



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020021387-3 A2



(22) Data do Depósito: 19/10/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 03/05/2022

(54) **Título:** DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL

(51) **Int. Cl.:** G01N 11/16; C08B 37/00.

(52) **CPC:** G01N 11/162; C08B 37/0006; C08B 37/0045; C08B 37/0048; G01N 11/16.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) **Inventor(es):** GUSTAVO ALEXANDRE FUCHS; NADIA KRIEGER; DAVID ALEXANDER MITCHELL; JOANA LÉA MEIRA SILVEIRA; SHAYLA FERNANDA BARBIERI.

(57) **Resumo:** DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL. A presente patente de invenção (PI) refere-se à elaboração de um método para quantificação de atividade pectinolítica em dispersões de pectina cítrica, principalmente extraída do bagaço de laranja, mas que pode ser aplicado para pectinas cítricas em geral. Para esta finalidade, definiu-se um método para o monitoramento da redução da viscosidade complexa nas dispersões durante a hidrólise da pectina, em tempo real, pela ação de pectinases, utilizando um reômetro rotacional. A queda da viscosidade complexa foi equiparada com a liberação de ácido D-galacturônico, principal monômero da estrutura da pectina e produto da hidrólise por pectinases. A utilização da reologia como ferramenta para monitorar a atividade enzimática em tempo real pode trazer benefícios para a indústria por possibilitar o monitoramento da atividade enzimática em tempo real e apresentar o resultado imediato da análise.



## **DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL**

### **Fundamentos da invenção e descrição do estado da técnica**

{001}. A pectina é definida como um polissacarídeo aniônico formado majoritariamente por monômeros de ácido D-galacturônico ligados por ligação covalente  $\alpha$ -1,4, os quais podem estar parcialmente esterificados por grupos metil éster [1]. A pectina é um polímero natural biodegradável e biocompatível que pode ser aplicado nas áreas biomédica, farmacêutica, cosmética, sendo principalmente empregado na indústria alimentícia onde é utilizado como agente geleificante, espessante, texturizante e emulsificante [2] [3] [4]. Além disso, os compostos presentes em sua estrutura, quando isolados, se apresentam como produtos de alto valor agregado, por exemplo, o ácido D-galacturônico.

{002}. O ácido D-galacturônico (D-GalA) representa cerca de 70% dos monômeros na pectina laranja [5] e tem sido utilizado como acidificante e tensoativo, mas pode ser convertido em outros componentes de maior valor agregado, tais como o ácido mícico e o ácido L-galactônico.

{003}. O ácido L-galactônico pode ser convertido em ácido ascórbico (Vitamina C) e em ácido mícico por processos fermentativos [6], sendo este último um importante intermediário na síntese de bioplásticos devido à sua conversão em ácido furan-2,5-dicarboxílico (FDCA) [7].

{004}. A hidrólise da pectina para produzir D-GalA pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos. Na hidrólise química, são utilizados ácidos, como os clorídrico e sulfúrico, em altas temperaturas (80 a 100 °C) e baixos valores de pH (1,0 a 3,0) [8]. Contudo,

nestas condições, D-GalA pode ser degradado em lactonas e furfuranos, perdendo o seu valor econômico [9] [10].

{005}. A hidrólise enzimática utilizando pectinases (EC 3.2.1.15) apresenta vantagens em relação à hidrólise ácida, dado que as condições de reação são mais brandas, geralmente em temperatura de 20 a 40 °C e valores de pH 4,0 a 6,0. Nestas condições, a degradação do D-GalA é evitada [11].

{006}. A eficiência da hidrólise enzimática pode ser diretamente influenciada por vários fatores, tais como a estrutura química da pectina, o grau de metilesterificação da pectina, a presença de contaminantes provenientes do processo de extração, tais como lactonas e furfuranos, e a concentração de sólidos em solução durante a hidrólise [12].

{007}. As características da pectina dependem da sua fonte vegetal e do método de extração utilizado para sua obtenção. Na indústria, a pectina de laranja é extraída da região do albedo (mesocarpo) da laranja [13]. O processo industrial para a obtenção da pectina consiste na extração aquosa (65 a 100 °C), seguida de extração ácida, utilizando ácido oxálico ou ácido nítrico a altas temperaturas (80 a 100 °C) e baixos valores de pH (2,0 a 4,0). No entanto, as condições aplicadas neste processo apresentam desvantagens como a produção de lactonas e furfuranos, os quais podem inibir a atividade enzimática posterior [14] [15].

{008}. Para evitar estes problemas, o ácido cítrico tem sido utilizado para substituir os ácidos oxálico e nítrico na extração de pectina. O ácido cítrico pode ser considerado um solvente ecológico, sendo um dos ácidos orgânicos encontrados em limões e laranjas e classificado como ácido fraco, de alta solubilidade em água e biodegradável [16] [17].

{009}. Além de reduzir o impacto ambiental, a utilização do ácido cítrico no processo de extração da pectina é mais adequada para a

indústria alimentícia, uma vez que a despolimerização e degradação da pectina são menores visto que os ácidos orgânicos possuem capacidade de hidrólise inferior em relação aos ácidos minerais por serem ácidos fracos [14]–[16] [18] [19].

{010}. A cinética da hidrólise enzimática da pectina, para determinação da atividade enzimática, é geralmente seguida por métodos analíticos químicos, tais como métodos colorimétricos [20] e cromatográficos (cromatografia líquida de alta performance, HPLC), onde se determina o produto de hidrólise originado, por exemplo o D-GalA. Contudo, estes métodos são frequentemente caros, podem sofrer interferências de outros compostos e não quantificam a atividade durante a reação, em tempo real.

{011}. A determinação de atividade de pectinases também pode ser realizada através da queda da viscosidade de dispersões de pectina, com base na modificação da viscosidade aparente ou pela viscosidade cinemática. A viscosidade aparente, que é determinada em viscosímetro rotacional, é definida como o escoamento medido em um determinado ponto sob cisalhamento constante [24] [25].

{012}. Os viscosímetros rotacionais podem ser utilizados para determinação da atividade de pectinases com base na redução da viscosidade aparente, porém apresentam problemas com altas concentrações de pectina, onde o valor máximo utilizado é de 4,0% (m/v), com base na literatura analisada [23] [24] [25]. Além disso, para determinação da viscosidade aparente, as análises podem levar de 3 min até 120 min.

{013}. A viscosidade cinemática, que é viscosidade medida através do escoamento decorrente da força da gravidade, determinada através da utilização de viscosímetros capilares também pode ser uma ferramenta para determinar a atividade de pectinases, através da

redução da viscosidade relativa. Contudo, esse método é recomendado apenas para baixas concentrações de pectina, variando de 0,1% até 2,0% (m/v). Este método precisa de concentrações reduzidas pois, devido à alta viscosidade das dispersões de pectina em altas concentrações, pode causar o entupimento do capilar. Porém, a baixa concentração de pectina pode levar a erros na determinação da atividade, visto que não irá representar o efeito real da atividade em altas concentrações. Para estas análises, há necessidade da utilização de variados volumes de dispersão de pectina e tempos de reação, que podem variar, respectivamente, de 1 mL até 18 mL, com duração de 5 min até 15 min [26][27].

{014}. Ressalta-se que na própria literatura analisada, os autores citam a dificuldade de comparar resultados obtidos através da análise viscosimétrica, visto que cada autor estabelece seus próprios parâmetros, como temperatura, concentração, tempo de reação, além de definir diferentes maneiras para se determinar a atividade enzimática [24][26].

{015}. Neste pedido de invenção está sendo proposto um método mais rápido e direto de determinação de atividade de pectinases, que utiliza até 5,0% (m/v) de dispersão de pectina em volume de 3 mL. Este é um método reológico, que utiliza o reômetro HAAKE Mars II (Thermo Electron GmbH, Alemanha), para determinar a viscosidade complexa da dispersão de pectina.

{016}. A viscosidade complexa descreve a resistência total ao cisalhamento dinâmico, que pode ser expresso por dois componentes: módulos  $G'$  (módulo de armazenamento ou elástico) e  $G''$  (módulo viscoso ou de perda), em função da frequência utilizada (Equação 1) [24] [25].

**Equação 1:** Cálculo da viscosidade complexa com base nos módulos  $G'$ ,  $G''$  e na frequência angular [26] [27]:

$$|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

$$|n^*| = G^*/\omega$$

onde  $|G^*|$  = módulo complexo;  $G'$  = módulo viscoso;  $G''$  = módulo elástico;  $|n^*|$  = viscosidade complexa;  $\omega$  = frequência angular.

{017}. A viscosidade complexa, obtida a partir da reologia em sistema oscilatório dinâmico pode ser uma nova ferramenta útil para acompanhar a hidrólise da pectina, uma vez que é possível visualizar a queda de viscosidade complexa em curtos intervalos de tempo (< 2 min), além de permitir a análise de dispersões de pectina em concentração maior (5,0%, m/v) em relação à literatura disponível analisada para este pedido de patente, o que permite maior confiabilidade dos resultados.

{018}. Até o momento, pela busca de anterioridade realizada, inexistem trabalhos relatando o acompanhamento da queda da viscosidade complexa em reômetro rotacional durante a hidrólise enzimática de dispersões de pectina cítrica em diferentes concentrações utilizando pectinases, para determinação da atividade pectinolítica, que é o objetivo da presente invenção.

{019}. Em relação ao estado da técnica, existem alguns trabalhos com algumas similaridades ao presente pedido, os quais serão apresentados abaixo:

{020}. O trabalho de 1999, intitulado como "*Use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity*" [26] descreve a elaboração de uma metodologia viscosimétrica para quantificar a atividade enzimática e determinar os parâmetros cinéticos de um extrato enzimático comercial (Pectinex Ultra SP-L) em dispersão de pectina. Contudo, neste trabalho é utilizado um

viscosímetro para determinar a viscosidade aparente. Deste modo, este trabalho também não apresenta similaridade com este pedido de patente, visto que na presente solicitação a viscosidade é determinada através da utilização de um reômetro rotacional, no qual o resultado principal é a viscosidade complexa.

{021}. O trabalho de 2002, intitulado como "*Viscometric Method for Assaying of Total Endodepolymerase Activity of Pectinases*" [25] descreve um método viscosimétrico para identificação de atividade de endopoligalacturonases em pectina de laranja ou maçã (0,5% em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0). Contudo, foi utilizado um viscosímetro capilar termostaticado para identificar a queda da viscosidade relativa da dispersão. Este documento não apresenta coincidência, visto que o presente pedido de patente utiliza um reômetro rotacional para analisar a viscosidade complexa, a qual é determinada pelos módulos  $G'$  e  $G''$  e uma frequência angular específica.

{022}. O trabalho de 2002, intitulado como "*Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin*" [30], descreve um método para avaliar as propriedades de géis de leite obtidos através da ação de quimosina e coagulantes de plantas utilizando um reômetro rotacional. Contudo, este trabalho não avalia o aumento da viscosidade complexa, mas sim o comportamento dos parâmetros  $G'$  e  $G''$ . Além disso, o principal foco do trabalho é relacionado à coagulação da caseína, uma proteína presente no leite. Deste modo, este trabalho não apresenta coincidência com este pedido de patente, pois aqui o reômetro rotacional é utilizado para acompanhar a redução da viscosidade complexa em dispersões de pectina cítrica e determinar a atividade de pectinases.

{023}. O trabalho de 2009, intitulado como "*Selection of a method for determination of activity of pectinolytic enzymes in berry fruit materials*" [24] descreve diferentes métodos para determinar atividade

enzimática de produtos de frutas silvestres em diferentes concentrações, entres eles o método colorimétrico e o de redução da viscosidade. Contudo, para a determinação da atividade enzimática, foi utilizado um viscosímetro para determinar a redução da viscosidade aparente. Este documento não apresenta coincidência, visto no presente pedido de patente utiliza-se um reômetro rotacional para determinar a viscosidade complexa de dispersões de pectina cítrica para a determinação de atividade de pectinases.

{024}. No trabalho de 2017, intitulado como "*Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace*" [27] utiliza-se um método viscosimétrico para determinar a atividade pectinolítica de endo-pectinases produzidas a partir de fermentação do bagaço de laranja residual. Contudo, este trabalho utiliza um viscosímetro capilar para identificar a atividade enzimática a partir da viscosidade relativa. Deste modo, este documento não apresenta coincidência, visto que este pedido de patente utiliza um reômetro rotacional para determinar a queda da viscosidade complexa de pectina extraída do bagaço de laranja úmido e padrão analítico utilizando um extrato enzimático comercial rico em poligalacturonases.

{025}. A utilização da reologia como ferramenta para monitorar a atividade enzimática em tempo real pode trazer benefícios, principalmente para a indústria de cítricos, por possibilitar a análise de dispersões de pectina com concentrações relativamente mais altas, permitir o monitoramento durante a reação de hidrólise (em tempo real) e apresentar o resultado imediato da análise. A inovação está na elaboração de uma metodologia para determinação de atividade pectinolítica através da redução da viscosidade complexa obtida através de análise reológica de maneira rápida e direta, utilizando baixo volume de amostra.

### **Descrição da abordagem do problema técnico**

{026}. Com base na ação das pectinases sobre a pectina, surgiu a ideia proposta no presente pedido de patente de invenção: “DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL”. A inovação está no desenvolvimento de um método eficiente que possibilite a determinação da atividade enzimática das pectinases em dispersões de pectina em concentração de até 5,0% (m/v), mas não limitadas a esta concentração, utilizando um baixo volume de amostra (3 mL), em tempo real e de maneira rápida (< 2 minutos).

### **Descrição detalhada da invenção**

{027}. A presente invenção descreve uma metodologia para determinar a atividade enzimática de pectinases com base na redução da viscosidade complexa em dispersões de pectina, compreendida nas seguintes etapas: **1)** Extração da pectina; **2)** Determinação da atividade da enzima por método clássico, **3)** Solubilização da pectina; **4)** Solubilização da enzima; **5)** Determinação dos parâmetros da análise reológica; **6)** Análise da queda da viscosidade complexa; **7)** Redução da viscosidade complexa devido à hidrólise enzimática; **8)** Liberação de D-GalA durante a hidrólise enzimática; **9)** Cálculo da atividade enzimática a partir da geração de D-GalA; **10)** Cálculos da atividade enzimática a partir da redução da viscosidade complexa.

{028}. Com relação à etapa **1)**, extração da pectina, a extração com ácido cítrico foi realizada para extrair pectina do bagaço de laranja úmido. O bagaço de laranja úmido (200 g) foi submetido a tratamento com 99% de etanol (1:9) sob refluxo durante 30 min a 80 °C, fornecendo o extrato etílico e os resíduos insolúveis em álcool (AIR). Os extratos ácidos foram extraídos do AIR com 5,0% (m/v) de ácido cítrico (1:12), pH 2,0 durante 2 h a 80 °C. Os extratos ácidos foram obtidos por centrifugação (5.000 rpm; 20 min a 10 °C), dialisados em água ultra pura durante 72 h

(6-8 kDa), e depois tratados com 99% de etanol (3:1, v/v) para precipitar a pectina. O precipitado foi liofilizado durante 24 h a - 45 °C e 0,1 mbar.

{029}. Finalizando a etapa **1**), as amostras de pectina obtida do bagaço de laranja úmido e do padrão analítico de pectina cítrica (Sigma-Aldrich) foram caracterizadas utilizando-se as técnicas de cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC) para avaliar a homogeneidade e distribuição de massa molar; ressonância magnética nuclear (NMR) para caracterização da estrutura química e determinação do grau de metil esterificação; a cromatografia líquido gasosa (GLC) e análise colorimétrica através do método de Blumenkrantz & Asboe-Hansen [31] para dosagem dos monossacarídeos neutros e ácidos urônicos, respectivamente. De acordo com a dosagem colorimétrica, a quantidade de D-GalA presente na pectina extraída do bagaço de laranja úmido e da pectina do padrão analítico foram de 69% e 79% (m/m), respectivamente.

{030}. Em relação à etapa **2**), determinação da atividade da enzima por método clássico, no processo de hidrólise enzimática das amostras de pectina foi utilizado o extrato de pectinase comercial Pectinex Ultra Clear (Novozymes Latin America Ltda, Araucária, PR), rico em poligalacturonases. Este extrato apresentou uma atividade de 10.768 U mL<sup>-1</sup>, conforme determinado pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [20], utilizando a pectina cítrica comercial da Sigma-Aldrich como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida a liberação de 1 µmol de D-GalA por minuto nas condições do ensaio.

{031}. Ainda na etapa **2**), para avaliar a atividade do extrato de pectinase comercial pelo método clássico, a liberação de carboidratos redutores da hidrólise da pectina cítrica foi determinada com o método colorimétrico DNS. Foi utilizado um reator de vidro revestido com capacidade máxima de 50 mL, ligado a um banho-maria a 32 °C, com circulação de água através de tubos de silicone.

{032}. Finalizando a etapa **2)**, no reator de vidro, foram adicionados 20 mL de dispersão do padrão analítico de pectina cítrica (Sigma-Aldrich) a 1,0% (m/v) em tampão 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5 de acetato de sódio. Após estabilização a 30 °C, foi adicionado 1 mL de extrato enzimático diluído (1:1000) ao reator. Foram coletadas alíquotas de 0,5 mL a cada 30 s, durante a reação por 5 min. Cada alíquota foi colocada em um tubo de ensaio de 10 mL, em banho de gelo. Os tubos receberam 0,5 mL de DNS e foram depois colocados em banho de ebulição durante 5 min. Depois disso, foram adicionados 4 mL de água destilada refrigerada. Finalmente, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de ácido D-GalA nas amostras foi determinada por uma curva analítica, usando como padrão o ácido D-GalA puro.

{033}. Em relação à etapa **3)**, solubilização da pectina, as amostras de pectina obtidas do bagaço de laranja úmido e do padrão analítico (Sigma-Aldrich) foram diluídas em tampão acetato de sódio, 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5, visto que este tampão propicia melhor atividade para as pectinases. As amostras de pectina foram diluídas na concentração de 5% (m/v).

{034}. Em relação à etapa **4)**, solubilização da enzima, para realização dos experimentos foi utilizado o extrato comercial de pectinase citado em {030}, diluído em tampão 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5 de acetato de sódio. A enzima foi diluída na razão de 1:1000 para os testes em concentração de 5,0% (m/v) de pectina.

{035}. Em relação à etapa **5)**, determinação dos parâmetros da análise reológica, foram selecionados os parâmetros para as análises em sistema oscilatório dinâmico (tensão e frequência oscilatórias fixadas em 0,1 Pa e 1,0 Hz, respectivamente) para monitorar a variação da viscosidade complexa durante a hidrólise enzimática das amostras de pectina. Esta análise reológica foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Beux [32] e Esteves *et al.* [30], com

modificações. Os experimentos foram realizados com concentração de pectina de 5,0% (m/v) das amostras de pectina extraída do bagaço úmido de laranja e padrão analítico de pectina cítrica (Sigma-Aldrich).

{036}. Em relação à etapa **6)**, análise da queda da viscosidade complexa, as amostras foram solubilizadas e analisadas em tampão de acetato, pH 4,5, 0,2 mol L<sup>-1</sup> a 30 °C, condições ótimas para a atividade da pectinase. Depois, 150,0 µL do extrato enzimático, previamente diluído conforme {034}, foi adicionado para obter a proporção 1:1000 em 5,0% (m/v) de pectina para 3,0 mL de dispersão, que foi misturada completamente durante 10 s e depois imediatamente transferida para a placa base no reômetro rotacional. Para cada amostra, foram realizadas varreduras temporais com 900 medições do módulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) e viscosidade complexa ( $|\eta^*|$ ), pelo período máximo de 15 min a uma frequência fixa de 1,0 Hz a 30 °C. Utilizou-se o padrão analítico de pectina cítrica (Sigma-Aldrich), nas mesmas condições, para comparação.

{037}. Finalizando a etapa **6)**, os valores dos módulos elástico e viscoso e da viscosidade complexa foram determinados diretamente pelo software RheoWin Data Manager (Versão 4.86.0002, HAAKE). Os experimentos foram realizados em duplicata com média e desvio padrão avaliados pelo software estatístico Graphpad Prism 5.

{038}. Em relação à etapa **7)**, redução da viscosidade complexa devido à hidrólise enzimática, a viscosidade complexa de cada amostra na concentração de 5,0% (m/v) alcançou a metade do valor inicial em diferentes tempos. A amostra de pectina extraída do bagaço úmido da laranja alcançou o valor de 30 P em 10 segundos de reação, enquanto que a amostra da pectina analítica alcançou o valor de 6 P em 50 segundos de reação (Tabela 1).

{039}. Continuando a etapa **7)**, ressalta-se que a diferença entre a viscosidade complexa inicial entre as dispersões de pectina do bagaço de laranja úmido e do padrão analítico se deve à quantidade de ramificações que cada amostra possui, apesar de ter sido utilizada a mesma concentração de 5,0%(m/v) de pectina em ambas.

{040}. Finalizando a etapa **7)**, redução da viscosidade complexa devido à hidrólise enzimática, nas dispersões com concentração de 5,0% (m/v), durante os 100 segundos iniciais da hidrólise enzimática das amostras de pectina, verificou-se que a viscosidade complexa da pectina extraída do bagaço úmido da laranja sofreu uma queda de aproximadamente 91%. Para o padrão analítico de pectina, houve queda de 75% na viscosidade complexa (Tabela 1) em relação à amostra controle sem a adição do extrato enzimático. Após 100 segundos de reação, os valores de viscosidade complexa de ambas as amostras se mantiveram estáveis até o término da análise, sugerindo que o substrato (cadeia de homogalacturonana) foi hidrolisado pelo extrato de pectinase durante este período de análise.

**Tabela 1:** Viscosidade complexa ( $|\eta^*|$ ), expressa em P (Poise), de dispersões de pectina extraída do bagaço de laranja úmido (WOP) e pectina cítrica do padrão analítico (SP) submetidos a hidrólise com pectinase

Amostr a	Concentração (m/v)	Tempo de reação (s)			
		0	10	50	100
WOP	5,0%	59 P	30 P	-	5 P
SP		12 P	-	6 P	3 P

{041}. Em relação à etapa **8)**, liberação de D-GalA durante a hidrólise enzimática, para relacionar a queda da viscosidade complexa com a liberação de D-GalA, as amostras também foram analisadas em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência).

{042}. Ainda na etapa **8)**, as análises dos hidrolisados no HPLC após 100 segundos de reação (tempo na qual a viscosidade complexa já estava estabilizada) mostraram um teor de 0,33 mg mg<sup>-1</sup> (mg de D-GalA/mg de pectina) para a amostra de pectina extraída do bagaço úmido de laranja na concentração de 5,0% (m/v). Já em relação ao padrão analítico, os teores de D-GalA foram de 0,45 mg mg<sup>-1</sup> na concentração de 5,0% (m/v). Ressalta-se a inexistência de D-GalA livre nas dispersões de pectina antes da hidrólise enzimática.

{043}. Finalizando a etapa **8)**, considerando o teor de D-GalA apresentado em {029} e o resultados encontrados no HPLC apresentados em {042}, os rendimentos das reações de hidrólise, na concentração de 5,0% (m/v) após 100 segundos de reação, foram respectivamente de 48% para a pectina extraída do bagaço de laranja úmido e 57% para a pectina do padrão analítico.

{044}. Em relação na etapa **9)**, atividade enzimática a partir da geração de D-GalA, usualmente considera-se que uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de substrato por minuto sob condições padrão de temperatura, pH e demais variáveis. Contudo, muitas enzimas utilizadas na indústria são impuras, dificultando a quantificação de proteína ativa responsável pela transformação do substrato. Deste modo, a concentração destas enzimas comerciais é determinada em unidades por mL de extrato enzimático. Assim, nota-se que as unidades de atividade enzimática são definidas de diversas maneiras para enzimas diferentes e podem ter diferentes definições para a mesma enzima em condições reacionais e contextos diferentes [26].

{045}. Continuando na etapa **9)**, considerando a quantidade de D-GalA gerada e identificada por HPLC, formulou-se uma forma de interpretação da unidade de atividade enzimática U, apresentada abaixo:

{046}. Ainda na etapa **9)**, a atividade enzimática foi calculada com base nos resultados apresentados em {042} (Equação 2). Para a amostra de pectina extraída do bagaço úmido da laranja, para a concentração de 5,0% (m/v), a atividade determinada foi de 34.426 U mL<sup>-1</sup>. Para o padrão analítico de pectina cítrica, na concentração de 5,0% (m/v), a atividade determinada foi de 46.686 U mL<sup>-1</sup>. Ressalta-se que uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a liberação de 1 μmol de D-GalA por minuto nas condições do ensaio e dividido pelo volume de extrato enzimático utilizado.

**Equação 2:** Cálculo de atividade enzimática, considerando as concentrações de D-GalA quantificado pelo HPLC:

$$U_{HPLC} = \frac{P_{GalA}}{t}$$

$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{U_{HPLC}}{V_E}$$

Onde:

$U_{HPLC}$  = Unidade de atividade enzimática baseada na determinação de D-GalA por HPLC (μmol/min)

$P_{GalA}$  = Ácido galacturônico gerado (μmol)

$t$  = Tempo de reação (min)

$V_E$  = Volume de extrato enzimático utilizado (mL)

{047}. Finalizando a etapa **9)**, observando a produção de D-GalA, conseguiu-se associar a ação da enzima em hidrolisar a estrutura da pectina e liberar D-GalA, e deste modo concluiu-se que foi possível observar a hidrólise enzimática da pectina dessa maneira, em tempo real.

{048}. Em relação a etapa **10)**, determinação da atividade enzimática a partir da redução da viscosidade complexa, levando em consideração a queda da viscosidade complexa identificada pelo reômetro rotacional, formulou-se uma interpretação da unidade de atividade enzimática U, semelhante à apresentada em [30], demonstrada em {049}.

{049}. Continuando a etapa **10)**, considerando a redução da viscosidade complexa (Tabela 1), estipulou-se que uma unidade de atividade (U) é o volume de extrato necessário para reduzir a viscosidade complexa inicial pela metade, por minuto de reação na temperatura de 30 °C (Equação 3). A atividade enzimática da amostra de pectina extraída do bagaço de laranja, na concentração de 5,0% (m/v), foi de 32.000 U mL<sup>-1</sup>. No padrão analítico de pectina cítrica, na concentração de 5,0% (m/v) também foi determinado o valor de 32.000 U mL<sup>-1</sup>.

**Equação 3:** Cálculo de atividade enzimática, considerando a redução da viscosidade complexa inicial:

$$U_{n^*} = \frac{|n^*|_0}{2} \times \frac{1}{t_{n^*1/2}}$$

$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{U_{n^*}}{V_E}$$

Onde:

$U_{n^*}$  = Unidade de atividade enzimática baseada na viscosidade complexa (P/min)

$|n^*|_0$  = Viscosidade complexa inicial da dispersão (P)

$t_{n^*1/2}$  = Tempo de reação até a metade da viscosidade inicial (min)

$V_E$  = Volume de extrato enzimático utilizado (mL)

{050}. Finalizando a etapa **10)**, conseguiu-se associar a ação da enzima em hidrolisar a estrutura da pectina e diminuir a viscosidade complexa da dispersão, e deste modo concluiu-se que foi possível observar a hidrólise enzimática da pectina através deste método.

{051}. Diante dos resultados obtidos descritos nos parágrafos anteriores, pode-se considerar que o método para medir a atividade de pectinases em dispersões de pectina através de análise em reômetro rotacional, descrito nesta patente, é vantajoso no que diz respeito às condições operacionais, citadas em {010, 012-015 e 017}, e à eficiência em se monitorar a atividade da enzima pela queda de viscosidade

complexa {038-040}, que se correlaciona bem com a produção de D-GalA {042}, um produto de valor agregado e de interesse industrial. Além disso, permitiu rapidamente o cálculo para atividade enzimática {046 e 049} com base na redução da viscosidade complexa inicial {038}, utilizando um volume de 3 mL de dispersão de pectina em uma concentração de 5,0% (m/v) em menos de 2 minutos de reação.

## REFERÊNCIAS

- [1] A. G. J. Voragen, G. J. Coenen, R. P. Verhoef, and H. A. Schols, "Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls," *Struct. Chem.*, vol. 20, no. 2, pp. 263–275, 2009.
- [2] S. Y. Chan, W. S. Choo, D. J. Young, and X. J. Loh, "Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology," *Carbohydr. Polym.*, vol. 161, pp. 118–139, 2017.
- [3] F. Naqash, F. A. Masoodi, S. A. Rather, S. M. Wani, and A. Gani, "Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 168, pp. 227–239, 2017.
- [4] A. Noreen *et al.*, "Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 101, pp. 254–272, 2017.
- [5] B. M. Yapo, "Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model," *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 2, pp. 373–385, 2011.
- [6] J. Kuivanen *et al.*, "Conversion of orange peel to L-galactonic acid in a consolidated process using engineered strains of *aspergillus niger*," *AMB Express*, vol. 4, no. 1, pp. 1–8, 2014.
- [7] P. Richard and S. Hilditch, "D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, no. 4, pp. 597–604, 2009.
- [8] P. Ruano *et al.*, "Extraction and Characterization of Pectins From Peels of Criolla Oranges (*Citrus sinensis*): Experimental Reviews," *IntechOpen*, pp. 1–44, 2019.
- [9] S. A. Fazio, D. J. Uhlinger, J. H. Parker, and D. C. White, "Estimations of uronic acids as quantitative measures of extracellular and cell wall polysaccharide polymers from environmental samples," *Appl.*

- Environ. Microbiol.*, vol. 43, no. 5, pp. 1151–1159, 1982.
- [10] G. N. Blake, J.D.; Richards, "Problems of Lactonisation in the analysis of uronic acids," *Carbohydr. Res.*, vol. 28, pp. 275–281, 1968.
- [11] D. Stock *et al.*, "Conversion of citric pectin into D-galacturonic acid with high substrate loading using a fermented solid with pectinolytic activity," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 11, pp. 214–219, 2017.
- [12] A. Minjares-Carranco, B. A. Trejo-Aguilar, G. Aguilar, and G. Viniegra-González, "Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 21, no. 1, pp. 25–31, 1997.
- [13] M. S. R. De Oliveira and A. Willms, "Extração Diferenciada De Pectina De Frutas Cítricas," *XXV Congr. Bras. Ciência e Tecnol. Aliment.*, pp. 1–6, 2016.
- [14] S. V. Jensen, S. O. Sorensen, and C. Rolin, "PROCESS FOR EXTRACTION OF PECTIN," Patent Number: WO/2012/167963, 2012.
- [15] H. C. Buchholt, "PROCESS FOR EXTRACTION OF PECTIN," Patent Number: WO/2016/202986, 2016.
- [16] F. H. Verhoff, "Citric acid," *Miles Lab.*, pp. 1–6, 2005.
- [17] E. R. Pinheiro *et al.*, "Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, pp. 5561–5566, 2008.
- [18] A. M. Stephen, G. O. Phillips, and P. A. Williams, *Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition*. 2016.
- [19] P. Henrique *et al.*, "Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 88, pp. 373–379, 2016.
- [20] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.
- [21] G. Schramm, *Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos*, ARTLIBER. São Paulo, 2006.
- [22] R. Brummer, *Rheology essentials of cosmetic and food emulsions*. Berlin, 2006.
- [23] M. K. Patidar, S. Nighojkar, A. Kumar, and A. Nighojkar, "Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review," *3 Biotech*, vol. 8, no. 199, pp. 1–24,

2018.

- [24] A. Jakó b, J. Bryjak, and M. Polakovič, "Selection of a method for determination of activity of pectinolytic enzymes in berry fruit materials," *Chem. Pap.*, vol. 63, no. 6, pp. 677–682, 2009.
- [25] A. V. Gusakov, A. V. Markov, S. G. Grishutin, M. V. Semenova, E. G. Kondratyeva, and A. P. Sinitsyn, "Viscometric method for assaying of total endodepolymerase activity of pectinases," *Biochem.*, vol. 67, no. 6, pp. 676–682, 2002.
- [26] M. Mutlu, K. Sar, N. Demir, M. T. Ercan, and J. Acar, "Use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity," *J. Food Eng.*, vol. 41, no. 3, pp. 147–150, 1999.
- [27] M. Mahmoodi, G. D. Najafpour, and M. Mohammadi, "Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 12, pp. 4123–4128, 2017.
- [28] J. F. Steffe, *Rheological methods in food process engineering*, 2<sup>o</sup> Edition. East Lansing, 1992.
- [29] R. G. Larson, *The structure and rheology of complex fluids*. New York, 1999.
- [30] C. L. C. Esteves, J. A. Lucey, and E. M. V. Pires, "Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin," *Int. Dairy J.*, vol. 12, pp. 427–434, 2002.
- [31] N. Blumenkrantz and G. Asboe-Hansen, "New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids," *Anal. Biochem.*, vol. 54, pp. 484–489, 1973.
- [32] S. Beux, "Avaliação das Propriedades de Coagulação de Leite Bovino In Natura por Parâmetros Latodinamográficos e Reológicos," *Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná*, 2017.

## REIVINDICAÇÕES

**1. MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA, ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL, DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PECTINA CÍTRICA REALIZADA POR EXTRATO ENZIMÁTICO RICO EM PECTINASES**, caracterizada pela elaboração de uma metodologia que possibilita a determinação da atividade pectinolítica em tempo real, onde uma unidade de atividade (U) é o volume de extrato necessário para reduzir a viscosidade complexa inicial pela metade, por minuto de reação na temperatura de 30 °C. A análise da redução da viscosidade complexa compreende as dispersões de pectina extraída de laranja e da pectina comercial, ambas de origem cítricas e nas concentrações de 5% (m/v).

**2. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL, A PARTIR DA HIDRÓLISE DE PECTINA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela redução significativa da viscosidade complexa nas dispersões da pectina extraída de laranja e da pectina comercial, ambas de origem cítrica. Como a pectina de qualquer fonte é responsável pela viscosidade das dispersões, a metodologia aqui reivindicada pode compreender outras pectinas de distintas fontes.

**3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL EM SISTEMA OCILATÓRIO DINÂMICO**, de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizada pela utilização de parâmetros reológicos obtidos em sistema oscilatório dinâmico de reômetro rotacional (tensão e frequência oscilatórias fixadas em 0,1 Pa e 1,0 Hz, respectivamente), para identificação da redução da viscosidade complexa durante a hidrólise enzimática em tempo real.

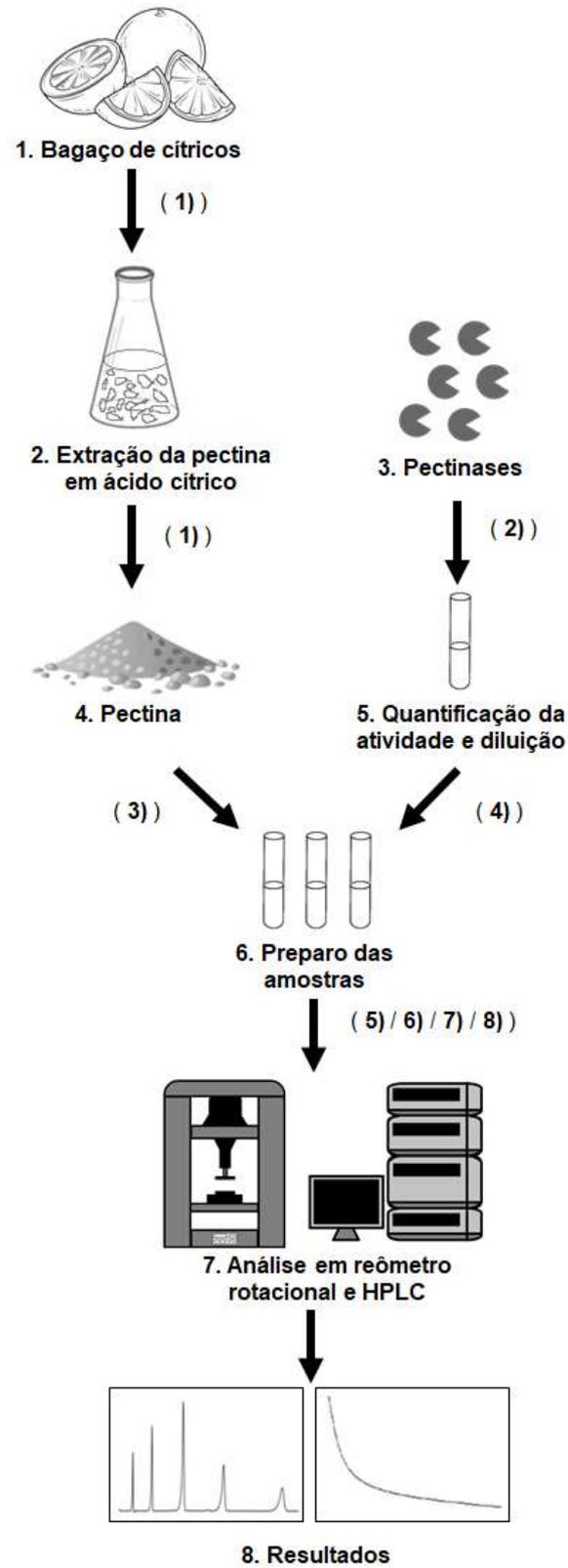
**4. METODOLOGIA RÁPIDA E DIRETA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL**, de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizada pela utilização de dispersões de pectina extraída de laranja e de pectina comercial, ambas de origem cítrica na concentração ideal de 5% (m/v), mas não limitada a esta concentração, nos volumes de 3 mL e a redução da viscosidade complexa em menos de 100 segundos, em tempo real.

**5. CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE PECTINOLÍTICA OBTIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL E A PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PECTINA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada pela correlação da queda da viscosidade complexa com a produção de ácido D-galacturônico, mensurada através de método cromatográfico, durante a hidrólise enzimática de dispersões de pectina extraída de laranja e de pectina comercial.

**6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL**, de acordo com as reivindicações 1 e 4, com a redução da viscosidade complexa que pode ser utilizada para previsão da produção de ácido D-galacturônico, um produto de interesse industrial, obtido por hidrólise enzimática de amostras de pectina extraída de laranja e de pectina comercial, mas não limitado a esta fonte de pectina.

## FIGURAS

Figura 1



**RESUMO****DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL**

A presente patente de invenção (PI) refere-se à elaboração de um método para quantificação de atividade pectinolítica em dispersões de pectina cítrica, principalmente extraída do bagaço de laranja, mas que pode ser aplicado para pectinas cítricas em geral. Para esta finalidade, definiu-se um método para o monitoramento da redução da viscosidade complexa nas dispersões durante a hidrólise da pectina, em tempo real, pela ação de pectinases, utilizando um reômetro rotacional. A queda da viscosidade complexa foi equiparada com a liberação de ácido D-galacturônico, principal monômero da estrutura da pectina e produto da hidrólise por pectinases. A utilização da reologia como ferramenta para monitorar a atividade enzimática em tempo real pode trazer benefícios para a indústria por possibilitar o monitoramento da atividade enzimática em tempo real e apresentar o resultado imediato da análise.