concentração de ácido produzido na reação e, através da Equação 6, calculou-se a atividade da PME a partir da variação da concentração do ácido em função da variação do tempo.

Exemplo para o cálculo da atividade da PME na amostra da Pectinex 100L Plus, a partir da Equação 6: a reação da pectina foi conduzida à força iônica constante $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,5 e a 25°C com o indicador azul de bromofenol e em presença da amostra de PME. Os dados de um dos experimentos estão representados na Tabela 3, que mostra a absorbância em 592 nm nos respectivos tempos da reação. A partir das absorbâncias têm-se as suas variações em função do tempo; a variação em 592 nm foi então convertida em variação de concentração de ácido, através da Equação 6, produzido a cada intervalo de tempo.

Tabela 3 - Absorbâncias, A, variação da A, ΔA , em 592 nm em função do tempo da reação e a variação da concentração de $[H^+]$ que corresponde a cada intervalo de tempo.

Tempo (s)	A em 592 nm	ΔA	$\Delta[H^+]$ (mol)
0	0,809847		
90	0,760955	$4,889 \times 10^{-2}$	$2,335 \times 10^{-4}$
180	0,724774	$3,618 \times 10^{-2}$	$2,409 \times 10^{-4}$
270	0,706426	$1,835 \times 10^{-2}$	$2,513 \times 10^{-4}$

A Figura 23 mostra a variação da concentração de H^+ em mol produzido na reação em função do tempo em seg. Observa-se uma resposta linear, entre a concentração de ácido produzido pelo tempo.

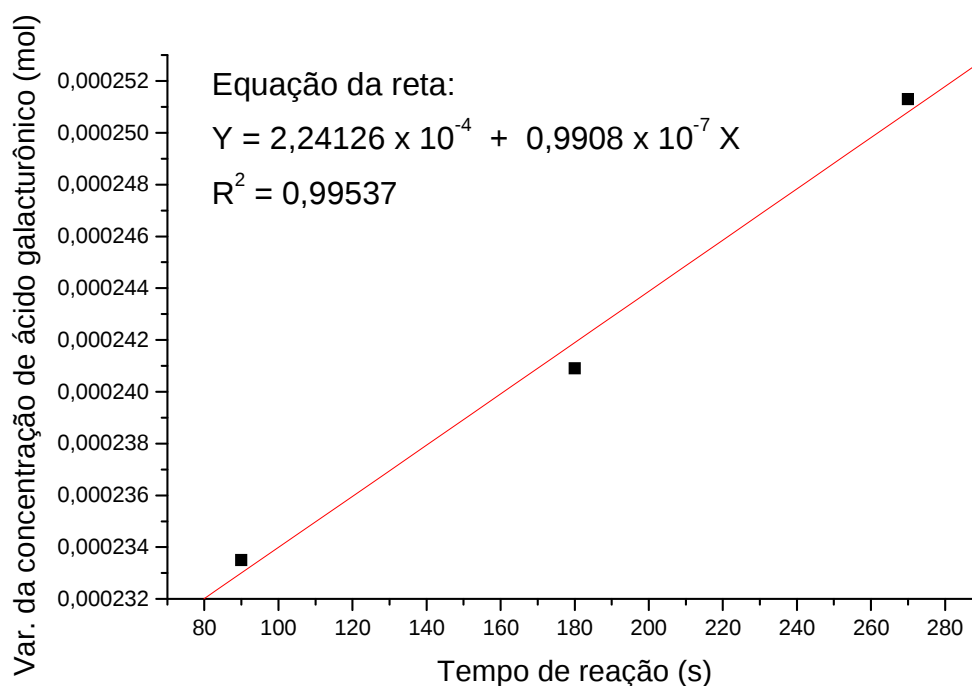


Figura 23 – Variação da concentração de H^+ em mol produzido na reação em função do tempo (s).

A atividade da PME na amostra comercial de pectinase, Pectinex 100L Plus, foi calculada a partir da equação da reta; o coeficiente angular é igual a $0,9908 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}$, a própria atividade que pode ser expressa $0,9908 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$

Todos os experimentos foram feitos em duplicata e o valor da atividade do segundo experimento foi de $0,9092 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}$. Fez-se a média entre os dois valores e obteve-se a atividade de $0,950 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}$ ou $0,950 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$ para a PME na amostra comercial de pectinase, Pectinex 100L Plus, nas condições de 25 °C e pH 4,5.

Para todos os experimentos com os indicadores foi utilizado esse procedimento para determinar a atividade da PME nas amostras de pectinases industriais estudadas. A atividade da PME com o indicador azul de bromofenol nas amostras da Panzym Clears foi de $1,343 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$; já nas amostras da Panzym Univers foi de $1,015 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$ e nas Pectinex 100L Plus foi de $0,950 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$.

A atividade da PME nas três amostras industriais também foi determinada com o indicador verde de bromocresol a pH 4,5 e na temperatura de 25 °C; deve-se lembrar que a faixa de mudança de cor deste indicador ocorre em 3,8 a 5,4. A partir da curva padrão deste indicador com o ácido D-galacturônico e da Equação 7 calculou-se a atividade da PME para cada amostra de enzima. A curva apresentou uma resposta linear e um coeficiente de correlação de 0,9948.

$$\Delta A_{617, \text{pH } 4,5} = 0,1245 + 393,363 [\text{H}^+] \quad (7)$$

Na Tabela 4 tem-se os valores das atividades da PME para as três amostras industriais com os dois indicadores estudados. Observa-se que os valores das atividades da PME nas três amostras foram inferiores para o indicador verde de bromocresol em relação aos valores obtidos com o indicador azul de bromofenol. Essas diferenças, segundo Vilariño et al. (1993), podem ser atribuídas à menor sensibilidade do verde de bromocresol, à faixa de mudança de cor do indicador e à sua estabilidade em relação ao pH em que a reação da pectina em presença da enzima foi conduzida. O pH da reação foi igual a 4,5, próximo ao pH ótimo de cada amostra estudada, e na faixa de pH em que o indicador mudava de cor 3,8 a 5,4. Para ambos os indicadores a estabilidade da cor foi verificada durante 20 min na solução de pectina a pH 4,5, na temperatura de 25 °C e força iônica constante. Constatou-se que a cor do indicador verde de bromocresol na reação com a pectina não permanecia constante, a absorbância da solução variava mesmo em ausência da PME. Já o azul de bromofenol muda de cor na faixa de 3,0 a 4,6, ficando mais próximo ao pH 4,5 em que a reação foi conduzida. A cor deste indicador manteve-se constante durante a reação. Logo, os dados obtidos a partir do azul de bromofenol são mais precisos. Constatou-se também que a concentração do

indicador não precisa ser exata, porém deve ser rigorosamente constante para cada medida de atividade.

Tabela 4 Atividade em mmol.s^{-1} da PME por Uv-Vis com os dois indicadores a pH 4,5 a 25 °C.

Atividade da PME (mmol.s^{-1})		
Enzima/ Indicadores	azul de bromofenol	verde de bromocresol
Pectinex 100L Plus	$0,950 \times 10^{-4}$	$1,347 \times 10^{-5}$
Panzym Univers	$1,015 \times 10^{-4}$	$2,730 \times 10^{-5}$
Panzym Clears	$1,343 \times 10^{-4}$	$3,538 \times 10^{-5}$

Ceci e Lozano (1997) utilizaram o verde de bromocresol para determinar a atividade da PME em duas amostras de pectinases industriais em pH 4,5 e 5,1 a 25 °C. Determinaram a atividade da PME a partir de uma curva padrão com ácido D-galacturônico e o indicador em 617 nm. Observaram que o pH ótimo para a PME em ambas as amostras de pectinases estudadas foi de 4,5.

Comparando-se os dados das atividades da PME, nas três amostras de pectinases, obtidas através dos diferentes procedimentos, na temperatura de 25 °C e pH igual a 4,5, Tabela 5, observa-se uma boa concordância entre os valores de atividade da PME para os três procedimentos testados. No estudo Uv-Vis o indicador azul de bromofenol apresentou boa estabilidade em solução com a pectina durante o período de 20 min de reação. Os dados da atividade da PME mostram uma boa correlação quando comparados àqueles obtidos por ΔV_{NaOH} e ΔpH . Os dados obtidos pela variação do pH pelo tempo também apresentam boa concordância com os obtidos pela variação de volume de base pelo tempo.

Tabela 5 – Comparação das Atividades da PME obtidas nos diferentes métodos a 25 °C e pH igual 4,5.

Enzima/ Métodos	Atividade da PME (mmol. s ⁻¹)		
	azul de bromofenol	ΔV_{NaOH}	ΔpH
Pectinex 100L Plus	$0,950 \times 10^{-4}$	$0,941 \times 10^{-4}$	$1,157 \times 10^{-4}$
Panzym Univers	$1,015 \times 10^{-4}$	$0,881 \times 10^{-4}$	$0,904 \times 10^{-4}$
Panzym Clears	$1,343 \times 10^{-4}$	$1,080 \times 10^{-4}$	$1,291 \times 10^{-4}$

5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PME, NA AMOSTRA DA PECTINEX 100L PLUS, PELA QUANTIFICAÇÃO DO METANOL

5.5.1 Purplad

A Figura 24 mostra a curva padrão do metanol com álcool oxidase em presença do reagente Purpald a 25 °C. Observa-se um aumento linear da absorbância com o aumento da concentração de metanol.

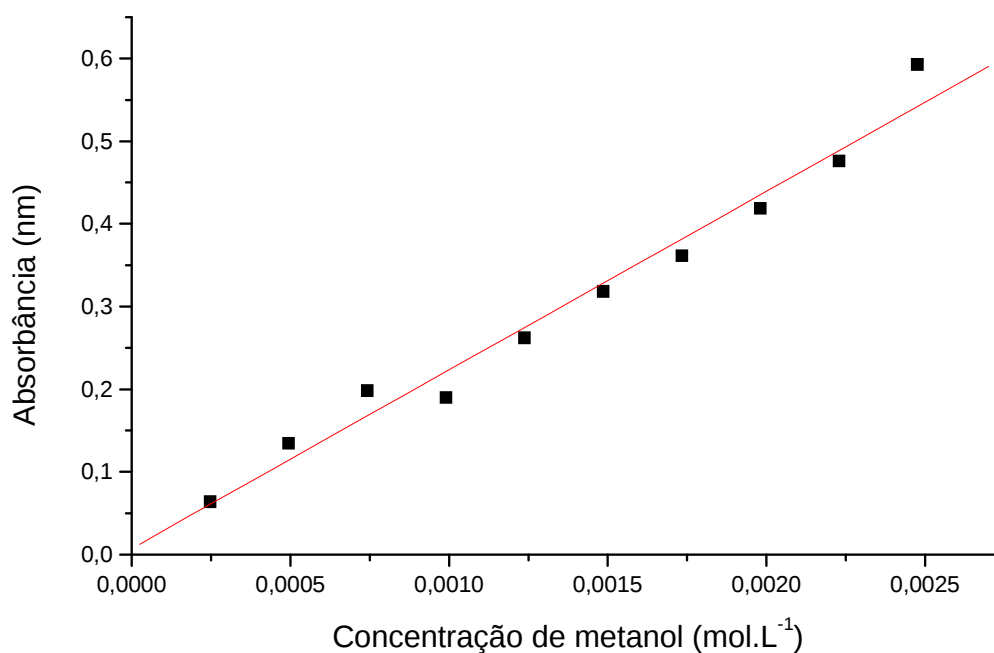


Figura 24 – Curva padrão do metanol com a álcool oxidase e o reagente Purpald a 25 °C e pH 4,5.

A partir da curva padrão do metanol detectado com Purpald tem-se uma resposta linear que está representada na Equação 8. O coeficiente de correlação da curva foi 0,98743.

$$\Delta A_{550, \text{pH } 7,15} = 0,00732 + 215,99694 \times [\text{MeOH}] \quad (8)$$

A partir da curva padrão e da variação da absorbância, obtida a partir da reação da pectina desmetoxilada com álcool oxidase e o Purpald, calculou-se a concentração de metanol [MeOH] liberado na reação. A atividade da PME foi calculada a partir do gráfico da concentração do metanol pelo tempo e o valor obtido foi de $3,602 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$.

5.5.2 Acetil Acetona

Segundo Anthon e Barrett (2004), pode-se obter uma curva padrão com boa resposta linear do metanol em presença da álcool oxidase e com a acetil acetona. A Figura 25 mostra a curva padrão do metanol com a acetil acetona a 25 °C e pH 4,5; observa-se que com o aumento da concentração de metanol também ocorre um aumento linear na absorbância. Esta banda deve-se ao produto da reação da acetil acetona com o formaldeído, produzido pela oxidação do metanol com a álcool oxidase, e o meio reacional. O produto que absorve em 412 nm é o 3,5-diacetil-1,4-dihidro-2,6-dimetil piridina.

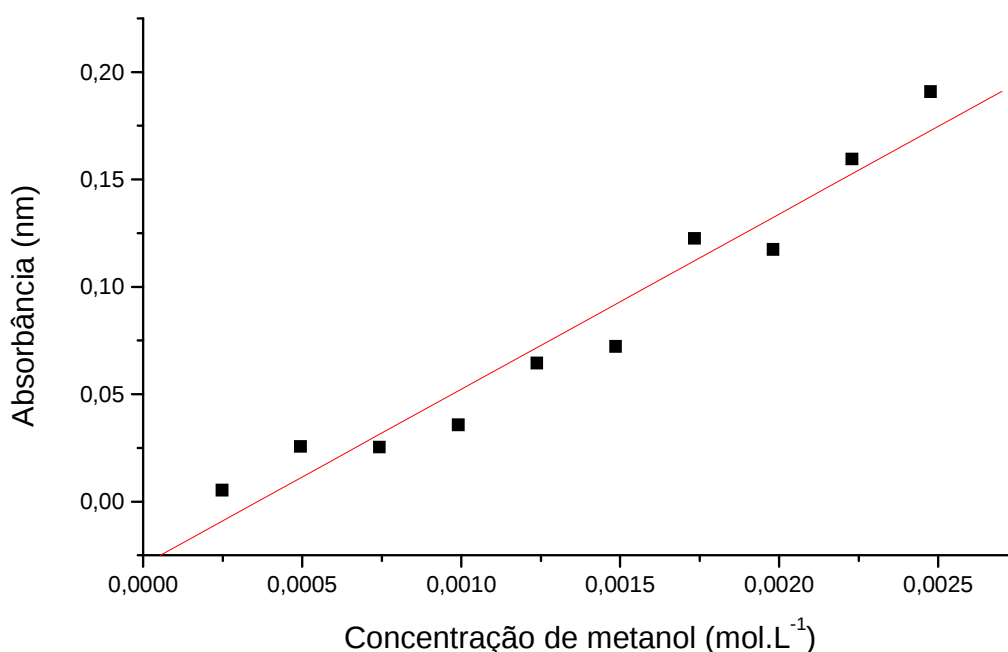


Figura 25 – Curva padrão do metanol com a álcool oxidase com a acetil acetona a 25 °C e pH 4,5.

A partir da curva padrão do metanol detectado com acetil acetona tem-se uma resposta linear que está representada na Equação 9. O coeficiente de correlação da curva foi 0,97354.

$$\Delta A_{412, \text{pH}4,5} = - 0,02931 + 81,63622 \times [\text{MeOH}] \quad (9)$$

Com a reação da pectina desmetoxilada, da álcool oxidase e da acetil acetona obtiveram-se as absorbâncias correspondentes a cada intervalo de dois min. A partir da curva padrão calculou-se a concentração de metanol [MeOH] produzido a cada intervalo de tempo. Um gráfico foi construído com $\Delta[\text{MeOH}]$ em função do tempo, a atividade da PME na amostra da Pectinex 100L Plus foi $1,073 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$.

Observa-se que o valor da atividade da PME, obtido pelo reagente Purpald $3,602 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$, foi mais que três vezes o valor obtido pelo reagente acetil acetona $1,073 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$. Segundo Anthon e Barrett (2004), o Purpald deve ser preparado em solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH, meio altamente básico. Quando esse reagente foi utilizado, após a reação da álcool oxidase com a pectina desmetoxilada em solução tampão, a solução de Purpald fortemente básica anulou o efeito tampão 7,15 da solução. Mediu-se o pH da solução resultante tampão, pectina desmetoxilada, álcool oxidase, Purpald e água ultra-pura para completar o volume de 2,0 mL: o valor do pH ficou acima 12.

Após a adição do reagente Purpald a reação foi conduzida a 30°C por 30 min, período de tempo em que o Purpald reage com o formaldeído. Como o meio é altamente básico, não se deve descartar a possibilidade de ele afetar a hidrólise da pectina, produzindo mais metanol. O sistema contém álcool oxidase, que oxida o metanol a formaldeído, e este então reage com o Purpald, resultando num aumento da concentração de metanol e, conseqüentemente, num aumento na atividade da PME. Segundo Ly-Nguyen et al. (2002), a autohidrólise da pectina deve ser considerada quando a atividade da PME for determinada a uma temperatura e pH acima de 50°C e 6,5, respectivamente. Já segundo Arbaisah et al. (1997), medidas da atividade da PME acima de pH 9,0 não são confiáveis devido à reação de desesterificação pelo meio alcalino. Segundo Anthon e Barrett (2004), o Purpald é mais

sensível que a acetil acetona, porém os dois autores não consideraram o fator pH do sistema e também não fizeram referência à autohidrólise da pectina.

Na determinação do metanol com a acetil acetona, os reagentes utilizados não alteraram o pH do sistema, que permaneceu em 4,35. Assim, pode-se afirmar que somente foi detectado o metanol produzido pela ação da PME.

Na Tabela 6 encontram-se os valores da atividade da PME, Pectinex 100L Plus, determinada pelos vários procedimentos. Observa-se que o valor da atividade - determinado pelo reagente acetil acetona, para detectar o metanol - foi semelhante aos valores obtidos pelos procedimentos potenciométricos, bem como àquele em que a concentração de H^+ foi detectada espectroscopicamente pelo indicador azul de bromofenol.

Tabela 6 – Atividade da PME de uma amostra industrial de pectinase, Pectinex 100L Plus, por diferentes métodos nas condições de 25 °C e pH 4,5.

	Atividade da PME (mmol.s^{-1})
Método / Enzima	Pectinex 100L Plus
Purpald	$3,602 \times 10^{-4}$
Acetil acetona	$1,073 \times 10^{-4}$
Indicador azul de bromofenol	$0,950 \times 10^{-4}$
Variação de pH	$1,157 \times 10^{-4}$
Variação de volume de NaOH	$0,941 \times 10^{-4}$

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE RESIDUAL DA PME EXÓGENA NO SUCO DE MANGA PELOS PROCEDIMENTOS ΔV_{NaOH} E ΔpH

O suco de manga, após centrifugado, manteve o pH em 4,50 e os sólidos solúveis em 16 °Brix. A Figura 26 mostra a estabilidade térmica do suco de manga com a amostra comercial de pectinase, Pectinex 100L Plus, por titulometria através da variação do volume de

NaOH pelo tempo. Observa-se que o tratamento térmico realizado a 45 °C por um período de tempo de 10, 20 e 30 min de exposição não influenciou na atividade da PME, pois esta é a temperatura ótima de atuação da enzima. Com o aumento da temperatura ocorreu uma queda na atividade: a 50 °C por 10 min de exposição a atividade residual foi 72,3%, por 20 min reduziu a 61% e por 30 min alcançou 47%. Na temperatura de 60 °C por 10, 20 e 30 min a atividade residual atingiu valores de 59,6%, 47,6% e 31,9%, respectivamente. Com o tratamento a 65 °C no mesmo período de tempo de exposição, a atividade residual ficou em torno de 30%; e com tratamento a 70 °C por 20 e 30 min de exposição, atividade permaneceu próxima de 29%. Quando a temperatura foi elevada para 75 °C por 10 min observou-se que a atividade residual permaneceu em 24,1%; já em 20 min de exposição ocorreu a completa inativação. Um estudo de Wilinska et al. (2008) mostrou que o tratamento a 66 °C por 2,5 min no suco de maçã com PME exógena foi suficiente para a completa inativação.

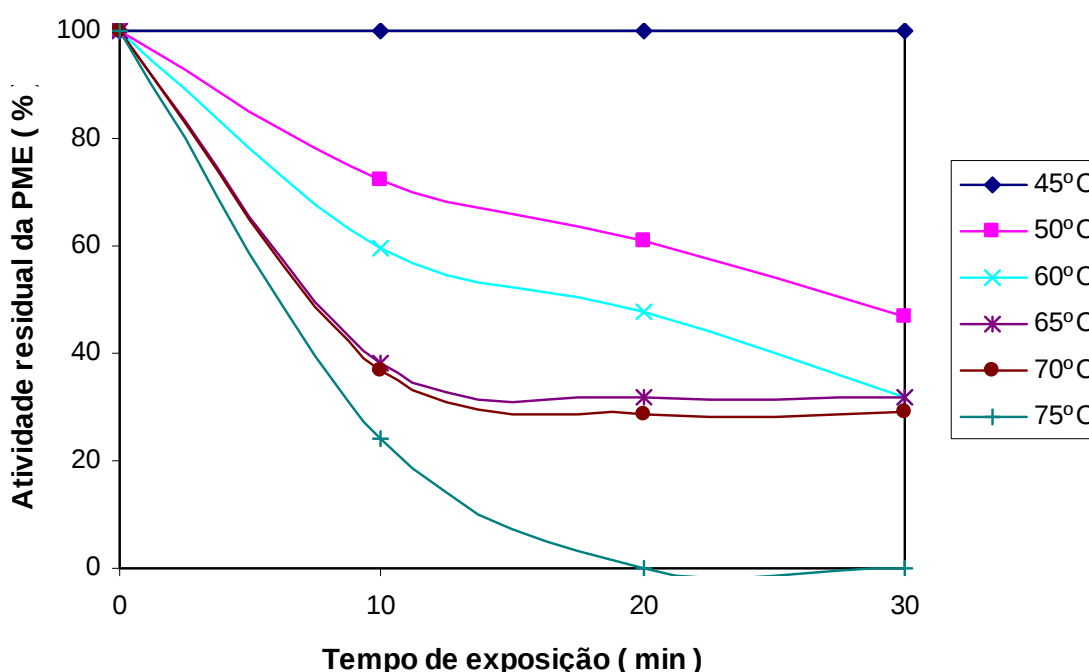


Figura 26 – Atividade residual da PME exógena no suco de manga, em 5 mg.mL⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, temperatura 45 °C e 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl, ΔV_{NaOH} .

A atividade residual da PME no suco de manga foi determinada pelo procedimento da variação de pH. A Figura 27 mostra a estabilidade térmica da PME exógena, Pectinex 100L Plus, no suco de manga. Observa-se que no tratamento a 45 °C e por 10, 20 e 30 min de exposição, a atividade mantém-se em 100%. Isso ocorre porque a PME encontra-se na sua temperatura ótima. Com o aumento da temperatura de tratamento para 50 °C, verifica-se uma atividade residual de 85,34% para 10 min de exposição e de 64,76% para 20 e 30 min. Para o tratamento térmico a 55 °C por 10, 20 e 30 min, as atividades obtidas foram 63,77%, 58,66% e 49,08%, respectivamente. Quando o suco com a amostra comercial de pectinase foi submetido ao tratamento de 60 °C, observaram-se valores de atividade residual de 51,14% para 10 min; 39,16% para 20 min; e 36,15% para 30 min de exposição. Para o tratamento a 65 °C por 10, 20 e 30 min, as atividades obtidas foram 63,77%, 58,66% e 49,08%, respectivamente. Quando o suco com a amostra comercial de pectinase foi submetido ao tratamento de 60 °C, observaram-se valores de atividade residual de 51,14% para 10 min; 39,16% para 20 min; e 36,15% para 30 min de exposição. Para o tratamento a 65 °C por 10, 20 e 30 min, a atividade variou de 31,71 a 21,37%. Com o tratamento a 70 °C por 3, 6 e 10 min de exposição, a atividade residual ficou em torno de 25%, com o aumento da temperatura para 75 °C observou-se a completa inativação da PME em 5 min de exposição.

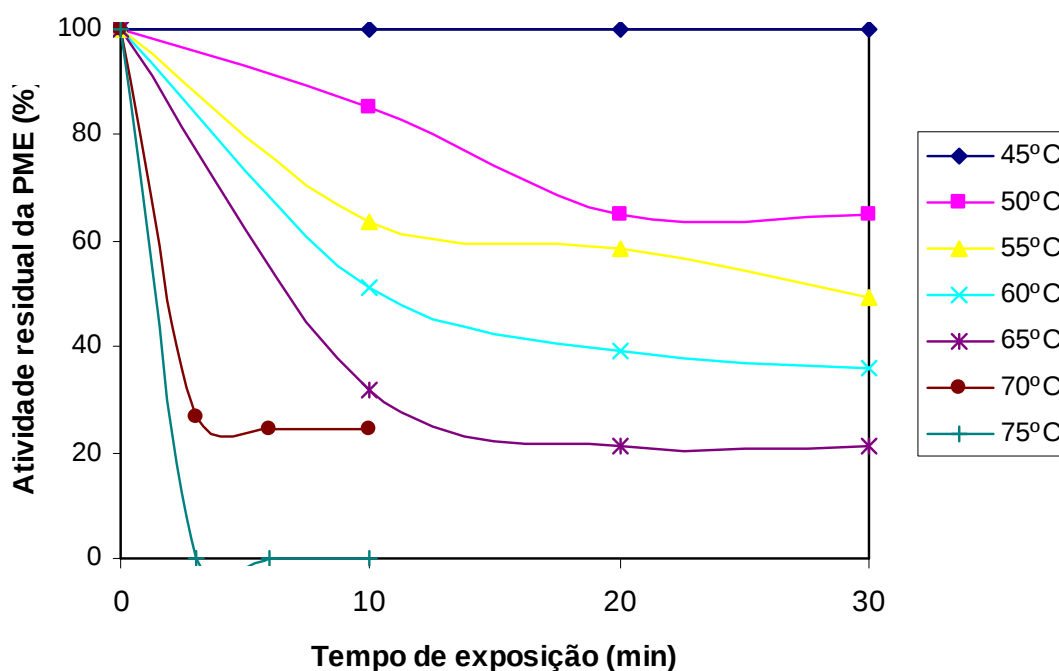


Figura 27 – Atividade residual da PME exógena, Pectinex 100L Plus, no suco de manga em 5 mg.mL⁻¹ de pectina de maçã, pH 4,0, a 45 °C e 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl, ΔpH.

A Tabela 7 mostra as atividades residuais da PME exógena, Pectinex 100L Plus, no suco de manga pelos procedimentos $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ e $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$, em diferentes temperaturas e tempos de exposição. Observa-se que os valores da atividade residual da PME por de $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$ são levemente superiores aos valores obtidos por $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$. No procedimento $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$ o ajuste do pH no sistema é imediato, o que favorece a obtenção das medidas a cada pequeno intervalo de tempo, 10 seg, assim tem-se o pH no tempo real da reação. Já no procedimento da $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ a cada pequena adição de base ocorre uma mudança do pH, o que dificulta associar essa adição ao tempo real da reação sem considerar o período de estabilização do pH. Embora seja quase impossível, dessa forma, manter o pH constante, os valores da atividade residual obtidos por ambos os procedimentos foram bem próximos. Assim, pode-se obter resultados com bom grau de confiabilidade através de medidas potenciométricas, com um equipamento devidamente calibrado, tanto com o procedimento $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ ou $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$.

Tabela 7 – Atividade residual da PME exógena no suco de manga a diferentes temperaturas e tempos de exposição pelos procedimentos da $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ e $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$, expressa em $10^{-3} \times \text{mmol.s}^{-1}$.

Temperatura (°C)								
	45		55		65		75	
Procedimentos: $A = \Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ $B = \Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$	A	B	A	B	A	B	A	B
Tempo (min)								
10	0,652	0,778	0,426	0,496	0,250	0,246	0,0	0,0
20	0,652	0,778	0,420	0,456	0,207	0,166	0,0	0,0
30	0,652	0,778	0,351	0,382	0,208	0,166	0,0	0,0

Os resultados obtidos no estudo com o suco de manga em presença da PME comercial, para o tratamento térmico a 70 °C por 10, 20 e 30 min de exposição, mostram que a atividade residual permaneceu entre 36,8 e 29%. Já no tratamento térmico da PME comercial, nas mesmas condições, a atividade residual manteve-se entre 29,92 – 9,97%. Segundo Seymour et al. (1991), essa diferença entre as atividades residuais da PME com o suco de manga, e sem este, deve-se ao efeito protetor que as unidades de carboidratos oferecem à enzima. Esse efeito protetor depende da composição química do suco em estudo.

6 CONCLUSÕES

A reação da pectina em presença da PME em todos os experimentos mostrou uma cinética de primeira ordem. Observou-se que a PME nas três preparações enzimáticas, Pectinex 100L Plus, Panzym Clears e Panzym Univers, foi mais ativa em pH 4,0 a 4,5. Conclui-se que a enzima nas três pectinases apresenta maior atividade na temperatura de 45 °C. Entre as três amostras estudadas, a Panzym Clears apresentou maior atividade, ou seja, maior concentração de PME.

A partir dos resultados de ambos os procedimentos $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ e $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$ nas amostras de pectinases Pectinex 100L Plus e da Panzym Clears, concluiu-se que a inativação ocorreu na temperatura de 75 °C com no máximo 10 min de exposição. Através do procedimento da variação do pH pelo tempo tem-se a liberação de H^+ no tempo real da reação. Assim, através desse procedimento obtêm-se valores de atividade mais precisos.

A atividade da PME nas três amostras de pectinases, Pectinex 100L Plus, Panzym Clears e Panzym Univers, a 25 °C e pH 4,5, determinada por espectroscopia Uv-Vis com o indicador azul de bromofenol apresentou boa correlação com a atividade determinada pelos procedimentos por potenciometria. Conclui-se que esse indicador pode ser utilizado para determinar a atividade da PME em amostras de pectinases em que o pH ótimo localiza-se na faixa ácida.

A reação da pectina desmetoxilada com a PME, Pectinex 100L Plus, para quantificar o metanol com a acetil acetona, mostrou boa concordância com os dados obtidos nos procedimentos utilizados neste trabalho. A determinação do metanol com este reagente não alterou o pH do sistema, assim pode-se afirmar que somente foi detectado o metanol produzido pela ação da PME.

Já na reação com o reagente Purpald, o valor obtido para a atividade da PME foi $3,602 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$, mais que três vezes o valor obtido pelo reagente acetil acetona $1,073 \times 10^{-4} \text{ mmol.s}^{-1}$. Esse aumento na atividade foi atribuído ao meio fortemente básico ocasionado pela solução do Purpald, pH acima de 12, que anulou o efeito tampão pH 7,15 da solução. O meio altamente básico favoreceu a hidrólise da pectina, produzindo mais metanol; conseqüentemente, houve aumento na atividade da PME. Conclui-se que tal reagente não foi adequado para a quantificação do metanol produzido pela ação da PME na reação.

A inativação completa da PME exógena, Pectinex 100L Plus, no suco de manga ocorreu na temperatura de 75 °C por 20 min de exposição no procedimento $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t_{\text{tempo}}$ e na mesma temperatura durante 10 min de exposição pelo procedimento $\Delta \text{pH} / \Delta t_{\text{tempo}}$.

No tratamento térmico da PME em ausência e presença do suco de manga, constatou-se que a atividade residual da enzima a 70 °C por 10, 20 e 30 min de exposição em presença do suco foi maior que a atividade residual em ausência do suco. Essa diferença entre as atividades residuais da PME deve-se ao efeito protetor que as unidades de carboidratos oferecem à enzima.

Verificou-se que a atividade da PME pode ser monitorada quantificando o metanol e a concentração de ácido liberado na desmetoxilação da pectina, através de estudos espectroscópicos. Também pode ser determinada a partir de estudos potenciométricos, pelos procedimentos da variação de volume de base pelo tempo e pela variação do pH pelo tempo com um sistema de equilíbrio devidamente calibrado. Concluiu-se, através do procedimento da variação do pH pelo tempo, que os resultados apresentaram boa correlação com os demais métodos utilizados e que esse procedimento apresenta vantagens sobre os demais, como medidas precisas e diretas da $[\text{H}^+]$. A reação dispensa uma série de reagentes e materiais de custos relativamente elevados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, J., RODRÍGUEZ, CANET, W., Purification and characterization of four pectinesterase from sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3416-3422, 1996.
- ALKORTA, I., GARBISU, C., LLAMA, M. J., SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- ANTHON, G. E., BARRETT, D. M. Comparison of free colorimetric reagents in the determination of methanol with alcohol oxidase. Application to assay of pectin methylesterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3749-3753, 2004.
- ANTUNES, L.E.C, GONÇALVES, E.D., TREVEVISAN, R. Alterações da atividade da poligalacturonase e pectinametilesterase em amora-preta (*Rubus spp.*) durante o armazenamento. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 12, n.1, p. 63-66, 2006.
- ARBAISAH, S. M., ASBI, B. A., JUNAINAH, A. H., JAMILAH, B. Purification and properties of pectinesterase from soursop (*Anona muricata*) pulp. **Food Chemistry**, v. 59, p. 33-40, 1997.
- ASSIS, S.A., LIMA, D.C., DE FARIA OLIVEIRA, O.M.M. Acerola's pectin methylesterase: studies of heat inactivation. **Food Chemistry**, v. 71, p. 465-467, 2000.
- BAYINDIRH, A., ALPAS, H., BOZOGLU, F., HIZAL, M. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. **Food Control**, v. 17, p. 52-58, 2006.
- BENEN, J.A.E., VAN ALEBEEK, G.J.W.M, VORAGEN, A.G.J. **Handbook of food enzymology**. New York: Basel, 2003.
- BURNS, J.K., PRESSEY, R. Ca²⁺ in cell walls of ripening tomato and peach. **Journal of American for Horticultural Science**, v. 112, p. 783-787, 1987.
- CANET, W., ALVAREZ, M. D., LUNA, P., FERNÁNDEZ, C., TORTOSA, M. E. Blanching effects on chemistry, quality and structure of green beans (cv. *Moncayo*). **European Food Research Technology**, v. 220, p. 421-430, 2005.
- CARBONELL, J. V., CONTRERAS, P., CARBONELL, L., NAVARRO, J. L. Pectin methylesterase activity in juices from mandarins, oranges and hybrids. **European Food Research Technology**, v. 222, p. 83-87, 2006.
- CASTRO, S. M., LOEY, A. V., SARAIVA, J. A., SMOUT C., HENDRICKX, M. Identification of pressure/temperature combinations for optimal pepper (*Capsicum annuum*) pectin methylesterase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p. 831-838, 2006.
- CECI, L., LOZANO, J. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. **Food Chemistry**, v. 61, p. 237-241, 1998.

COLAGRANDE, O., SLIVA, A., FUMI, M. D. Recent Applications of Biotechnology in Wine Production. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 2-18, 1994.

COLLET, L. S. F. C. A., SHIGEOKA, D. S., BADOLATO, G. G., TADINI, C. C. A kinetic study on pectinesterase inactivation during continuous pasteurization of orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 125-129, 2005.

CROAK, S., CORREDIG, M. The role of pectin in orange juice stabilization: effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 961-965, 2006.

DE ASSIS, S. A., FERREIRA, B. S., FERNANDES, P., GUAGLIANONI, D. G., CABRAL, J. M. S., OLIVEIRA, O. M. M. F. Gelatin-immobilized pectinmethylesterase for production of low methoxyl pectin. **Food Chemistry**, v. 86, p. 333-337, 2004.

DE SIO, F., DIPOLLINA, G., VILLARI, G., LOIUDICE, R., LARATTA, B., CASTALDO, D. Thermal resistance of pectin methylesterase in tomato juice. **Food Chemistry**, v. 52, p. 135-138, 1995.

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

DUVETTER, T., LOEY, A. V., SMOUT, C., VERLENT, I., LY-NGUYEN, B., HENDRICKX, M. *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase: study of the inactivation by temperature and pressure and the inhibition by pectin methylesterase inhibitor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 385 – 390, 2005.

FACHIN, D., LOEY, A. M. V., NGUYEN, B. L., VERLENT, I., INDRAWATI, HENDRICKX, M. E. Comparative Study of the Inactivation Kinetics of Pectinmethylesterase in Tomato Juice and Purified Form. **Biotechnology**, v. 18, p. 739-744, 2002.

FAO – FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Production of fruit vegetables share in world. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 01 de novembro de 2008.

FAYYAZ, A., ASBI, B. A., GHAZALI, H. M., CHE MAN, Y.B., JINAP, S. Kinetics of papaya pectinesterase. **Food Chemistry**, v. 53, p. 129-135, 1995a.

FAYYAZ, A., ASBI, B. A., GHAZALI, H. M., CHE MAN, Y.B., JINAP, S. Stability studies of papaya pectinesterase. **Food Chemistry**, v. 53, p. 391-396, 1995b.

FRAEYE, I., DUVETTER, T., VERLENT, I., SILA, D. N., HENDRICKX, M., LOEY, A. V. Comparison of enzymatic de-esterification of strawberry and apple pectin at elevated pressure by fungal pectinmethylesterase. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, p. 93-101, 2007.

FU, J. T., RAO, M.A. The influence of sucrose and sorbitol on gel-sol transition of low-methoxyl pectin + Ca²⁺ gels. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 371-380, 1999.

FU, J. T., RAO, M.A. Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: the effect of sucrose. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 93-100, 2001.

GRANADA, G. L., VENDRUSCOLO, J. L., TREPTOW, R. O. Caracterização química e sensorial de sucos clarificados de amora-preta (*Rubus spp. L.*). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 143-147, 2001.

GRASSIN, C., WEIJDEN, C. V. D., HOEVEN, R. A. M. V. D., DIJCK, P. W. M. V., BOER, W. R. Enzymatic composition of commercial pectinases in use in the fruit juice industry. **Processing Fruit**, maio /junho, p. 130-135, 2005.

HAGERMAN, A. E., AUSTIN, P. J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 440-444, 1986.

HOURET, D., MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides-III: Molecular size of heterogeneous pectin chains. Calibration and application of SEC to pectin analysis. **Carbohydrate Polymer**, v.16, p. 409-432, 1991.

INGALLINERA, B., BARBAGALLO, R. N., SPAGNA, G., PALMERI, R., TODARO, A. Effects of thermal treatments on pectinesterase activity determined in blood oranges juices. **Enzyme and microbial technology**, v. 36, p. 258-263, 2005.

JACOBSEN, N. W., DICKINSON, R. G. Spectrometric assay of aldehydes as 6-mercapto-3-substituted-s-triazolo(4,3-b)-s-tetrazines. **Analytical Chemistry**, v. , v. 46, p. 298-299, 1974.

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

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

KLAVONS, J. A., BENNETT, R. D. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 597-599, 1986.

KLUGE, R. A., NACHTIGAL, J. C., FACHINELLO, J. C., BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Campinas: Rural Ltda, 2002.

KURITA, O., FUJIWARA, T., YAMAZAKI, E. Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. **Carbohydrate polymers**, v. 74, p. 725-730, 2008.

LAATS, M. M., GROSDENIS, F., RECOURT, K., VORAGEN, A. G. J., WICHERS, H. J. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from green beans (*Phaseolus vulgaris L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 572-577, 1997.

LACROIX, N.; FLISS, I.; MAKHLOUF, J. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International**, v. 38, p. 568-576, 2005.

LARATTA, B., LOIUDICE, R., GIOVANE, A., QUAGLIUOLO, L., SERVILLO, L., CASTALDO, D. Thermostability of three pectinesterase isoenzymes in tomato fruit. **Food Chemistry**, v. 52, p. 415-418, 1995.

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

LY-NGUYEN, B., LOEY, A. M. V., FACHIN, D., VERLENT, I., DUVETTER, T., VU, S. T., SMOUT, C., HENDRICKX, M. E. Strawberry pectin methylesterase (PME): Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1447 – 1450, 2002.

MANGOS, T. J., HAAS, M. J. A spectrophotometric assay for the enzymatic demethoxylation of pectins and the determination of pectinesterase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 244, p. 357-366, 1997.

MARTÍNEZ, P. E., FORTUNYR. C. S., BELLOSO, O. M. Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric field or heat treatment. **European Food Research Technology**, v. 222, p. 321-329, 2006.

MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R.J. **The Determination and Use of Stability Constants**. New York: VCH, p. 229, 1992.

MCNEIL, M., DARVILL, A. G., FRY, S. C., ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MUTLU, M., SARTOGLU, K., DEMIR, N., ERCAN, M. T., ACAR, J. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, v. 41, p. 147-150, 1999.

NASH, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. **Biochemical Journal**, v. 55, p.416-412, 1953.

NIKOLIC', M. V., MOJOVIC, L. Hydrolysis of apple pectin by the coordinated activity of pectic enzymes. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1-9, 2007.

OLLÉ, D., BARON, A., LOZANO, Y. F., BRILLOUET, J.M. Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) puree. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2713-2716, 2000.

PLAZA, L., DUVETTER, T., PLANCKEN, I. V., MEERSMAN, F., LOEY, A. V., HENDRICKX, M. Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectinmethylesterase. **Food Chemistry**, v.111, p. 912-920, 2008.

RESENDE, J. M., CHITARRA, M. I. F., MALUF, W. R., CHITARRA, A. B., SAGGIN JÚNIOR, O. J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multiocular. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 206-212, 2004.

RIAH, E., RAMASWAMY, H. S. High-Pressure of Apple Juice: Kinetics of Pectin Methyl Esterase Inactivation. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 908-914, 2003.

REIGNAULT, P., VALETTE-COLLET, O., BOCCARA, M. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p.1-11, 2008.

- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Blücher, 2004.
- REVILLA, I., GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 63, p. 307-312, 1998.
- ROLIN, C. Pectins. In: Whistler, R. L., BeMiller, J. N. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivates**. San Diego: Academic Press, 3rd, p. 257-293, 1993.
- SAMPEDRO, F. RODRIGO, D., HENDRICKX, M. Inactivation kinetics of pectin methyl esterase under combined thermal-high pressure treatment in an orange juice-milk beverage. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 133-139, 2008.
- SARIOĞLU, K., DEMIR, N., ACAR, J., MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. **Journal of Food Engineering**, v. 47, p. 271-274, 2001.
- SCHELLER, H. V., JENSEN, J. K., SORENSEN, S. O., HARHOLT, J., GESHI, N. Biosynthesis of pectin. **Physiologia Plantarum**, v. 129, p. 283-295, 2007.
- SENTADREU, E., CARBONELL, L., CARBONELL, J. V., IZQUIERDO, L., Effects of heat treatment conditions on fresh taste and on pectinmethylesterase activity of chilled mandarin and orange juices. **Food Science and Technology International**, v. 11, p. 217-222, 2005.
- SEYMOUR, T. A., PRESTON, J. F., WICKER, L., LINDSAY, J. A., WEI, C., MARSHALL, M. R. Stability of pectinesterase of Marsh White grapefruit pulp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1075-1079, 1991.
- SILA, D. N., SMOUT, C., SATARA, Y., TRUONG, V., LOEY, A. V., HENDRICKX, M. Combined thermal and high pressure effect on carrot pectinmethylesterase stability and catalytic activity. **Journal of Food Engineering**, v.78, p. 755-764, 2007.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. **Princípios de análises instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 5 ed., 2002.
- TRIBESS, T. B., TADINI, C. C. Inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p.1328-1335, 2006.
- UENOJO, M., PASTORE, G. M. Pectinases: aplicação industrial e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.
- VILARIÑO, C., DEL GIORGIO, J. F., HOURS, R. A., CASCONI, O. Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 26, p. 107-110, 1993.
- VIVAR-VERA, M.A., SALAZAR-MONTOYA, J.A., CALVA-CALVA, G., RAMOS-RAMÍREZ, E.G. Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. **LWT**, v.40, p. 278-284, 2007.
- WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker, 2nd, 1994.

WILINSKA, A., RODRIGUES, A. S. F., BRYJAK, J., POLAKOVIC, M. Thermal inactivation of exogenous pectin methylesterase in apple and cloudberry juices. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 459-465, 2008.

WOOD, P. J., SIDDIQUI, I. R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 39, p. 418-428, 1971.

ZHANG, R., CHENG, L., WANG, L., GUAN, Z. Inactivation Effects of PEF on Horseradish Peroxidase (HRP) and Pectinesterase (PE). **IEE Transactions on Plasma Science**, v. 34, p. 2630-2636, 2006.

ZOCCA, F., LOMOLINO, A. C., SPETTOLI, P., LANTE, A. Detection of pectinmethylesterase activity in presence of methanol during grape pomace storage. **Food Chemistry**, v.102, p. 59-65, 2007.